

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

**Valitud geenide funktsioonikao mõju *Escherichia coli* metallitundlikkusele erinevates
testformaatides**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Carmen Marianne Teär

Juhendaja PhD Merilin Rosenberg

TARTU 2025

INFOLEHT

Valitud geenide funktsioonikao mõju *Escherichia coli* metallitundlikkusele erinevates testformaatides

Uurimisgrupi töös on varasemalt biotsiidsetele vase ja hõbeda pindadele eksponeeritud *E. coli* populatsioonides leitud mutatsioone potentsiaalselt metallitundlikkusega seotud geenides. Käesolevas töös uuriti *E. coli* katkestusmutantide elumust vase ja hõbeda pinnal poolkuivades tingimustes ja kasvudünaamikat vedelsöötmes vastavate metalliioonide juuresolekul tuvastamaks, kas nende geenide funktsioonikadu mõjutab metallitundlikkust erinevates katsekeskkondades. Leiti, et osadel mutantidel esines metsiktüvest parem elumus vase ja hõbeda pinnal, kuid sellega kaasnesid kasvundefektid metallita vedelsöötmes. See viitab, et kõrgem metallitolerantsus pinnal tuleneb küll vastava geeni funktsioonikaost ja esineb lõivsuhe efektiivse kasvu ja stressitaluvuse vahel. Katkestusmutantide enamasti metsiktüvega sarnane metallitundlikkus vedelsöötmes näitab, et metallitundlikkuses on oluline roll on ka testformaadil ja erinevates biotsiidsetes stressistsenaariumites võivad bakterile kasulikud olla erinevad kaitsemehhanismid.

Märksõnad: *Escherichia coli*, antimikroobsed pinnad, vask, hõbe
CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The effect of loss of function in selected genes on *Escherichia coli* metal tolerance in different test formats

Previous research identified mutations in *E. coli* populations exposed to biocidal copper and silver surfaces, potentially linked to metal sensitivity. This study examined the viability of *E. coli* knockout mutants on copper and silver surfaces under semi-dry conditions and their growth in liquid media with metal ions to assess whether gene loss affects metal sensitivity across environments. Some mutants showed better survival than the wild type on metal surfaces but had growth defects in metal-free liquid media, suggesting that increased surface tolerance results from gene loss and involves a trade-off between growth and stress resistance. The similar metal sensitivity of most mutants and wild type in liquid media highlights the importance of test conditions and suggests that different stress scenarios may require distinct bacterial defense mechanisms.

Keywords: *Escherichia coli*, antimicrobial surfaces, copper, silver
CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Antimikroobsed ained ja materjalid.....	7
1.1.1. Vase ja hõbeda antimikroobne toime.....	7
1.2. Bakterid antimikroobsetel pindadel	8
1.2.1. Bakterite kaitsemehhanismid vase ja hõbeda vastu	8
1.2.2. Kohastumine vase ja hõbeda pindadel	9
1.3. Antibakteriaalse efektiivsuse hindamine.....	10
1.3.1. Bakteritsiidne toime	11
1.3.2. Bakteriostaatiline toime.....	11
1.3.3. Kasvukineetika antimikroobse aine osaliselt inhibeerival kontsentratsioonil	11
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	13
2.1. Töö eesmärgid	13
2.2. Materjal ja meetodika	14
2.2.1. Kasutatud materjalid.....	14
2.2.2. Bakterikultuuride kasvutingimused	16
2.2.3. Kasvuparameetrite analüüs.....	17
2.2.4. Vase ja hõbeda minimaalse inhibeeriva ja bakteritsiidne kontsentratsioon.....	17
2.2.5. Tundlikkuse määramine vase ja hõbeda pindadele	18
2.2.6. Andmeanalüüs ja statistika	19
2.2.7. Kasutatud andmebaasid.....	20
2.3. Tulemused	21
2.3.1. Katkestusmutantide kasvudefektid.....	21
2.3.2. Kasvuparameetrid vase ja hõbeda juuresolekul.....	23
2.3.3. Minimaalne inhibeeriv ja bakteritsiidne kontsentratsioon	26
2.3.4. Tundlikkus hõbeda ja vase pindadele poolkuivades tingimustes.....	28
2.4. Arutelu.....	31
KOKKUVÕTE	35
RESÜMEE/SUMMARY	36
TÄNUSÕNAD	38

KIRJANDUSE LOETELU	39
Lisa 1. Kasvuparameetrid erinevatel vase ja hõbeda kontsentratsioonidel tüvede kaupa	44
Lisa 2. Tüvede kasvukõverad vase ja hõbeda juuresolekul kontsentratsioonide kaupa.	46
Lisa 3. Ellujääjate osakaal pinnatestides	47
LIHTLITSENTS.....	48

KASUTATUD LÜHENDID

AUC – kasvukõvera joonealune pindala (*area under the growth curve*)

CFU – kolooniat moodustav ühik (*Colony-forming unit*)

DGC - *Dashing Growth Curves*

DI – deioniseeritud vesi

EPA – Ameerika Ühendriikide Keskkonnakaitseagentuur (*The Environmental Protection Agency, USA*)

KV – kuiv orgaanikavaene pinnakatse tingimus

LB – Luria-Bertani sööde (*Luria-Bertani broth, lysogeny broth*)

MBC – minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (*minimal bactericidal concentration*)

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (*minimal inhibitory concentration*)

MOPS- 4-morfoliinpropaansulfoonhape

NB – mikrobioloogiline vedelsööde (*nutrient broth*)

NR – niiske orgaanikarikas pinnakatse tingimus

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid

SL – orgaaniline saastelahus (*EPA Soil Load*)

SISSEJUHATUS

Antimikroobsete omadustega pindu kasutatakse potentsiaalselt patogeensete mikroobide leviku tõkestamiseks, eriti suurte inimvoogudega avalikes ruumides ja tervishoiuasutustes. Levinumateks lahendusteks on metallipõhised pinnakatted, näiteks hõbedast ja vasest või neid sisaldavatest materjalidest, mille mikroobivastased omadused on tuntud juba sajandeid. Enamik metallide antibakteriaalse toime uuringuid on keskendunud vedelsöötmes läbi viidud testidele, mis ei kajasta täpselt olukorda tahketel puutepindadel, kus metallpinna toimemehhanismid võivad erineda metalliioonist kasvusöötmes või kombineeruda keskkonnatingimustest tuleneva stressiga. Samuti on leitud, et antibakteriaalsete metallide ja metallpindade efektiivsus sõltub ekspositsioonitingimustest, sealhulgas kontaktiajast, temperatuurist, õhuniiskusest ja muudest katsetingimustest.

Antimikroobsed ained ja pinnad kas surmavad bakterid või pärsivad nende kasvu. Vedelates keskkondades on täheldatud, et bakterid omavad mitmesuguseid kaitsemehhanisme, mis võimaldavad neil antimikroobse aine juuresolekul ellu jääda. Evolutsioonilise kohastumise tulemusena võivad ellujäänud bakterid aja jooksul omandada suurenenud tolerantsuse ka metallpindade suhtes. Siiski ei ole täpselt teada, kas metallpindadel rakenduvad samad kaitsemehhanismid, mis vedelas keskkonnas. Lisaks on uurimused näidanud, et bakterite kaitsevastus võib varieeruda sõltuvalt nii toimeainest kui ekspositsioonikeskkonnast, mis viitab võimalikele erinevustele kaitsemehhanismidele erinevates biotsiidsetes stressistsenaariumites.

Varasemalt viis meie töögrupi doktorant Sandra Park läbi laboratoorse evolutsioonikatse, kus erinevates keskkonnatingimustes eksponeeriti *E. coli* ATCC 8739 tsükliliselt vase ja hõbeda pindadele. Evolutsioneerunud bakteripopulatsioonides tuvastati kõrge esinemissagedusega mutatsioone, mille sagedus võis tõusta selektsiooni tulemusel ja muteerunud geenide roll võib potentsiaalselt olla seotud bakteri vähenenud metallitundlikkusega. Käesoleva töö põhieesmärgiks oli uurida, kas nende *E. coli* geenide puhul võis metallitundlikkuse muutust põhjustada funktsioonikadu, kasutades *E. coli* BW25113 katkestusmutantide raamatukogu.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antimikroobsed ained ja materjalid

Antimikroobseid aineid kasutatakse laialdaselt erinevates toodetes ja materjalide koostises, mille eesmärgiks on mikroobide kasvu pärssimine või surmamine erinevatel pindadel. Enim kasutatakse desinfektsioonivahendites erinevad alkoholi-, halogeeni-, kvaternaarse ammooniumi- ja peroksiidiühendid. Nimetatud ühendite puuduseks on antimikroobse toime vähenemine ajas, mida on täheldatud näiteks kloorheksidiindiglükonaadi puhul (Shen et al., 2024). Samuti on desinfektsioonivahendite biotsiidne toime perioodiline, mitte pidev ja sõltub kasutamise sagedusest.

