

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

***Escherichia coli* ATCC 8739 laboratoorne evolutsioon antimikroobsetel metallpindadel**

Magistritöö

30 EAP

Sandra Park

Juhendajad: teadur Merilin Rosenberg, PhD

professor Angela Ivask, PhD

TARTU 2024

## INFOLEHT

### ***Escherichia coli* ATCC 8739 laboratoorne evolutsioon antimikroobsetel metallpindadel**

Antimikroobseid pinnamaterjale kasutatakse patogeensete bakterite leviku vähendamiseks puutepindade kaudu, kuid nende kroonilist mõju pinnal ellu jäänud bakterite antimikroobsete ainete tundlikkuse muutustele on vähe uuritud. Käesolevas magistritöös disainiti ja viidi läbi laborievolutsiooni katsed antimikroobsetel hõbe- ja vaskpindadel reaalelulähedastes ekspositsioonitingimustes ning iseloomustati muutusi evolutsioneerunud populatsioonide fenotüübis ja genotüübis. Fenotüübilised muutused metallitundlikkuses sõltusid tugevasti ekspositsioonikeskkonnast andmata eelist klassikalistes tundlikkuse testides. Mutatsioonianalüüsist selgusid küll potentsiaalsed passiivsed kaitsemehhanismid metallide sidumise või rakku pääsemise takistamise kaudu, kuid ei leitud muutusi teadaolevates aktiivselt metallitolerantsust või antibiootikumide ristresistentsust põhjustavates geenides, sh väljavoolupumpades. Seega ei leidnud kinnitust, et hõbedast ja vasest puutepindade kasutamine võiks oluliselt tõsta antimikroobsete ainete sh antibiootikumide ja metallide ristresistentsuse tekkeriski.

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; B220 Geneetika, tsütogeneetika; T150 Materjalitehnoloogia

Märksõnad: *Escherichia coli*, laboratoorne evolutsioon, vask, hõbe, antimikroobsed pinnad

### **Laboratory evolution of *Escherichia coli* ATCC 8739 on antimicrobial metal surfaces**

Antimicrobial surface materials aim to reduce the spread of pathogenic bacteria via touch surfaces, yet their long-term impact on bacterial sensitivity to antimicrobial agents remains underexplored. This master's thesis involved laboratory evolution experiments on antimicrobial silver and copper surfaces in application-relevant conditions, analyzing phenotypic and genotypic changes in evolved populations. Phenotypic changes in metal sensitivity were highly dependent on the exposure environment, showing no advantage in standard sensitivity tests. Mutation analysis found potential passive defense mechanisms but found no changes in known genes involved in significantly increased metal and antibiotic cross-resistance. Thus, increased risk of cross-resistance to antimicrobials, including metals and antibiotics in response to silver and copper surfaces was not confirmed.

CERCS codes B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; B220 Genetics, cytogenetics; T150 Material technology.

Keywords: *Escherichia coli*, laboratory evolution, copper, silver, antimicrobial surfaces

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	6
SISSEJUHATUS.....	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Antimikroobsete pindade efektiivsus .....	8
1.2 Bakteriaalsed kaitsemehhanismid vase ja hõbeda liia vastu .....	9
1.3 Vase ja hõbeda ekspositsiooni potentsiaalsed riskid .....	10
1.4 Laboratoorne evolutsioon antimikroobsete metallipindade juuresolekul.....	11
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	14
2.1 Töö eesmärgid .....	14
2.2 Materjal ja metoodika.....	14
2.2.1 Kasutatud tüved, söötmed, lahused .....	14
2.2.2 Kasutatud pinnad, pindade ettevalmistus ja puhastamine .....	15
2.2.3 Pinnaekspositsiooni katsete tingimused .....	16
2.2.4 Populatsioonide ja valitud mutantide pinnatundlikkuse hindamine .....	19
2.2.5 DNA eraldamine ja sekveneerimine.....	19
2.2.6 Mutatsioonianalüüs.....	19
2.2.7 Practionite disain mutantide isoleerimiseks ja konstrueerimiseks, PCR .....	20
2.2.8 Mutantide konstrueerimine.....	22
2.2.9 Mutantide isoleerimine evolutsioneerunud populatsioonidest ja isolaatide kontrollimine .....	23
2.2.10 Biofilmi biomassi määramine kristallvioleti meetodil .....	24
2.2.11 Ujumisliikuvuse iseloomustamine.....	25
2.2.12 Kasutatud andmebaasid .....	25

2.2.13	Statistika .....	25
2.3	Tulemused ja arutelu .....	26
2.3.1	Evolutsioonikatsete disain .....	26
2.3.2	Evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonianalüüs .....	30
2.3.2.1	Akumuleerunud mutatsioonide arv .....	30
2.3.2.2	Uued DNA liited.....	32
2.3.2.3	Punktmutatsioonid hõbeda ja vase pindadel evolutsioneerunud populatsioonides.....	35
2.3.3	Mutantide konstrueerimine ja isoleerimine .....	39
2.3.3.1	Ühe lookuse mutantide konstrueerimine .....	39
2.3.3.2	Mutantide isoleerimine .....	39
2.3.4	Evolutsioneerunud populatsioonide ja mutantide kirjeldamine .....	41
2.3.4.1	Evolutsioneerunud populatsioonide tundlikkus hõbeda- ja vasepindadele ..	41
2.3.4.2	Mutantide tundlikkus hõbeda- ja vasepindadele .....	43
2.3.4.3	Evolutsioneerunud populatsioonide ujumisliikuvus.....	44
2.3.4.4	Biofilmi moodustamise võime .....	47
	KOKKUVÕTE .....	49
	RESÜMEE/SUMMARY .....	50
	TÄNUSÕNAD .....	52
	KIRJANDUSE LOETELU.....	53
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	63
	LISAD .....	64
	Lisa 1. Mutantide konstrueerimiseks disainitud praimerid .....	64
	Lisa 2. Huvipakkuvad mutatsioonid .....	67
	Lisa 3. Kontrollpindadel esinevad mutatsioonid .....	68
	Lisa 4 Mutantide MBC katse.....	70
	Lisa 5 Ujumisliikumise taastumine .....	72



## KASUTATUD LÜHENDID

AgNP – hõbeda nanoosakesed (NP *nanoparticles*)

Amp – ampitsilliin

H – hõbe

K – klaas

Km - kanamütsiin

KV – kuiv ja orgaanikavaene

NB – toitepuljong (*nutrient broth*)

NR – niiske ja orgaanikarikas

RH – suhteline õhuniisikus (*relative humidity*)

SL – orgaaniline saastelahus (*soil load*)

SNV – *single nucleotide variant*

T – roostevaba teras

V – vask

## SISSEJUHATUS

Antimikroobseid pinnamaterjale kasutatakse täiendava passiivselt toimiva lahendusena potentsiaalsete patogeenide ja multiresistentsete bakterite leviku piiramiseks puutepindadel puhastustsüklite vahel. Sellistest materjalidest levinuimate, vase ja hõbeda, antimikroobseid omadusi on inimkond erinevatel eesmärkidel rakendanud sadu aastaid. Peamiselt võiks antimikroobsed pinnad kasu tuua eelkõige kohtades, kus potentsiaalsete patogeenide leviku risk on kõrge, näiteks tervishoiuasutustes, toiduainetööstuses, ühistranspordis jms. On teada, et pinna efektiivsus sõltub suurel määral nii orgaanilisest saastusest, õhuniiskusest kui ka bakterisuspensiooni kuivamise kiirusest ning ka kõrge efektiivsusega antimikroobsetel pindadel jääb baktereid ellu. Ellujääjad võivad soodsamates tingimustes paljuneda ja muutuda korduval kokkupuutel antimikroobsete metallpindadega evolutsiooni tulemusena nende pindade toimele vähem tundlikuks. Vase ja hõbeda ioonidele vähem tundlikud bakterid võivad kirjanduse põhjal omandada ristresistentse antibiootikumidele samade molekulaarsete mehhanismide kaudu.

Kasutades antimikroobseid pinnamaterjale, sh hõbeda- ja vasespõhiseid pindu, praktilistes rakendustes on oluline hinnata nende kasutamisest tulenevaid riske kasutustingimustele võimalikult lähedastes tingimustes, sh nii võimalikku tundlikkuse vähenemist konkreetse pinnamaterjali toimele kui ka antibiootikumiresistentsete bakterite leviku võimalikku soodustamist ristresistentse tekkimise läbi.

Genotüüpilisi ja fenotüüpilisi muutusi kokkupuutel raskemetallidega, sh hõbeda ja vasega, on uuritud eksponeerides baktereid metallioonidele või nanoosakestele vedelikukeskkonnas. Andmeid leiab ka keskkonnastressorite (nt. osmootse šoki, kuivamise) mõju kohta eraldi, aga antimikroobsed puutepinnad erinevad söötmepehkest laborimetoodikatest selle poolest, et bakterid on samaaegselt eksponeeritud antimikroobsetele metallidele ja mitmetele keskkonnastressoritele. Hiljuti on publitseeritud kaks vastuoluliste ja raskesti üldistatavate tulemustega laborievolutsiooni katset vasespõhistel pindadel. Bakterite kohastumist korduvale kokkupuutele hõbedapindadega reaalelulähedastes tingimustes ei ole uuritud.

Käesoleva magistr töö eesmärk oli uurida vase ja hõbepindade korduva ekspositsiooni mõju *Escherichia coli* ATCC 8739 tüvele reaalelulähedastes keskkonnatingimustes, analüüsida laborievolutsiooni katsete jooksul akumulunud mutatsioone, iseloomustada evolutsioneerunud populatsioonide tundlikkuse muutust antimikroobsetele metallpindadele ning isoleerida ja iseloomustada huvipakkuvaid mutatsioone kandvaid mutante.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Antimikroobsete pindade efektiivsus

Antimikroobsete pindade rakendamise põhiline eesmärk on piirata potentsiaalselt patogeensete bakterite levikut puhastamistsüklite vahel. Pindade antimikroobne efekt võib tuleneda bakterite kinnitumist takistavatest omadustest, kontakt-tapmisest, biotsiidi vabanemisest pinnalt, fotokatalüütilise aktiivuse tõttu jt (Sjollema et al., 2018). Selles töös keskendutakse vase- ja hõbedapindadele, mille peamiseks toimetehhanismiks peetakse metalliioonide vabanemist pinnalt (Molteni et al., 2010). Seega võiks suurem ellujäämispotentsiaal olla bakteritel, mis suudavad metalliioone detoksifitseerida (S. Liu & Zhang, 2016).

Antimikroobse pinna praktiliseks rakendamiseks on vaja hinnata selle efektiivsust. Efektiivsuse hindamiseks on kasutusel mitmeid meetodeid. Näiteks 1) suspensioonimeetodite puhul uputatakse pind bakterisuspensiooni ning hinnatakse ekspositsioonijärgselt elusrakkude arvukust; 2) diffusioonitestid võimaldavad hinnata pinnalt vabanenud antimikroobse aine põhjustatud bakterite kasvuinhibitsiooni antimikroobse pinna vahetus läheduses; 3) pinnale pipeteeritud bakterisuspensiooni katmine kilega, võimaldamaks bakterite otsekontakt pinnaga (Sjollema et al., 2018). Enim kasutatud ISO 22196 (ISO, 2011) standardmeetodi puhul pipeteeritakse bakterisuspensioon pinnale ning kaetakse kilega tagamaks bakterirakkude otsekontakt pinnaga ning inkubeeritakse küllastunud õhuniiskuse tingimustes 37° C juures 24 tundi. Ükski eelkirjeldatud meetoditest ei võimalda antimikroobse pinna efektiivsust hinnata reaalelulähedastes kasutustingimustes. Seetõttu töötati meie laboris välja antimikroobse pinna efektiivsuse hindamisemethodika (Kaur et al., 2024), mis võimaldab pindade efektiivsust testida erinevates puutepindade rakendustes esinevates keskkonnatingimustes. Kaur et al. tulemustest nähtub, et antimikroobse pinna efektiivsus sõltub nii testkeskkonna õhuniiskusest, orgaanikaga saastusest kui ka bakterisuspensiooni tilga kuivamise kiirusest. Märkimisväärne on, et metallipõhiste antimikroobsete pindade efektiivsus on suurim 90% suhtelises õhuniiskuses ja orgaanikavaestes tingimustes ning 20% õhuniiskuses ja orgaanilise saastuse korral kaotavad pinnad efektiivsuse pea täielikult. Puutepinna imitatsioonil kuivades tingimustes surid *E. coli* O157:H7 rakud vasepinna toimel membraani depolarisatsiooni tõttu, kuid depolarisatsiooni ei nähtud terase pinnal (Warnes et al., 2012). Loomulikult sõltub antimikroobse pinna efektiivsus ka antimikroobse aine sisaldusest. Gramnegatiivsete *Enterococcus faeciumi* kliiniliste isolaatide puhul näidati, et näiteks 89%, 95% ja 100% vasesisaldusega sulamid tapsid kõik bakterid 1 h möödudes, 70% ja 65% 2 h möödudes, (Warnes et al., 2010). *Escherichia coli* puhul näidati et 99% vask surmab kõik rakud 1 minutiga, ca 60% sisaldusega vase sulamid 5-15 minutiga (Santo et al., 2008).

## 1.2 Bakteriaalsed kaitsemehhanismid vase ja hõbeda liia vastu

Vaseioonid on bakterile vajalikud ja kuuluvad metalloensüümide koostisesse (Anraku & Gennis, 1987; Cooper et al., 1992), kuid vase liig on rakule toksiline (Rensing & Grass, 2003). Vaseioonid võivad esineda bakteris nii  $\text{Cu}^{+2}$  kui  $\text{Cu}^{+1}$  ioonina. Lisaks võivad nii  $\text{Cu}^{+1}$  (Macomber & Imlay, 2009) kui ka  $\text{Ag}^{+1}$  (H. Li & Xu, 2024) ioonid kahjustada Fe-S klastrit sisaldavaid dehüdrataase. Siiani ei ole üheselt selge, kuidas vask rakku pääseb (Giachino & Waldron, 2020), samas võivad monovalentsed ioonid läbida rakumembraani passiivselt või mitte spetsiifiliste transporterite kaudu (Outten et al., 2001). Valdav osa vaske on periplasmaatiline, kus tagatakse peamiselt ka vasehomöostaas (Giachino & Waldron, 2020). *E. coli* tüvedes esineb mitmeid vase homöostaasiga seotud süsteeme, nt *cus*, *cue*, *cop*, *pco*.

CueO periplasmaatiline oksüdaas, mis konverteerib  $\text{Cu}^{+1}$  vähem toksiliseks  $\text{Cu}^{+2}$  (Outten et al., 2001) ning võib kaitsta ensüüme vase toksilisuse eest polüfenooli komplekside tootmise abil (Grass & Rensing, 2001). CopA on P-tüüpi ATPaas, mis eemaldab rakust tsütosoolset vaske (Fan et al., 2001). *CueR* on transpertsiooni regulaator, mis kontrollib tsütosoolse vase hulka rakus (Outten et al., 2000). *CueRi* ekspressiooni aktiveerivad nii rakusisene  $\text{Cu}^{+1}$  kui  $\text{Ag}^{+1}$ , ning CueR aktiveerib oma korda nii CueO kui CopA (Outten et al., 2000). *CopA*, *cusCFBA* ja *cueO* deletsiooniga *E. coli* rakkudel on täheldatud suurenenud tundlikkust vasepindadele (Santo et al., 2008). Lisaks subletaalse hõbedananoosakeste juuresolekul tehtud mutatsioonide akumulatsiooni katsest leiti hõbeda nanoosakeste resistentseid kolooniaid milles oli mutatsioone *cusS*, *cusR* ja *ompR* geenides (Wu et al., 2022). *CusCFBA* on vase ja hõbeda väljavoolusüsteem, mille transkriptsiooni initseeritakse vase ja hõbeda kontsentratsioonist sõltuvalt (Franke et al., 2003) kahekomponentse süsteemi CusRSi poolt (Munson et al., 2000). Reeglina on *E. colis* vase ja hõbeda tundlikkust vähendavad *sil* (Randall et al., 2015) ja *pco* (Rensing & Grass, 2003) lookused plasmiidset päritolu. *E. coli* ATCC 8739-s on aga nii kromosomaalne *sil* lookus (Blanco Massani et al., 2018), kui ka kromosomaalne *pco* lookus.

Kirjeldatud on ka kaudsemalt metalliooni homöostaasiga seotud mehhanisme metalliooni tolerantsi suurendamiseks. Kirjanduses on pakutud, et sulfidrüülrühmad aminohapetes ja teistes molekulides võivad aidata bakteritel metalle detoksifitseerida. *Pseudomonas stutzeri* puhul on täheldatud, et hõbedatolerantsetes rakkudes olid kogunenud  $\text{AgSi}$  kompleksid, mis võis tekkida divesiniksulfiidi ja hõbeda reaktsiooni tõttu (Slawson et al., 1992, 1994). Analoogset raskemetalli biosaadavuse vähendamist komplekseerimise läbi on näidatud ka *Klebsiella aerogenes*el, mis moodustab kaadmiumi toksilisuse vähendamiseks rakus kaadmiumsulfiidi (Aiking et al., 1982). Ka *E. colis* võib divesiniksulfiid ja tioolkompleksid omada rolli mitmesuguste raskemetallide sidumises (Essa et al., 2018). *E. colis* divesiniksulfiidi

tootvaid ensüüme kodeerivad geenid *tnaA*, *metC*, *cysK*, *cysM*, *maly*, mille hulgast on TnaA puhul näidatud peamist rolli divesiniksulfiidi tootmisel (Awano et al., 2005). AgS kompleksid vähendavad hõbeda biosaadavust, kuid ei elimineeri täielikult hõbeda toksilisust. Katses, kus baktereid eksponeeriti väävliga kaetud hõbeda nanoosakestele (AgNP), täheldati kroonilise ekspositsiooni korral toksilisust (M. Li et al., 2019). Ka mittespetsiifilised poriinid võivad osaleda metallitolerantsuses. Näiteks AgNP-de puhul on näidatud, et *ompC* on tolerantsiks vajalik (Radzig et al., 2013), samas on näidatud ka vastupidist. Poriinide OmpF või OmpC puudumine ei mõjutanud *E.coli* vase ja hõbeda tundlikkust (X. Z. Li et al., 1997).

### 1.3 Vase ja hõbeda ekspositsiooni potentsiaalsed riskid

Antimikroobsete pindade ja ainete kasutamisel peetakse potentsiaalseteks ohtudeks antibiootikumitundlikkust vähendavat kaasregulatsiooni, kaasresistentsust ja ristresistentsust (Baker-Austin et al., 2006; Murray et al., 2024). Ristresistentsus on olukord, kus sama geneetilise muutuse tagajärjel muutub bakter vähem tundlikuks mitte ainult selektsiooni põhjustanud antimikroobsele ainele vaid ka mõne teise biotsiidi või antibiootikumi suhtes. Kaasregulatsiooni puhul põhjustavad metalliioonid füsioloogilisi muutusi (näiteks aktiveerivad väljavoolupumpasid), mis samaaegselt vähendab ka antibiootikumitundlikkust. Ilma genoomi sekveneerimise või mõne muu lisa testita võib olla neil keeruline vahet teha. Kaasresistentsusest räägitakse juhul, kui geneetilises elemendis, eelkõige plasmiidis, on korruga nii antibiootikumi kui mõne muu antibakteriaalse ühendi tolerantsi või resistentsust tagavad lookused.

Korduval subletaalse CuSO<sub>4</sub> kontsentratsioonile eksponeeritud bakterite puhul tekkis rohkem polümüksiin B ja klooramfenikooli *de novo* spontaanseid mutante kui metsiktüübis ning CuSO<sub>4</sub> eksponeeritud populatsioonid olid resistentsemad tsiprofloksatsiinile (16x MIC), aga ka tetratsükliinile (3x MIC) ja kloorampfenikoolile (3x MIC) (J. Li et al., 2021). Varasemalt on kirjeldatud ka vastupidist nähtust, kus subinhibitoorse CuSO<sub>4</sub> kontsentratsiooni juures söötmes evolutsioneerunud populatsiooni vaseiooni tundlikkus vähenes, kuid tundlikkus antibiootikumidele (klooramfenikool ja bakitratsiin) eellasega võrreldes hoopis suurenes (Boyd et al., 2022). Seega võib ristresistentuse või kaasregulatsiooni esile kerkimine oleneda ka evolutsiooniks kasutatud antimikroobse aine kontsentratsioonist, mitte ainult konkreetsest antimikroobsest ühendist.

Laborievolutsioonikatses, kus uuriti paralleelsel AgNP, AgNO<sub>3</sub> ja gentamütsiini juuresolekul vedelas keskkonnas *Pseudomonas aeruginosa* evolutsiooni, näidati, et 30 päevase evolutsiooni tulemusena 107 korda tõusnud gentamütsiini MIC vs AgNP, AgNO<sub>3</sub> puhul vaid 3x tõusnud MIC (Mann et al., 2021). Lisaks demonstreeriti, et järjest suureneva kontsentratsiooniga AgNP,

AgNO<sub>3</sub> ekspositsiooni tulemusena tekkis püsiv persistente fenotüüp ning näidati, et evolutsioneerunud gentamüsiini resistentne populatsioon oli võrreldes metsiktüübiga tundlikum AgNP ja AgNO<sub>3</sub> suhtes, mis näitab, et ristresistentsust või kaasregulatsiooni ei tekkinud.

Biotsiiditolerantsuse suurenemine võib kaasa tuua lõivsuhteid teistes omadustes. Evolutsiooni tulemusena AgNP juuresolekul suurenes *E. coli* tolerantne hõbeda nanoosakestele, kuid esines kasvudefekte LB vedelsöötmes (Alhajjar et al., 2022).

Lisaks muutustele antimikroobsete ainete tundlikkuses võib ohuks olla ka virulentsuse suurenemine metalliooni ekspositsiooni tõttu. *P. aeruginosa* puhul on nähtud, et peale CuSO<sub>4</sub> ekspositsiooni tõuseb siderofoori püoverdiini tootmine, mis suurendab virulentsust (Lear et al., 2022). Huvitav on ka töö, kus leiti et 12 aastat haigla vasktorustikus evolutsioneerunud nakkuspuhanguid põhjustanud *P. aeruginosa* isolaadid kandsid 37 kb pikkust genoomset saart, mis tagas vasetolerantsuse ning oli ka multiresistentne antibiootikumidele (Petitjean et al., 2021). See illustreerib seda, et pikaajalise evolutsiooni toimetel keskkonnas, kus on mitmete patogeensete bakterite levik suur, võib toimuda horisontaalne geeniülekanne. Samas töös toodi välja, et vasetolerantne *P. aeruginosa* tekitab mitmeid nakkuspuhanguid ning bakterigenoomi oli lisaks akumulatsioon mutatsioone aminohappemetabolismis, lipopolüsahhariidi biosünteesis ja antibiootikumiresistentsuses. *Enterobacter cloacae* tüve E\_clo\_Niagara puhul on aga näidatud, et CuSO<sub>4</sub> surub tsiprofloksatsiini poolt indutseeritud hüpermutaatori teket alla (Crane et al., 2018).

Värske ülevaateartikkel pakub välja, et baktereid võiks proovida „meelitada“ antimikroobseid ühendeid rakku sisse transportima, et inhibeerida väljavoolupumpade tööd ja eemaldada rakuväliseid barjääre (H. Li & Xu, 2024).