Eespool nimetatud puudusi saab ületada näiteks võttes kasutusele antibakteriaalseid pinnamaterjale, mis on pikatoimelised. Üha enam uuritakse antimikroobsete omadustega nanostruktuurseid pindu. Näiteks on kiilide tiibadel täheldatud teravaid piigi-taolisi struktuure, mis on võimelised läbistama bakteriraku membraane (Ivanova et al., 2012). Lisaks kasutatakse fotokatalüütilisi pindasid, mis valguse toimel genereerivad reaktiivseid hapnikuühendeid (ROS), millel on tõendatud antimikroobne toime nii gramnegatiivsete kui ka grampositiivsete bakterite vastu (Paspaltsis et al., 2006).

Levinumad antimikroobsed pinnad või pinnakatted sisaldavad hõbedat või vaske, mille antimikroobseid omadusi käsitletakse käesoleva töö alapeatükis 1.1.1.

1.1.1. Vase ja hõbeda antimikroobne toime

Vaske ja hõbedat on sajandeid kasutatud nende antimikroobse toime tõttu. Üldiselt peetakse nende metallide antimikroobse toime peamiseks põhjuseks vastavate ioonide (Cu^+ , Cu^{2+} ja Ag^+) vabanemist (X. Wang et al., 2016). Näiteks on leitud, et vase- ja hõbedaioonid seonduvad mikroobide valkude väävlit sisaldavate tiolrühmadega, mille tulemusena häirub ensüümide funktsioneerimine ja oluliste metaboolsete radade töö (Kirakosyan et al., 2008; H. Wang et al., 2020). Samuti on näidatud, et vase- ja hõbedaioonid kahjustavad bakterite DNA-d ja valke, mis takistab DNA replikatsiooni ja rakkude jagunemist (Feng et al., 2000; Warnes & Keevil, 2016).

Ka metallide nanoosakestega kaetud pinnad vabastavad keskkonda ioone (Slavin et al., 2017), näiteks vase- ja hõbedaioonid (Dutta, 2011; Zakharova et al., 2015). Lisaks võivad vase ja hõbeda nanoosakesed indutseerida oksüdatiivset stressi, mille tagajärjeks on biomolekulide kahjustused ja DNA lagunemine (Adeyemi et al., 2020; Giannousi et al., 2014).

Vase ja hõbeda antimikroobne toime võib tuleneda ka otsekontaktist mikroorganismidega, kus biotsiidne toime võib ilmneda minutite jooksul (Santo et al., 2011). Uuringud on näidanud, et metallpindade antimikroobne efektiivsus sõltub olulisel määral keskkonnateguritest, näiteks temperatuurist, õhuniiskusest ja orgaanilisest saastatusest (Kaur et al., 2024).

1.2. Bakterid antimikroobsetel pindadel

Bakteritel on välja kujunenud mitmeid erinevaid mehhanisme vase ja hõbeda ionide kahjuliku mõjuga toimetulekuks. Järgnevates peatükkides käsitletakse bakterite erinevaid vase ja hõbeda vastaseid kaitsemehhanisme ning kohastumusi.

1.2.1. Bakterite kaitsemehhanismid vase ja hõbeda vastu

Vase ja hõbeda vastased kaitsemehhanismid on Cu^+ ja Ag^+ ionide sarnasuse tõttu tihti kattuvad. *E. coli*'l esineb CusCFBA kompleks, mis pumpab Cu^+ ioone rakust välja ja võib aktiveeruda ka Ag^+ ionide korral (Franke et al., 2003; Long et al., 2010; Munson et al., 2000). Vase olemasolul aktiveerib CusS vastusregulaatori CusR, mis omakorda stimuleerib cusCFBA geenide transkriptsiooni (Franke et al., 2003).

Samuti transpordib ühevalentseid vaseioone P-tüüpi ATPaas CopA tsütoplasmast periplasmasse (Rensing et al., 2000). CopA süsteemi reguleerib CueR, mis aktiveerub vaseioonide kontsentratsiooni tõusu korral tsütoplasmas (Petersen & Møller, 2000). Enamasti hõbedaione CopA ei transpordi, kuid vähesel määral on seda näidatud (Stoyanov et al., 2003). Kokkuvõttes reguleerivad CueR ja CusR/S süsteemide aktiveerumist vastavalt Cu^+ kontsentratsioonile tsütoplasmas või periplasmas. (Munson et al., 2000; Outten et al., 2001)

Peale ionide rakust välja transportimise suudavad bakterid vähendada metalliioonide toksilisust. CueO oksüdaas oksüdeerib periplasmas ühevalentse vase (Cu^+) kahevalentseks (Cu^{2+}), mis on bakterirakkudele vähem toksiline (Singh et al., 2004). Näidatud on, et CueO kaitseb periplasmas asuvaid ensüüme vase põhjustatud kahjustuste eest (Grass & Rensing, 2001). Samuti osaleb vaseioonide detoksifikatsioonis plasmiidne *pco*-geeniklast (Brown et al., 1995).

Hõbedaiionide rakust välja pumpamiseks on samuti leitud eraldiseisev enamasti plasmiidne SilFCBA süsteem, mis on homoloogiline CusFCBA kompleksiga (Randall et al., 2015). Hõbedaresistentsuse piirkond koosneb üheksast geenist: *silE*, *silS*, *silR*, *silC*, *silF*, *silB*, *silA*, *ORF105* ja *silP*. Selle süsteemi keskne osa on kahekomponentne hõbedale reageeriv regulatsioonisüsteem *silRS*, mis reguleerib mitmete resistentsuselementide, sealhulgas hõbeda

effluks-ATPaasi *silP*, väljavoolupumba *silCBA* ja periplasmilise hõbeda šaperoni *silF* ekspressiooni (Gupta et al., 1999). Eelmainitud *pco* ja *sil* geeniklastrid esinevad tihti koos plasmiidisena (Stahlin et al., 2016).

Samuti kaitsevad bakterid end antimikroobsete ainete eest biofilmi moodustamisega (Rumbaugh & Sauer, 2020). Bakteritel on antimikroobsetel pindadel biofilmi moodustamise võime vähenenud pinna enda bakteritsiidse toime tõttu (Gomes et al., 2019).

1.2.2. Kohastumine vase ja hõbeda pindadel

Vase ja hõbeda pindadele korduvalt eksponeeritud bakteripopulatsioonides ei ole tuvastatud teadaolevate kaitsemehhanismidega seotud mutatsioone, mis suurendaksid tolerantsust nendele pindadele. Kuigi mõnes tolerantsemas populatsioonis on leitud mutatsioone (Bleichert et al., 2020; Rosenberg et al., 2025; Xu et al., 2022), ei ole muteerunud geenide seost metallitolerantsusega funktsionaalselt uuritud.

Samuti on varasemalt märgatud, et vaskpinnal evolutsioneerunud bakteritel suurenes vaskpinna tolerantsus, kuid mitte vasetundlikkus vedelsöötmes (Bleichert et al., 2020; Rosenberg et al., 2025). Sandra Pargi töös järeldati sellest, et bakterite metallikaitsemehhanismid poolkuival pinnal võivad olla passiivsed ja seotud ionide rakku sisenemise takistamise või inaktiivsesse vormi sidumisega, kuid vedelsöötmes ionide väljapumpamise süsteemide aktivatsiooniga (Rosenberg et al., 2025).

Xu *et al.* töös leiti, et kuigi teatud bakteripopulatsioonid suutsid paremini ellu jääda vaskpinnal, ei esinenud neis mutatsioone vase väljapumpamise süsteemides. Sellest järeldati, et katsetes kasutatud tüved kasutasid vaseioonide kahjuliku mõju vältimiseks alternatiivseid mehhanisme (Xu et al., 2022). Samale järeldusele on jõutud ka Bleichert *et al.* uurimuses, kus ei leitud vase pindadel paremini ellu jäänud bakteripopulatsioonides mutatsioone teadaolevalt metallitolerantsusega seotud mehhanismide geenides. See-eest täheldati vaskpindadelt leitud mutantidel geenide *tnaA*, *tnaB* ja *tnaC* ekspressiooni vähenemist (Bleichert et al., 2020), mille seos metallitundlikkusega ei ole selge. *tnaA* kodeerib trüptofanaasi, mis toodab trüptofaanist signaalmolekuli indooli (Newton & Snell, 1964; D. Wang et al., 2001) ja tsüsteiinist divesiniksulfiidi (Awano et al., 2005).

Sandra Pargi uurimus näitas seevastu mutatsioone mitmetes teadaolevates metallitaluvuse ja stressivastuse geenides nagu *ompC*, *zraS* ja *cysN* (Rosenberg et al., 2025). Samuti esines mutatsioone ka väävlimetabolismiga seotud geenides, sealhulgas ka *tnaA* geenis, mis autorite

sõnul võisid anda eelise metallpindadel, kuid mitte vedelas keskkonnas (Rosenberg et al., 2025).

Sandra Pargi evolutsioonikatsetes eksponeeriti *E. coli* tüve ATCC 8739 tsükliliselt hõbe- ja vaskpindadele erinevates keskkonnatingimustes. Katsete tulemusel tuvastati evolutsioneerunud bakteripopulatsioonides geenid, kuhu olid akumulierenud mutatsioonid. Käesolevas töös kasutati nende geenide KEIO kollekttsioonist (Baba et al., 2006) pärit katkestusmutante, milles evolutsioonikatses kõrgema sagedusega mutatsioonid tuvastati (Tabel 1).

Tabel 1. Sandra Pargi evolutsioonikatsest tuvastatud geenid, mille katkestusmutante kasutati käesolevas töös. Kohandatud ja tõlgitud tabel geenidest, kus vasele või hõbedale kuivas orgaanikavaeses (KV) või niiskes orgaanikarikkas (NR) tingimuses eksponeeritud evolutsioneerunud bakteripopulatsioonides viies paralleelses liinis akumulierenud mutatsioonid (Rosenberg et al., 2025). Mutatsioonide sagedus populatsioonis on kujutatud numbriliselt ja värvigradiendiga. Funktsionaalne annotatsioon pärineb EcoCyc andmebaasist (Moore et al., 2024).

Mutatsiooni annotatsioon	Ag_KV					Ag_RN					Cu_KV					Cu_NR					Geen	Funktsionaalne annotatsioon EcoCyc alusel
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
Y343* (TAC→TAG)	1,0																				<i>ompC</i>	Välismembraani poriin
E145D (GAA→GAI)	0,3																				<i>zraS (hydH)</i>	Sensoorne histidiinkinaas
Q19K (CAG→AAG)		0,4																			<i>apt</i>	Adeniini fosforibosüültransferaas
V120F (GTT→ITT)													1,0								<i>rssB</i>	RpoS regulaatorvalk
G13R (GGG→AGG)													1,0								<i>ybiB</i>	Mittespetsiifiline DNA-d seondav valk
T986I (ACA→ATA)														1,0							<i>yfhM</i>	α2-makroglobuliin
Q440* (CAG→TAG)															1,0						<i>cysN</i>	Sulfaadi adenüültransferaas
M266I (ATG→ATI)						0,4	0,3	0,4	0,7	0,1											<i>tnaA</i>	Trüptofanaas, L-tsüsteiini desulfhüdraas
::IS1 (209-217/1392 nt)							0,2														<i>ydjN (tcyP)</i>	L-tsüsteiini transporter
G44D (GGC→GAC)							0,1															
intergenic 53 bp→54 bp (-189)																		0,3			<i>yrdA</i>	Heksapeptiidi kordusjärjestusi sisaldav valk

1.3. Antibakteriaalse efektiivsuse hindamine

Selleks, et antimikroobseid toimeaineid ja materjale kasutada, on vaja teada nende efektiivsust. Toime võib väljenduda kasvuinhibitsioonis (bakteriostaatiline toime) või elusarvukuse vähenemises (bakteritsiidne toime). Klassikaliselt hinnatakse antimikroobsete toimeainete efektiivsust minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (*minimal inhibitory concentration*, MIC)

ja minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (*minimum bactericidal concentration*, MBC) kaudu, analüüsides erinevate toimeaine kontsentratsioonide mõju.

1.3.1. Bakteritsiidne toime

Vedelas testkeskkonnas saab bakteritsiidset toimet hinnata MBC abil. MBC on toimeaine madalaim kontsentratsioon, mis surmab vähemalt 99,9% bakteritest (EUCAST, 1998). Antud töös kohandati MBC määramiseks *spot* testi, mis on sobilik metallisoolade ja nanoosakeste testimiseks (Suppi et al., 2015).

Mittepoorsete antimikroobsete pindade bakteritsiidset toimet saab hinnata erinevate standardiseeritud meetoditega, nagu näiteks ISO 22196:2011 ja ISO 7581:2023 (Maitz et al., 2024), aga kasutusel on ka erinevaid publitseeritud testformaate (Sjollema et al., 2018). Pinnatestide puhul varieeritakse tavaliselt toimeaine kontsentratsiooni asemel ekspositsiooniga. Pindade biotsiidse toime hindamisel on oluline valida pindade kasutustingimustele (õhuniiskus, saasteained, temperatuur jne.) vastav katsemeetod, sest testkeskkonna parameetrid mõjutavad antimikroobse pinna efektiivsust. Näiteks langeb efektiivsus madala suhtelise õhuniiskusega ja/või kõrgema orgaanikasisaldusega keskkonnas, mille tõttu bakterite elumus pinnal suureneb ja vale testi valik põhjustaks pindade antibakteriaalse efektiivsuse ülehindamise (Kaur et al., 2024; Maitz et al., 2024).

1.3.2. Bakteriostaatiline toime

Peale bakteritsiidse toime võivad antimikroobsed toimeained omada bakteriostaatilist toimet, mille korral mikroobid ei pruugi surra, kuid nende kasv on osaliselt või täielikult pärssitud. Enamasti kasutatakse kasvuinhibitsiooni iseloomustamiseks MIC väärtust (EUCAST, 1998). MIC on uuritava aine madalaim kontsentratsioon, mis inhibeerib mikroobide kasvu täielikult.

Kasvuinhibitsiooni antimikroobsetel pindadel tavaliselt ei hinnata, aga pinnamaterjalist eraldanud toimeaine põhjustatud kasvuinhibitsiooni saab hinnata inhibitsioonitsooni suuruse (*zone of inhibition*, ZOI) kaudu tardsöötmele (ASTM International, 2018; Sjollema et al., 2018). ZOI testi eelduseks on toimeaine(te) efektiivne difusioon tardsöötmes, mida tahkete pindade korral ei pruugi üldse või piisaval määral toimuda (Cavenaghi et al., 1992; Sjollema et al., 2018).

1.3.3. Kasvukineetika antimikroobse aine osaliselt inhibeerival kontsentratsioonil

Antimikroobse aine erinevad kontsentratsioonid võivad bakterite kasvu pärssida mittetäielikult. Samuti võib madalatel kontsentratsioonidel avalduda hormeetiline mõju, mille korral

mõõdukas stress võib soodustada kasvu, mida on näidatud näiteks ka ZnO puhul (X. Li et al., 2020).

Mittetäielik inhibitsioon väljendub muutunud kasvuparameetrites MICist madalamatel toimeaine kontsentratsioonidel. Kasvu saab iseloomustada parameetritega nagu latentsiaeg (*lag time*), maksimaalne kasvukiirus ja saagis, mille väärtuste leidmiseks saab kasutada vabalt kättesaadavat tarkvara *Dashing Growth Curves* (DGC)(Reiter & Vorholt, 2024). Inhibitsiooni korral ei vasta kasvukõverad alati ootuspärasele eksponentsiaalsele kasvukineetikale, mille tõttu on keeruline kasvuparameetreid määrata. Esineda võib kahefaasiline kasv või toksilised metallikontsentratsioonid võivad muuta kasvudünaamikat nii, et see ei ole kirjeldatav tavapäraste eksponentsiaalsest kasvust lähtuvate meetoditega ja ei sobi programmidele lähteandmeteks. Sellisel juhul saab kasutada kasvukõvera joonealust pindala (AUC, *area under the growth curve*), mis koondab nii latentsiaja, kasvukiiruse kui saagise erinevusest tulenevaid efekte (Smith et al., 2024).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töös püstitati järgnevad eesmärgid:

1. Kasutades KEIO kollektiooni ühe geeni katkestusmutante tuvastada, kas tsüklilisel vase ja hõbeda pindadele eksponeerimisel kõrge sagedusega akumulunud mutatsioonide puhul oli potentsiaalse metallitolerantsuse suurenemise põhjuseks muteerunud geeni funktsiooni kadumine.
2. Hinnata, kas muutused katkestusmutantide metallitundlikkuses on universaalsed või sõltuvad kasvu- ja/või ekspositsioonitingimustest.

Töö eesmärkide täitmiseks:

1. Hinnati valitud geenide inaktiveerimise potentsiaalset mõju bakteritele, kasutades eelretsenseeritud teadusartikleid (Scopus) ja funktsionaalse annotatsiooni informatsiooni (EcoCyc).
2. Iseloomustati *E. coli* BW25113 metsiktüve ja katkestusmutantide kasvuparameetreid koos ja ilma vase või hõbeda ionide juuresolekuta kasvukeskkonnas.
 - a. Määrati vase ja hõbeda MIC väärtused vähekomplekseerivas minimaalsöötmes
 - b. Iseloomustati kineetilisi kasvuparameetreid kasvu inhibeerivatel vase ja hõbeda kontsentratsioonidel võrreldes inhibitsioonita kasvuga.
3. Iseloomustati vase ja hõbeda pindade ning ionide bakteritsiidset toimet *E. coli* BW25113 metsiktüvele ja katkestusmutantide
 - a. Määrati vase ja hõbeda MBC vähekomplekseerivas minimaalsöötmes
 - b. Hinnati tundlikust vase ja hõbeda pindadele valitud ekspositsioonitingimustes

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud materjalid

2.2.1.1 Bakteritüved ja söötmed

Käesolevas töös kasutatud söötmete ja lahuste koostised on välja toodud Tabelis 2. Kõik kasutatud söötmed, lahused ja tarvikud kas telliti steriilsena või autoklaaviti 121°C temperatuuril vähemalt 15 minutit.

Katsetes on kasutatud KEIO kolleksioonist pärinevat *E. coli* K-12 BW25113 metsiktüve ja tema ühe geeni katkestusmutante (Baba et al., 2006). Bakteritüved on saadud Niilo Kaldalult Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudist. Ühe geeni katkestusmutantide puhul on uuritava geeni järjestus asendatud kanamütsiini resistentsuse kassetiga, mis põhjustab vastava geeni täieliku funktsioonikao ja neid võib selle geeni osas käsitleda deletsioonmutantidena. Kolleksioonist on valitud nende geenide katkestused, milles on meie grupi varasemas töös tuvastatud mutatsioonid, mis võivad olla seotud vase ja hõbeda tundlikkuse vähenemisega (Rosenberg et al., 2025).