#### **1.4 Laboratoorne evolutsioon antimikroobsete metallide juuresolekul**

Laborievolutsiooni katsed võimaldavad uurida bakterite potentsiaalset geneetilist adaptatsiooni ja füsioloogilist kohastumust selektiivse tingimuse toimetel. Vedelkultuuridel põhinevad laborievolutsiooni põhimetoodikad saab jagada kolmeks: (I) mutatsiooniakumulatsiooni katsed, mida iseloomustavad kitsad pudelikaelad selektsioonitsükklites; (II) kemostaadikatsed, kus populatsiooni suurus on konstantne ja (III) vedelkultuuride seeriad (*batch culture*), mille puhul külvatakse igas tsüklis edasi fraktsioon eelmise tsükli kultuurist (McDonald, 2019). Vedelkultuuri katseformaad on reeglina tehniliselt lihtne ja võimalik ülal pidada ka pikaajaliselt. Näiteks Lenski 1988 aastal alustatud evolutsioonikatse *E. coli*ga, kus igapäevaselt pipeteeriti eelmise päeva bakterikultuurist 1% värskesse söötmesse 37 °C juures kasvatades (Lenski,

2017). Ka antimikroobsete metallisoolade mõju uurimisel on enamasti kasutatud vedelkultuuripõhiseid katseid. Metallisoolasid on laborievolutsiooni katsetes kasutatud muutumatus või kasvavas kontsentratsioonis. Osaliselt mutatsioonide tekkimise juhuslikkuse tõttu ning ka erinevatest keskkonnatingimustest tulenevalt ei ole selliste evolutsioonikatsete tulemused üheselt tõlgendatavad. Tihti leitakse vastusena metallisooladele või nanoosakesele mutatsioone väljavoolupumpadega seotud geenides (nt Graves et al., 2015; X. Z. Li et al., 1997; Wu et al., 2022). Bakterite evolutsiooni antimikroobsetel metallpindadel on seni vähe uuritud. Teadaolevalt on publitseeritud kaks laborievolutsiooni katset vasepõhistel pindadel (Bleichert et al., 2020; F. Xu et al., 2022). Ülevaatic võrdlus katsetest on toodud tabelis 1. Bakterite evolutsioonikatsetes (pool)kuival pinnal erinevad vedelkultuuris tehtavatest laboratoorsetest evolutsioonikatsetest, sest esinevad stressifaktorid nagu osmootse rõhu muutused ja kuivamine (Santo et al., 2008). Senised pindadel käbi viidud laboratoorse evolutsiooni katsed erinevad nii meetoodika kui tulemuste poolest. Xu *et al.* kasutasid selektsioonisurvena järjestikku kahte erineva vasesisaldusega pinda (messing ja vask), samas kui Bleichert *et al.* suurendasid selektsioonisurvet pikendades ekspositsiooni aega vase (Cu 99,9%) pinnal. Xu *et al.* valik kasutada negatiivse kontrollina mitte inertset pinda, vaid vedelkultuuri on küsitav, kuna see ei kajasta keskkonnatingimuste mõju ja ei võimalda eristada pinnaformaadi efekti vaskpinna efektist. Vastuolulised on ka Xu *et al.* katse evolutsioneerunud populatsioonide spontaansete mutatsioonide tekkesageduste tulemused, mis tuvastasid, et nii söötmes passeeritud kontrolliinides kui ka vasele eksponeeritud populatsioonides oli spontaansete mutatsioonide tekkesagedus oluliselt kõrgem kui metsiktüübis. See viitab, et evolutsioonikatset võidi alustada hüpermutaatori genotüübiga bakteriga. Bleichert *et al.*, katses leiti vasele eksponeeritud populatsioonides jällegi äärmiselt vähe mutatsioone. Akumuleerunud mutatsioonide hulga erinevus võib olla tingitud ka erinevast ekspositsioonitsükli arvust, kuna enamate ekspositsioonitsükli jooksul jõuab ka rohkem mutatsioone akumuleeruda.

**Tabel 1.** Kahe seni publitseeritud vase pinnal läbi viidud laborievolutsiooni katse katsetingimused

Võrreldav tunnus	Bleichert <i>et al.</i> , 2020	Xu <i>et al.</i> , 2022
<b>Kasutatud bakteritüved</b>	<i>E. coli</i> K-12 (W3110); <i>S. aureus</i> N315	<i>P. fluorescens</i> SBW25- <i>lacZ</i>
<b>Testpind</b>	Vask (99,9% Cu)	Messing (63,5% Cu, 36,5% Zn) ja vask (99,9% Cu)
<b>Inokulum ja inokuleerimise viis</b>	Üleöökuultuuri suspensioon PBSis, 10 <sup>8</sup> rakku pinna kohta; 40 µl baktersuspensiooniga immutatud vatitikuga hõõrutud pinnale 3 korda	Deioniseeritud vees kontsentreeritud üleöökuultuur, rakuarvukust ei ole täpsusatud; üks 20 µl tilk pipeteeritud pinnale.
<b>Ekspositsioonikeskkonna tingimused ja ekspositsiooni kestus</b>	Ei ole välja toodud; 30 sek → 60 min <i>E. coli</i> 3 min → 60 min <i>S. aureus</i>	20° C, niiskes Petri tassis niiskuse säilitamiseks; 60 min
<b>Kasvatamine evolutsioonitsüklite vahel</b>	Vahetult peale ekspositsiooni tardsöötmele, üleskasvanud kolooniatest külvati mõne koloonia biomass edasi tardsöötmele ja kasvatati üleöö	Vedelsöötmes
<b>Ekspositsioonitsüklite arv</b>	41 tsüklit <i>E. coli</i> 38 tsüklit <i>S. aureus</i>	200 tsüklit messingul → 120 tsüklit vasel.
<b>Kontroll(pind)</b>	Inkubatsioon roostevabal terasel	Vedelkuultuuri passaažid
<b>Tuvastatud mutatsioonide lävisagedus populatsioonides</b>	Fikseerunud mutatsioonid	Alates sagedusega 50%
<b>Tuvastatud mutatsioonide arv</b>	4 punktmutatsiooni, 1 IS elemendi insertiooni <i>E. colis</i> ; <i>S. aureuses</i> 2 punktmutatsiooni	Vasepopulatsioonides keskmiselt 540 punktmutatsiooni, kontrollides 71 punktmutatsiooni
<b>Tundlikkuse muutus vasepinnale</b>	Bakterid talusid peale evolutsioonikatset vaske pikema ekspositsiooniaja jooksul	Bakterid talusid peale evolutsioonikatset kõrgema vasesisaldusega pinda
<b>Agari MIC (CuSO<sub>4</sub>)</b>	Ei muutunud võrreldes metsiktüübiga	MIC tõusis vähesel määral (7-15%) võrreldes metsiktüübiga
<b>Kasvudünaamika rikkas söötmes</b>	Kasvus ei olnud muutusi võrreldes eellasega	Vasele eksponeeritud bakteritel täheldati aeglasemat kasvu kui metsiktüübil.

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Lähtuvalt meie uurimisgrupi varasema töö tulemustest, mis näitavad, et antimikroobsete metallpindade efektiivsus oleneb suurel määral ekspositsioonikeskkonna tingimustest ja kuivades tingimustes kasutatavate pindade efektiivsus ei ole tuletatav klassikalise mikrobioloogia vedelkultuuridel põhinevate meetoditega, püstitasime hüpoteesi: Bakteriaalsete kaitsemehhanismide kohastumine (pool)kuivadel antimikroobsetel metallpindadel oleneb keskkonnas leiduvatest ressurssidest ja lisastressoritest.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli:

- 1) Disainida laboratoorse evolutsiooni katsete eksperimentaalne formaat hindamaks antimikroobsete hõbe- ja vaskpindade korduva subletaalse ekspositsiooni mõju *E. coli* erinevates rakendusspetsiifilistes (pool)kuivades tingimustes. Täpsustada katsetingimusi pilootkatsetega, et tagada testformaadi toimivus ja eesmärgipärasus.
- 2) Analüüsida hõbeda ja vase pinnal evolutsioneerunud populatsioonides akumulunud mutatsioone antimikroobse tundlikkuse kontekstis.
- 3) Isoleerida ja/või konstrueerida huvipakkuvaid genoomseid muutusi kandvaid mutante neist tulenevate võimalike kaitsemehhanismide paremaks hindamiseks erinevates testkeskkondades.
- 4) Iseloomustada muutusi evolutsioneerunud populatsioonide ja valitud mutantide tundlikkuses hõbe- ja vaskpindadele, ujumisliikumises ja biofilmi moodustamise võimes.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud tüved, söötmed, lahused

Evolutsioonikatsetes kasutati antimikroobsete pindade testides kasutatavat mudeltüve (ISO, 2011) *Escherichia coli* ATCC 8739, (sün. DSM1576, Crooks'i tüvi), mis telliti DSMZist (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Saksamaa). Mutantide konstrueerimisel plasmiidi paljundamiseks *E. coli* CC118  $\lambda$  pir tüve (saadud Heili Ilveselt).

Kõik töös kasutatud söötmed ja lahused valmistati deioniseeritud või destilleeritud veega ja steriliseeriti autoklaavimise või filtreerimise teel. Bakterikultuuridega töötati aseptilistes tingimustes töötavas bioohutuskapis.

**Tabel 2.** Kasutatud söötmed ja lahused

Sööde/lahus	Komponendid
<b>LB vedelsööde</b>	Trüptoon 10g/L, pärmiekstrakt 5g/L, NaCl 5g/L
<b>LB tardsööde</b>	LB vedelsööde, agar 15 g/L
<b>LB ujumissööde</b>	LB vedelsööde, agar 3 g/L, 0,05g/L TTC
<b>Selektiivne LB tardsööde</b>	LB tardsööde + kanamütsiin (Km) 50 µg/ml või + ampitsilliin (Amp 100 µg/ml) või Km 50 µg/ml+ Amp 100 µg/ml
<b>Toksilisust neutraliseeriv sööde (<i>soy casein digest broth with lecithin and polysorbate</i>, SCDLP (ISO, 2011))</b>	Letsitiin 1g/L, kaseiinpepton 17 g/L, sojapepton 3 g/L NaCl 5 g/L, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5 g/L, glükoos 2,5 g/L, TWEEN® 80 7 g/L
<b>500x lahjendatud toitepuljong (1:500 <i>nutrient broth</i>, NB (ISO, 2011))</b>	Lihaekstrakt 0,006 g/L , pepton 0,02 g/L, 0,01 g/L NaCl
<b>Orgaaniline saastelahus (<i>soil load</i>, SL) (EPA, 2022)</b>	Veise seerumalbumiin 2,5 g/L, pärmiekstrakt 3,5 g/L, mutsiin 0,8 g/L , NaCl 6,4 g/L , KCl 0,16 g/L, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,152 g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,16 g/L;
<b>Fosfaatpuhver (PBS)</b>	NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,44 g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g/L; pH 7.1

### 2.2.2 Kasutatud pinnad, pindade ettevalmistus ja puhastamine

Ekspositsioonis kasutati antimikroobsete omadustega hõbeda (99.95% Ag, Surepure Chemetals, USA) ja vase (99% Cu, Metroprint OÜ, Eesti) 20 mm diameetriga kuponge (edaspidi pinnad). Kontrollpindadena kasutati roostevaba lehtterase 20 mm diameetriga kuponge (lisaks Fe-le : 18% Cr, 8% Ni, 1.4% Mn; 2B viimistlus; Aperam-Stainless, France) ning borosilikaatklaasist 18 mm x 18 mm katteklase (Corning® 2855-18, Corning Inc., USA). Roostevaba terast kasutati, sest sarnaselt vasele ja hõbedale on tegemist metallilise pinnaga, kust võib eralduda metalliioone, kuid sellel pole märkimisväärset antimikroobset aktiivsust.

Lisaks on teras puutepindadena laialdaselt kasutuses. Bioloogiliselt inertse kontrollina asutati borosilikaatklaasist katteklase.

Metallpindu taaskasutati evolutsioonikatsete ekspositsioonitsükklites. Puhastamiseks töödeldi pindu ekspositsioonitsükklite vahel 5% sidrunhappes, atsetoonis ja 70% EtOH järgmiselt: esmalt asetati pinnad sidrunhapet ja klaaskuule sisaldavasse tsentrifuugi tuubi, raputati 2 min, misjärel sonikeeriti 15 min, raputati uuesti 2 minutit ja pinnad loputati destilleeritud vees. Sama protsessi korrati ka atsetooni ja 70% EtOH-ga. Pärast 70% EtOH-ga pesuetappi kuivatati kupongid steriilsetes tingimustes bioohutuskapis. Kuivad kupongid koguti pinnatüübi järgi steriilsetesse Petri tassidesse ja hoiustati kasutamiseni. Ekspositsioonijärgselt inaktiveeriti metallkupongid 70% EtOH-s vähemalt 15 min, puhastati eelkirjeldatud viisil ja seejärel taaskasutati.

Katsetes, kus baktereid eksponeeriti eelnevalt kasutamata vaskpindadele, raputati pindu 100% atsetoonis, loputati destilleeritud vees ning raputati 70% EtOH-s, kuivatati bioohutuskapis ning hoiustati steriilses Petri tassis.

Katteklaasid desinfitseeriti 70% EtOH-ga, kuivatati bioohutuskapis ning steriliseeriti UV-ga mõlemalt poolt 15 minutit. Kuivamise järgselt hoiustati katteklase steriilses Petri tassis kasutamiseni.

### **2.2.3 Pinnaekspositsiooni katsete tingimused**

Evolutsioonikatsetes ja bakterite antimikroobsete metallpindade tundlikkuse hindamisel kasvatati rakke kõigis etappides 37 °C juures LB tardsöötmele (tabel 2). Inokulumi rakuarvukus valiti nii, et sõltumata erinevustest inokulumi tilga suuruselt ja ekspositsioonisöötmetest eksponeeriti pinnale kõigis tingimustes sihtväärtusena  $8,13 \times 10^6$  CFU-d pinna kohta EN 13697:2015+A1:2019 (CEN, 2015) standardi „saastunud pinna“ tingimuse eeskujul. Inokulumi tilkade suurused ja ekspositsiooni keskkonnatingimused on valitud meie uurimisgrupis tehtud antimikroobsete pindade efektiivsuse hindamise katsete tulemuste põhjal (Kaur et al., 2024). Evolutsioonikatsetesse valiti kaks vastanduvat tingimuste kombinatsiooni. Niiske ja orgaanikarikas (NR) ekspositsioonikeskkond valiti jäljendamaks niiskes keskkonnas kehavedelike, toiduainete vms pritsmeid, mille puhul suudavad bakterid kontrollpindadel vähesel määral kasvada limiteeritud ressursside ja lisastressorite tõttu. Kuivad ja orgaanikavaesed (KV) ekspositsioonitingimused valiti jäljendamaks mikroobidega saastunud veepritsmeid, mille puhul kasvamine ekspositsioonitingimustes ei ole võimalik ja bakterid surevad keskkonnatingimuste tõttu ka kontrollpindadel.

Evolutsioonikatsed koosnesid kolmest osast: (I) inokulumi valmistamisest ja pindade inokuleerimisest, (II) bakterite eksponeerimisest pindadele kontrollitud keskkonnatingimustes

ning (III) bakterite eemaldamisest pindadelt ja kloonalsest kasvatamisest LB tardsöötmele spontaansete mutatsioonide akumulatsiooniks ning järgmise ekspositsioonitsükli inokulumi materjali ettekasvatuseks.

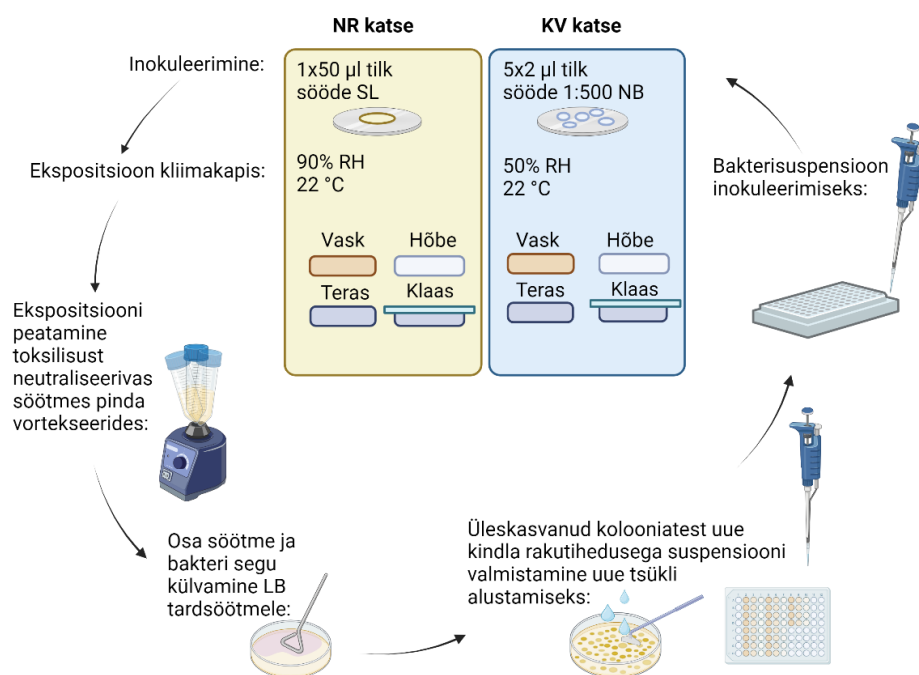
Inokulumi valmistamiseks inkubeeriti kultuuritasse 5 ml fosfaatpuhvriga (PBS, tabel 2) 15 min, suspendeeriti bakterite biomass tardsöötmele ja viidi steriilse deioniseeritud veega kahekordse soovitud rakuarvukuseni ning segati vahetult enne pindade inokuleerimist 1:1 suhtes kokku kahekordse kontsentratsiooniga saastelahusega (SL) või 250x lahjendatud toitapuljongiga (NB) (tabel 2). Evolutsioonikatsete paljude paralleelidega formaadist lähtuvalt hinnati inokulumi valmistamisel bakterisuspensiooni rakuarvukust spektrofotomeetriliselt (600 nm) 96 – kaevulises mikrotiiterplaadis kasutades plaadilugejat (Tecan Sunrise™ Basic, Tecan Austria, Austria). Bakterite ekspositsioon pindadele viidi läbi kliimakapis (Climacell EVO, Memmert, USA). Ekspositsiooniks kasutati evolutsioonikatsetes 6-kaevulisi suspensioonikultuuri plaate ja antimikroobse tundlikkuse hindamiseks kandilisi Petri tasse, mille põhja (KV tingimustes) või 3D prinditud steriilsele sõrestikule (NR tingimustes) asetati pinnad. Sõrestiku kasutamisel lisati sõrestiku alla niiskuse säilitamiseks steriilset deioniseeritud vett. Ekspositsioon peatati pindade asetamisega ühekaupa 10 ml toksilisust neutraliseerivasse söötmesse (SCDLP, tabel 2) ning vortekseeriti 30 sekundit maksimaalsel intensiivsusel rakkude pinnalt lahti pesemiseks. Saadud suspensioonist tehti 10-kordsete lahjenduste rida PBSis, millest külvati külvikuulidega 500 µl evolutsioonikatsetes või tilkkülvina 20 µl antimikroobse tundlikkuse hindamise katsetes LB tardsöötmele ning kasvatati 37 °C juures üleöö tundlikkuse katsetes või 40-50 h evolutsioonikatsetes. Evolutsioonikatsetes eelistati järgmise inokulumi valmistamiseks sellise lahjenduse kultuuritasse, mille puhul võimalikult suure kolooniate arvu juures ei olnud bakterite kasv tardsöötmele konfluentne.

Tabelis 3 on toodud ekspositsiooniajad, mida kasutati evolutsioonikatsete pilootkatses ning tumedalt toodud esile ajapunktid, mis valiti kasutamiseks evolutsioonikatsetes. Ajapunktid valiti selliselt, et orgaanikavaese kuiva keskkonna puhul sureks hõbeda ja vase pinnal 2 logaritmi bakteritest ning selekteeritaks ellu jäämist. Niiske orgaanikarikka keskkonna puhul valiti ajapunkt nii, et see võimaldaks vähest kasvu kontrollpinnal, aga ei vähendaks oluliselt elusarvukust hõbeda ja vase pinnal ning selekteeritaks kasvu.

**Tabel 3.** Kasutatud ekspositsiooniajad evolutsioonikatsete pilootkatsetes

	Vask	Hõbe	Teras	Klaas
Kuiv, orgaanikavaene (KV)	25 min, 1 h, 3 h	2 h, 4 h, 6 h	2 h, 6 h	2 h, 6 h
Niiske, orgaanikarikas (NR)	1 h, 3 h, 6 h, 24 h	6 h, 24 h	6 h, 24 h	6 h, 24 h

Evolutsioonikatsete igas tsükli kasvatatud rakkude suspensiooni säilitati lühiajaliselt -80 C juures 20% glütseroolis võimaldamaks kultuuride saastumisel või kõikide rakkude surma korral antimikroobsete pindade efektiivsuse varieeruvuse tõttu kasutada eelneva tsükli materjali katse jätkamiseks. 30. tsüklist pärit bakterisuspensioonid säilitati pikaajaliselt fenotüüpiliseks iseloomustamiseks. 30. tsükli bakterisuspensiooni alikvoodid säilitati lisaks ka -20°C juures DNA eralduseks. Täpsemad katsetingimused on skemaatiliselt esitatud joonisel 1. Evolutsioonikatse viidi eraldi läbi NR ja KV ekspositsioonitingimustes (joonis 1) Kummaski evolutsioonikatsetes eksponeeriti igale pinnatüübile 5 paralleelset liini (üksteisest sõltumatut kordust).



**Joonis 1.** Evolutsioonikatsete katseskeem.

#### **2.2.4 Populatsioonide ja valitud mutantide pinnatundlikkuse hindamine**

Muutusi vasel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonide vastavalt vase või hõbeda pinna tundlikkuses hinnati vastava evolutsioonikatse tingimustes. Muutusi valitud mutantide vase ja hõbeda pinna tundlikkuses hinnati üldjoontes samas testformaadis, aga veidi modifitseeritud tingimustes, mis juhul on muudetud parameetrid toodud välja vastavaid tulemusi kajastavatel joonistel. Pinnatundlikkuse katseid korraldati kolmes bioloogilises ja kahes tehnilises korduses (kokku vähemalt 6 andmepunkti ühe pinnatüübi kohta).

Populatsioonide pinnatundlikkuse testide puhul ilmnis tulemuste suur varieeruvus ja muutused tundlikkuses olid pigem väikesed. Et vähendada varieeruvust ja tuvastada suuremat muutust tundlikkuses testiti valitud mutante pikema ekspositsiooniajaga, kuid siiski evolutsioonikatse formaadis. Nii evolutsioneerunud populatsioonide kui huvipakkuvaid genoomseid muutusi kandvate mutantide pinnatundlikkuse hindamise eesmärgiks oli tuvastada, kas vask- ja hõbepindadele korduvalt eksponeeritud bakterid saavad neil pindadel paremini hakkama. NR tingimustes oodati muutust kasvus, KV tingimustes suremuses. Mutantide pinnatundlikkuse katseteks vaskpindadel oli eelnevalt tarvis otsustada, kas kasutada korduvalt pestud ja suurema aga ka varieeruvama antimikroobse toimega või uusi ja vähem varieeruva, aga evolutsioonikatsetes kasutatutest madalama antimikroobse toimega vaskpindu. Lisaks tuli võtta arvesse ventilatsiooni mõju bakterite elumusele bakterisuspensiooni kuivamise kiiruse tõttu, sest evolutsioonikatsetes viidi läbi 6-kaevulise suspensioonikultuuri plaadi kaevudes „suletud tingimustes“ samas kui mutantide pinnatundlikkust oli optimaalseim testida kandilise Petri tassi põhjas „avatud tingimustes“.

#### **2.2.5 DNA eraldamine ja sekveneerimine**

Genoomne DNA eraldati külmutatud rakkudest DNA eraldamise kitiga PureLink™ Microbiome DNA purification kit (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, USA). Täisgenoomsed järjestused telliti Novogene'ist (Novogene (UK) Company Limited, Ühendkuningriigid) Illumina NovaSeq 6000 platformil 150 bp pikkuste paarisotstega lugemitena,  $\sim 368 \pm 167x$  genoomse katvusega. Saadud lugemid deponeeriti European Nucleotide Archive'i (ENA) ning on vabalt kättesaadavad tunnuse (*accession*) PRJEB75034 alusel.

#### **2.2.6 Mutatsioonianalüüs**

Populatsioonide täisgenoomsete resekveneeritud DNA järjestuste joondamiseks referentsgenoomile (GenBank: CP000946.1) kasutati Breseq'i tööriista (*pipeline*) (Deatherage & Barrick, 2014). Breseq on välja töötatud haploidsete genoomide mutatsioonianalüüsiks ja

joondab lühikesi resekveneeritud nukleotiidijärjestusi referentsgenoomile. Evolutsioneerunud populatsioonide geneetilise heterogeensuse tõttu kasutati antud magistritöös Breseqi polümorfismi režiimis (*polymorfism mode*), et tuvastada populatsioonis mittefikseerunud mutatsioone, mis esinevad sagedusega vahemikus 5-100%. Analüüsiti nii punktmutatsioone (*single nucleotide variant, SNV*), kui kimäärsete järjestuste joondamisel referentsgenoomi erinevatesse piirkondadesse joonduvaid uusi liiteid (*new junctions*) DNA järjestustes. Uued liited märgivad genoomi struktuurseid ümberkorraldusi nagu deletsioone, insertioone, duplikatsioone, inversioone või mobiilsete elementide liikumist jne. Lühikeste 150 bp lugemite alusel on paljusid selliseid mutatsioone võimatu õigesti annoteerida, mistõttu on tulemustes esitatud objektiivsema parameetrina tuvastatud uute liidete arv.

Tulemustest eemaldati enne analüüsi mutatsioonid, mis:

- 1) olid võrreldes referentsjärjestusega tuvastatavad sekveneeritud eellastüve genoomis
- 2) olenevalt analüüsist alla sobiva piirmäära esinevad mutatsioonid (piirmäär esitatud vastava joonise või tabeli juures)
- 3) funktsionaalsel annotatsioonil sünonüümsed mutatsioonid ja lugemisraamidest allavoolu paiknevad mittekodeerivas alas asuvad mutatsioonid

Tuvastatud mutatsioonidest valiti välja suurema esinemissagedusega ja funktsionaalselt huvipakkuvamad, mida püüti reprodutseerida metsiktüüpi *E. coli* genoomis modifitseeritud Martínez-García ja de Lorenzo meetodil (Martínez-García & de Lorenzo, 2011), hindamaks mutatsioonide potentsiaalset kasu antimikroobse tundlikkuse kontekstis.