Tabel 2. Töös kasutatud söötmed ja lahused

Sööde		Koostisosad
Luria-Bertani sööde (<i>Luria-Bertani broth</i> , <i>lysogeny broth</i> , LB)	Vedelsööde	trüptoon 10 g/l; pärmiekstrakt 5 g/l; NaCl 5 g/l
	Tardsööde	LB vedelsööde + agar 15 g/l
Orgaaniline saastelahus (<i>EPA Soil Load</i> , SL) (EPA, 2022)		Fosfaatpuhveris: pärmiekstrakt 2 g/l; veise seerumalbumiin (<i>bovine serum albumin</i> , BSA) 2,5 g/l; mutsiin 0,8 g/l
Orgaanikavaene saastelahus (500x lahjendatud <i>nutrient broth</i> , NB) (Kaur et al., 2024)		Deioniseeritud vees: : lihaekstrakt 0,006 g/l; peptoon 0,02 g/l; NaCl 0,01 g/L
Toksilisust neutraliseeriv sööde (<i>Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate Broth</i> , SCDLP) (ISO, 2011)		Kaseiinipeptoon 17 g/l; sojapeptoon 3 g/l; NaCl 5 g/l; Na ₂ HPO ₄ 2,5 g/l; glükoos 2,5 g/l; letsitiin 1 g/l; surfaktant (Tween80) 7 g/l
Vähekomplekseeriv minimaalsööde (MOPS+CasAA+glükoos)		MOPS 8 370 mg/L (pH 7,4); tritsiin 717 mg/L (pH 7,4); FeSO ₄ * 7H ₂ O 2,78 mg/l; NH ₄ Cl 508 mg/l; K ₂ SO ₄ 48,1 mg/l; CaCl ₂ * 2H ₂ O 0,0735 mg/l; MgCl ₂ * 6H ₂ O 107,3 mg/l; NaCl 29 200 mg/l; (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4H ₂ O 3,7 mg/l; H ₃ BO ₃ 2,5 mg/l; CoCl ₂ 3,8 mg/l; CuSO ₄ * 5H ₂ O 2,5 mg/l; MnCl ₂ * 4H ₂ O 1,6 mg/l; ZnSO ₄ * 7H ₂ O 2,9 mg/l; K ₂ HPO ₄ 229,9 mg/l; CasAA 0,4%; L-trüptofaan 20 µg/l; glükoos 0,4%
Fosfaatpuhver (PBS), pH≈7		NaCl 8g/l; KCl 0,2 g/l; Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,81 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l

2.2.1.2. Antimikroobsed ained ja materjalid

MIC ja MBC katsetes kasutati antimikroobse toimeainena vasksulfaat pentahüdraati ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) või hõbenitraati (AgNO_3). Vasksulfaadi olemasolevast 1024 mM vasekontsentratsiooniga lahusest valmistati 32 mM töölahus. Hõbenitraadi puhul kasutati kommertsiaalselt 0,1 M vesilahust (Fisher Chemicals, USA). Töös kasutatud kontsentratsioonivahemikud on toodud Tabelis 3.

Tabel 3. Metallisoolade kontsentratsioonivahemikud MIC ja MBC katsetes.

Katse	Metalliiooni allikas	Kontsentratsioonivahemik
MIC ja MBC	Vasksulfaat (CuSO_4)	0,5 – 32 mM
MIC	Hõbenitraat (AgNO_3)	0,06 – 3,9 μM
MBC		0,24 – 15,6 μM

Töös kasutati ümaraid 2 cm läbimõõduga 99,95% hõbeda (Surepure Chemetals, USA) ja 99% vase (Metroprint OÜ, Eesti) pindu. Pindu puhastati ja kasutati korduvalt. Selleks inaktiveeriti kasutatud pinnad eelnevalt 70% etanoolis vähemalt 15 minuti jooksul ja viidi läbi kolmeetapiline puhastustsükkel. Inaktiveeritud pindu raputati ja sonikeeriti Branson 1800 sonikaatorvannis (Branson Ultrasonics Corporation, USA) järjestikku 50 ml tsentrifuugituubides, mis sisaldasid klaaskuule ja 5% sidrunhapet, 100% atsetooni või 70% etanooli. Iga 15 minutilisele sonikeerimisele eelnes ja järgnes 2 minutit raputamist. Iga kemikaalipesu vahel loputati pindu destilleeritud vees. Peale viimast etappi kuivatati pinnad töötavas bioohutuskapis ja hoiustati steriilsetes Petri tassides.

2.2.2. Bakterikultuuride kasvutingimused

Kõik bakteritüved külvati $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 20% glütserooli suspensioonist LB tardsöömele, kasvatati $37\text{ }^\circ\text{C}$ juures üleöö ja hoiustati $4\text{ }^\circ\text{C}$ juures järgnevateks katseteks.

MIC ja MBC määramiseks külvati tüved LB tardsöötmeelt 1,5 ml LB vedelsöötmesse 14 ml ventileerivates tuubides ning inkubeeriti $37\text{ }^\circ\text{C}$ ja 150 rpm juures üleöö. Statsionaarsed vedelkultuurid külvati järgmisel päeval värskesse LB vedelsöötmesse 50-kordsete lahjendusega ning kasvatati eksponentsiaalsesse faasi. Eksponentsiaalset faasi tuvastati DEN-600 fotomeetriga (Biosan, Läti) mõõtes optilist tihedust, kuni OD_{600} väärtus jäi vahemikku 0,5 - 0,7.

Pinnakatsete jaoks külvati bakterite tüved masskülvimeetodil LB tardsöötmele ning kasvatati 37 °C juures üleöö.

2.2.3. Kasvuparameetrite analüüs

Bakterite kasvu iseloomustamiseks analüüsiti kasvukineetikat. Selleks kasvatati bakterid ette nii nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.2. Eksponentsiaalses kasvufaasis tüved pesti ja vahetati LB vedelsööde vähekomplekseeriva minimaalsöötme vastu, et vähendada söötmekomponentide mõju metalli antimikroobsele toimele (Käkinen et al., 2011). Selleks tsentrifugeeriti bakterisuspensioonid (4430 g, 5 min, 22 °C) ning LB vedelsööde eemaldati. Järgnevalt teostati kaks korda pesu, kus bakterid suspendeeriti 5 ml PBS-is ja tsentrifugeeriti uuesti samadel tingimustel. Peale viimast PBS-i eemaldamist võeti bakterid üles 10 ml steriilses deioniseeritud vees (DI), mõõdeti optiline tihedus ja lahjendati see teoreetilise väärtuseni 0,001 (umbes 10^6 CFU/ml) 2x kontsentratsiooniga vähekomplekseerivas minimaalsöötmes.

Enne bakterisuspensiooni lisamist 96-kaevulisse mikrotiiterplaati, teostati DI vees kahekordsed metallisoolade lahjenduste read ja lisati bakterisuspensioon 1:1 suhtes. Plaadi ühe kaevu lõppmahuks oli 150 µl. Negatiivseks kasvukontrolliks kasutati steriilset söödet, positiivseks kontrolliks bakterit minimaalsöötmes ilma metallisooladeta. Mikrotiiterplaat asetati optilise tiheduse mõõtmiseks BioTek Synergy H1 plaadilugejasse (Agilent Technologies, USA), mis mõõtis optilist tihedust 600 nm juures 15-minutiliste intervallidena. Mõõtmisprogrammi pikkus oli umbes 23 h, mille vältel oli temperatuur püsivalt 37°C ning segati topeltorbitaalselt. Tulemuste osas on esitatud kasvukõverad vase ja hõbeda kontsentratsioonide kohta, kus esinesid suurimad muutused. Kõik kasvukõverad on esitatud Lisades 1 ja 2.

2.2.4. Vase ja hõbeda minimaalse inhibeeriva ja bakteritsiidne kontsentratsioon

MIC väärtused määrati peatükis 2.2.5. saadud kasvukõverate hindamisel. Mutantide MIC väärtused määrati vase ja hõbeda sooladele ning võrreldi saadud väärtusi metsiktüve väärtustega. MIC väärtuseks loeti madalaim kontsentratsioon, mille juures ei olnud kasvukõveraid hinnates võimalik tuvastada eksponentsiaalset kasvu. Hõbenitraadiga teostati 6 ja vasksulfaadiga 4 korduskatset.

MBC katse teostati (Suppi et al., 2015) töös kirjeldatud meetodi järgi. Selle jaoks kasvatati ja pesti bakterid, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.2. ja lahjendati rakutiheduseni $OD_{600} = 0,2$ (umbes 2×10^8 CFU/ml). Metallisooladele tehti 96-kaevulistes mikrotiiterplaatides 75 µl mahus minimaalsöötmes kahekordsed lahjendused, millele lisati bakterisuspensioon 1:1 suhtes.

Kasutatud kontsentratsioonivahemikud on leitavad Tabelis 3. Plaatte inkubeeriti 37 °C juures staatiliselt ja tehti väljakülvid 1, 24 ja 48 h inkubatsiooni järel 5 µl mahus LB tardsöötmele ning asetati 24 tunniks 37 °C juurde kasvama. MBC väärtuseks loeti soola madalaim kontsentratsioon, mille korral puudus külvitäpis nähtav kasv täielikult.