### **2.2.7 Praimerite disain mutantide isoleerimiseks ja konstrueerimiseks, PCR**

Mutantide konstrueerimiseks disainiti SnapGene® tarkvara (Dotmatics, saadaval [snapgene.com](http://snapgene.com)) abil praimerid, mille sulamistemperatuur jäi eelistatult vahemikku 53-58 °C. Kõik disainitud praimerid on toodud lisas 1, antud töös kasutatud praimerid on leitavad tabelis 4. Praimerid telliti Microsynth AG-lt.

**Tabel 4.** Töös kasutatud praimerid

<b>Praimer</b>	<b>Järjestus 5'→3'</b>	<b>Kasutuseesmärk</b>
<b>2715-22inF</b>	taccgccagagaggatcagaaaccaaagtggcg	Deletsioonmutandi konstrueerimiseks
<b>2715-22inR</b>	cgccactttggttctgtacctctctggcggtag	Deletsioonmutandi konstrueerimiseks
<b>2715-22outF</b>	cagtcaggatccccggctgacttcatgtttacg	Deletsioonmutandi konstrueerimiseks
<b>2715-22outR</b>	ctgacagaattcttgcaggtcagccatcg	Deletsioonmutandi konstrueerimiseks
<b>psnw2F</b>	gtaaacgacggccagt	Kontrollpraimerid plasmiidile pSNW2
<b>psnw2R</b>	acaggaaacagctatgacc	Kontrollpraimerid plasmiidile pSNW2
<b>psltsR</b>	ggttcttatggctcttgtatctatcag	Kontrollpraimerid plasmiidile pSLTS
<b>psltsF</b>	ggcgagttacgggttgta	Kontrollpraimerid plasmiidile pSLTS
<b>ydjNoutR</b>	cagtcagaattccccacagtctgctggc	Kontrollpraimerid <i>ydjN</i> geenile
<b>ydjNoutF</b>	cagtcaggatccggtagtgaattcggataagagg	Kontrollpraimerid <i>ydjN</i> geenile
<b>ydjNctrIF</b>	actgatttgcctaactgag	Kontrollpraimerid <i>ydjN</i> geeni katkestusele IS elemendi insertiooniga
<b>ydjNctrIR</b>	gaacatcgtggttctggtg	Kontrollpraimerid <i>ydjN</i> geeni katkestusele IS elemendi insertiooniga
<b>tnaAoutF</b>	ctgacaggatccgtgttgagtatatgttgcgcg	Kontrollpraimerid <i>tnaA</i> punktmutatsioonile
<b>tnaAoutR</b>	cagtcagaattcgtggcgcagagcaaac	Kontrollpraimerid <i>tnaA</i> punktmutatsioonile

PCRi jaoks kasutati diagnostilistel eesmärkidel Thermo Scientific™ DreamTaq DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, Leedu) ning kloonimisel ja sekveneerimisel Thermo

Scientific™ Phusion™ Hot Start II DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, Leedu). Ensüümide kasutamisel jälgiti tootjapoolset protokollit. Saadud PCRi produktide suurust ja olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil pingel 6,25 V/cm. Sangeri sekveneerimine telliti TÜ genoomika instituudi tuumiklaborist.

### 2.2.8 Mutantide konstrueerimine

Selleks, et uurida konkreetse geeni või lookuse mutatsiooni mõju *E. coli* ATCC 8739 hõbeda ja vase tundlikkusele, otsustati viia evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonianalüüsist leitud mutatsioonide hulgast huvipakkuvamaid üle 20 % esinemissagedusega mutatsioone (lisa 2) ühekaupa metsiktüübi kromosoomi.

Mutatsioonide sisseviimiseks *E. coli* kromosoomi kasutati gramnegatiivsetele bakteritele väljatöötatud armita (*scarless*) mutageneesi meetodit (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Meetod põhineb homoloogilisel rekombinatsioonil ja pärmist pärit järjestusspetsifilise I-Sce-I endonukleaasi abil huvipakkuva mutatsiooni kandva plasmidi kointegraadi väljalõikel kromosoomist. Lõike ja homoloogilise rekombinatsiooni tagajärel jääb genoomi 50% tõenäosusega mutantne ja 50% tõenäosusega metsiktüüpi järjestus. Martínez-García ja de Lorenzo armita meetodit eelistati, kuna bakteri kromosoomi sooviti viia nii deletsioone kui punktmutatsioone. Levinumat Datsenko ja Wanneril (Datsenko & Wanner, 2000) põhinevat *E. coli* genoomi modifitseerimise meetodit ei kasutatud, kuna see jätab deletsiooni puhul järjestusse armi ja ei võimalda kasutada selektsioonimarkerit punktmutatsioonide sisse viimisel.

Algse meetodi plasmidi pEMG asemel kasutati pEMG derivaati pSNW2 (Wirth et al., 2020) (saadud Rita Hõrakult) ning pSW-I asemel plasmidi pSLTS (Kim et al., 2014), mis telliti Addgene'ist (Addgene, USA, Massachusetts). Plasmid pSNW2 sisaldab lisaks multikloneerimissaidile, Km selektsioonimarkerile ja I-Sce-I lõikesaitidele ka roheline fluoreseruva valguga (GFP) geeni, mis aitab plasmidi kointegraate sisaldavaid ning selle kaotanud kolooniaid kergemini eristada. Anhydrotetratsükliiniga indutseeritavat I-Sce-I endonukleaasi kodeeriv plasmid pSLTS on temperatuuritundliku replikatsiooni originiga, mis võimaldab plasmidi lihtsamini populatsioonist eemaldada.

Mutatsiooni viimiseks kromosoomi amplifitseeriti *E. coli* ATCC 8739 genoomilt kaks DNA lõiku praimerite paaridega 2715-22inF ja 2715-22outR ning 2715-22inR ja 2715-22outF (vt tabel 4). Saadud lõigud ühendati õmbleva (*sewing*) PCRiga kasutades primereid 2715-22outR ja 2715-22outF.

PCRi produktide ja pSNW2 restriksiooniks kasutati FastDigest BamHI ja FastDigest EcoRI restriktase. Lõigatud plasmidi töödeldi aluselise fosfataasiga (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase). Ligatsiooniks kasutati T4 DNA ligaasi. Kõik eelmainitud ensüümid on toodetud Thermo Fisher Scientificu (Leedus) poolt ja reaktsioonid viidi läbi vastavalt tootjapoolsele juhisele.

Konstrueeritud plasmid elektroporeeriti konstruktiga plasmidi paljundamiseks *E. coli* CC118  $\lambda$  pir tüvesse (saadud Heili Ilveselt). Plasmid eraldati kultuurist kitiga FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Kit (Favorgene, järgides tootja poolset protokollit ning korrektse konstrukti esinemist kontrolliti PCRi ja Sangeri sekveneerimisega. Korrektse konstruktiga plasmid poreeriti *E. coli* ATCC 8739 tüvesse. Tardsöötmele selekteeriti helendavaid kolooniaid, mis näitab, et mutantset piirkonda kandev plasmid integreerus genoomi homologse rekombinatsiooni abil. Seejärel poreeriti kointegraati kandvasse bakterisse plasmid pSLTS. Elektroporatsiooni järgselt pipeteeriti rakud 500  $\mu$ l LB vedelsöötmesse (tabel 2), kuhu oli lisatud 200 ng/ml lõppkontentratsioonis anhidrotetratsükliini I-Sce-I endonukleaasi induktsiooniks. Rakke indutseeriti 1,5 h ja külvati LB+Amp tardsöötmele (tabel 2) ning kasvatati üleöö 30 °C juures, külvati edasi LB tardsöötmele (vt tabel 2) ja kasvatati 37 °C juures 2 passaaži, et eemaldada rakkudest temperatuuritundlik pSLTS plasmid. Kolooniaid kontrolliti nii kasvu järgi kanamütsiinil ja ampitsiliinil kui ka PCRiga. Mutandi kontrollimiseks amplitseeriti praimeritega 2715-22outR ja 2715-22outF (vt tabel 4) PCRi produkt ning sekveneeriti Sangeri meetodil.

Elektroporatsiooniks kompetentsete rakkude valmistamiseks kontsentreeriti eksponentsiaalse kasvufaasi rakke 100x ning pesti 3 korda külma 10% glütserooliga (tsentrifuugiti bakterid põhja (5000 g 10 min), eemaldati supernatant ja resuspendeeriti õrnalt). Elektroporatsioonil lisati 30  $\mu$ l rakkudele kas 1  $\mu$ l plasmidi või ligatsioonisegu. Elektroporatsiooniks kasutati 2 mm elektroporatsiooniküvette ja Gene Pulser Xcell™ Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA, Kalifornia) elektroporaatori tootjapoolset programmi „E. coli - 2mm - 2,5 kV“.

### **2.2.9 Mutantide isoleerimine evolutsioneerunud populatsioonidest ja isolaatide kontrollimine**

Alapeatükis 2.2.8 kirjeldatud meetod ühe oli uuritavas *E. coli* tüves ATCC 8739 ühe lookuse mutantide konstrueerimiseks madala efektiivsusega ning õnnestus konstrueerida vaid deletsioonmutant  $\Delta$ EcolC\_2715-2722 ( $\Delta$ 2715-2722), mistõttu otsustati enim huvi pakkuvate lookuste EcolC\_4286 (*tnaA*) ja EcolC\_1903 (*ydjN*) mutandid isoleerida evolutsioneerunud populatsioonidest. Mutandid isoleeriti populatsioonidest, kus lähtuvalt mutatsioonianalüüsist

esines konkreetseid mutatsioone suurima sagedusega. Populatsioonid külvati lahjenduskülvina LB tardsöötmele (tabel 2) ja inkubeeriti 37 °C üleöö üksikute kolooniate saamiseks. Mutantse isolaadi tuvastamiseks valiti 5-10 kolooniat ning kontrolliti mutatsiooni esinemist PCRi ja/või Sangeri sekveneerimise abil (vt alapeatükk 2.2.7 ja tabel 4). Sekventse joondati referentsgenoomile (Genbank: CP000946.1) SnapGene® programmi (Dotmatics, saadaval [snapgene.com](http://snapgene.com)) abil.

Mutantide pinnatundlikkuse testidesse kaasati lisaks kaks Sigrit Umerovi poolt evolutsioneerunud populatsioonidega tehtud minimaalse biotsiidse kontsentratsiooni (MBC) testidest esile kerkinud erakordselt hõbedatolerantset isolaati. Nii minu kui Sigrit Umerovi isoleeritud mutantide genoomne DNA eraldati, resekveneeriti ja joondati referentsgenoomile nii nagu kirjeldati alapeatükis 2.2.5. ja 2.2.6. Hõbedatolerantsete isolaatide resekveneerimise ja mutatsioonianalüüsi käigus tuvastati *silS* mutatsioonid, mistõttu nimetatakse neid isolaate edaspidi *silS/cusA* ja *silS/pqiA*.

#### **2.2.10 Biofilmi biomassi määramine kristallvioleti meetodil**

Biofilmi moodustamise võime suurenemist on seostatud suurema virulentsusega (viide) . Klassikaliste biofilmikatsete pesuetappides pestakse välja ka tugevaid biofilme moodustava *Pseudomonas aeruginosa* biofilmi biomass (Kragh et al., 2019). Lisaks on *E. coli* ATCC 8739 tüve puhul teise ohurühma oportunistliku patogeeniga, millega töötates tuleb vältida pritsmeohuga töövõtteid. Eelneva tõttu otsustati modifitseerida kristallvioletipõhist staatilise biofilmi protokoll (O'Toole, 2011) nii, et vältida kaevude pesemisel pipeteerimist ja vedelike kallamist 96-kaevulisest plaadist. Baktoreid kasvatati üleöö LB vedelsöötmes, seejärel tehti 4 korduses 100x lahjendused 100 µl mahus 96 - kaevulisse koekultuuri töötluseta plaati (Greiner, Saksamaa), mille sisse asetati biofilmi kandjaks madala profiiliga polüpropüleenist PCRi plaat (FrameStar® 96 Well Non-Skirted PCR Plate, Low Profile; Azenta, Suurbritannia) analoogselt Calgary biofilmiseadmele (Ceri et al., 1999). Saadud Calgary laadset süsteemi inkubeeriti staatiliselt 24 h 25 °C, 24 h 37 °C või 48 h 37 °C. Inkubatsiooni järgselt loputati kandjat ettevaatlikult PBS-is ning värviti 125 µl 0,1% kristallvioleti lahusega 15 min 96-kaevulises koekultuuri töötluseta plaadis. Peale biofilmi värvimist loputati kandjat ettevaatlikult kolm korda destilleeritud vees. Biofilmil lasti kandjal kuivada ca 1 h, misjärel lahustati värv 96% etanoolis inkubeerides 15 minutit, eemaldati 96-kaevulisest plaadist kandja ja mõõdeti neelduvus lainepikkusel 550 nm plaadilugejaga (Tecan Sunrise™ Basic, Tecan Austria, Austria).

### 2.2.11 Ujumisliikuvuse iseloomustamine

Ujumisliikuvuse iseloomustamiseks kasutati ujumistesti pehmes tardsöötmes. Söötmena kasutati 0,3% agarisisaldusega LB tardsöödet, kuhu oli lisatud 0,005% lõppkontsentratsioonis trifenüültetrasooliumkloriidi (TTC) (vt tabel 2). TTC-d kasutati ujumistsooni paremaks visualiseerimiseks, kuna TTC värvub hingamisahela aktiivsuse tulemusena punaseks (Shields & Cathcart, 2011) Inokulumina kasutati bakterisuspensiooni 10x lahjendust PBSis. Ujumistestiks torgati bakterisuspensioon steriilse tikuga ümara Petri tassi keskele söötmesse ning inkubeeriti 37 °C juures 12, 18, 24 ja 48 h, misjärel hinnati visuaalselt ujumistsooni diameetrit.

### 2.2.12 Kasutatud andmebaasid

Mutatsioonide analüüsimisel ja annotatsioonide täpsustamisel on kasutatud:

- KEGG (Kanehisa et al., 2023; Kanehisa & Goto, 2000)
- STRING (Szklarczyk et al., 2023)
- BLAST (Altschul et al., 1990)
- UniProt (The UniProt Consortium, 2023)
- ISfinder (Siguier et al., 2006)
- QuickGO (Binns et al., 2009)
- Genbank (Clark et al., 2016)

### 2.2.13 Statistika

Tulemuste statistiseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism programmi versioonis 10.2.2 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) ühe- või kahefaktorilist disperisoonanalüüsi (ANOVA) koos Holm-Šidáki *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ .

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Evolutsioonikatsete disain

Sageli kasutatakse evolutsioonikatsetes antimikroobse ühendi subhüübitorset või subletaalset kontsentratsiooni vedelas katsekeskkonnas. Ka antimikroobsete metallpindade peamiseks toimemehhanismiks peetakse metalliioonide vabanemist, kuid eralduvate ionide kontsentratsioon muutub nii ajas kui keskkonnatingimustest tulenevalt ja ekspositsiooni doosi ei saa kontrollida kontsentratsiooni kaudu. Küll aga on võimalik selektsioonisurvet muuta muutes ekspositsiooni kestust (Bleichert et al., 2020) või kasutades erineva metallisisaldusega sulameid (F. Xu et al., 2022). On teada, et antimikroobse pinna efektiivsus sõltub ekspositsiooni kestusest, õhuniiskusest kui ka pinna orgaanilisest saastusest (Kaur et al., 2024). Käesolevas magistritöös uuriti hõbe- ja vaskpinna korduva ekspositsiooni mõju bakterite genoomile ning vase ja hõbeda tundlikkusele vastanduvates reaalelulähedastes keskkonnatingimustes. Evolutsioonikatsete disainimisel lähtuti kirjandusest, sh hiljutistest pinnaevolutsiooni artiklitest (Bleichert et al., 2020; F. Xu et al., 2022) (vt tabel 1), meie uurimisgrupis kasutusel olevast antimikroobsete pindade efektiivsuse hindamise meetodika tulemustest erinevates keskkonnatingimustes (Kaur et al., 2024) ja hinnangulisest töömahust.

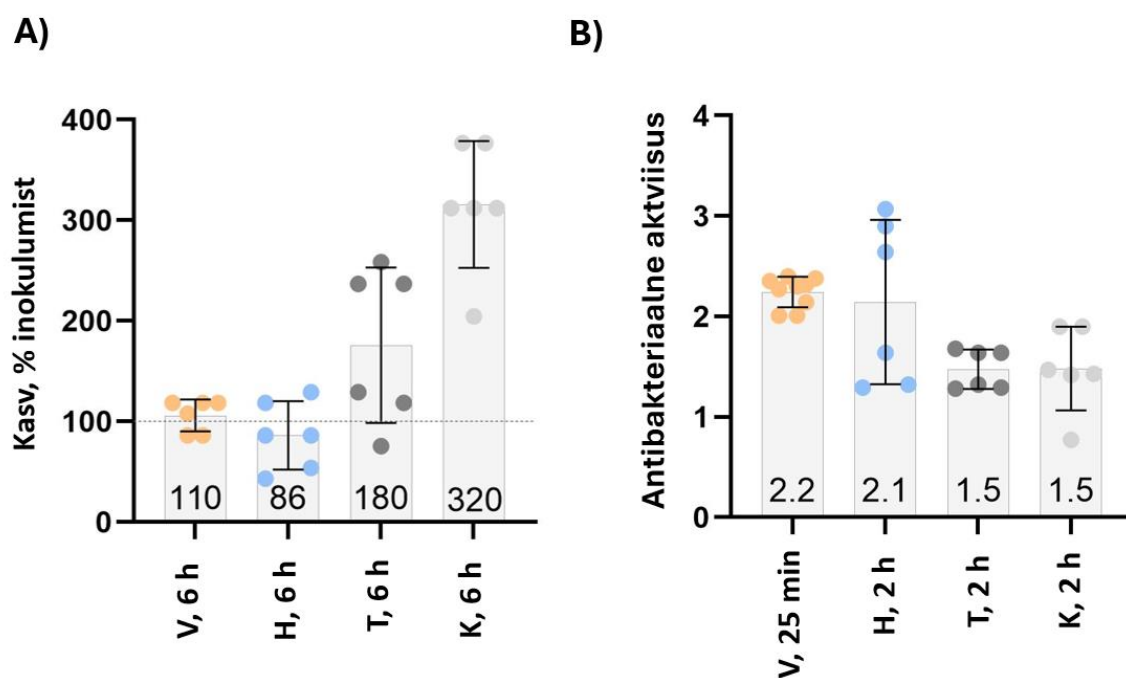
Evolutsioonikatsete eksperimentaalsel disainil oli oluline arvestada, et peamist selektsioonisurvet avaldaks antimikroobsete pindade ja kontrollitud keskkonnatingimuste koostoime, mitte juhuslikud meetodika iseärasused. Näiteks on teada, et hõbeda nanoosakestele tolerantsemad (Alhajjar et al., 2022) või vasepindadel evolutsioneerunud (F. Xu et al., 2022) bakterid võivad olla aeglasema kasvuga LB vedelsöötmes, mistõttu oli oluline kasvatada rakke ekspositsioonide vahel tardsöötmel, et säilitada alampopulatsioonide proportsioone ja vältida kiirekasvuliste rakkude selektsiooni vedelsöötmes. Ühtlasi võiks klonaalne ruumiliselt piiratud kasv tardsöötmel vähendada bakterite omavahelist globaalset konkurentsi ka muudes aspektides, mis vedelsöötmes esinevad. Lisaks ei tahetud tekitada üksikute kolooniate pudelikaelu nagu tehti seda vaskpinna evolutsioonikatses *E.coli* ja *S. aureusega* (vt tabel 1), mistõttu otsustati suspendeerida kogu kolooniate mass 5 ml PBSis, mida kasutati inokulumi valmistamiseks. Selline lähenemine võimaldab tekitada mitmekesisema mutatsioonide valiku selektsiooniks. Varasemates pinnaevolutsiooni katsetes (vt tabel 1) on kasutatud ekspositsioonisöötmena kas PBSi või deioniseeritud vett ning ei võrreldud erinevaid katsekeskkondi. Käesoleva magistritöö katsete tarbeks valiti kaks söödet: rohke orgaanika sisaldusega ja vähese orgaanika sisaldusega. Illustreerimaks saastust kehavedelikega otsustati kasutada orgaanikarikas keskkonnas ühte suurt 50 µl inokulumi tilka ning veepritsmete jäljendamiseks 5x2 µl väikeseid tilkasid Kaur et al. järgi. Teades, et pinna efektiivsus sõltub

õhuniiskusest, siis kindla ekspositsioonitemperatuuri ja õhuniiskuse säilitamiseks viidi katsed läbi kliimakapis.

Katses otsustati kasutada kahte antimikroobset pinda: vaske ja hõbedat. Kontrollpindadena otsustati kasutada bioloogiliselt inertsest klaasi ning antimikroobse omaduseta roostevaba terast. Ühes varasemas pinnaevolutsiooni katses ei kasutatud kontrollina pinda, teises katses kasutati kontrollpinnana roostevaba terast (vt tabel 1).

Selleks, et maandada ohtu kaotada evolutsioonikatse paralleele juhusliku saastuse tõttu või surmava ekspositsiooni tõttu ja tagada populatsioonide säilimine läbi terve evolutsioonikatse, säilitati iga tsükli materjal 20% glütserooli lahuses  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures, et vajadusel liikuda evolutsioonikatses tsüklites tagasi.

Optimaalse ekspositsiooni kestuse leidmiseks viidi läbi pilootkatsed erinevate ekspositsiooniaegadega. Pilootkatsete tulemusel valiti ekspositsiooni ajaks NR keskkonnas vase puhul 1 h, hõbeda ja kontrollpinda puhul 6 h (joonis 2). KV keskkonnas vasel 25 min, hõbe- ja kontrollpindadel 2 h (joonis 2). NR keskkond võimaldab vähest kasvu kontrollpindadel. KV keskkonna puhul seati eesmärgiks rakendada selektsioonisurvet tappes hõbe- ja vaskpindadel umbes 2 logaritmi baktereid tsükli kohta. NR keskkonna puhul võiks SL söötme ekspositsiooni tõttu olla selekteeritud energiakulukamate kaitsemehanismide rakendamine, KV tingimuse puhul aga pigem vähem energiakulukate passiivsete kaitsemehhanismide selektsioon kasvu mitte võimaldavate ja ka kontrollpindadel biotsiidsete tingimuste tõttu.



**Joonis 2. Esialgne hõbeda ja vase pinna poolt põhjustatud kasvuinhibitsioon (A) niiskes orgaanikarikkas (NR) ja pindade antibakteriaalne aktiivsus (B) kuivas orgaanikavaeses (KV) evolutsioonikatse tingimuses inokulumi elusarvukuse suhtes pinna kohta. Tähisted joonistel: V-vask, H-hõbe, T-teras, K-klaas. Katset on korratud 2 paralleelis, 3 bioloogilises korduses (6 andmepunkti). KV keskkonnas suudavad bakterid ekspositsioonija jooksul kontrollpindadel kasvada, aga mitte vask- ja hõbepindadel (A). NR keskkonnas väheneb bakterite elusarvukus ekspositsioonija jooksul kontrollpindadel ca 1.5 logaritmi ning vask- ja hõbepindadel ca 2 logaritmi võrreldes inokulumiga (B). Antimikroobse aktiivsuse käsitletakse elusarvukuse  $\log_{10}$  vähenemist võrreldes kontrollpinna või inokulumiga, siinkohal  $\log_{10}\text{CFU/pind}(\text{inokulumis}) - \log_{10}\text{CFU/pind}(\text{ekspositsioonijärgselt})$ . Graafikul on toodud kuue andmepunkti keskväärtsused ja vearibadena standardhälve.**

Ekspositsioonitsükliks valiti 30 tsükliks, mis on vähem kummaski varasemalt tehtud laborievolutsiooni katsest vaskpindadel (tabel 1), kuid katsemahtu piirasid mitmed tegurid, näiteks magistritöö maht ja ambitsioon anda evolutsioonikatsetega sisend standardmeetodikasse (meie uurimisgrupp osaleb ISO/TC 330 tehnilises komitees), mistõttu pidi katse olema tehtav ühel inimesel mõistliku aja jooksul. Kuna 30. tsükli populatsioonid säilitati  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , on võimalik evolutsioonikatset jätkata ka tulevikus. Inimlikku võimekust arvesse võttes planeeriti ekspositsiooni osa katsest ülepäeviti, mille vahel bakterid kasvasid LB tardsöötmele ja tehti ettevalmistusi järgmiseks ekspositsioonitsükliks. Ekspositsioonile järgneval päeval tuli kontrollida bakterite kasvu ning välistada saastus. Lisaks tuli tagada igaks ekspositsiooniks puhtad kasutusvalmis pinnad (pindade puhastamine), LB tardsöötmetassid, söötmed ja muud tarvilikud lahused. Evolutsioonikatse nägi seega ette igapäevast laboratoorset

tööd 2 kuu vältel ühe evolutsioonikatse kohta eeldusel, et kõik läheb plaanipäraselt. Praktikas pikenesid mõlemad katsed umbes 2 nädala võrra.