2.2.5. Tundlikkuse määramine vase ja hõbeda pindadele

Pinnakatse formaat pärineb Sandra Pargi evolutsioonikatsesest (Rosenberg et al., 2025). Antud töös olid tulenevalt kasutatud tüve erinevast tundlikkusest (selle töö Lisa 3 ja Rosenberg et al., 2025 Joonis 1) ekspositsiooniajad erinevad: lühemad ajapunktid vase ja hõbeda pinnal kuivas orgaanikavaeses (KV) tingimustes ja vase pinnal niiskes orgaanikarikkas (NR) tingimuses. Hõbeda pinnal NR tingimustes oli ekspositsiooniaeg sama evolutsioonikatsesega. Bakteritüved kasvatati nii, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.2. Katse päeval lisati tüvedega LB tardsöötme tassidele 5 ml PBS-i ning peale 15-minutit suspendeeriti biomass. Fotomeetriga mõõdeti saadud bakterisuspensiooni 10- ja 100-kordset lahjendust, ning lahjendati esialgset suspensiooni ekspositsioonisöötmes sihitud OD₆₀₀-ni, et saavutada 8,13x10⁶ CFU-d pinna kohta (Tabel 4). KV katseformaadis kasutati ekspositsioonisöötmena orgaanikavaest saastelahust (500x lahjendatud NB sööde) ja NR katseformaadis orgaanilist saastelahust (SL).

Tabel 4. Pinnakatsete tingimused.

	Kuiv orgaanikavaene (KV)	Niiske orgaanikarikas (NR)
Sihtud bakterisuspensioonide OD₆₀₀	OD ₆₀₀ = 1	OD ₆₀₀ = 0,2
Rakkude sihtmärk arvukus pinna kohta	8,13x10 ⁶ CFU	
Tilga suurus ja arv	2 µl x 5 tilka	50 µl tilk
Ekspositsioonisööde	1:500 NB	SL
Ekspositsiooniajad	Cu 15 minutit	Cu 35 minutit
	Ag 1 tund	Ag 6 tundi
Temperatuur	22 °C	22 °C
Suhteline õhuniiskus	50% RH	90% RH

Nii KV kui NR katsetes kasutati 6-kaevulisi plaate, mille kaevude põhjas asuvale sõrestikule asetati vase või hõbeda pinnad. KV katses pipeteeriti igale pinnale plaadi põhjas viis 2 µl tilka

bakterisuspensiooni, misjärel plaat kaeti 9 x 9 cm sõrestiku ja kaanega. NR testformaadis pipeteeriti kaevude põhja 2 ml DI vett, mille peale asetati sõrestikud ning nende peale testpinnad. NR katses pipeteeriti igale pinnale üks 50 µl tilk bakterisuspensiooni. 6-kaevulised plaadid asetati Climacell Ecoline kliimakappi (BMT Medical Technology, Tšehhi), kus oli eelnevalt valitud katsele sobivad parameetrid, mis on välja toodud Tabelis 4.

Ekspositsiooni peatamiseks sukeldati pinnad 10 ml toksilisust neutraliseerivat söödet (SCDLP) sisaldavatesse 50 ml tuubidesse, kus neid vortekseeriti maksimaalsel intensiivsusel 30 sekundit. Esialgsetest inokulumidest ja eksponeeritud suspensioonidest tehti 96-kaevulistes mikrotiiterplaatides 300 µl mahus PBS-is kümnekordsete lahjenduste read, millest tehti 20 µl tilkkülvid LB tardsöötmetele. Külvitasse inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Hõbeda ja vase pindadel KV ja NR tingimustes teostati 3-4 katsekordust.

Pinnakatsetes kasutatud 3D printitud sõrestikke korduvkasutati, puhastades neid 70% etanooliga ja kiiritades mõlemalt poolt 15 min UVC kiirgusega suletud bioohutuskapis.

2.2.6. Andmeanalüüs ja statistika

Töös kasutati kvantitatiivsete tulemuste statistiliseks analüüsiks GraphPad Prism 10.4.1 (GraphPad Software Inc., USA). Kolme või enama andmegrupi statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks kasutati ühefaktorilist dispersioonianalüüsi (ANOVA) koos *post-hoc* testiga usaldusnivool 0,05. Kahe andmegrupi võrdlemisel kasutati ANOVA asemel Studenti t-testi usaldusnivool 0,05. Sama tarkvara kasutati ka AUC-i leidmiseks ja jooniste koostamiseks.

Kasvukõverate hindamiseks kasutati veebitööriista DGC (Reiter & Vorholt, 2024), mis eemaldas kasvukõveralt negatiivse kontrolli väärtuste alusel tausta ning tuvastas eksponentsiaalse kasvufaasi, mille alusel arvutas latentsiaja, saagise ja maksimaalse kasvukiiruse. Kasutati Gompertzi mudelit libiseva akna suurusega 10 (*sliding window of 10*).

Pinnakatsete tulemused väljendati suhtelise elumusena võrreldes metsiktüvega, mille saamiseks leiti kõigepealt kolooniate arv pinna kohta peale pinnaekspositsiooni ning jagati läbi metsiktüve keskmise kolooniate arvuga pinna kohta peale ekspositsiooni.

Kõikide arvutuste tegemiseks ja tabelite koostamiseks, mis olid sisendiks GraphPad-i ja DGC-i, kasutati Microsoft Excel versioon 2502 (Microsoft Corporation, USA).

2.2.7. Kasutatud andmebaasid

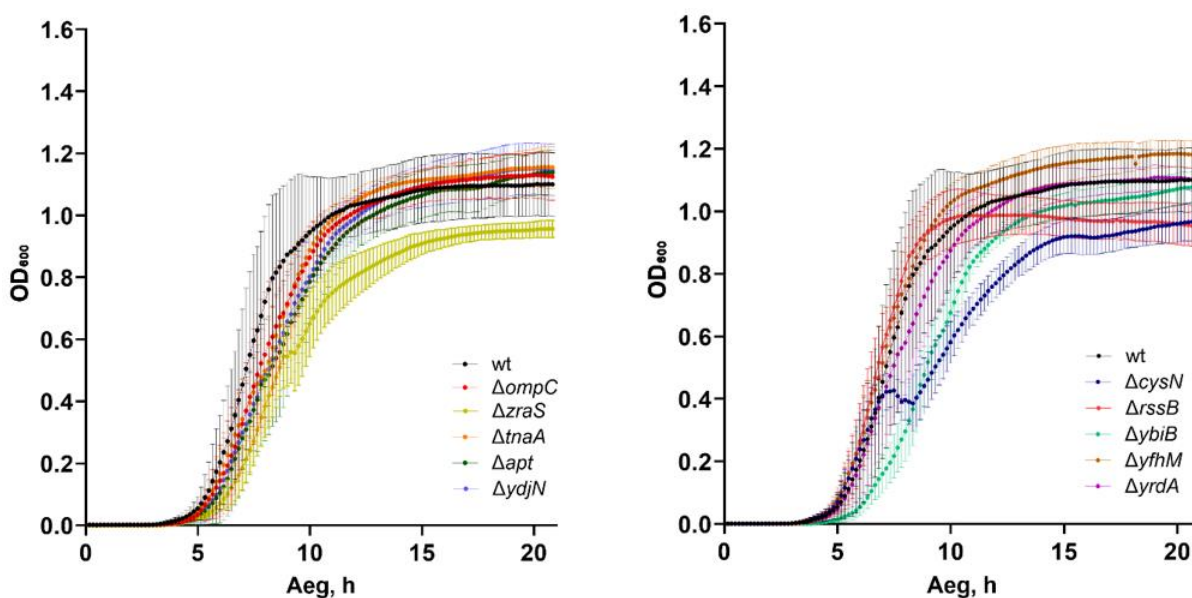
Käesolevas töös kasutati mutantide kirjeldamiseks EcoCyc andmebaasi (Moore et al., 2024). Teadusartiklid leiti kasutades Scopus andmebaasi (www.scopus.com).

2.3. Tulemused

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli tuvastada, kas huvipakkuvate geenide funktsioonikadu muudab *E. coli* vase ja hõbeda tundlikkust ning kas katkestusmutantide metallitundlikkus sõltub ekspositsioonitingimustest. Selleks kasutati KEIO kollektsioonist (Baba et al., 2006) pärit *E. coli* BW25113 metsiktüve ja ühe geeni katkestusmutante, millele määrati vase ja hõbeda MIC ja MBC väärtused. Paralleelselt MIC-i määramisega võrreldi kasvuparameetreid vase ja hõbeda põhjustatud mittetäielikul kasvuinhibitsioonil. Seejärel viidi läbi pinnatundlikkuse katsed vase ja hõbeda pindadel kuivades orgaanikavaestes ja niisketes orgaanikarikastes ekspositsioonitingimuses jäljendades mutantide valiku aluseks olnud varasema evolutsioonikatse tingimusi.

2.3.1. Katkestusmutantide kasvudefektid

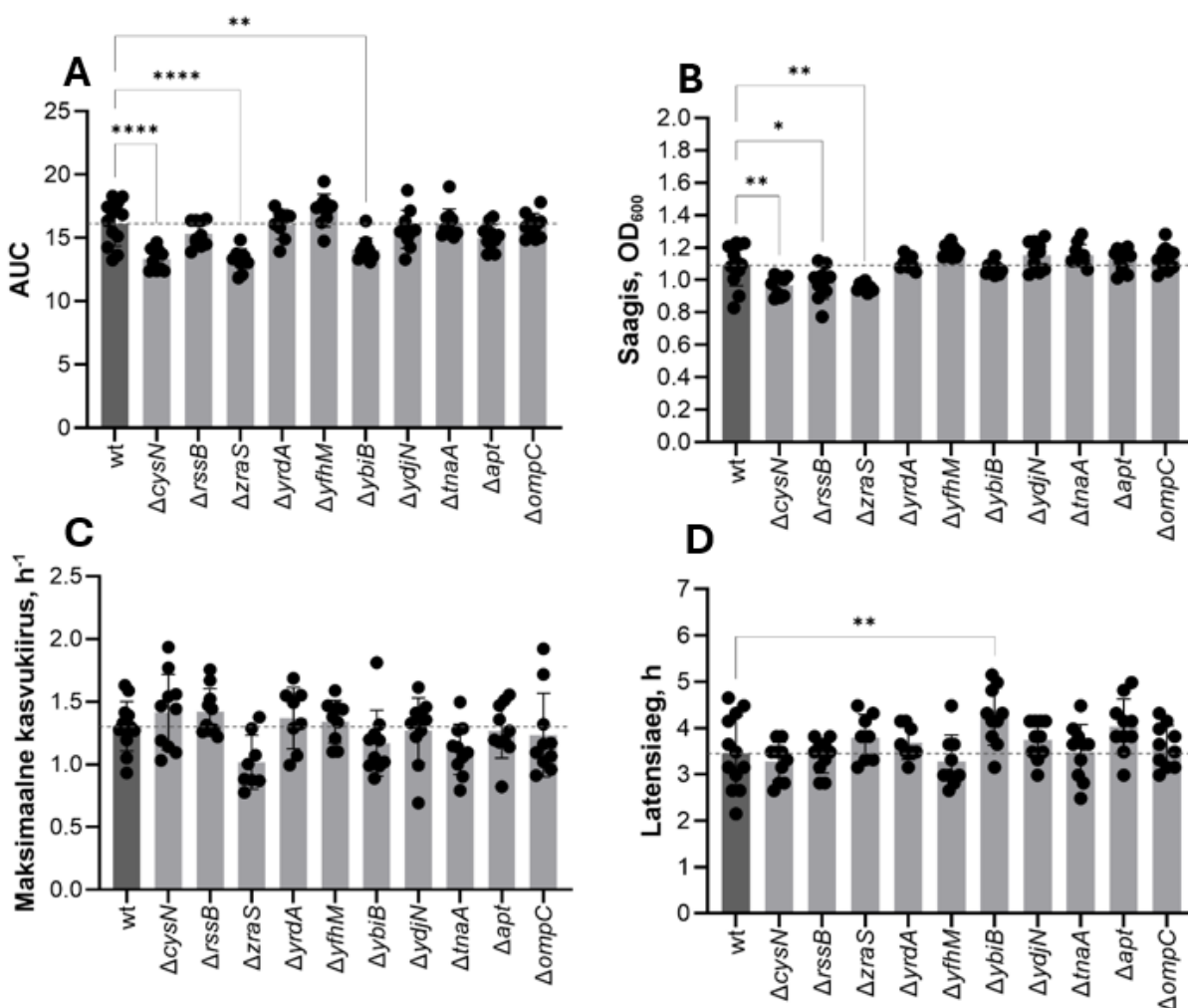
Katkestusmutantide kasvukõverad olid ilma vase ja hõbeda juuresolekuta suhteliselt sarnased metsiktüve kasvukõveratega. Metsiktüvest erineva kasvudünaamikaga oli $\Delta cysN$, millel esines selgelt kahefaasiline kasv (Joonis 1, paremal). $\Delta zraS$, $\Delta cysN$ ja $\Delta rssB$ kasvukõverad jäid madalamale platoole kui metsiktüve kasvukõver, mis väljendub ka madalamas saagise väärtuses (maksimaalne optiline tihedus) (Joonis 2B).



Joonis 1. *E. coli* BW25113 metsiktüve ja katkestusmutantide kasvukõverad vähekomplekserivas minimaalsöötmes. Optiline tihedus (OD) on mõõdetud lainepikkusel 600 nm, taust eemaldatud kasvuta kaevu optilise tiheduse alusel. Graafikul on esitatud 10 – 12 bioloogilise korduse andmepunktide keskväärts ja standardhälve. Loetavuse huvides on mutantid jaotatud kahele graafikule ja metsiktüve kasvukõver mõlemal märgitud mustaga.

$\Delta ybiB$ katkestusmutandil esines metsiktüvest oluliselt pikem latentsiaeg (Joonis 2D). Kuigi $\Delta zraS$ -il ilmneb joonisel 2C madalam maksimaalne kasvukiirus, ei erinenud ühegi mutandi kasvukiirus suure varieeruvuse tõttu statistiliselt oluliselt metsiktüvest.

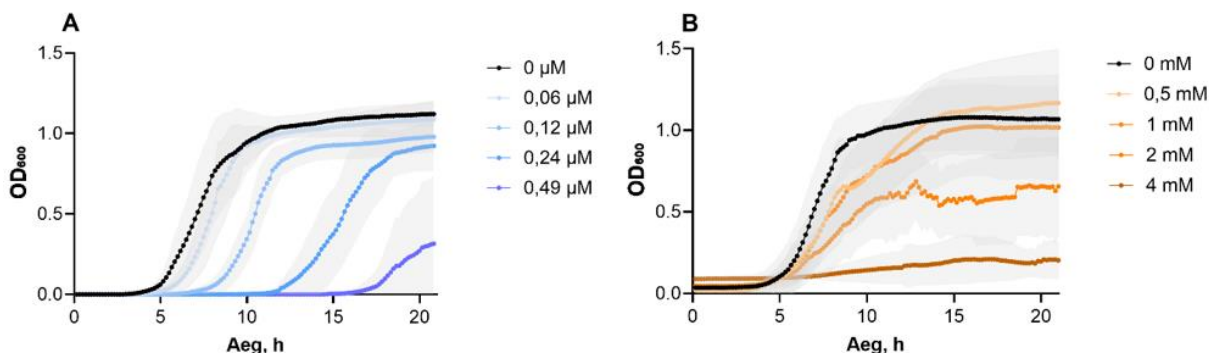
Vaadates erineva varieeruvusega kasvuparameetreid eraldi, oli keeruline tüvesid võrrelda, mistõttu, kasutati AUC väärtusi (Joonis 2A), mis kirjeldab korraga kõiki kasvuparameetreid. AUC väärtuse alusel esinesid kasvudefektid $\Delta cysN$ ja $\Delta zraS$ mutantidel, mis tulenes madalamast saagisest (Joonis 2B), ja $\Delta ybiB$ -l, mis tulenes pikemast latentsiajast (Joonis 2D). $\Delta rrsB$ puhul ei erinenud parameetrid koondav AUC väärtus (Joonis 2A) metsiktüvest hoolimata madalamast saagisest (Joonis 2B) ilmselt veidi kiirema kasvukiiruse tõttu (Joonis 2C).



Joonis 2. *E. coli* BW25113 metsiktüve ja katkestusmutantide kasvuparameetrid: kasvukõvera joonealune pindala (AUC) (A), saagis (B), maksimaalne kasvukiirus (C) ja latentsiaja pikkus (D) vähekomplekseerivas minimaalsöötmes. Joonisel on esitatud 10-12 bioloogilise korduse keskvärtus ja standardhälve. Statistilisel analüüsil kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos *post-hoc* testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulised muutused on märgitud * $P<0,05$; ** $P<0,01$; **** $P<0,0001$.