**Tabel 5.** Läbi viidud evolutsioonikatsete lõplikud tingimused

<b>Tingimus</b>	<b>Niiske, orgaanikarikas (NR)</b>	<b>Kuiv, orgaanikavaene (KV)</b>
<b>Inokulumi rakuarvukus ja rakkude arv pinnal</b>	1,63x10 <sup>8</sup> CFU/ml 8,13x10 <sup>6</sup> CFU-d pinna kohta	8,13x10 <sup>8</sup> CFU/ml 8,13x10 <sup>6</sup> CFU-d pinna kohta
<b>Ekspositsiooniaeg</b>	1 h – vask 6 h –hõbe, teras, klaas	25-30 min – vask 2 h – hõbe, teras, klaas
<b>Suhteline õhuniiskus</b>	90%	50%
<b>Temperatuur</b>	22°C	22°C
<b>Pinnal eksponeerimiseks kasutatud sööde</b>	Orgaaniline saastelahus ( <i>soil load</i> , SL) Orgaanika sisaldus: 6,8 g/L	500x lahjendatud toitepuljong ( <i>nutrient broth</i> , NB), Orgaanika sisaldus: 0,026 g/L
<b>Inokulumi tilkade suurus ja arv pinnal</b>	1x50 µl	5x2 µl
<b>Järgmise tsükli ettekasvatuseks kasutatav lahjendus</b>	10 <sup>-1</sup> või 10 <sup>-2</sup> – vask, hõbe 10 <sup>-2</sup> – teras, klaas	10 <sup>0</sup> või 10 <sup>-1</sup> – vask, hõbe 10 <sup>-1</sup> – teras, klaas
<b>Ettekasvatuse temperatuur ja aeg</b>	37 °C, 40-50 h	37 °C, ca 40-50 h

Evolutsioonikatse disaini tulemusena viidi läbi kaks evolutsioonikatset: niiskes orgaanikarikkas keskkonnas (NR) ning kuivas orgaanikavaeses (KV) keskkonnas neljal pinnal (lõplikud tingimused toodud tabelis 5). Evolutsioonikatsete tulemusena saadi 20 populatsiooni niiskest orgaanikarikkast katsest ning 20 populatsiooni orgaanikavaesest kuivast katsest (vt tabel 6).

**Tabel 6.** Niiskes ja orgaanikarikkas ning kuivas ja vaeses ekspositsioonikeskkonnas laborievolutsiooni katsete tulemusel saadud populatsioonide lühendid

Populatsiooni lühend	Populatsiooni päritolu	Populatsiooni lühend	Populatsiooni päritolu
V1_NR	<b>vaskpinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>niiskes ja orgaanikarikkas</b> keskkonnas	V1_KV	<b>vaskpinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>kuivas ja orgaanikavaeses</b> keskkonnas
V2_NR		V2_KV	
V3_NR		V3_KV	
V4_NR		V4_KV	
V5_NR		V5_KV	
H1_NR	<b>hõbepinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>niiskes ja orgaanikarikkas</b> keskkonnas	H1_KV	<b>hõbepinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>kuivas ja orgaanikavaeses</b> keskkonnas
H2_NR		H2_KV	
H3_NR		H3_KV	
H4_NR		H4_KV	
H5_NR		H5_KV	
T1_NR	<b>teraspinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, niiskes ja orgaanikarikkas keskkonnas	T1_KV	<b>teraspinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>kuivas ja orgaanikavaeses</b> keskkonnas
T2_NR		T2_KV	
T3_NR		T3_KV	
T4_NR		T4_KV	
T5_NR		T5_KV	
K1_NR	<b>klaaspinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>niiskes ja orgaanikarikkas</b> keskkonnas	K1_KV	<b>klaaspinnal</b> evolutsioneerunud populatsioonid, <b>kuivas ja orgaanikavaeses</b> keskkonnas
K2_NR		K2_KV	
K3_NR		K3_KV	
K4_NR		K4_KV	
K5_NR		K5_KV	

## 2.3.2 Evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonianalüüs

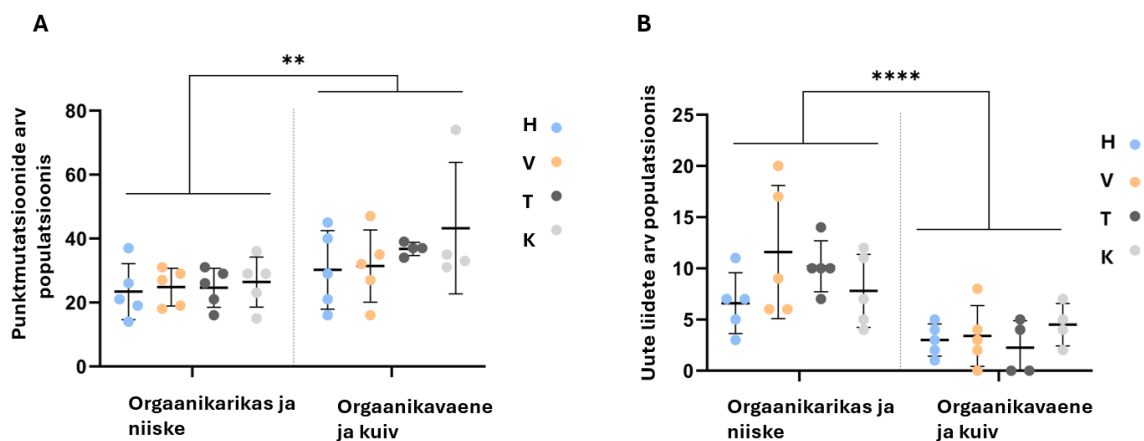
### 2.3.2.1 Akumuleerunud mutatsioonide arv

Selleks, et analüüsida populatsioonides evolutsiooni käigus akumulereunud mutatsioone telliti Novogene'ist evolutsioneerunud populatsioonide täisgenoomi sekveneerimine Illumina NovaSeq 6000 platformil (150 bp paarisotstega lugemid, genoomne katvus ca 300x). Saadud järjestused joondati referentsgenoomile *E. coli* ATCC 8739 (Genbank: CP000946.1) kasutades Breseq'i tööriista (Deatherage & Barrick, 2014). Analüüsi tulem annab populatsioonis tuvastatud punktmutatsioonide ja uute DNA liidete (*new junctions*) esinemissageduse protsendina vahemikus 5% tehnilisest tuvastamispiirist kuni 100% fikseerunud mutatsioonideni. Uued liited DNAs tekivad insertioonide, deletsioonide, duplikatsioonide või teiste suuremate genoomsete ümberkorralduste tulemusel.

Hüpermutaatori fenotüüpi ja genotüüpi on seostatud suurenenud ajutise kohanemisvõimega, mistõttu on vaja määrata mutatsioonide erinemissagedused evolutsioneerunud populatsioonides, tuvastamaks hüpermutaatori esinemist populatsioonis ning seeläbi

suurenenud adaptatsiooni potentsiaali antimikroobsetel pindadel. Samas, et tekiks keskkonnaspetsiifiliselt kasulik tunnus võib olla vajalik mitmete mutatsioonide teke spetsiifilises geneetilises kontekstis. Nt LTE (*long term evolution*) katses kerkis esile tsitraati lagundav *E. coli* mutant, mille tekkeks oli vajalik oli geeni duplikatsioon, duplitseerunud geeni koopia sattumine soodsamasse regulatoorsesse alasse ja veel mitmed lisa mutatsioonid, kuid bakterit ei iseloomustanud hüpermutaatori genotüüp (Blount et al., 2008; Lenski, 2017). Seega ei pruugi olla hüpermutaatorluse teke vajalik kohanemiseks keskkonnaga. Tavapäraselt väljendatakse mutatsioonisagedust generatsiooni kohta (Rosche & Foster, 2000). Pinnakatse formaadi eripärade tõttu ei saa rakendada generatsioonide arvul põhinevaid meetodikaid mutatsioonisageduste arvutamiseks. Seetõttu on käesolevas töös võrreldud evolutsioneerunud populatsioonides esinevate mutatsioonide absoluutarvusi eeldusel, et kõrgema mutatsioonisageduse korral akumulereerub populatsioonides rohkem mutatsioone. Bakterite tsükliline ekspositsioon vask- ja hõbepinnale ei suurendanud akumulereerunud mutatsioonide absoluutarvu oluliselt võrreldes kontrollpindadega kummaski katsetingimuses (joonis 3). Meie laboris Sigrít Umerovi poolt tehtud rifampiini fluktuatsiooni testi tulemused evolutsioneerunud populatsioonidega on eelneva järelusega kooskõlas. Seega katse jooksul ei kerkinud esile hüpermutaatori genotüüpi vastupidiselt *P. fluorescens*iga läbiviidud pinnaevolutsiooni katses (F. Xu et al., 2022) leitud.

Mutatsioonitüüpide puhul joonistusid välja erinevused mitte pinnatüübi- vaid keskkonnasõltuvalt. Kuivas ja orgaanikavaeses keskkonnas evolutsioneerunud populatsioonidel esines enam punktmutatsioone, kui niiskes ja orgaanikavaeses keskkonnas evolutsioneerunud populatsioonidel (joonis 3). Uusi DNA liiteid esines rohkem niiskes ja orgaanikarikkas keskkonnas evolutsioneerunud populatsioonidel kui kuivas ja orgaanikavaeses keskkonnas evolutsioneerunud populatsioonidel (joonis 3).



**Joonis 3. Evolutsioonikatsetes akumulunud punktmutatsioonide ja uute DNA liidete arv populatsioonis.** Tähisted joonistel: V-vask, H-höbe, T-teras, K-klaas. A) Punktmutatsioonide arv populatsioonis B) Uute DNA liidete arv populatsioonis. Vase ja hõbeda pindadel akumulunud mutatsioonide absoluutarv populatsioonides ei erinenud oluliselt kontrollpindadel evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonide arvust. Evolutsioonikatses tuvastatud punktmutatsioone esines statistiliselt oluliselt (\*\*= $p < 0,01$ ) rohkem kuivas ja orgaanikavaeses keskkonnas (A). Uusi DNA liiteid oli genoomi tekkinud statistiliselt olulisel määral rohkem orgaanikarikas ja niiskes keskkonnas, kui orgaanikavaeses ja kuivas evolutsioneerunud populatsioonidel (B) (\*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). Joonisel on toodud mõlemas evolutsioonikatses evolutsioneerunud 5 liini punktmutatsioonide ja uute DNA liidete arv iga pinnatüübi kohta, va kuiva ja orgaanikavaeses keskkonna terase ja klaasi pinnal, mille puhul on esitatud 4 liini andmed. esitatud on  $\geq 5\%$  sagedusega mutatsioonid, mis ei esinenud eellastüves. Statistilises analüüsis kasutati kahefaktorilist ANOVA-t ja *post-hoc* testi mitmestele võrdlustele usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Joonisel on esitatud keskvärtus ja vearibadena standardhälve.

### 2.3.2.2 Uued DNA liited

Vase ja hõbeda pinnal akumulunud uued DNA liited on toodud tabelis 7. Uute liidete seas olid sagedased mitmed IS-elementide (*IS=insertion sequence*) vahendatud deletsioonid või insertioonid. IS-elementid on transponeerivad elementid, mis sisaldavad transposaasi geeni ja pöördkordusjärjestusi. IS elementide liikumist genoomis on seostatud keskkonnamuutustega kohanemisega. Näiteks tsüstilise fibroosiga patsientidelt isoleeritud *P. aeruginosa* puhul, milles oli toimunud mitmeid IS elementide poolt vahendatud geenide inaktiveerumisi (Armbruster et al., 2021), mis muuhulgas põhjustas antibiootikumi tundlikkuse vähenemist IS elementide insertiooni tõttu poriini kodeerivasse geeni (Sentausa et al., 2020). IS elementide insertioonid ei pruugi põhjustada vaid geenide inaktivatsiooni, vaid mõjutada ka külgnivate geenide ekspressiooni ja regulatsiooni või tekitada hübriidseid promootoreid (Vandecraen et al., 2017). Näiteks *E. coli* vase pinna evolutsioonikatses leiti, et IS elementide insertioon geeni *ycbX* põhjustas hübriidpromootori, mis tõenäoliselt tõstis *ycbY* geeni ekspressiooni taset (Bleichert et al., 2020). Geeniekspressiooni muutusi ja geenide inaktivatsiooni võivad põhjustada ka IS-elementidega seotud deletsioonid: näiteks IS-elementide vahendatud deletsioon IS1 kõrval

olevates liikuvuse geenides tekitab *E. colis* liikuvusfunktsiooni kao (Plague et al., 2017) ja deletsioonid IS1X2 vahetus läheduses põhjustasid *E. colis* nitrofurantoanini resistentsuse (Wan et al., 2023).

Eriti arvukalt leitud IS-elementide vahendatud varieeruva pikkusega deletsioone alates lookusest EcolC\_2715 kuni maksimaalselt lookuseni EcolC\_2749. Huvitav on, et varieeruva pikkusega, aga vähemalt EcolC\_2715-EcolC\_2716 lookusi mõjutavaid deletsioone tuvastati evolutsioneerunud populatsioonides mitmeid, kuid need kõik algavad sama EcolC\_2714 IS1X2 transposaasi kodeeriva lugemisraami algusest. Sarnast nähtust on varem kirjeldatud ning põhjendatud IS elementide väljalõiget soodustava valgu (IEE) funktsiooniga enteropatogeenses *E. coli* (Kishino et al., 2024; Kusumoto et al., 2011). IEE aktiivuseks on vajalik nii AEP domään kui helikaasi domään (Calvo et al., 2023). IEE valgujärjestuse BCS62752.1 alusel (Nakamura et al., 2022) tuvastati *E. coli* ATCC 8739 genoomist valk, mis kodeerib helikaasi EcolC\_1463 (*radD*), kuid mitte AEP domääni. Seega ei ole samast kohas algavad deletsioonid tõenäoliselt seletatavad IEE-ga. Kuna sama IS1X2 IS elementide koopiad on genoomis ka mujal, aga enamuse IS-vahendatud deletsioone on seotud EcolC\_2714 lookusega, on võimalik, et erineva pikkusega deletsioonide teke samast alguspunktist võib olla tingitud genoomsest ebastabiilsusest selles konkreetses piirkonnas.

Kõigil EcolC\_2715 algusega deletsioonidel on osaliselt või täielikult hõlmatud vähemalt geenid EcolC\_2715 (*clpS*) ja EcolC\_2717 (*cspD*). CspD on replikatsiooni inhibeeriv toksiin (Yamanaka et al., 2001). ClpS on ClpSAP valgulagundamise kompleksi spetsiifilisust tagav adaptorvalk (Dougan et al., 2002). Kuna EcolC\_2713 (*clpA*) on katkestatud metsiktüübis EcolC\_2714 (IS1 transposon) poolt, võiks eeldada, et ClpSAP kompleks on *E. coli* ATCC 8739 tüves juba algselt inaktiveeritud. Seega juhul, kui tegemist on positiivse selektsiooniga kirjeldatud deletsiooni suhtes, selekteeritakse tõenäoliselt *cspD* inaktivatsiooni. Valgu lagundamissüsteemide positiivset seost ISi elementide liikumisega on varem näidatud (Kusumoto et al., 2011), kuid täpsed mehhanismid ei ole selged. Võimalik, et ka *clpA* enda katkestus mõjutab IS elementide liikumist, kuigi Kusumoto *et al.* sellist seost ei tuvastanud. Genoomi ebastabiilsusele deletsioonidega hõlmatud piirkonnas viitab ka asjaolu, et tegemist ei olnud pinnatüübi spetsiifilise nähtusega (vt lisa 3 ja tabel 7). EcolC\_2715 lugemisraamist algavaid deletsioone esines kokku 13 populatsioonis, enim niiskes ja orgaanikarikkas keskkonnas ning kontrollpindadel evolutsioneerunud populatsioonides (8 populatsioonis) (lisa 6). Populatsioonis alla 20% esinemissagedusega deletsioone oli veel rohkemates populatsioonides. Selle alusel võiks kahtlustada, et *cspD* deletsioon võib olla tingitud genoomsest ebastabiilsusest IS1ga külgnevas piirkonnas ja deletsioonita

populatsioonides(/pindadel/keskkondades) võidi selekteerida hoopis deletsiooni esinemise vastu.

Lisaks esines IS- elementide insertioone nii vasel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonides geenides EcolC\_1903 (*ydjN*), EcolC\_3887, EcolC\_3242 (*aroM*), EcolC\_0730 (*nemR* sarnane transkriptsioonifaktor) , EcolC\_2387 (*adhE*). YdjN on tsüsteiini importer, mille täpsema funktsiooni ja rolli üle metalli tolerantsis on diskuteeritud tulevastest peatükkides (2.3.4 ja 2.3.2.4). AroM (DeFeyter & Pittard, 1986), EcolC\_3887 ja EcolC\_0730 funktsioonid on teadmata, mistõttu on keeruline hinnata konkreetsete mutatsioonide potentsiaalset mõju metallitundlikkusele. EcolC\_2387 (*adhE*) kodeerib multifunktsionaalset etanooli oksidoreduktaasi (Echave et al., 2002), kuid ka selle geeni seos metallitundlikkusega ei ole selge.

**Tabel 7.** Vase ja hõbeda pinnal evolutsioneerunud populatsioonides esinenud IS-elementi vahendatud deletsioonid ja insertioonid. Taustavärv illustreerib mutatsiooni esinemissagedust evolutsioneerunud populatsioonis, mida tumedam sinine seda madalam, mida tumedam oranž seda kõrgem on sagedus. Mutatsioonid tabelis on toodud sagedusega 0,2-1,0, va 1037 bp deletsioon, mille sagedus on 0,1, kuna esineb samas populatsioonis esineb üks sarnase algusega mutatsioon veel. Hallilt esile tõstetud IS-element vahendatud mutatsioonid ei ole hõbe- ega vaskpinna spetsiifilised. Populatsioonide tähised on seletatud tabelis 6.

populatsioon	(algus)positsioon	mutatsioon	annotatsioon	mõjutatud geen (lookus)	
H2_NR	2 105 547	::IS1X2 (+)	::IS1X2 (+) (209/1392 nt)	EcolC_1903	<i>ydjN/tsyP</i>
V3_NR	2 987 583	Δ 6,100 bp	IS1X2-vahendatud	EcolC_2715- EcolC_2720	<i>clpS,cspD,...</i>
H3_NR	2 987 583	Δ 8,906 bp	IS1X2-vahendatud	EcolC_2715- EcolC_2722	<i>clpS,cspD,...</i>
H4_NR	2 987 582	Δ 1,037 bp	IS1X2-vahendatud	EcolC_2715- EcolC_2716	<i>clpS,cspD</i>
H4_NR	2 987 583	Δ 7,339 bp	IS1X2-vahendatud	EcolC_2715- EcolC_2720	<i>clpS,cspD,...</i>
V1_KV	2 987 581	Δ 2,440 bp	IS1X2-vahendatud	EcolC_2715- EcolC_2717	<i>clpS,cspD,...</i>
V4_KV	2 987 583	Δ 32,016 bp	IS1X2-vahendatud	EcolC_2715- EcolC_2745	<i>clpS,cspD,...</i>
H3_KV	2 629 020	::IS1R(+)	::IS1R(+) kodeeriv (1714-1723/2676 nt)	EcolC_2387	<i>adhE</i>
V2_KV	3 551 945	::IS1X2 (-)	::IS1X2 (-)(271-279/678 nt)	EcolC_3242	<i>aroM</i>
V4_KV	784 740	::IS1X2 (+)	::IS1X2 (+)(167-174/645 nt)	EcolC_0730	EcolC_0730
V5_KV	4 265 419	::IS1X2 (-)	::IS1X2 (-) (269-277/3360 nt)	EcolC_3887	EcolC_3887

### 2.3.2.3 Punktmutatsioonid hõbeda ja vase pindadel evolutsioneerunud populatsioonides.

Evolutsioonikatses jooksul akumulunud punktmutatsioonid esinesid reeglina vaid ühes evolutsioneerunud populatsioonis ja ei kordunud, va *tnaA* M266I asendus NR H1-H5 (siin ja edaspidi populatsiooni lühendi seletused on toodud tabelis 6) populatsioonides. Kui mutatsioonide arvu puhul võeti arvesse kõiki tuvastatud mutatsioone, siis täpsemalt annoteeriti populatsioonis üle 20% esinemissagedusega mutatsioone (vt lisa 3 ja 4). Teadaolevates vase ja hõbeda tolerantsiga seotud lookustes (*sil*, *cus*, *cop*, *cue*, *pco*) ei leitud mutatsioone üheski populatsioonis, mis on kooskõlas ühe varasema pinna evolutsiooni artikliga (Bleichert et al., 2020), teises (F. Xu et al., 2022) tehtud katses siiski tuvastati mutatsioone *copR* ja *copS* geenides. Käesoleva magistritöö evolutsioonikatses hõbe- ja vaskpinnal evolutsioneerunud populatsioonides oli akumulunud mutatsioone geenides, mis olid seotud näiteks väävlimetabolismi, liikuvuse, rakupinna ja membraanitranspordiga ja milles ei tuvastatud mutatsioone kontrollpindadel evolutsioneerunud populatsioonides (lisa 2). Liikuvuse ja rakupinnaga seotud geenides leidis mutatsioone ka varasemalt tehtud evolutsioonikatses *P. fluorescens* vaskpinnal evolutsioneerunud populatsioonides (F. Xu et al., 2022). Järgnevalt on kirjeldatud vase ja hõbeda pinnal akumulunud punktmutatsioone (tabel 8).

Populatsioonis V2\_NR esines intergeenne ühe nukleotiidi insertioon geenist *yrdA* ülesvoolu. *YrdA* on teadmata funktsiooniga valk, mille ekspressioonimustrid polüamiini induktsioonil on sarnased sarnased *tnaA*-ga (Yohannes et al., 2005) ning *Bacillus subtilis*es võib *YrdA* olla seotud väävli assimilatsiooniga (Hayashi et al., 2015), millel võib olla kaudne seos metallitolerantsusega, kuna väävli ühendid võivad reageerida metalliioonidega, sh vase ionidega. V3\_NR toimunud mutatsioon S245C geenis *rfaJ*, mis osaleb lipopolüsahhariidide sünteesis (Pradel et al., 1992) ja võib seeläbi mõjutada raku pinna omadusi, mis võib muuta vase tolerantsi.

Kõigis NR keskkonnas evolutsioneerunud hõbeda populatsioonides esines *tnaA* geenis mutatsioon M266I (sagedus 13-70%), mis asub *tnaA* kodeeritava tsüptofanaasi aktiivsaiidi (K270) lähedal (G. Li & Young, 2015). Trüptofanaas toodab trüptofaanist indooli, aga ka tsüsteiinist divesiniksulfiidi (Awano et al., 2003, 2005; Newton & Snell, 1964), mida on seostatud antimikroobsete ühendite tolerantsiga (Essa et al., 2018). Populatsioonis H2\_NR tuvastati *ydjN* geenis mutatsioon G44D. *YdjN* on *E. coli*s tsüstiini importeri, mis võib transportida ka tsüstiini komplekse (Deutch et al., 2014), sh hõbeda ja tsüsteinikomplekse. H3\_NR populatsioonis olid mutatsioon C→T geenide *yehH* ja *pth* lugemisraamidest ülesvoolu vastavalt positsioonides -117 ja 161). *YehH* on sisemembraani valk, mille puudumisel on rakud tundlikumad vesinikperoksiidile (J. Lee et al., 2010). *Pth* on peptidüül-tRNAde ümbertöötamise

eest vastutav hüdrolaas, mille inaktivatsioon on *E.coli*le letaalne (Menninger, 1979). *YchH* ja *pth* võimalik seos metallitolerantsusega ei ole selge.

V3\_KV populatsioonis olid fikseerunud mutatsioonid geenides *rrsB* (V120F) ja *ybiB* (G13R). Valk RssB on sigma S stabiiluse modulaator (Duan et al., 2013), mille puudumisel suureneb *E.coli* ostmootse, oksüdatiivse ja temperatuuri taluvus (Bougdoor et al., 2006). YbiB on LexA reguleeritud DNA-ga seonduv valk, mis võib osaleda SOS vastuses ja persistentsuses (Schneider et al., 2015). Mõlemad mutatsioonid võivad mõjutada vasest tingitud stressiga toimetulekut stressivastuse kaudu. V4\_KV populatsioonis oli fikseerunud mutatsioon T986I geenis *yfhM*. YfhM on lipoproteiin  $\alpha_2$ -makroglobuliin, mis kaitseb rakku peremeesraku peptidaaside eest (Doan & Gettins, 2008) ja võib osaleda periplasmaatilise kaitse ja parandamissüsteemis (Budd et al., 2004), seega võib *yfhM* mutatsioon mõjutada periplasmaatilist toimetulekut vasega, kuna valdav osa vaske rakus asub periplasmas. V5\_KV populatsioonis esines mutatsioon geenis *cysN* (Q440\*). *CysN* on veel üks väävliainevahetusega seotud geen, mille ülesregulatsiooni on märgatud teiste tsüsteiini biosünteesi geenide hulgas vaseiooni vastusena (Yamamoto & Ishihama, 2005).