2.3.2. Kasvuparameetrid vase ja hõbeda juuresolekul

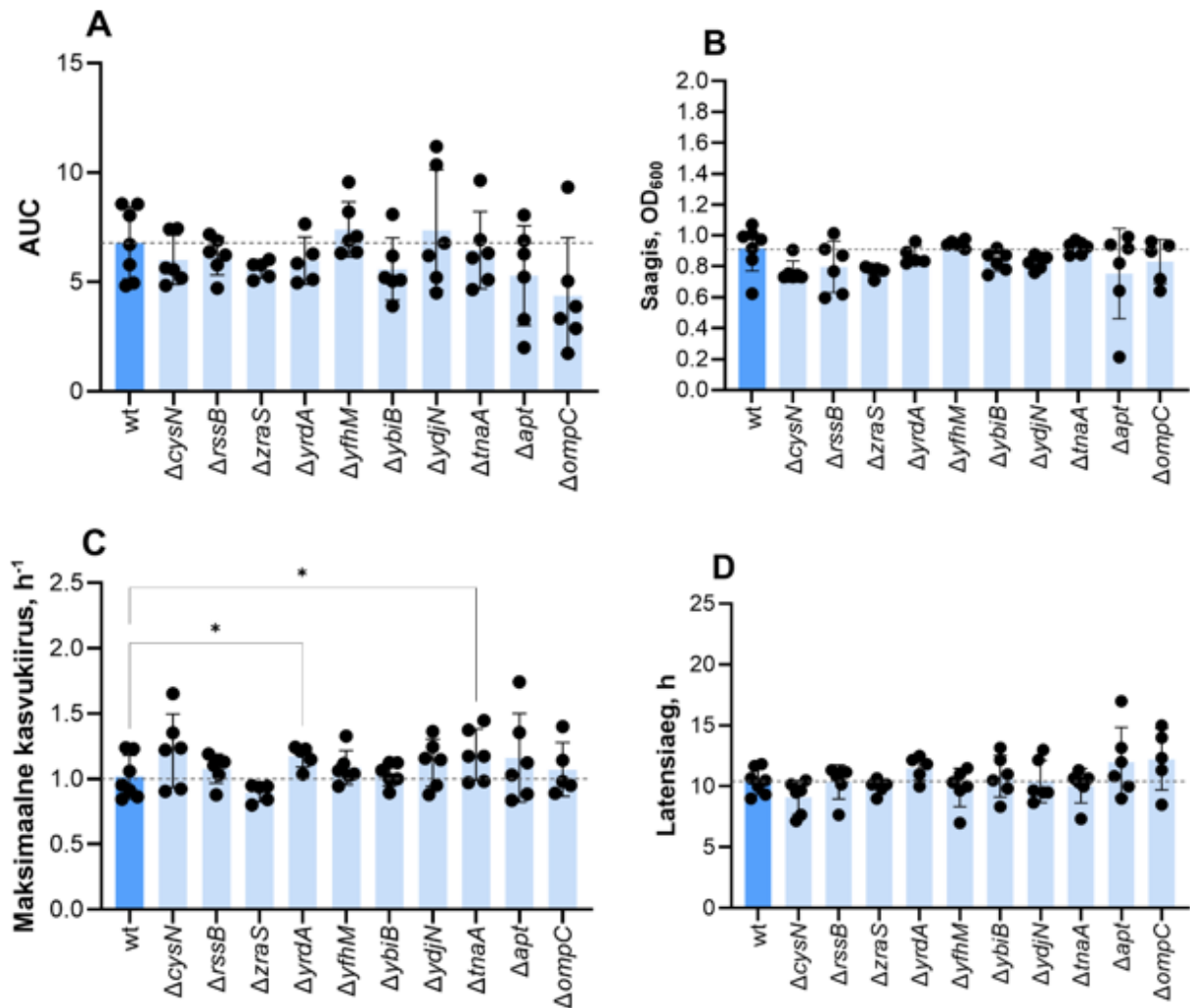
Vase või hõbeda lisamisel kasvukeskkonda täheldati erinevaid muutusi metsiktüve kasvukineetikas (Joonis 3). Hõbeda kontsentratsiooni tõustes pikenes latentsiaeg (Joonis 3A), kuid vase puhul vähenes pigem saagis ja kasvukiirus (Joonis 3B).



Joonis 3. *E. coli* BW25113 metsiktüve kasvukõverad hõbeda (A) ja vase (B) erinevatel kontsentratsioonidel vähekomplekserivas minimaalsöötmes. Optiline tihedus (OD) on mõõdetud lainepikkusel 600 nm, taust eemaldatud kasvuta kaevu optilise tiheduse alusel. Graafikul on esitatud 5-6 bioloogilise korduse andmepunktide keskvärtus ja standardhälve. Teiste tüvede kasvukõverad erinevatel metallikontsentratsioonidel on esitatud Lisas 1.

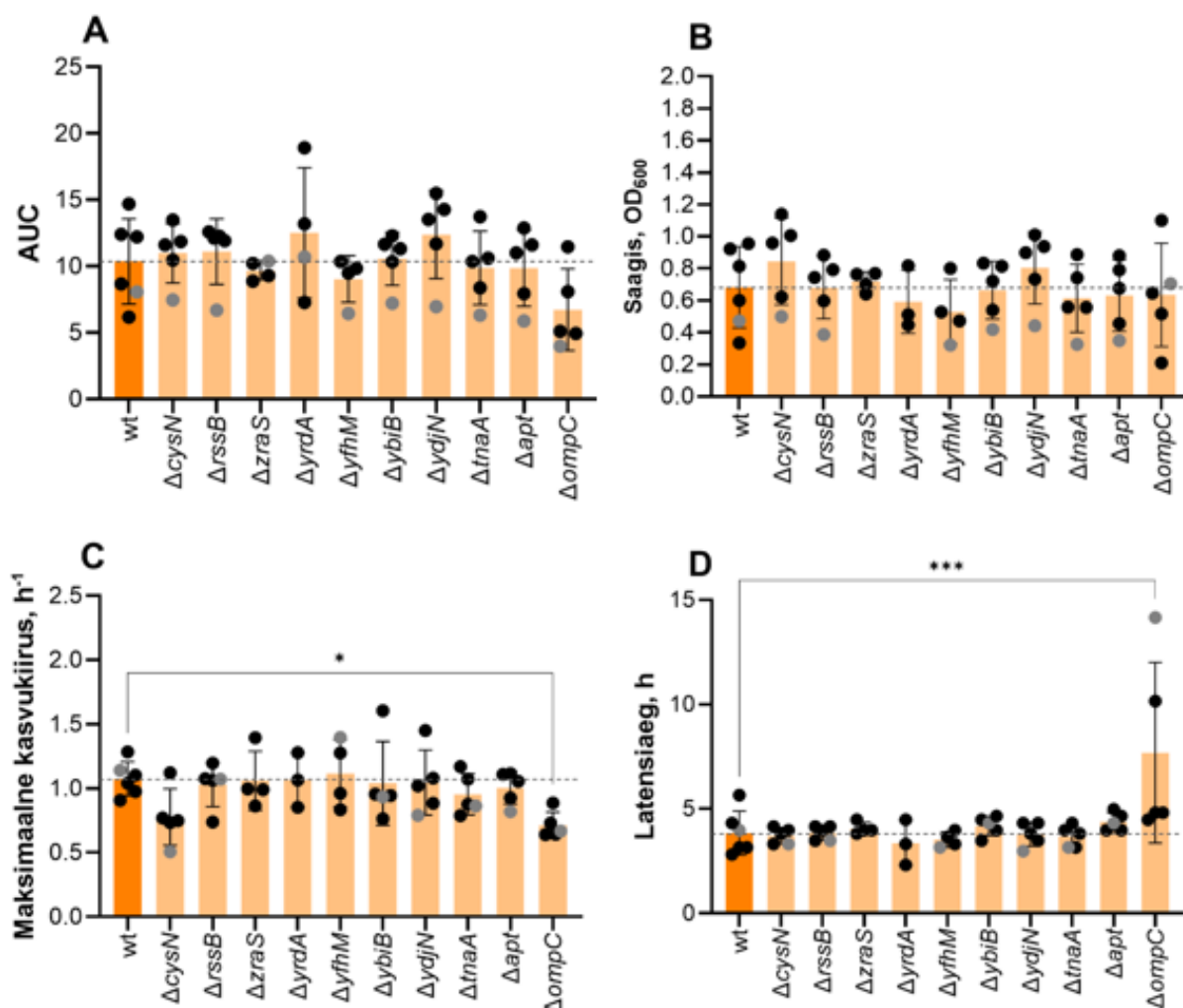
$\Delta cysN$, $\Delta zraS$ ja $\Delta ybiB$ mutantide kasvudefektid, mis esinesid metalli juuresolekuta (Joonis 2A), võivad esineda ka hõbeda juuresolekul (Joonis 4A), kuid suure katsete vahelise varieeruvuse tõttu ei ole erinevused metsiktüvest statistiliselt olulised. Kõrgematel hõbeda ja vase kontsentratsioonidel ilmnemid erinevused metsiktüve ja katkestusmutantide kasvukineetikas (Joonised 4 ja 5). $\Delta yrdA$ ja $\Delta tnaA$ katkestusmutantidel oli hõbeda juuresolekul maksimaalne kasvukiirus statistiliselt olulisemalt suurem metsiktüvest (Joonis 4C).

Hõbeda puhul ei erinenud mutantide AUC-i, saagise ja latentsiaja väärtused suure varieeruvuse tõttu statistiliselt oluliselt metsiktüvest (Joonis 4A, B ja D). $\Delta ompC$ puhul varieerub AUC väärtus pigem alla (Joonis 4A) ja võiks kahtlustada metsiktüvest suuremat hõbeda põhjustatud kasvuinhibitsiooni, aga selle kinnitamine vajaks lisakatseid.



Joonis 4. *E. coli* BW25113 katkestusmutantide kasvukõverate alusel arvutatud kasvukõvera joonealune pindala (AUC) (A), saagis (B), maksimaalne kasvukiirus (C) ja latentsiaeg (D) 0,24 μM hõbeda (AgNO_3) kontsentratsioonil vähekomplekseerivas minimaalsöötmes. Joonisel on esitatud 5-6 bioloogilise korduse keskvärtus ja standardhälve. Statistilisel analüüsil kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos *post-hoc* testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulised muutused on märgitud * $P<0,05$.