Välismembraani poriini kodeeriv *OmpC* osaleb gramnegatiivsete bakterite rakuümbrisega seotud stressivastuses (Macritchie & Raivio, 2009). Osalus metallitolerantsuses on ebaselge, näiteks on näidatud, et *ompC* deleteerimine ei suurenda oluliselt hõbeda ja vase soolade tolerantsi (X. Z. Li et al., 1997) kuigi on demonstreeritud ka vastupidist efekti hõbeda iooni ja nanoosakeste puhul (Radzig et al., 2013). *OmpC* geeni oli tekkinud stoppkoodon (Y343\*) populatsioonis H1\_KV. Lisaks oli samas populatsioonis tekkinud aminohappe asendusmutatsioon E145D geenis *zraS* sensordomeenis, mis võib muuta ZraS afiinsust metallidele (Taher & de Rosny, 2021). ZraS kuulub kahekomponetsesse süsteemi ZraRS, mis vastusena kõrgele tsingi või plii kontsentratsioonile fosforüleerib ZraRi (Petit-Härtlein et al., 2015; Taher & de Rosny, 2021), ning ZraR võib osaleda stressivastuses reguleerides membraani intaktsusega seotud gene (Rome et al., 2018).

Populatsioonis H2\_KV esines mutatsiooni tagajärjel aminohappe muutus Q19K geenis *apt* (adeniini fosforibosüültransferaas). *Apti* rikkumisel on nähtud adeniini akumulatsiooni rakus, kuid ka suurenenud vase tolerantsi *Staphylococcus aureuses* (Norambuena et al., 2023). Lisaks on näidatud, et adeniinil on suur afiinsus hõbedale (Giese & McNaughton, 2002; Luk et al., 1975). Seega võib *apti* funktsiooni häirumine mõjutada nii vase kui hõbeda tolerantsi tõenäoliselt metalliioonide sidumise kaudu. Populatsioonis H3\_KV leiti punktmutatsioon A→T geenide *anmK* ja *slyB* vahel, mõlemast lugemisraamist ülesvoolu, vastaval positsioonis -271 ja -3. Valk AnmK osaleb peptidoglükaani taaskasutamises (Uehara et al., 2005). SlyB on

stressiga indutseeritud lipoproteiin, mis osaleb välismembraani stabiliseerimisel (Janssens et al., 2024). Mutatsioon A97P geenis *flgH* oli ainus populatsioonis H4\_KV  $\geq 20\%$  sagedusega esinenud mutatsioon. FlgH on viburi L-rõnga valk (Wadhwa & Berg, 2021). Liikuvusega seotud geenide mutatsioone esines aga nii vask- ja hõbepindadel kui ka kontrollpindadel. Populatsioonis H5\_KV geenide *yegH* ja *wza* vahel esines punktmutatsioon T→A, mis asus mõlemist lugemisraamist ülesvoolu vastavalt positsioonides -47 ja -612. YegH on oletatav sisemembraani transporter, mis asub kolaanhappe sünteesi ja transpordi geenide vahetus läheduses (sh *wza*) (Harris et al., 2018), mistõttu võib mutatsioon potentsiaalselt mõjutada raku pinnaomadusi. Lisaks leidis H5\_KV populatsioonis mutatsioon C→T ülesvoolu (-185) geeni *argT* lugemisraamist. *ArgT* on stressivastusega seotud valk, mille ülesregulatsiooni on täheldatud *E. colis* glükoosinälja korral (Wick et al., 2001). Lisaks sõltub ArgT regulatsioon nii ClpAP kui ka ClpXP valgulangundamiskompleksidest (Weichart et al., 2003), seega võib mutatsiooni korral olla mõjutatud ArgT regulatsioon, mis võib läbi stressivastuse kaudselt mõjutada hõbepinna tolerantsi.

**Tabel 8.** Hõbeda ja vase pindadel evolutsioneerunud populatsioonides 0,2-1 sagedusega akumulatsioonid punktmutsatsioonid. Erandiks on *ydjN*, mille sagedus on 0,1, kuna samas populatsioonis esines IS-elementi insertioon samasse geeni sagedusega 0,2 (vt tabel 7). Taustavärv illustreerib mutatsiooni esinemissagedust evolutsioneerunud populatsioonis, mida tumedam sinine seda madalam, mida tumedam oranž seda kõrgem on sagedus. Hall taust toob esile mutatsioonid, mis esinevad ka kontrollpindadel. Populatsioonide lühendite tähendus on seletatud tabelis 6.

populatsioon	(algus)positsioon	mutatsioon	annotatsioon	mõjutatud geen (lookus)	
V2_NR	465 883	53 bp→54 bp	intergeenne 53 bp→54 bp (-189)	EcolC_0434	<i>yrdA</i>
V3_NR	88 398	A→T	S245C ( <u>A</u> GT→ <u>T</u> GT)	EcolC_0083	EcolC_0083
H1-5_NR	4 740 468	C→A	M266I ( <u>A</u> TG→ <u>A</u> T <u>T</u> )	EcolC_4286	<i>tnaA</i>
H2_NR	2 105 625	C→T	G44D ( <u>G</u> GC→ <u>G</u> AC)	EcolC_1903	<i>ydjN/tycP</i>
H3_NR	2 666 933	T→C	intergeenne (-117)	EcolC_2421	<i>ychH</i>
H3_NR	2 666 933	T→C	intergeenne (-161)	EcolC_2422	<i>pth</i>
V3_KV	2 634 829	C→A	V120F ( <u>G</u> TT→ <u>T</u> TT)	EcolC_2392	<i>rssB</i>
V3_KV	3 111 116	C→T	G13R ( <u>G</u> GG→ <u>A</u> GG)	EcolC_2843	<i>ybiB</i>
V4_KV	1 263 419	C→T	T986I ( <u>A</u> CA→ <u>A</u> TA)	EcolC_1157	<i>yfhM</i>
V5_KV	1 049 782	C→T	Q440* ( <u>C</u> AG→ <u>T</u> AG)	EcolC_0961	<i>cysN</i>
H1_KV	1 584 799	C→G	Y343* ( <u>T</u> AC→ <u>T</u> AG)	EcolC_1435	<i>ompC</i>
H1_KV	4 430 894	T→A	E145D ( <u>G</u> AA→ <u>G</u> AT)	EcolC_4022	<i>zraS</i>
H2_KV	3 450 094	G→T	Q19K ( <u>C</u> AG→ <u>A</u> AG)	EcolC_3147	<i>apt</i>
H3_KV	2 196 802	A→T	intergeenne A→T (-3)	EcolC_1988	<i>slyB</i>
H3_KV	2 196 802	A→T	intergeenne A→T (-271)	EcolC_1989	<i>anmK</i>
H4_KV	2 774 065	C→G	A97P ( <u>G</u> CG→ <u>C</u> CG)	EcolC_2521	<i>flgH</i>
H5_KV	1 472 947	C→T	intergeenne C→T (-185)	EcolC_1342	<i>argT</i>
H5_KV	1 755 361	T→A	intergeenne T→A (-47)	EcolC_1578	<i>yegH</i>
H5_KV	1 755 361	T→A	intergeenne T→A (-612)	EcolC_1579	<i>wza</i>

### 2.3.3 Mutantide konstrueerimine ja isoleerimine

#### 2.3.3.1 Ühe lookuse mutantide konstrueerimine

Selleks, et uurida huvipakkuvamate üksikute geenide mõju bakterite metallpinna tolerantsile, otsustati mutatsioonid ükshaaval kromosoomi viia. Kuna huvipakkuvate mutatsioonide seas oli nii nukleotiidi-asendusi lugemisraamides kui geenide katkestusi, kasutati mutatsioonide sisseviimiseks *E. coli* kromosoomi gramnegatiivsetele bakteritele väljatöötatud armita (*scarless*) mutageneesi meetodit (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Meetod põhineb pärimist pärit järjestusspetsifilise I-Sce-I endonukleaasil ja homoloogsel rekombinatsioonil mutantset järjestust kandva plasmiidiga. Huvipakkuvamate mutatsioonide nimekiri on toodud lisa 3.

Mutantide konstrueerimisel esines mitmeid probleeme. Komplitseeritud oli madala koopiaarvuga plasmidi pSNW2 paljundamine piisavas hulgas mitmeteks paralleelseteks ensümaatilisteks reaktsioonideks. DNA fragmentide geelist eraldamisel tekkisid suured kaod, samas kui geelelektroforeesita oli probleemiks madal ligatsiooni efektiivsus. Seetõttu loobuti ühe lookuse mutantide konstrueerimisest. Lisaks ilmnemise tõenäoliselt tüvespetsiifilised probleemid. Kuigi meetodit on erinevates *E. coli* tüvedes, sh ATCC 8739 tüves kasutatud, võis meetodi efektiivsust vähendada mutantset järjestust kandva plasmidi integreerumine mitte ainult sihtmärklõukusesse, vaid ka näiteks *lac* lookue homoloogia alusel. Juhtudel, kus õnnestus genoomi viia mutatsiooni kandev plasmid, oli probleemiks mutantsete ja metsiktüüpi kolooniate suhe peale I-Sce-I induktsiooni, mida võis põhjustada modifitseeritavate geenide transkriptsioon. Varasemalt on näidatud, et lõikamine I-Sce-I endonukleaasi abil võib olla aktiivselt transkribeeritavate geenide puhul takistatud, mida leevendab kahe terminaatori lisamine mutatsiooni kandvasse konstrukti (Kim et al., 2014).

Armita mutageneesi kasutades õnnestus kromosomaalne deletsioon  $\Delta EcolC_{2715-2722}$  (deleteeritud geenid: *clpS*, *cspD*, *macB*, *macA*, *ybjX*, *ybjD*, *aqpZ*, *EcolC\_{2722}* (teadmata funktsiooniga membraani valk)). Mitmete efektiivsust pärssivate probleemide ilmnemisel mutantide konstrueerimisel otsustati ennustamatu töömahu vältimiseks huvipakkuvaid mutatsioone kandvaid baktereid isoleerida evolutsioneerunud populatsioonidest.

#### 2.3.3.2 Mutantide isoleerimine

Teadaolevalt stressivastuse või metallitundlikkusega geenide kõrval pakkusid enim huvi väävlit sisaldavate aminohapete ainevahetusega seotud geenid, kuna nende rolli metallivastastes kaitsemehhanismides pole varem kirjeldatud. *TnaA* geeni mutatsioon, mis põhjustas

aminohappelise muutuse (M266I) esines kõigis NR keskkonnas evolutsioneerunud hõbeda populatsioonidel sagedusega 13-70% mutatsioon, kuid ei tuvastatud mitteüheski teises populatsioonis, mis viitab mutatsiooni kasulikkusele kindlates ekspositsioonitingimustes. *TnaA* kodeerib trüptofanaasi, mis osaleb peamiselt indooli tootmises trüptofaanist, kuid ka divesiniksulfiidi tootmisel tsüsteiinist (Awano et al., 2003, 2005; Newton & Snell, 1964). Mutatsiooni tulemusel toimus koodoni muutus, mille tulemusena transleeritakse metioniini asemel isoleutsiin. Metioniini struktuuris sisaldub väävel, mis võib reageerida hõbeda iooniga ning rikkuda valgu funktsiooni. Fe-S klastriga ensüümide kahjustamist hõbeda poolt on varasemalt näidatud (F. F. Xu & Imlay, 2012). Isoleutsiini struktuuris ei esine väävlit, seega on võimalik, et aminohappe muutus aitab säilitada *TnaA* aktiivsust hõbeda juuresolekul.

Valk *YdjN* on tsüstiini/tsüsteiini ja selle komplekside transporter, mille puhul on kirjeldatud seost selenotsüsteiini tolerantsusega (Deutch et al., 2014). *YdjN* geeni inserteerunud IS1 element on tõenäoliselt geeni inaktiveeriva mõjuga. Tegemist võib olla kasuliku mutatsiooniga, kuna nt sulfiidiga kaetud hõbeda nanoosakesed olid kroonilise, kuid mitte akuutse ekspositsiooni korral toksilised *E. colile* (M. Li et al., 2019). Seega võib olla *ydjN::IS* mutatsioon kasulik, kuna ei transpordita sisse lisaks tsüsteiinile ka potentsiaalselt toksilisi tsüsteiini ja hõbeda komplekse.

*TnaA*(M266I) mutant isoleeriti populatsioonist H4\_NR ning *ydjN::IS* populatsioonist H2\_NR. Isoleeritud *tnaA*(M266I) ja *ydjN::IS* mutante kontrolliti, vastavalt kas Sanger sekveneerimisega või PCRi abil.

Lisaks isoleeris Sigrít Umerov evolutsioneerunud populatsioonidega läbiviidud hõbenitraadi tundlikkuse (minimaalse biotsiidese kontsentratsiooni, MBC) katsetest kaks hõbedatolerantset sekundaarset isolaati. Isolaatide genoomne DNA eraldati, ning telliti täisgenoomi sekveneerimine ja viidi läbi mutatsioonianalüüs. Tabel 9 kirjeldab isoleeritud mutantides tuvastatud mutatsioone.

Nii Sigrít Umerovi poolt isoleeritud sekundaarseid isolaate, minu poolt isoleeritud populatsioonidest pärit isolaate kui ka konstrueeritud deletsioonmutanti nimetatakse edaspidi mutantideks.

**Tabel 9.** Evolutsioneerunud populatsioonidest isoleeritud mutantide ja MBC katsest isoleeritud mutantides esinevad mutatsioonid. Tabel ei hõlma sünonüümseid punktmutatsioone ja lugemisraamides allavoolu paiknevaid intergeenseid mutatsioone.

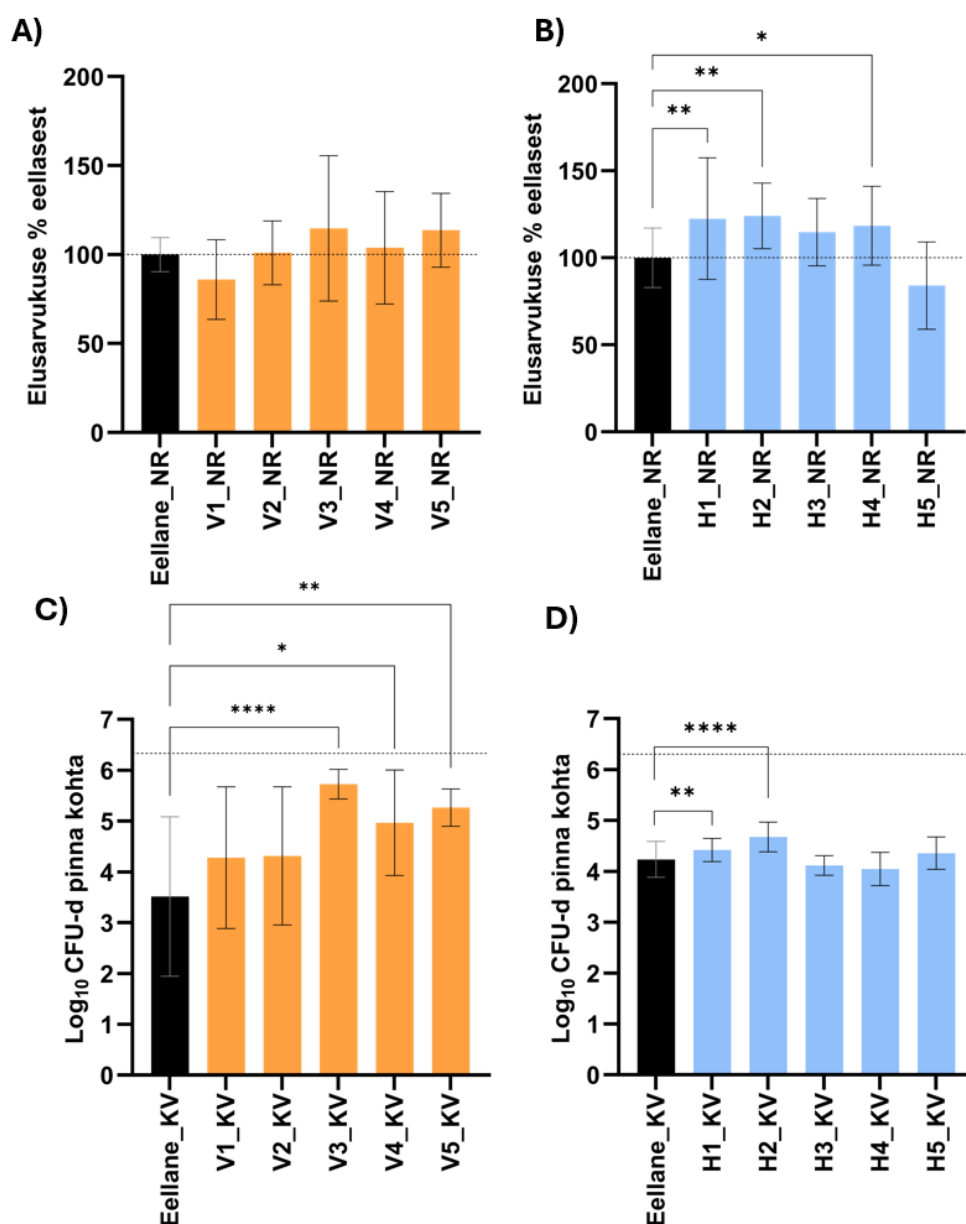
Positsioon	Annotatsioon	Mõjutatud lookused	Mõjutatud geenid sarnasuse alusel	<i>tnaA</i> M266I	<i>ydjN</i> ::IS1	<i>silS/pqiA</i>	<i>silS/cusA</i>
1,900,542	W8* (TGG→TGA)	EcolC_1701	<i>flil</i>	+	+	+	
2,624,634	Δ3 bp (855-857/1677 nt)	EcolC_2385	<i>oppA</i>	+	+	+	
2,625,746	intergeenne A→C (-256)			+	+	+	
2,987,583	Δ7339 bp	EcolC_2715-EcolC_2721	<i>clpS,cspD,...</i>	+			
<b>4,740,468</b>	<b>M266I (ATG→ATT)</b>	<b>EcolC_4286</b>	<b><i>tnaA</i></b>	+			
3,098,445	A17V (GCG→GTG)	EcolC_2832	<i>glnH</i>		+		
<b>2,105,539</b>	<b>::IS1 (209-217/1392 nt)</b>	<b>EcolC_1903</b>	<b><i>ydjN (tcyP)</i></b>		+		
1,230,172	intergeenne G→A (-112)	EcolC_1127	<i>yphH</i>			+	
	intergeenne G→A (-6)	EcolC_1128	<i>yphG</i>			+	
<b>2,898,355</b>	<b>C2Y (TGC→TAC)</b>	<b>EcolC_2646</b>	<b><i>pqiA</i></b>			+	
<b>3,746,708</b>	<b>L242Q (CTG→CAG)</b>	<b>EcolC_3427</b>	<b><i>silS</i></b>			+	
4,548,981	S102C (AGC→TGC)	EcolC_4122	<i>fdhD</i>			+	
1,755,361	intergeenne T→A (-47)	EcolC_1578	<i>yegH</i>				+
	intergeenne T→A (-612)	EcolC_1579	<i>wza</i>				+
<b>3,356,525</b>	<b>W662S (TGG→TCG)</b>	<b>EcolC_3071</b>	<b><i>cusA</i></b>				+
<b>3,746,615</b>	<b>H211R (CAC→CGC)</b>	<b>EcolC_3427</b>	<b><i>silS</i></b>				+

### 2.3.4 Evolutsioneerunud populatsioonide ja mutantide kirjeldamine

#### 2.3.4.1 Evolutsioneerunud populatsioonide tundlikkus hõbeda- ja vasepindadele

Evolutsiooni käigus akumulunud mutatsioonide võimaliku vase ja/või hõbeda tolerantsi suurendava potentsiaali kirjeldamiseks viidi läbi pinnatundlikkuse katsed hõbe- ja vasepindadel. Tundlikkust testiti vasel evolutsioneerunud populatsioonide puhul vasepinnal ning hõbedal evolutsioneerunud populatsioonide puhul hõbepinnal evolutsioonikatsel vastavas keskkonnas (tulemused esitatud joonisel 4). Niiskes ja orgaanikarikkas tingimustes ilmnes vähenenud tundlikkus hõbepinnale populatsioonidel H1\_NR, H2\_NR, H4\_NR. Populatsioonides esinevad mutatsioonid ei võimalda muutust üheselt seletada. On võimalik, et hõbedatundlikkuse vähenemist põhjustas populatsioonides erineva esinemissagedusega *tnaA* geeni mutatsioon, mis võib võimaldada divesiniksulfiidi tootmist hõbeda juuresolekul orgaanikarikkas keskkonnas. Kuivas ja orgaanikavaeses keskkonnas talusid vasepinnale eksponeerimist paremini populatsioonid V3\_KV, V4\_KV ja V5\_KV ning hõbepinna ekspositsiooni populatsioonid H1\_KV ja H2\_KV. Tundlikkuse muutust kuivas ja orgaanikavaeses keskkonnas vasepinnal võib seletada potentsiaalselt kahe fikseerunud mutatsiooniga geenides *rssB* ja/või *ybiB* (V3\_KV), *yfhM* ja/või ΔEcolC\_2715-EcolC\_2745 (V4\_KV), *cysN* ja/või EcolC\_3887::IS1 (V5\_KV) (vt alapeatükk 2.3.2.2 ja 2.3.2.4). Vähenenud hõbedapinna tundlikkus kuivas ja orgaanikavaeses keskkonnas võib populatsioonis H1\_KV

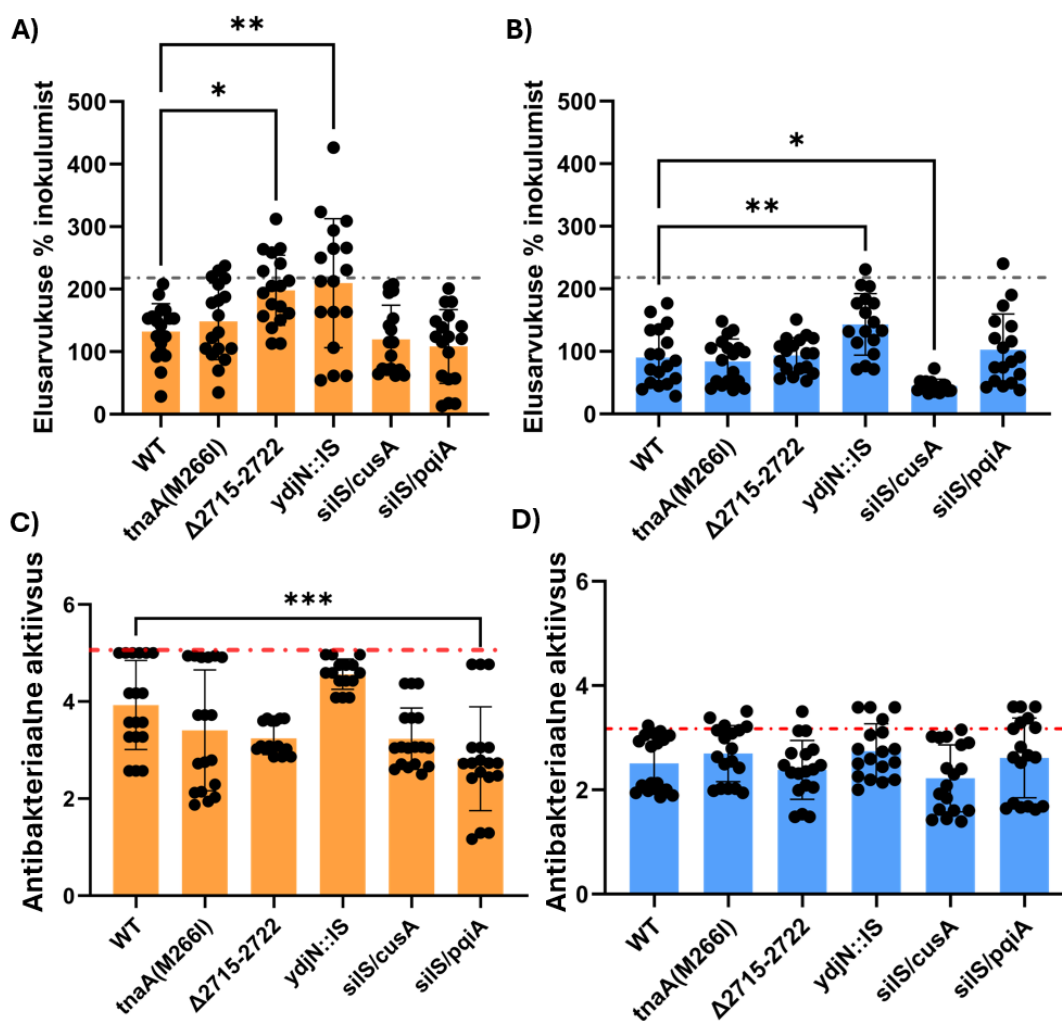
olla põhjendatav muteerunud *ompC* ja *zraS*iga ning H2\_KV puhul *apt* geeni mutatsiooniga (vt alapeatükk 2.3.2.2 ja 2.3.2.4).



**Joonis 4. Vasel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonide vask- ja hõbepinna tundlikkus.** NR-niiske orgaanikarikas, KV-kuiv orgaanikavaene. V-vask, H-hõbe. A ja B panel kirjeldavad NR tingimusi, C ja D KV tingimusi. Joonisel kujutavad oranžid tulbad vaskpinda, sinised hõbepinda. Katseid korrati 3 bioloogilises korduses, 2 tehnilises replikaadis (va vask KV 2 korda). Tulemusi on võrreldud vastava katse eellase vastu. Joonisel on toodud keskvärtused ja standardhälbed vearibadena. A ja B paneelidel olev punktiir rõhutab eellase kasvuprotsenti. C ja D paneelidel olev punktiir kirjeldab arvutuslikku bakterite algarvukust inokulumis pinnal kohta. Andmete analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi ja *post-hoc* test, usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Statistiliselt olulised tulemused on esile toodud tärnidega (\*= $p < 0,05$ ), (\*\*= $p < 0,01$ ), (\*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

### 2.3.4.2 Mutantide tundlikkus hõbeda- ja vasepindadele

Hindamaks huvipakkuvate mutatsioonide mõju vask- ja hõbepinna tolerantsile, viidi läbi pinnatestid evolutsioonikatse tingimustes võikeste modifikatsioonidega. Bakterite pinnaekspositsioon toimus avatud kaaneta kandilises Petri tassis, et tagada võimalikult ühtlane ventilatsioon vältimaks ebaühtlast inokulumi tilkade kuivamist, mis mõjutab bakterite elumust pinnal (Kaur et al., 2024). Evolutsioonikatses kasutati 6-kaevulisi plaate selleks, et vähendada ventilatsioonist tulenevat saastustiski. Ekspositsiooni pikkus valiti sõltuvalt keskkonnast. Huvipakkuvaid genoomseid muutusi kandvate mutantide pinnatundlikkuse hindamise eesmärgiks oli tuvastada, kas vask- ja hõbepindadele korduvalt eksponeeritud bakterid saavad neil pindadel paremini hakkama. NR tingimustes oodati muutust kasvamise võimes, KV tingimustes väiksemas suremuses. Katsete tulemused on toodud joonisel 5. NR keskkonnas hõbe- ja vaskpinnal oli kasvueelise mutandil *ydjN::IS* (joonis 5, A-B). Võimalik, et NR keskkonnas selekteeritud muutustel on tegu ekspositsiooni söötmespetsiifikaga, kuna orgaanilise saastelahuse komponendid mutsiin ja BSA on tsüsteiinirikkad võrreldes *E. coli* valkude keskmise 1% tsüsteiini sisaldusega (Miseta & Csutora, 2000). Mutsiinis on tsüsteiini 8,5% (Uniprot: A0A5G2QSD1), BSA-s 5,8% aminohapetest (Uniprot: P02769), mistõttu võib söötmes sisalduv tsüsteiin komplekseeruda vase ja hõbedaga ning seeläbi olla substraadiks YdjN transporterile. Sel juhul võiks eeldada, et *ydjN* katkestamine vähendab aminohapetega seotud metallide transporti rakku. Söötmespetsiifikat võib kinnitada asjaolu, et KV keskkonnas ei olnud häirunud tsüsteiini importeriga mutandil eelist kummalgi pinnal (joonis 5, C-D). NR keskkonnas oli eelis vaskpinnal ka  $\Delta 2715-2722$  deleetsioonmutandil, kuid põhjus ei ole lihtsasti seletatav. Vastupidiselt Sigrit Umerovi bakalaureusetöö MBC katsete tulemustele hõbedaiiooni juuresolekul (lisa 4), ei anna *silS* mutatsioonid hõbepinnal võrreldes metsiktüübiga (WT) eelist nagu hõbenitraadi juuresolekul vedelas keskkonnas. Huvitava kombel talub *silS/cusA* mutant NR keskkonnas hõbepinda oluliselt kehvemini kui metsiktüüp (WT). Tegemist võib olla lõivsuhtega metalli talumise ja kasvukiiruse vahel nagu on varasemalt näidatud hõbeda nanoosakeste tolerantsetel bakteritel on kasvundefektid (Alhajjar et al., 2022). Samas oli isolaat *silS/pqiA* oluliselt tundetum vaskpinnale KV tingimustes, mis võib olla seotud teiste isolaadis esinenud mutatsioonide kaasmõjuga (vt tabel 9).



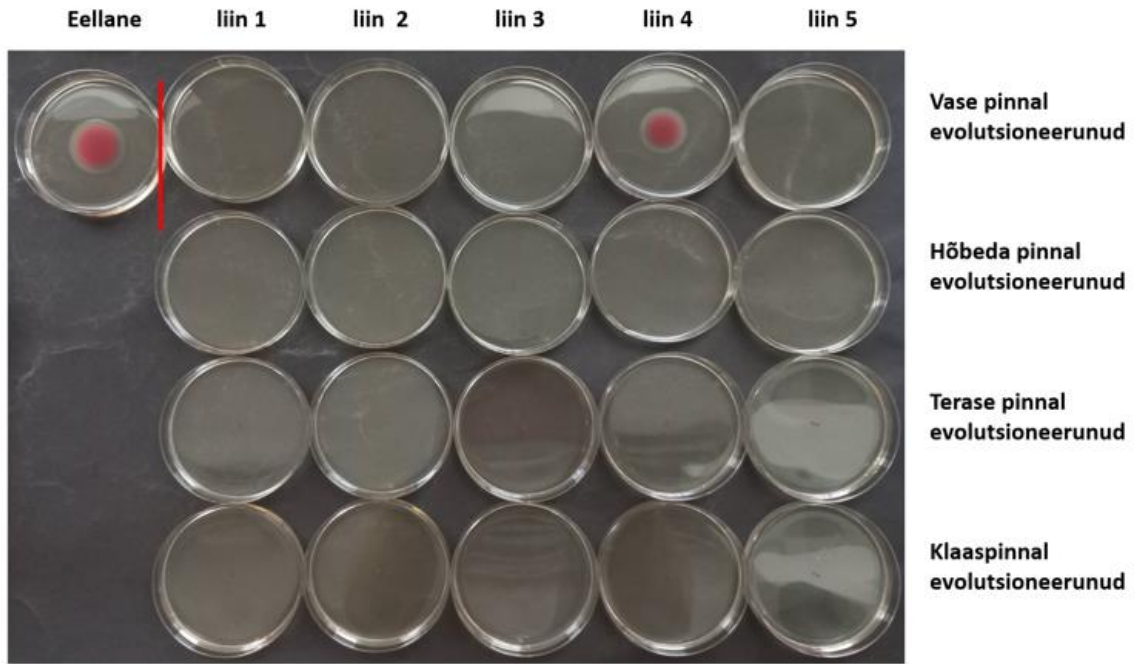
**Joonis 5. Huvipakkuvamate mutantide vask- ja hõbepinna tundlikkus.** Tähisted joonisel: NR-niske orgaanikarikas, KV-kuiv orgaanikavaene; WT- metsiktüüp, *E. coli* ATCC 8739;  $\Delta$ 2715-2722 – deletsioon mutant; *tnaA*(M266I) ja *ydjN::IS* – populatsioonidest isoleeritud mutantid; *silS/cusA* ja *silS/pqiA* – MBC katsest isoleeritud mutantid. A ja B paneel kirjeldavad NR tingimuse tulemusi, C ja D KV tingimuse tulemusi. Punane joon näitab määramispiiri, hall joon keskmist kasvu % klaaspinnal. Oranžid tulbad tähistavad vase pinda, sinised hõbeda pinda. Paneelil A ja B on näidatud, 6 h ajapunkti tulemusi, paneelil C 35 min ajapunkti tulemusi ning paneelil D 4 h ajapunkti tulemusi. Joonisel on esitatud keskväärtused ja vearibadena standardhälve. Andmete analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi ja *post-hoc* testi, usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Analüüsist on eemaldatud tõenäoliselt kõrvalekalduvad väärtused (ROUT Q=10%), Statistiliselt oluliselt erinevad väärtused WT-st on joonisel esile toodud tärnidega: (\*= $p < 0,05$ ), (\*\*= $p < 0,01$ ), (\*\*\*=  $p < 0,001$ ). Antimikroobse aktiivsusega käsitletakse elusarvukuse  $\log_{10}$  vähenemist võrreldes kontrollpinna või inokulumiga, siinkohal  $\log_{10}$ CFU/pind(inokulumis)- $\log_{10}$ CFU/pind(ekspositsioonijärgselt). Katseid on korratud 3 bioloogilises korduses.

### 2.3.4.3 Evolutsioneerunud populatsioonide ujumisliikuvus

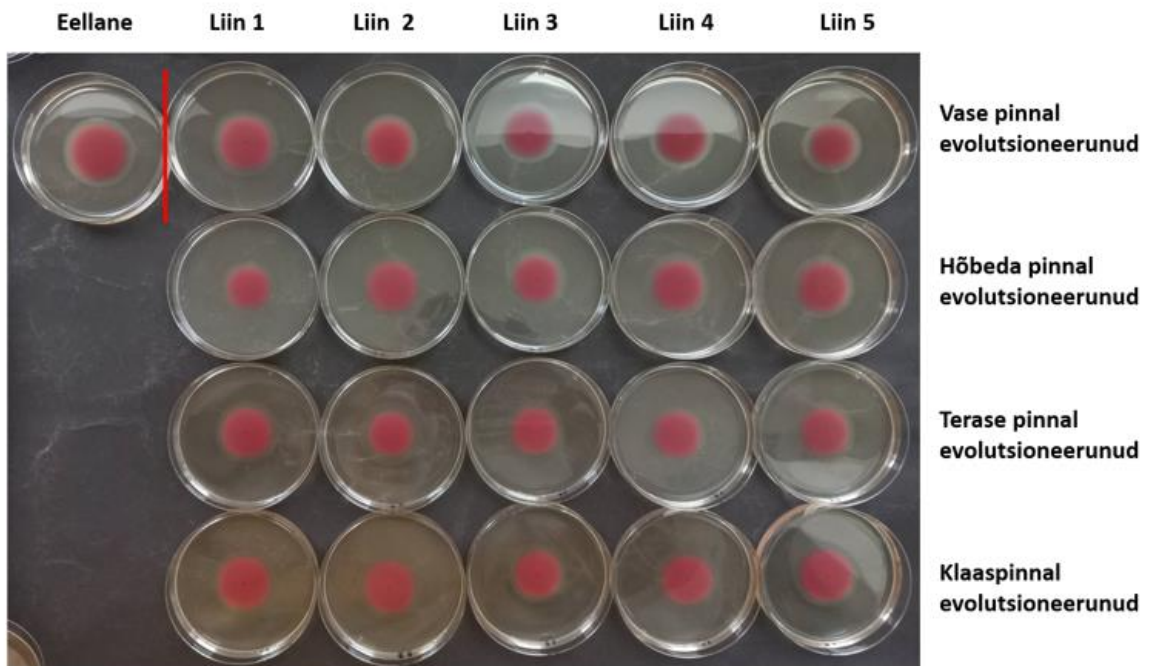
*E. coli* ATCC 8739 metsiktüübil on viburite poolt vahendatud ujumisvõime, mida uurisin oma bakalaureusetöös (Vaikla, 2022). Ujumine annab eelise vedelas keskkonnas ja võimaldab

kemotaktiliselt näiteks nii toitainetele lähemale liikuda kui ka ebasoodsates tingimustes vedelas või poolvedelas keskkonnas põgeneda. Suurenenud liikuvuse soodustavat rolli on näidatud nii patogeneesis kui ka AgNP tolerantsis (Stabryla et al., 2021). Ujumisliikumise seotud geenide inaktiveerimine võib aga aidata ka energiat kokku hoida, kuna liikumine on bakterile väga energiakulukas. Evolutsioonikatse järgsest mutatsioonianalüüsist selgus, et NR evolutsioonikatse eellases oli tekkinud mutatsiooni tagajärjel *fliI* geenis varajane stoppkoodon (W8\*) 90,3% sekveneeritud järjestustest ning see mutatsioon fikseerus kõigis NR populatsioonides. Kirjandusest on teada, et *fliI* deletsioonitüved on liikumatud (Erhardt et al., 2014) mistõttu tekkis kahtlus, et ka NR tingimustes evolutsioneerunud populatsioonid on liikumisvõimetud. Selle kontrollimiseks viidi läbi ujumiskatse, mille tulemus kinnitas (joonis 6) tekkinud kahtlust. Niiske ja orgaanikarikka katse eellase ujumisvõime (joonis 6, ülemine paneel) on sarnane kuiva ja orgaanikavaese katse eellase ujumisvõimega (joonis 6, alumine paneel), milles võib järeldada, et niiske ja orgaanikarikka katse eellase 9,7% ujumisvõimelistest bakteritest said poolpehmes söötmes kasvueelise. Kuna tegemist on stoppkoodoniga, siis võib toimuda juhuslik stoppkoodoni reversioon. Ujumiskatset korrati 3 erineval korral, nähti erineval ajahetkedel toimuvaid juhuslikke reversioone NR populatsioonides katsest katsesse (lisa 5). Seega kui evolutsioonikatse keskkonnas oleks ujumisliikumine andnud eelise, siis seleksioon oleks pidanud toimuma ujumisliikumise säilitamise suunas.

12 h, 37° C Ujumisliikumise test NR-s evolutsioneerunud populatsioonidele



12h, 37° C Ujumisliikumise test KV-s evolutsioneerunud populatsioonidele

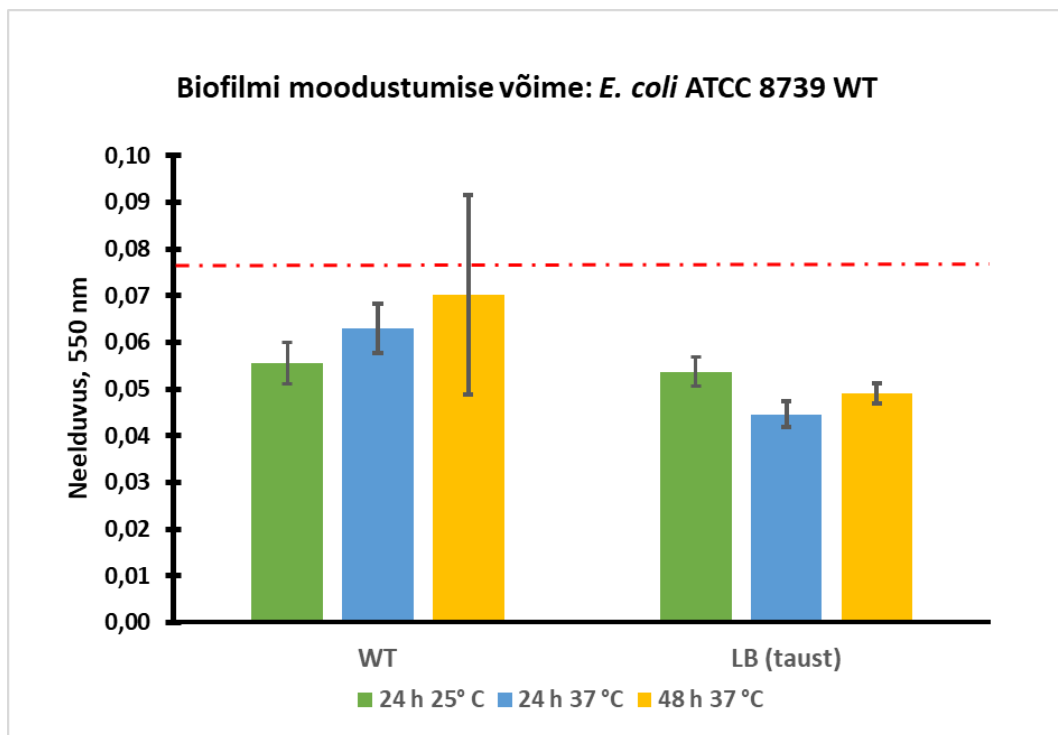


**Joonis 6. Populatsioonide viburist sõltuv liikumisvõime.** Ujumisliikumist uuriti torkekülviga 0,3% LB tardsöötmesse, kuhu oli lisatud 0,005% tetrasooliumkloriidi (TTC), inkubeeriti 8h 12h 24 h, 37 C. Esitatud on 12 h tulemused, kus tulemused on kõige paremini jälgitavad. Katset korrati KV populatsioonide puhul ühel ja NR puhul 3 korral. Niiskes toitainerikas keskkonnas evolutsioneerunud populatsioonid on enamasti pärsitud ujumisliikuvusega võrreldes eellasega (Va vase liin 4, kus toimus tõenäoliselt varakult stoppkoodoni reversioon) (ülemine paneel). Võrreldes eellasega pole kuivas toitainevaeses keskkonnas liikumine oluliselt pärsitud (alumine paneel).

#### 2.3.4.4 Biofilmi moodustamise võime

Biofilm on bakterite tavapärane substraadile, teineteisele või keskkondade piirpindadele kinnitunud kooseluvorm, mis võimaldab ebasoodsaid tingimusi üle elada. Biofilmi moodustub raskemetallide juuresolekul vähem (J.-H. Lee et al., 2014; Syed et al., 2021; F. Xu et al., 2022). On teada, et biofilmid on tihti krooniliste infektsioonide põhjuseks ning sageli ka antibiootikumidele tolerantsemad (nt Penesyan et al., 2019). Seetõttu oli oluline hinnata, kas korduv ekspositsioon antimikroobsetele metallpindadele võib tõsta biofilmi moodustumise võimet. Näiteks on varem nähtud, et vasepinnal evolutsioneerunud populatsioonides moodustus LB-s kasvatades biofilmi hoopis vähem võrreldes eellasega (F. Xu et al., 2022).

Biofilmi katsed kristallvioletiga ebaõnnestusid, kuna uuritav tüvi ei moodusta kasutatud tingimustes mõõdetavas hulgas biofilmi biomassi (joonis 7). Probleem ei olnud tõenäoliselt Calgary seadme analoogis, kuna katsetati ka biofilmi moodustumist samas süsteemis *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-ga ja teiste *E. coli* tüvedega, mis olid võimelised samas süsteemis biofilmi tootma (meie töögrupi avaldamata andmed). Ka *E. coli* ATCC 8739 puhul on varem näidatud O'Toole'i (O'Toole, 2011) meetodikaga mõõdetava biofilmi teket kristallvioletiga töötlemisel 37 °C juures peale 24 h inkubatsiooni LB-s (Jubair et al., 2022). Võimalik, et kuigi biofilmi moodustamise võime võib olla seotud patogeensusega, sõltub selle regulatsioon suurel määral peremeesorganist sõltuvalt ja ei ole üheselt ülekantav laia kasutusega laborimetoodikatesse. *E. coli* MG1655 on võimeline moodustama biofilmi mikroitiiterplaadis 25 °C juures, samas kui patogeene tüvi O157:H7 ja probiootiline Nissle 1917 tüvi moodustasid kordades vähem biofilmi biomassi, kui *E. coli* MG1655 (H. Liu et al., 2024). Eelmainitud artiklis kasutatakse ka mitmeid mikroskoopial põhinevaid meetodeid biofilmi uurimiseks: konfokaallaset skaneerivat mikroskoopiat (CLSM), skaneerivat eletronmikroskoopiat ja ka FTIR mikrospektroskoopiat. Eelnimetatud meetodid võiksid aidata edaspidi uurida evolutsioneerunud populatsioonide biofilmi omadusi, kuid nende meetodite optimeerimine ületanuks käesoleva magistritöö mahtu.



**Joonis 7. *E. coli* ATCC 8739 biofilmi biomassi moodustumine.** Staatilise biofilmi pilootkatse 24 h 25 °C, 24 h 37 °C ja 48 h 37 °C. Nelja tehnilise korduse keskväärtus, vearibadena standardhälve. WT- *E. coli* ATCC 8739 metsiktüüp, LB- bakterita sööde, tausta hindamiseks. Punane punktiir näitab kristallvioleti puhul mõõdetava optilise tiheduse lineaarse vahemiku alampiiri konkreetse vedelikukihi paksuse ja seadme korral. Kuna WT moodustatud biofilmi neelduvuse väärtused jäävad igas testitud tingimuses alla määramispiiri, siis tuleb tõdeda, et *E. coli* ATCC 8739 ei moodusta käesolevates tingimustes piisavalt biofilmi biomassi, et selle muutusi kristallvioleti meetodil hinnata.

## KOKKUVÕTE

Bakterite evolutsiooni antimikroobsetel pindadel on vähe uuritud, mistõttu ei ole teada milliseid kaitsemehhanisme bakterid lisastressoritega pinnakontekstis eelistatult kasutavad. Varasemalt on näidatud, et vaseiooni ja hõbedaiooni ekspositsioon suurendab antibiootikumide ristresistentsuse riski. Välja selgitamiseks muutusi *E. coli* ATCC 8739 genoomis ja metallpindade tundlikkuses peale korduvat ekspositsiooni antimikroobsetele hõbe- ja vaskpindadele, disainiti ja viidi läbi kaks laborievolutsiooni katset, mis jäljendasid reaalelulähedasi tingimusi saastunud puutepindadel.

Käesolevas magistritöös leiti, et evolutsioon antimikroobsetel vask- ja hõbepindadel ei suurendanud mutatsioonide tekkesagedust. Erinevate mutatsioonitüüpide esinemine oli sõltuv keskkonnast, mitte pinnatüübist, mis viitab, et võimalike kohanemismehhanismide seleksioon oli poolkuivades tingimustes mõjutatud eelkõige ekspositsioonikeskkonnast. Väljavoolupumpade ning vase ja hõbeda homöostaasiga seotud geenide muteerumist vask- ja hõbepindadel ei täheldatud vastupidiselt kirjanduses näidatud vedelsöötme keskkonna vase ja hõbedaiooni juuresolekul läbiviidud laborievolutsiooni katsetele.

Evolutsioneerunud populatsioonide tundlikkus hõbe- ja vaskpindadele vähenes, kuid mitte kõikides evolutsioonikatse populatsioonides. Tundlikkuse muutuste põhjuslikkust ei ole võimalik genoomis esinevate mutatsioonidega üheselt selgitada. Küll aga tuvastati, et tsüstiini importeri funktsiooni kadu IS elemendiga katkestamise tõttu võimaldab nii vase kui hõbeda pinnal kasvada ja ellu jääda paremini kui metsiktüüp, kuid efekt on tõenäoliselt spetsiifiline tsüsteiinirikmale ekspositsioonikeskkonnale.

Evolutsioonikatse järgselt vedelas katseformaadis hõbedatundlikkuse katsetest esile kerkinud *SilS* mutatsioone kandvatel hõbedaresistentsetel isolaatidel ei olnud pindadel tugevat eelist võrreldes metsiktüübiga. Need tulemused näitavad veelgi, et ioonispetsiifilised kaitsemehhanismid ei pruugi anda eelist pinnakontekstis.

Lõpetuseks, korduv ekspositsioon antimikroobsetele vask- ja hõbepindadele ei põhjustanud hüpermutaatori esile kerkimist. Kuigi evolutsioneerunud populatsioonide seas oli populatsioone, mille tolerantsus vask- või hõbepindadele oli vähesel määral suurenenud võrreldes eellasega, ei olnud tegemist kõiki populatsioone hõlmava trendiga. Samuti ei selekteeritud mutatsioone samades geenides erinevates keskkondades. Kuna genoomne taust ei võimaldanud tolerantsi suurenemist üheselt selgitada, tuleks teha täiendavaid katseid isolaatide ja ühe lookuse mutantidega, selgitamiseks välja tolerantsi muutumise põhjused.

## RESÜMEE/SUMMARY

### Laboratory evolution of *Escherichia coli* ATCC 8739 on antimicrobial metal surfaces

Sandra Park

#### Summary

Antimicrobial surfaces may contribute to reduction of bioburden and potential pathogen carryover on touch surfaces. However, even surfaces with high antimicrobial activity do not eliminate 100% of bacteria in all conditions. Consequently, the few bacteria that survive on antimicrobial surface, may gain tolerance mechanisms through evolution. Increased metal ion tolerance may contribute to increased tolerance of antibiotics and other antimicrobial agents via the same molecular mechanism, for example by activating efflux pumps. There is a lack of studies of bacterial evolution on antimicrobial surfaces in application-relevant conditions. To investigate changes in phenotypic tolerance to antimicrobial surfaces and accumulation of mutations in bacteria repeatedly exposed to copper and silver surfaces in real-life-like conditions, two thirty-cycles long evolution experiments with *E. coli* strain ATCC 8739 were designed and conducted. In one of those, bacteria were exposed to silver and copper in high-organic humid conditions and in the other one, in low-organic dry conditions to imitate surfaces exposed frequently to splashes of body fluids or surfaces experiencing occasional water aerosols, respectively. Bacterial evolution on stainless steel and glass surfaces was used as control for the respective exposure environment. In each specific environment, five parallel bacterial populations were evolved. The whole genomes of all separately evolved populations were sequenced and whole-genome mutation analysis was carried out using breseq pipeline.

Mutation analysis of evolved populations revealed that copper- and silver-exposed populations did not accumulate more mutations than those on stainless steel and glass control surfaces. This indicates that no hypermutator genotypes emerged during the evolution experiment. Interestingly the proportion of specific mutation type differed depending on the exposure conditions not surface type. Populations evolved in humid high-organic conditions had more new DNA junctions (indicating structural genomic variation) than single nucleotide variants (SNVs). In low-organic dry conditions the opposite was observed. This suggests that the presence of organic soiling may also influence evolutionary scenarios of potential tolerance mechanisms on antimicrobial copper and silver surfaces.

Some evolution experiments in the presence of copper and silver ions in liquid media have shown cross-resistance to antibiotics, often due to mutations in efflux-related genes. However, in this thesis, efflux-related mutations in copper or silver surface exposed populations were not

observed. Sequencing data of copper and silver evolved populations revealed only one population that carried mutated outer membrane porin encoding *ompC* that has been controversially indicated in increased tolerance of both metal ions and antibiotics. No mutations in genes known directly affect copper or silver tolerance were found. This indicates that efflux systems are not as critical in metal surface tolerance as they are in metal ion tolerance in liquid test format. Furthermore, this also indicates that findings from ion exposure experiments are not at least directly transferrable to surface context.

Copper and silver surface efficacy tests with evolved populations revealed that two or three populations from both evolving conditions coped better with surfaces compared to ancestor, except for copper lineages from high-organic humid conditions that did not show any physiological adaption to copper surfaces. For the populations which had adapted to antimicrobial metal surfaces, there is no clear genomic explanation for the observed adaption.

To further investigate potential of accumulated mutations in copper or silver tolerance, one mutant was constructed and two mutants were isolated from evolved populations. The mutant carrying *ydjN*::IS mutation showed significant growth advantage on copper and silver surfaces compared to the wild-type strain in high-organic humid conditions. Latter is probably due to cysteine content in the exposure medium that may cause formations copper or silver and cysteine complexes, which are toxic to cells. Inactivation of *ydjN* gene by IS prevents import of these toxic cysteine-metal complexes into the cell.

From minimal bactericidal concentration (MBC) assays conducted with evolved populations, two silver resistant colonies emerged that were isolated, sequenced and included into copper and silver tolerance testing. Sequencing data revealed, that both carried a different *silS* gene mutation, probably causing increased copper and silver tolerance in liquid MBC tests. Notably, said *silS* mutations emerged *de novo* only after exposure to the high concentration of silver nitrate, and were not detected in evolved populations. Isolates carrying *silS* mutations did not show increased silver surface tolerance.

To conclude, this study showed that bacterial evolution on antimicrobial metal surfaces is dependent on exposure conditions and is unlikely to result in a hypermutator genotype or rapid acquisition of cross-resistance mechanisms with antibiotics, as has been observed in liquid format evolution experiments in the presence of copper or silver ion. This thesis also demonstrates that mutations that are useful in liquid environment may not be as useful on surfaces and vice versa.

## TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Merilin Rosenbergi ja Angela Ivaskit mitmekesise toetuse ja mõistvuse eest. Tänan, et nägite minus potentsiaali. Tänan ka oma juhendatavat Sigrít Umerovi meeldiva koostöö eest evolutsioneerunud populatsioonide iseloomustamisel ja tulemuste interpreteerimisel sama projekti raames. Lisaks soovin tänada meie uurimisgrupi liikmeid, keda kohtasin laboris sageli: Brendat, Hannat ja Harleeni – teie huumorimeel ja sõbralikkus tegid ka väga pikad katsepäevad kiiremini mööduvaks. Viimaks tänan Heili Ilvest *E. coli* CC118  $\lambda$  pir tüve eest ning Rita Hõrakut pSNW2 plasmidi eest.

Käesolev magistritöö on seotud Eesti Teadusagentuuri projekti PRG1496 ja Haridus- ja Teadusministeeriumi projektiga TK210.

Töös kasutatud joonis 1 on loodud Biorenderi (biorender.com) abil.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Aiking, H., Kok, K., van Heerikhuizen, H., & van 't Riet, J. (1982). Adaptation to Cadmium by *Klebsiella aerogenes* Growing in Continuous Culture Proceeds Mainly via Formation of Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 938–944. <https://doi.org/10.1128/aem.44.4.938-944.1982>
- Alhajjar, R. K., Roche, K. M., & Techtmann, S. M. (2022). Comparative Analysis of the Mechanism of Resistance to Silver Nanoparticles and the Biocide 2,2-Dibromo-3-Nitrilopropionamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(6), e02031-21. <https://doi.org/10.1128/aac.02031-21>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anraku, Y., & Gennis, R. B. (1987). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 262–266. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90131-9](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90131-9)
- Armbruster, C. R., Marshall, C. W., Garber, A. I., Melvin, J. A., Zemke, A. C., Moore, J., Zamora, P. F., Li, K., Fritz, I. L., Manko, C. D., Weaver, M. L., Gaston, J. R., Morris, A., Methé, B., DePas, W. H., Lee, S. E., Cooper, V. S., & Bomberger, J. M. (2021). Adaptation and genomic erosion in fragmented *Pseudomonas aeruginosa* populations in the sinuses of people with cystic fibrosis. *Cell reports*, 37(3), 109829. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109829>
- Awano, N., Wada, M., Kohdoh, A., Oikawa, T., Takagi, H., & Nakamori, S. (2003). Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on l-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2), 239–243. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1262-2>
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., & Takagi, H. (2005). Identification and Functional Analysis of *Escherichia coli* Cysteine Desulfhydrases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4149–4152. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4149-4152.2005>
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Binns, D., Dimmer, E., Huntley, R., Barrell, D., O'Donovan, C., & Apweiler, R. (2009). QuickGO: A web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics*, 25(22), 3045–3046. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp536>
- Blanco Massani, M., Klumpp, J., Widmer, M., Speck, C., Nisple, M., Lehmann, R., & Schuppler, M. (2018). Chromosomal Sil system contributes to silver resistance in *E. coli* ATCC 8739. *BioMetals*, 31(6), 1101–1114. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0143-1>
- Bleichert, P., Bütof, L., Rückert, C., Herzberg, M., Francisco, R., Morais, P. V., Grass, G., Kalinowski, J., & Nies, D. H. (2020). Mutant Strains of *Escherichia coli* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Obtained by Laboratory Selection To Survive on

- Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(1), e01788-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01788-20>
- Blount, Z. D., Borland, C. Z., & Lenski, R. E. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(23), 7899–7906. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803151105>
- Bougdour, A., Wickner, S., & Gottesman, S. (2006). Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of  $\sigma$ S stability in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 20(7), 884–897. <https://doi.org/10.1101/gad.1400306>
- Boyd, S. M., Rhinehardt, K. L., Ewunkem, A. J., Harrison, S. H., Thomas, M. D., & Graves, J. L. (2022). Experimental Evolution of Copper Resistance in *Escherichia coli* Produces Evolutionary Trade-Offs in the Antibiotics Chloramphenicol, Bacitracin, and Sulfonamide. *Antibiotics*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060711>
- Budd, A., Blandin, S., Levashina, E. A., & Gibson, T. J. (2004). Bacterial  $\alpha$ 2-macroglobulins: Colonization factors acquired by horizontal gene transfer from the metazoan genome? *Genome Biology*, 5(6), R38. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-r38>
- Calvo, P. A., Mateo-Cáceres, V., Díaz-Arco, S., Redrejo-Rodríguez, M., & de Vega, M. (2023). The enterohemorrhagic *Escherichia coli* insertion sequence-excision enhancer protein is a DNA polymerase with microhomology-mediated end-joining activity. *Nucleic Acids Research*, 51(3), 1189–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad017>
- CEN. (2015). *EN 13697:2015+A1:2019 chemical disinfectants and antiseptics—Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas—Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)*.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–1776.
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Cooper, R. A., Knowles, P. F., Brown, D. E., McGuirl, M. A., & Dooley, D. M. (1992). Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal*, 288(Pt 2), 337–340.
- Crane, J. K., Cheema, M. B., Olyer, M. A., & Sutton, M. D. (2018). Zinc Blockade of SOS Response Inhibits Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Enteric Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00410>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

- Deatherage, D. E., & Barrick, J. E. (2014). Identification of mutations in laboratory evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1151*, 165–188. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6_12)
- DeFeyter, R. C., & Pittard, J. (1986). Genetic and molecular analysis of aroL, the gene for shikimate kinase II in Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, *165*(1), 226–232. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.226-232.1986>
- Deutch, C. E., Spahija, I., & Wagner, C. E. (2014). Susceptibility of Escherichia coli to the toxic L-proline analogue L-selenaproline is dependent on two L-cystine transport systems. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(5), 1487–1499. <https://doi.org/10.1111/jam.12623>
- Doan, N., & Gettins, P. G. W. (2008).  $\alpha$ -Macroglobulins Are Present in Some Gram-negative Bacteria: CHARACTERIZATION OF THE  $\alpha$ 2-MACROGLOBULIN FROM ESCHERICHIA COLI\*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(42), 28747–28756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803127200>
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L., & Bukau, B. (2002). ClpS, a Substrate Modulator of the ClpAP Machine. *Molecular Cell*, *9*(3), 673–683. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00485-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00485-9)
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., & Zhu, G. (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, *53*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100335>
- Echave, P., Esparza-Cerón, M. A., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., Membrillo-Hernández, J., & Lin, E. C. C. (2002). DnaK dependence of mutant ethanol oxidoreductases evolved for aerobic function and protective role of the chaperone against protein oxidative damage in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(7), 4626–4631. <https://doi.org/10.1073/pnas.072504199>
- EPA. (2022). *Test method for evaluating the efficacy of antimicrobial surface coatings MB-40-00*.
- Erhardt, M., Mertens, M. E., Fabiani, F. D., & Hughes, K. T. (2014). ATPase-Independent Type-III Protein Secretion in Salmonella enterica. *PLOS Genetics*, *10*(11), e1004800. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004800>
- Essa, A. M. M., Al Abboud, M. A., & Khatib, S. I. (2018). Metal transformation as a strategy for bacterial detoxification of heavy metals. *Journal of Basic Microbiology*, *58*(1), 17–29. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700143>
- Fan, B., Grass, G., Rensing, C., & Rosen, B. P. (2001). Escherichia coli CopA N-Terminal Cys(X)2Cys Motifs Are Not Required for Copper Resistance or Transport. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *286*(2), 414–418. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5367>
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., & Nies, D. H. (2003). Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *185*(13), 3804–3812. <https://doi.org/10.1128/jb.185.13.3804-3812.2003>

- Giachino, A., & Waldron, K. J. (2020). Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. *Molecular Microbiology*, *114*(3), 377–390. <https://doi.org/10.1111/mmi.14522>
- Giese, B., & McNaughton, D. (2002). Surface-Enhanced Raman Spectroscopic and Density Functional Theory Study of Adenine Adsorption to Silver Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*, *106*(1), 101–112. <https://doi.org/10.1021/jp010789f>
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *286*(5), 902–908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5474>
- Graves, J. L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S. H., & Barrick, J. E. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Genetics*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>
- Harris, S., Piotrowska, M. J., Goldstone, R. J., Qi, R., Foster, G., Dobrindt, U., Madec, J.-Y., Valat, C., Rao, F. V., & Smith, D. G. E. (2018). Variant O89 O-Antigen of *E. coli* Is Associated With Group 1 Capsule Loci and Multidrug Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02026>
- Hayashi, S., Itoh, K., & Suyama, K. (2015). Genes of *Bacillus subtilis* 168 that Support Growth of the Cyanobacterium, *Synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1 on Agar Media. *Microbial Ecology*, *70*(3), 849–852. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0610-y>
- ISO. (2011). *ISO 22196:2011 measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces*.
- Janssens, A., Nguyen, V. S., Cecil, A. J., Van der Verren, S. E., Timmerman, E., Deghelt, M., Pak, A. J., Collet, J.-F., Impens, F., & Remaut, H. (2024). SlyB encapsulates outer membrane proteins in stress-induced lipid nanodomains. *Nature*, *626*(7999), 617–625. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06925-5>
- Jubair, N., R., M., Fatima, A., Mahdi, Y. K., & Abdullah, N. H. (2022). Evaluation of Catechin Synergistic and Antibacterial Efficacy on Biofilm Formation and *acrA* Gene Expression of Uropathogenic *E. coli* Clinical Isolates. *Antibiotics*, *11*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091223>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kaur, H., Rosenberg, M., Kook, M., Danilian, D., Kisand, V., & Ivask, A. (2024). Antibacterial activity of solid surfaces is critically dependent on relative humidity, inoculum volume, and organic soiling. *FEMS Microbes*, *5*, xtad022. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad022>
- Kim, J., Webb, A. M., Kershner, J. P., Blaskowski, S., & Copley, S. D. (2014). A versatile and highly efficient method for scarless genome editing in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *BMC Biotechnology*, *14*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-84>

- Kishino, R., Saito, T., Muto, S., Tomita, Y., & Sekine, Y. (2024). Insertion sequence excision is enhanced by a protein that catalyzes branch migration and promotes microhomology-mediated end joining. *Genes to Cells*, 29(2), 131–149. <https://doi.org/10.1111/gtc.13090>
- Kragh, K. N., Alhede, M., Kvich, L., & Bjarnsholt, T. (2019). Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100006>
- Kusumoto, M., Ooka, T., Nishiya, Y., Ogura, Y., Saito, T., Sekine, Y., Iwata, T., Akiba, M., & Hayashi, T. (2011). Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nature Communications*, 2(1), 152. <https://doi.org/10.1038/ncomms1152>
- Lear, L., Hesse, E., Buckling, A., & Vos, M. (2022). Copper selects for siderophore-mediated virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 22(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02720-w>
- Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., & Wood, T. K. (2010). Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2088–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04611.x>
- Lee, J.-H., Kim, Y.-G., Cho, M. H., & Lee, J. (2014). ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological Research*, 169(12), 888–896. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.005>
- Lenski, R. E. (2017). Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *The ISME Journal*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.69>
- Li, G., & Young, K. D. (2015). A new suite of *tnaA* mutants suggests that *Escherichia coli* tryptophanase is regulated by intracellular sequestration and by occlusion of its active site. *BMC Microbiology*, 15(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0346-3>
- Li, H., & Xu, H. (2024). Mechanisms of bacterial resistance to environmental silver and antimicrobial strategies for silver: A review. *Environmental Research*, 248, 118313. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118313>
- Li, J., Phulpoto, I. A., Zhang, G., & Yu, Z. (2021). Acceleration of emergence of *E. coli* antibiotic resistance in a simulated sublethal concentration of copper and tetracycline co-contaminated environment. *AMB Express*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01173-6>
- Li, M., Li, J., Sun, J., He, Y., Chen, P., & Zhang, C. (2019). Is sulfidation a true detoxification process for silver nanoparticles?: From the perspective of chronic exposure. *Environmental Science: Nano*, 6(12), 3611–3624. <https://doi.org/10.1039/C9EN00989B>
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Williams, K. E. (1997). Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins. *Journal of Bacteriology*, 179(19), 6127–6132.

- Liu, H., Ma, J., Yang, P., Geng, F., Li, X., Lü, J., & Wang, Y. (2024). Comparative analysis of biofilm characterization of probiotic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1365562>
- Liu, S., & Zhang, X.-X. (2016). Small colony variants are more susceptible to copper-mediated contact killing for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, *65*(10), 1143–1151. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000348>
- Luk, K. F. S., Maki, A. H., & Hoover, R. J. (1975). Studies of heavy metal binding with polynucleotides using optical detection of magnetic resonance. Silver(I) binding. *Journal of the American Chemical Society*, *97*(5), 1241–1242. <https://doi.org/10.1021/ja00838a047>
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(20), 8344–8349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>
- Macritchie, D. M., & Raivio, T. L. (2009). Envelope Stress Responses. *EcoSal Plus*, *3*(2), 10.1128/ecosalplus.5.4.7. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.5.4.7>
- Mann, R., Holmes, A., McNeilly, O., Cavaliere, R., Sotiriou, G. A., Rice, S. A., & Gunawan, C. (2021). Evolution of biofilm-forming pathogenic bacteria in the presence of nanoparticles and antibiotic: Adaptation phenomena and cross-resistance. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 291. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01027-8>
- Martínez-García, E., & de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: Analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, *13*(10), 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>
- McDonald, M. J. (2019). Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO reports*, *20*(8), e46992. <https://doi.org/10.15252/embr.201846992>
- Menninger, J. R. (1979). Accumulation of peptidyl tRNA is lethal to *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *137*(1), 694–696. <https://doi.org/10.1128/jb.137.1.694-696.1979>
- Miseta, A., & Csutora, P. (2000). Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(8), 1232–1239. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026406>
- Molteni, C., Abicht, H. K., & Solioz, M. (2010). Killing of Bacteria by Copper Surfaces Involves Dissolved Copper. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(12), 4099–4101. <https://doi.org/10.1128/AEM.00424-10>
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W., & O'Halloran, T. V. (2000). Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *182*(20), 5864–5871. <https://doi.org/10.1128/jb.182.20.5864-5871.2000>
- Murray, L. M., Hayes, A., Snape, J., Kasprzyk-Hordern, B., Gaze, W. H., & Murray, A. K. (2024). Co-selection for antibiotic resistance by environmental contaminants. *Npj*

*Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00026-7>

- Nakamura, K., Seto, K., Isobe, J., Taniguchi, I., Gotoh, Y., & Hayashi, T. (2022). Insertion Sequence (IS)-Excision Enhancer (IEE)-Mediated IS Excision from the lacZ Gene Restores the Lactose Utilization Defect of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O121:H19 Strains and Is Responsible for Their Delayed Lactose Utilization Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(16), e00760-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00760-22>
- Newton, Wm. A., & Snell, E. E. (1964). Catalytic properties of tryptophanase, a multifunctional pyridoxal phosphate enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(3), 382–389. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.3.382>
- Norambuena, J., Al-Tameemi, H., Bovermann, H., Kim, J., Beavers, W. N., Skaar, E. P., Parker, D., & Boyd, J. M. (2023). Copper ions inhibit pentose phosphate pathway function in Staphylococcus aureus. *PLOS Pathogens*, 19(5), e1011393. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011393>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 47, 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A., & O'Halloran, T. V. (2001). The Independent cue and cusSystems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth inEscherichia coli \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30670–30677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104122200>
- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J., & O'Halloran, T. V. (2000). Transcriptional Activation of an Escherichia coliCopper Efflux Regulon by the Chromosomal MerR Homologue, CueR \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31024–31029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006508200>
- Penesyán, A., Nagy, S. S., Kjelleberg, S., Gillings, M. R., & Paulsen, I. T. (2019). Rapid microevolution of biofilm cells in response to antibiotics. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0108-3>
- Petit-Härtlein, I., Rome, K., de Rosny, E., Molton, F., Duboc, C., Gueguen, E., Rodrigue, A., & Covès, J. (2015). Biophysical and physiological characterization of ZraP from Escherichia coli, the periplasmic accessory protein of the atypical ZraSR two-component system. *Biochemical Journal*, 472(2), 205–216. <https://doi.org/10.1042/BJ20150827>
- Petitjean, M., Juarez, P., Meunier, A., Daguindau, E., Puja, H., Bertrand, X., Valot, B., & Hocquet, D. (2021). The rise and the fall of a Pseudomonas aeruginosa endemic lineage in a hospital. *Microbial Genomics*, 7(9), 000629. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000629>
- Plague, G. R., Boodram, K. S., Dougherty, K. M., Bregg, S., Gilbert, D. P., Bakshi, H., & Costa, D. (2017). Transposable Elements Mediate Adaptive Debilitation of Flagella in Experimental Escherichia coli Populations. *Journal of Molecular Evolution*, 84(5), 279–284. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9797-5>

- Pradel, E., Parker, C. T., & Schnaitman, C. A. (1992). Structures of the rfaB, rfaI, rfaJ, and rfaS genes of *Escherichia coli* K-12 and their roles in assembly of the lipopolysaccharide core. *Journal of Bacteriology*, *174*(14), 4736–4745. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4736-4745.1992>
- Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A., & Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *102*, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>
- Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., & O’Neill, A. J. (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(4), 1037–1046. <https://doi.org/10.1093/jac/dku523>
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2–3), 197–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00049-4)
- Rome, K., Borde, C., Taher, R., Cayron, J., Lesterlin, C., Gueguen, E., De Rosny, E., & Rodrigue, A. (2018). The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, *430*(24), 4971–4985. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.021>
- Rosche, W. A., & Foster, P. L. (2000). Determining Mutation Rates in Bacterial Populations. *Methods*, *20*(1), 4–17. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0901>
- Santo, C. E., Taudte, N., Nies, D. H., & Grass, G. (2008). Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of *Escherichia coli* on Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(4), 977–986. <https://doi.org/10.1128/AEM.01938-07>
- Schneider, D., Kaiser, W., Stutz, C., Holinski, A., Mayans, O., & Babinger, P. (2015). YbiB from *Escherichia coli*, the Defining Member of the Novel TrpD2 Family of Prokaryotic DNA-binding Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(32), 19527–19539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620575>
- Sentausa, E., Basso, P., Berry, A., Adrait, A., Bellement, G., Couté, Y., Lory, S., Elsen, S., & Attrée, I. (2020). Insertion sequences drive the emergence of a highly adapted human pathogen. *Microbial Genomics*, *6*(9), e000265. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000265>
- Shields, P., & Cathcart, L. A. (2011, november 1). *Motility Test Medium Protocol*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Motility-Test-Medium-Protocol-Shields-Cathcart/833f69a78390b63d49e5cade0081a9eb50794e88#citing-papers>
- Siguiet, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: The reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, *34*(Database issue), D32–36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>
- Sjollema, J., Zaat, S. A. J., Fontaine, V., Ramstedt, M., Luginbuehl, R., Thevissen, K., Li, J., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2018). *In vitro* methods for the evaluation of

- antimicrobial surface designs. *Acta Biomaterialia*, 70, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.001>
- Slawson, R. M., Lohmeier-Vogel, E. M., Lee, H., & Trevors, J. T. (1994). Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Biometals*, 7(1), 30–40. <https://doi.org/10.1007/BF00205191>
- Slawson, R. M., Trevors, J. T., & Lee, H. (1992). Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology*, 158(6), 398–404. <https://doi.org/10.1007/BF00276299>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Stabryla, L. M., Johnston, K. A., Diemler, N. A., Cooper, V. S., Millstone, J. E., Haig, S.-J., & Gilbertson, L. M. (2021). Role of bacterial motility in differential resistance mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Nature Nanotechnology*, 16(9), 996–1003. Scopus. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00929-w>
- Syed, A., Zeyad, M. T., Shahid, M., Elgorban, A. M., Alkhulaifi, M. M., & Ansari, I. A. (2021). Heavy Metals Induced Modulations in Growth, Physiology, Cellular Viability, and Biofilm Formation of an Identified Bacterial Isolate. *ACS Omega*, 6(38), 25076–25088. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04396>
- Taher, R., & de Rosny, E. (2021). A structure-function study of ZraP and ZraS provides new insights into the two-component system Zra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(3), 129810. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129810>
- The UniProt Consortium. (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Uehara, T., Suefuji, K., Valbuena, N., Meehan, B., Donegan, M., & Park, J. T. (2005). Recycling of the Anhydro-N-Acetylmuramic Acid Derived from Cell Wall Murein Involves a Two-Step Conversion to N-Acetylglucosamine-Phosphate. *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3643–3649. <https://doi.org/10.1128/jb.187.11.3643-3649.2005>
- Vaikla, S. (2022). *Escherichia coli* pinnal liikuvuse testsüsteemi väljatöötamine ja liikuvuse analüüs metallistressi tingimustes.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., & Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 709–730. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303661>
- Wadhwa, N., & Berg, H. C. (2021). Bacterial motility: Machinery and mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00626-4>
- Wan, Y., Sabnis, A., Mumin, Z., Potterill, I., Jauneikaite, E., Brown, C. S., Ellington, M. J., Edwards, A., & Sriskandan, S. (2023). *IS1-related large-scale deletion of chromosomal regions harbouring oxygen-insensitive nitroreductase gene nfsB causes nitrofurantoin heteroresistance in Escherichia coli* (lk 2023.04.03.535367). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535367>

- Warnes, S. L., Caves, V., & Keevil, C. W. (2012). Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environmental Microbiology*, *14*(7), 1730–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02677.x>
- Warnes, S. L., Green, S. M., Michels, H. T., & Keevil, C. W. (2010). Biocidal Efficacy of Copper Alloys against Pathogenic Enterococci Involves Degradation of Genomic and Plasmid DNAs. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(16), 5390–5401. <https://doi.org/10.1128/AEM.03050-09>
- Weichart, D., Querfurth, N., Dreger, M., & Hengge-Aronis, R. (2003). Global Role for ClpP-Containing Proteases in Stationary-Phase Adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *185*(1), 115–125. <https://doi.org/10.1128/jb.185.1.115-125.2003>
- Wick, L. M., Quadroni, M., & Egli, T. (2001). Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environmental Microbiology*, *3*(9), 588–599. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00231.x>
- Wirth, N. T., Kozaeva, E., & Nikel, P. I. (2020). Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI—mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. *Microbial Biotechnology*, *13*(1), 233–249. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13396>
- Wu, K., Li, H., Cui, X., Feng, R., Chen, W., Jiang, Y., Tang, C., Wang, Y., Wang, Y., Shen, X., Liu, Y., Lynch, M., & Long, H. (2022). Mutagenesis and Resistance Development of Bacteria Challenged by Silver Nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *66*(10), e00628-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00628-22>
- Xu, F. F., & Imlay, J. A. (2012). Silver(I), Mercury(II), Cadmium(II), and Zinc(II) Target Exposed Enzymic Iron-Sulfur Clusters when They Toxicify *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(10), 3614–3621. <https://doi.org/10.1128/AEM.07368-11>
- Xu, F., Liu, S., Naren, N., Li, L., Ma, L. Z., & Zhang, X.-X. (2022). Experimental evolution of bacterial survival on metallic copper. *Ecology and Evolution*, *12*(8), e9225. <https://doi.org/10.1002/ece3.9225>
- Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Molecular Microbiology*, *56*(1), 215–227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04532.x>
- Yamanaka, K., Zheng, W., Crooke, E., Wang, Y.-H., & Inouye, M. (2001). CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *39*(6), 1572–1584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02345.x>
- Yohannes, E., Thurber, A. E., Wilks, J. C., Tate, D. P., & Slonczewski, J. L. (2005). Polyamine stress at high pH in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiology*, *5*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-59>

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

IS-finderi kodulehekülg, külastatud viimati aprill 2024: <http://www-is.biotoul.fr>

Barrick Lab kodulehekülg, Breseqi manuaal viimati kasutatud jaanuar 2024:

<https://barricklab.org/twiki/pub/Lab/ToolsBacterialGenomeResequencing/documentation/>

Biorender, viimati kasutatud 28.05.2024: <https://www.biorender.com/>

## LISAD

### Lisa 1. Mutantide konstrueerimiseks disainitud praimerid

0083 sisemine fwd	aacttcatgatcgttgcacgaaag
0083 sisemine rev	aaacttcgatgacaacgatcatgaagtc
0083 valimine praimer (D)	CAGTCAGAATTCcattcctttcgttttcggg
0083 valimine praimer fwd (A)	GACTCAGGATCCccccaaatactttgctgatc
0440 fwd OUT	CAGTCAGGATCCgatacgcacgcatactgtgc
0440 rev OUT	CAGTCAGAATTCgagttggtcatggaaaacgg
0440i fwd IN	gacgggcaatagtaggatgcg
0440i rev IN	gcgatcctacattgcccgctg
0440ii fwd	cagcaccattcaaatatcggtcg
0440ii rev IN	gaccgatattgaaatgggtgctgg
0511 fwd out	GACTCAGGATCCctgccgatcgtatcg
0511 rev	cacgatcgtatggtaaatacgtcaac
0511 rev out	CTGACAGAATTCgcaatcggccatcaggag
0511 sisemine fwd	gttgatcgtattaccacatcgtcgtgg
0730 fwd OUT	CAGTCAGGATCCgccgccagttgtgtattatc
0730 fwd stopp koodon	ggccacgattttagcctgtc
0730 rev OUT	GTCACAGAATTCagacttttctcacctgtcgc
0730 stopp rev	gacaggctaaaaatcgtggcc
0961 fwd IN flank	tgcacgagccagttagcaataatggcgctgcatg
0961 fwd OUT	CTGACAGGATCCgaagtcgggcaacgag
0961 rev IN flank	catgcagcgcattattggctaactggctcatgcac
0961 rev OUT	CAGTCAGAATTCcaggcgcttcgtaaacg
1157 fwd IN	gctcggttatactgccgattg
1157 fwd OUT	CAGTCAGGATCCgtcatgatctttatttgagtacgc
1157 rev IN	caatcggcagtataaccgagc
1157 rev OUT	CTGACAGAATTCgcaatccatccgccg
1435 fwd IN SNP	gtccacctaggtgactacaaaatcaacctgc
1435 fwd OUT	CTGACAGGATCCCCGgtagcgtgaagcggC
1435 rev IN SNP	caggttgattttgtagtcaacctaggtggaca
1435 rev OUT	CAGTCAGAATTCgattcaccagtggccccg
1701in-F	ctgccgttatctcctgggcagcagtcaggcgc
1701in-R	gcgcctgactcgtgccccaggagataacggcag
1701out-F	CTGACTGGATCCgtggtggtgcaacgtc
1701out-R	CTGACAGAATTCgcaaggtcatgacaggg
1835 fwd OUT	CAGTCAGGATCCgcgaggccaaatccgatg
1836 fwd IN flank	attcaccgaaggagggaatcatgggcaaagcaacg
1836 reV OUT	CAGTCAGAATTCtcgactttaccaagccaac
1836 rev OUT flank	cgttgctttgccatgacctttccctcctcgttg
1903 fwd IN flank	accgttgccagcataagacccgttctcctgatc
1903 fwd OUT	CAGTCAGGATCCggtagtgaaattcggataagagg
1903 kontroll	gaacatcgtggtgttcgttg
1903 kontroll F	actgattttgctaactgag
1903 rev IN flanking	gatcaggagaacggggttcttatgctggcaacggtc
1903 rev OUT	CAGTCAGAATTCcccacagtctgctggc

1988/1989 fwd IN	cgtttaacattgtaaaatctcctgttcacc
1988/1989 fwd OUT	CAGTCAGGATCCgtcagtaacctgaccacacg
1988/1989 rev IN	ggtgaacaggagattttacaatgattaaacg
1988/1989 rev OUT	GACTCAGAATTCccgcatcagcaaaaagtcg
2385/86-89 fwd IN	cttttattgaccgtagccacaggccctcaatg
2385/86-89 fwd OUT	CTGACTGGATCCctgaacttctgaaccattgttacg
2385/86-89 rev IN flank	gagggcctgtggctgatacggtaataaaaagag
2385/86-89 rev OUT	TGACTGTCTAGAgttctttttgtgccgccc
2392 fwd in	caggcaaaaacatctcgcgc
2392 fwd OUT	GTCACTGGATCCtcgcattcagaccgcag
2392 rev IN	gcgcgagatgtttttgcctg
2392 rev OUT	CAGTCAGAATTCcgttggtacgcacc
2454-66 fwd IN flank	gattggcgggtgatggggctcatataaatatgctcg
2454-66 fwd OUT	CTGACTGGATCCttgtcaatcaatgagttattcctc
2454-66 rev IN flank	atatttatatgaagccacatcaccgcacacac
2454-66 rev OUT	CAGTCAGAATTCcattcctgcaacagatcc
2521 fwd OUT copy	CAGTCAGGATCCccagtagaagaattaatgcagag
2521 rev OUT	CTGACAGAATTCgcaatcctccggtgc
2521H fwd IN	ctggcattcggagaggagc
2521h rev IN	agctcctctccgaatgccagc
2521K fwd IN	tattgcgtggtagacgatctcaaa
2521k rev IN copy	GTTTgaagatcgtctaccagc
2715 rev IN flanking	taccgccagagaggatcagaaaccaaagtggcg
2715/22 fwd IN flank	cgccactttggtttctgtacctctctggeggtag
2715/22 rev OUT	CTGACAGAATTCttgcaggtcagccatcg
2715/22/49 fwd OUT	CAGTCAGGATCCcggtgacttcatgtttacg
2715/49 fwd IN flanking	gccactttggtttctctgaagttgccctgaaaatg
2715/49 rev IN flanking	catttcaggggcaacttcacagaaaccaaagtggcg
2715/49 rev OUT	CAGTCAGAATTCcggtatcattattgtgaatttagc
2843 fwd IN	gttttctcgcgccgatc
2843 fwd OUT	GTCACAGGATCCcaccggtgatgttcg
2843 rev IN	atcgggcgcaggaaaaacc
2843 rev OUT	CAGTCAGAATTCagttgaactgcaccg
2971 fwd IN	caccaagatcatgaccaagaacaaacg
2971 fwd OUT	GACTCAGGATCCacgcacaaactgccag
2971 rev IN	cgttgttctttggtcatgatcttggtg
2971 rev OUT	CAGTCAGAATTCgcgatatttcggtattaccgg
3242 fwd IN flank	gactgtcacgcaaaactcattgttcatccacctac
3242 fwd OUT	CTGACAGGATCCacaatatctggagatcttactg
3242 rev IN flank	gtaaggtggatgaacattttgcgtgacagtcagc
3242 rev OUT	CAGTCTGAATTCtttcgagcgcctataactaac
3887 fwd IN flank copy	ttgctgaactgcatgccttcctttgatacaattcg
3887 fwd OUT	TCAGTCTCTAGAcgtattttcccttaaatccgc
3887 rev IN flank	tatcaaaggaaggcagatggacggtcagcaactg
3887 rev OUT	CAGTCAGAATTCcctacaatgcttgaatgaatgc
4286 fwd IN	cttgccggaaatgccagcatatc
4286 fwd OUT	CTGACAGGATCCgtgtttgagtatatgttgcgcg
4286 geeni piir fwd	CTGACTGGATCCttaaactctttaagttttgcggtg

4286 geeni piir rev	CAGTCAGAATTCatggaaaactttaacatcctcctg
4286 rev IN	atgctggcgattccgccaagaaag
4286 rev OUT	CAGTCAGAATTCgtggcgagagcaaac
psnw2F	gtaaacgacggccagt
psnw2R	acaggaaacagctatgacc
psltsR	ggtcttatggctcttgatctatcag
psltsF	ggcgagttacgggttgta

## Lisa 2. Huvipakkuvad mutatsioonid

Tabelis on toodud mutatsioonid, mis pakkusid huvi uurimaks nende adaptiivset efekti evolutsioneerunud vase ja hõbeda pinnatolerantsuses. Huvipakkuvamate mutatsioonide hulgas oli nii punktmutatsioone, kui IS-vahendatud deletsioone ja insertioone. Üldiselt valiti mutatsioone mille sagedus oli üle 20%.

Geen(id)	Mutatsioon(id)	Sagedus	Päritolu populatsioon
<b>EcolC_0083</b> ( <i>rfaJ</i> , <i>waaJ</i> )	S245C ( <u>A</u> GT→ <u>T</u> GT)	24%	NR V3
<b>EcolC_0511</b> ( <i>murA</i> )	Y393H ( <u>T</u> AT→ <u>C</u> AT)	66,7%	KV T5
<b>EcolC_0730</b> ( <i>nemR</i> , <i>ydhM</i> )	IS elemendi insertioon	93%	KV V4
<b>EcolC_0961</b> ( <i>cysN</i> )	Q440* ( <u>C</u> AG→ <u>T</u> AG)	100%	KV V5
<b>EcolC_1157</b> ( <i>yfhM</i> )	T986I ( <u>A</u> CA→ <u>A</u> TA)	100%	KV V4
<b>EcolC_1435</b> ( <i>ompC</i> )	Y343* ( <u>T</u> AC→ <u>T</u> AG)	100%	KV H1
<b>EcolC_1701</b> ( <i>fliI</i> )	W8* ( <u>T</u> GG→ <u>T</u> GA)	100%	Kõik NR populatsioonid
<b>EcolC_1836</b> ( <i>yeaR3</i> )	IS elemendi insertioon	91%	NR T3
<b>EcolC_1903</b> ( <i>ydjN</i> )	IS elemendi insertioon	21%	NR H2
<b>EcolC_1988/1989</b> ( <i>slyB</i> , <i>lanmK</i> , <i>ydhH</i> )	intergeenne (-3/-271) A→T	86,9%	KV H3
<b>EcolC_2385-2389</b>	ΔEcolC_2385-2389 IS-vahendatud	87%	KV T2
<b>EcolC_2392</b> ( <i>rssB</i> )	V120F ( <u>G</u> TT→ <u>T</u> TT)	100%	KV V3
<b>EcolC_2454-2466</b> ,	ΔEcolC_2454-2466 IS-vahendatud	16%	NR H5
<b>EcolC_2715-2722</b>	ΔEcolC_2715-2722 IS-vahendatud	18%-95%	NR H3, K3, K4, K2
<b>EcolC_2715-2749</b>	ΔEcolC_2715-2749 IS-vahendatud	13-56%	NR K1, K4, K5, T1
<b>EcolC_2843</b> ( <i>ybiB</i> )	G13R ( <u>G</u> GG→ <u>A</u> GG)	100%	KV V3
<b>EcolC_2971</b> ( <i>ybfE</i> )	A25T ( <u>G</u> CC→ <u>A</u> CC)	62%	NR T1
<b>EcolC_3242</b> ( <i>aroM</i> )	IS elemendi insertioon	91%	KV V2
<b>EcolC_3887</b>	IS elemendi insertioon	97%	KV V5
<b>EcolC_4286</b> ( <i>tnaA</i> )	M266I ( <u>A</u> TG→ <u>A</u> TT)	13-70%	NR H1-H5
<b>EcolC_0440</b> ( <i>acrF</i> )	Q29L ( <u>C</u> AA→ <u>C</u> TA), A12E ( <u>G</u> CA→ <u>G</u> AA)	16,5% ja 16,9%	KV T4
<b>EcolC_2521</b> ( <i>flgH</i> )	A97P ( <u>G</u> CG→ <u>C</u> CG) ja R73L ( <u>C</u> GA→ <u>C</u> TA)	53,9% JA 50%	KV H4 ja KV K1

### **Lisa 3. Kontrollpindadel esinevad mutatsioonid**

Tabelis on esitatud kontrollpindadel esinenud mutatsioonid. Tabelis on toodud mutatsioonid sagedustega 0,2-1, juhtudel kui sama mutatsioon esineb ka teistes evolutsioneerunud liinides on see kaasatud tabelisse ka juhul kui sagedus on 0,1. Kollasel taustal on esile tõstetud uued liited. K= klaas, T= teras, KV = kuiv ja orgaanika vaene, NR = niiske ja orgaanikarikas.

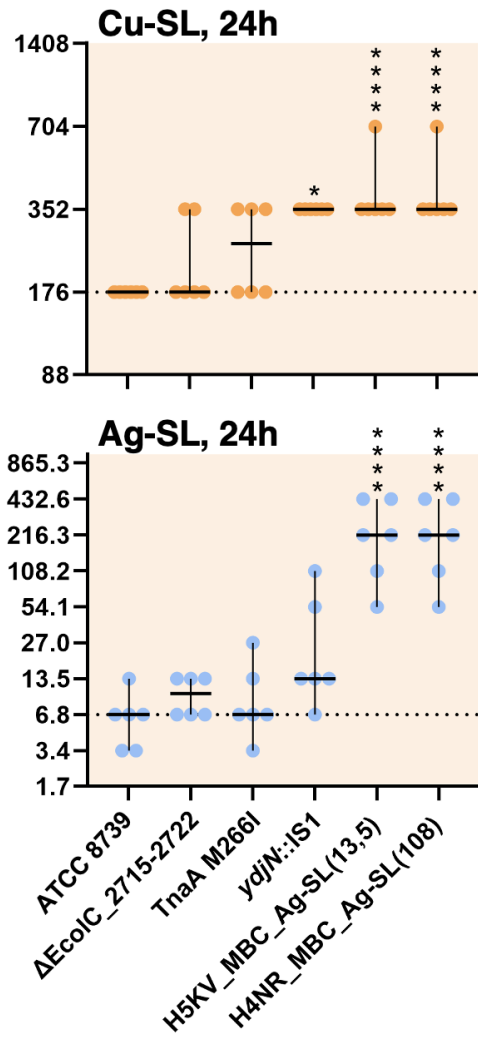
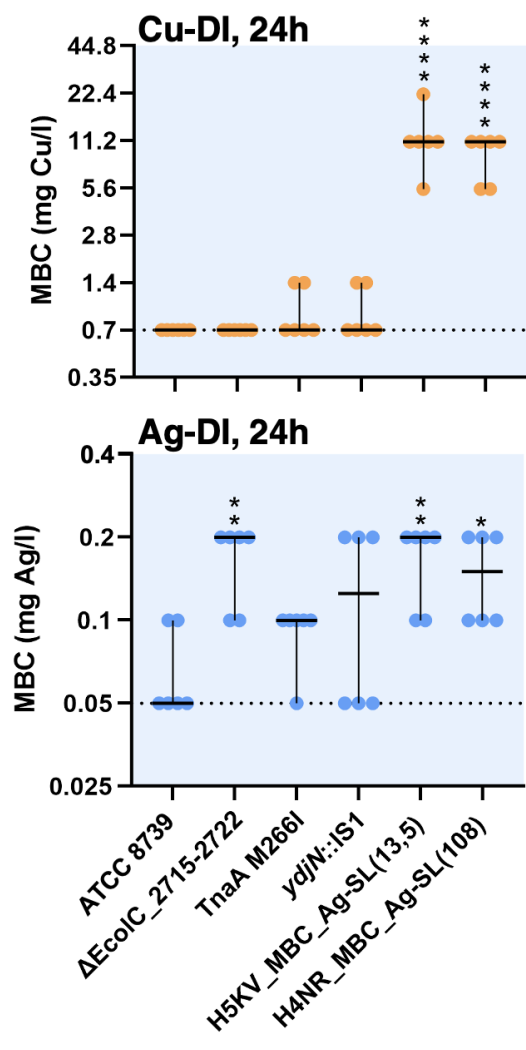
lookus/geen	mutatsioon	annotatsioon	K KV			K NR					T KV			T NR				
			1	3	4	1	2	3	4	5	2	4	5	1	2	3	4	5
EcolC_0041	T→C	intergeenne(-824)												0,4				
EcolC_0041	T→G	intergeenne(-828)												0,4				
EcolC_0041	T→A	intergeenne (-829)												0,4				
EcolC_0041	T→C	intergeenne (-849)												0,3				
EcolC_0158/ EcolC_0159	Δ38 bp	intergeenne (-19 ...-58/-114..-75)													1,0		0,1	
EcolC_0633	C→A	A15S (GCA→TCA)				0,3	0,1	0,1	0,1	0,6				0,3			0,1	
EcolC_0772	A→C	F231V (TTT→GTT)				0,2	0,2			0,2			0,2				0,1	
EcolC_0779	A→T	E399D (GAA→GAT)			0,6													
EcolC_0844	::IS3 (+)	kodeeriv (457-459/1623 nt)				0,6												
EcolC_1058	C→A	A11S (GCC→TCC)												0,3				
EcolC_1116	T→A	intergeenne (-105)								0,3								
EcolC_1117	T→A	intergeenne (-104)								0,3								
EcolC_1509	T→A	intergeenne (-419)			0,2							0,2	0,2	0,1				
EcolC_1720	A→C	intergeenne (-87)				0,1								0,6			0,1	
EcolC_1836	::IS4 (+)	kodeeriv (112-122/360 nt)													0,9		0,1	
EcolC_2105	T→G	F61C (TIT→TGT)		0,2	0,2			0,2			0,2			0,2			0,2	
EcolC_2385	T→G	E164A (GAA→GCA)											0,2					
EcolC_2386- EcolC_2389	Δ5770 bp	intergeenne (+389) kodeeriv(338/618 nt)								0,9								
EcolC_2447- EcolC_2453	min Δ4,593 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2454)										0,3						
EcolC_2455- EcolC_2456	min Δ2,116 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2454)												0,2				
EcolC_2521	C→A	R73L (CGA→CTA)	0,5															
EcolC_2528	Δ1 bp	kodeeriv (97/660 nt)		0,2														
EcolC_2572- EcolC_2573	Δ636 bp	kodeerivast (1842/ 2424) kodeerivasse (47/2019 nt)				0,3	0,1	0,1	0,2	0,6				0,3			0,1	
EcolC_2715- EcolC_2717	min Δ2,439 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)																
EcolC_2715- EcolC_2718	min Δ 3,459 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)														0,3		
EcolC_2715- EcolC_2720	min Δ5,750- 7,386 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)												1,0	0,8		0,8	
EcolC_2715- EcolC_2722	min Δ8,880- 9,231 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)						1,0	0,8	0,9						1,0		
EcolC_2715- EcolC_2728	min Δ17,609 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)				0,8												
EcolC_2715- EcolC_2745	min Δ32,015 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)																
EcolC_2715- EcolC_2749	min Δ35,461 bp	IS1X2-vahendatud (EcolC_2714)				0,2	0,1		0,1	0,6				0,3			0,1	
EcolC_2857- EcolC_2870	min Δ13972 bp	IS1R-vahendatud (EcolC_2872)															0,2	
EcolC_2863- EcolC_2870	Δ9,624 bp	IS1R-vahendatud (EcolC_2872)						0,8										
EcolC_2971	G→A	A25T (GCC→ACC)												0,6				
EcolC_2996	G→A	R312W (CGG→IGG)						0,7	0,6									
EcolC_3140	T→A	L242Q (CTG→CAG)								0,1					0,6		0,1	
EcolC_3242	::IS1X2 (+)	kodeeriv (315-323/678 nt)			0,6													
EcolC_4070	C→T	P340L (CCT→CTT)															0,3	

#### Lisa 4 Mutantide MBC katse

Sigrit Umerov hindas oma bakalaureusetöös mutantide *tnaA*(M266I), *ydjN::IS*,  $\Delta$ 2715-2722, *silS/cusA* (H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5)) ja *silS/pqiA* (H4NR\_MBC\_Ag-SL(108)) minimaalse biotsiidse kontsentratsiooni (MBC) orgaanikarikkas või orgaanikavaeses vedelikus AgNO<sub>3</sub> või CuSO<sub>4</sub> juuresolekul vedelas keskkonnas. Ekspositsiooniks kasutati steriilses vees pestud ja tsentrifuugimise teel kontentreeritud eksponentsiaalse kasvufaasi rakke (kasvatatud 37 °C juures 150 rpm), mis orgaanilise saastelahuses või deioniseeritud vees ja AgNO<sub>3</sub> või CuSO<sub>4</sub> lahustega (2 kordsete lahjenduste read). Ekspositsiooni alguses oli rakutihedus  $\sim 3 \times 10^8$  CFU/ml. 24-h ekspositsiooni järel toatemperatuuril tehti 5  $\mu$ l tilkkülvid LB tardsöötmetassidele, mida inkubeeriti 24 h 37°C juures, et määrata MBC väärtused. MBC väärtuseks loeti soola madalaim kontsentratsioon, mille juures ei kasvanud mitteselektiivsele söötmele külvatud proovist välja kolooniaid.

Andmepunktidenäna on esitatud korduskatsetes (3 bioloogilist, 2 tehnilist) leitud MBC väärtused log<sub>2</sub> skaalal. Välja on toodud MBC-de mediaan ja variatsiooniulatus. Tulemuste statistilisel analüüsil võrreldi kõigi mutantide metallisoola MBC väärtusi metsiktüve vastu, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Märgitud on vaid statistiliselt olulised muutused  $P^* < 0,05$ ;  $**P < 0,01$  ja  $****P < 0,0001$ . Statistilise analüüsi ja joonise autor on Sigrit Umerov. Joonis pärineb Sigrit Umerovi bakalaureusetööst.

Jooniselt on näha, et nii orgaanikavaeses kui orgaanikarikkas vedelikus tolereerisid oluliselt paremini *silS/cusA* ja *silS/pqiA* mutandid nii hõbeda kui ka vase iooni võrreldes metsiktüübi ATCC 8739-ga. Joonis on järgmisel lehel.



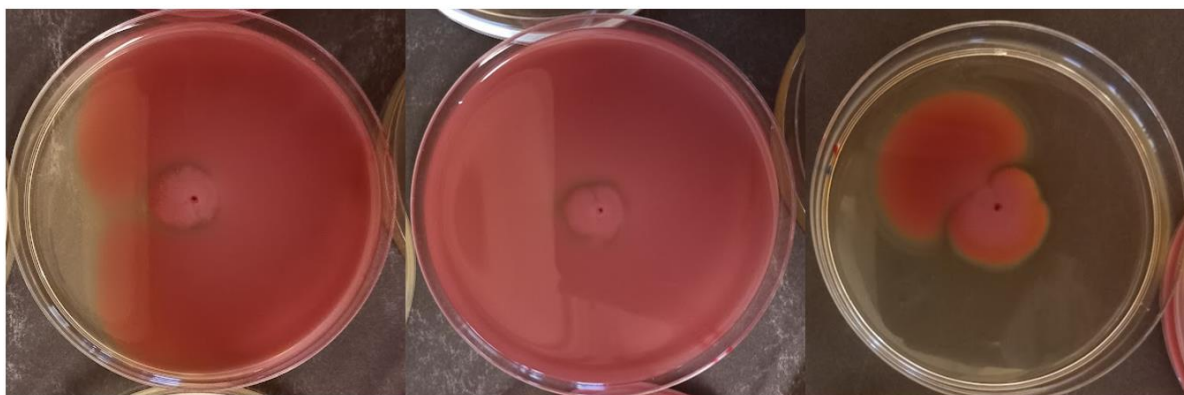
## Lisa 5 Ujumisliikumise taastumine

48 h, 37° C Ujumisliikumise test NR-s evolutsioneerunud populatsioonidele

Hõbe liin 2

Hõbe liin 3

Klaas liin 1



Joonisel on kujutatud ujumiskatse 48 h aja punkti. Joonisel on näha, et esialgu on ujumine olnud pärsitud ning ühel hetkel on tekkinud erineva ulatusega „lehvik“, mis näitab, et tekkis *fliI* geenis stoppkoodoni reversioon ning ujumisvõimelised bakterid said kasvuelise.

## LIHTLITSENTS

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sandra Park,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „*Escherichia coli* ATCC 8739 laboratoorne evolutsioon antimikroobsetel metall pindadel“, mille juhendajad on Merilin Rosenberg ja Angela Ivask, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **20.05.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Sandra Park*

**30.05.2024**