$\Delta cysN$, $\Delta zraS$ ja $\Delta ybiB$ mutantide kasvudefektid, mis esinesid ilma metallita (Joonis 2A), vase juuresolekul puuduvad (Joonis 5A). $\Delta ompC$ katkestusmutandil on vase juuresolekul metsiktüvest statistiliselt oluliselt madalam maksimaalne kasvukiirus (Joonis 5C) ja pikem latentsiaeg (Joonis 5D). Muid statistiliselt olulisi erinevusi kasvuparameetrites metsiktüve ja mutantide vahel vase juuresolekul ei esinenud. $\Delta cysN$ puhul tundub, et vase juuresolekul väheneb veidi kasvukiirus (Joonis 5C) ja suureneb saagis (Joonis 5B) võrreldes metsiktüvega, mistõttu potentsiaalsed teineteist tasakaalustavad muutused ei kajastu AUC väärtuses (Joonis 5A), küll aga on tendents vastupidine kasvudefektile, mis ilmnis ilma metallita söötmes (Joonis 2, madalam saagis ja AUC).

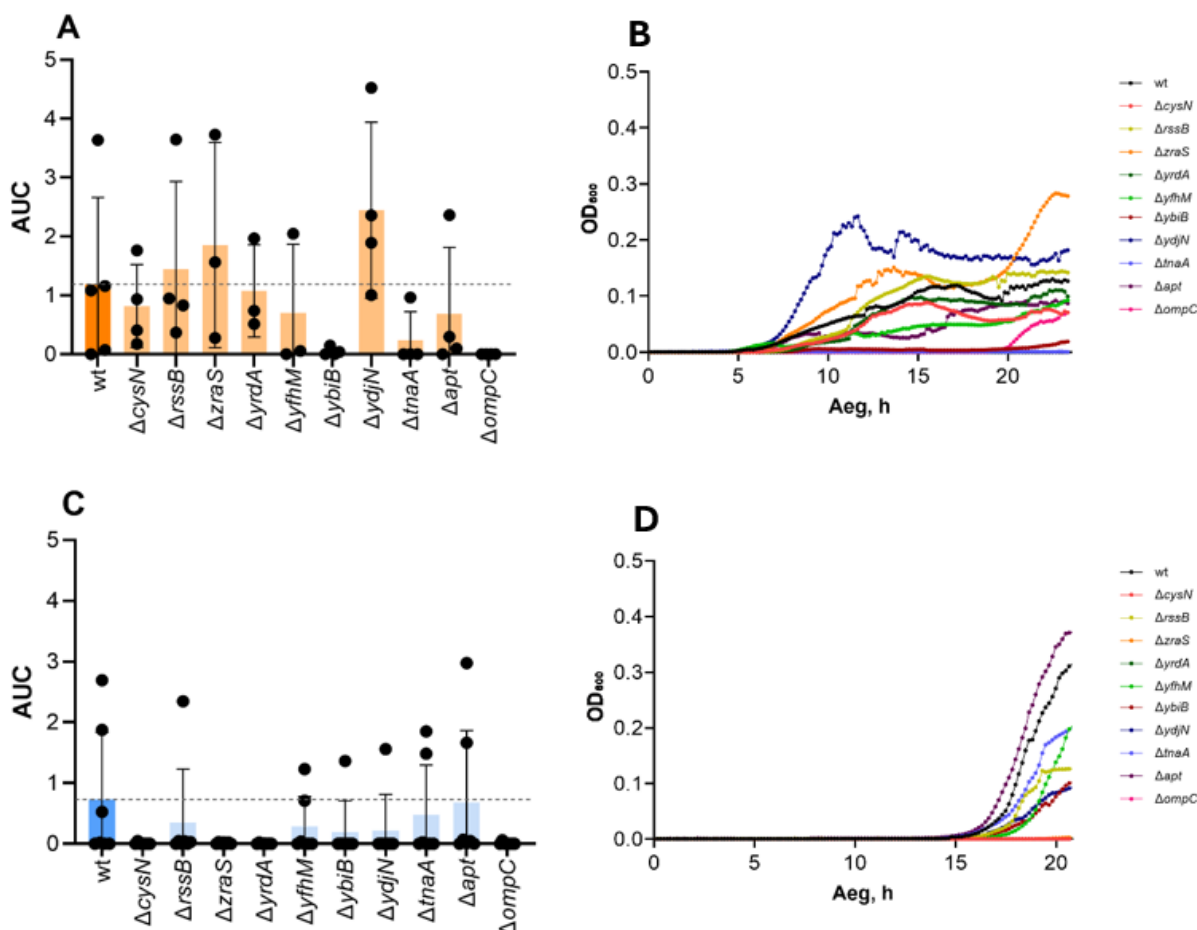


Joonis 5. *E. Coli* BW25113 katkestusmutantide kasvukõverate alusel arvutatud kasvukõvera joonealune pindala (AUC), saagis, maksimaalne kasvukiirus ja latentsiaeg 2 mM vase ($CuSO_4$) kontsentratsioonil vähekomplekseerivas minimaalsöötmes. Joonisel on esitatud 4-5 bioloogilise korduse keskvärtus ja standardhälve. Hallide täppidega on kujutatud ühe katse tulemused, mis erinesid teistest katsetest läbivalt madalama saagise tõttu. Statistilisel analüüsil kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos *post-hoc* testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulised muutused on märgitud * $P<0,05$; *** $P<0,001$.

Kõrgeimal kontsentratsioonil, kus kasv oli veel tuvastatav, aga kasvuparameetrid ei olnud enam kvantitatiivselt võrreldavad, sest osade tüvede puhul ja/või katsekordustes oli tegu täieliku inhibitsiooniga, ilmnesid madalamatest kontsentratsioonidest erinevad muutused (Joonis 6).

Vase puhul on $\Delta ybiB$, $\Delta ompC$, $\Delta yfhM$ ja $\Delta tnaA$ mutantide puhul erinevalt metsiktüvest enamikes katsetes tegu täieliku kasvuihbitsiooniga (MIC-väärtus)(Joonis 6A). $\Delta zraS$ mutandil on suur katsetevaheline latentsiaja varieeruvus, mis kajastub AUC väärtuses (Joonis 6A), aga mõõtmisperioodi lõpuks metsiktüvest palju kõrgem saagis (Joonis 6B). $\Delta yjdN$ mutandi puhul on metsiktüvest kõrgemate AUC väärtuste (Joonis 6A) põhjus seletatav nii metsiktüvest suurema kasvukiiruse kui kõrgema saagisega (Joonis 6B).

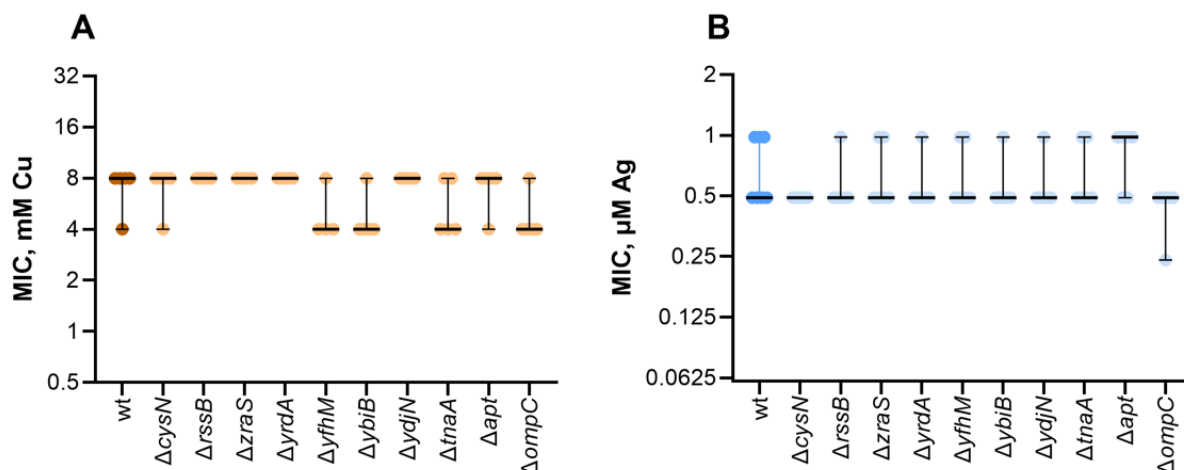
Kõrgeimal MIC-i eelsel hõbeda kontsentratsioonil esines kõigil tüvedel vähemalt osades katsekordustes täielikku kasvuinhibitsiooni (Joonis 6C), sellegipoolest võis Δapt mutandil täheldada nii kõrgemaid AUC väärtusi (Joonis 6C) tõenäoliselt lühema latsentsiaja tõttu (Joonis 6D) kui ka kõrgemat MIC väärtust (Joonis 7B), mis mõlemad viitavad paremale kasvamisvõimele kõrgel hõbeda kontsentratsioonil.



Joonis 6. *E. coli* BW25113 metsiktüve ja katkestusmutantide kasvukõverad ja kasvukõvera joonealused pindalad (AUC-id) vasesoola 4 mM (A, B) ja hõbesoola 0,49 μ M (C, D) kontsentratsioonil vähekomplekseerivas minimaalsöötmes. Optiline tihedus (OD) on mõõdetud lainepikkusel 600 nm, taust eemaldatud kasvuta kaevu optilise tiheduse alusel. Graafikutel on esitatud bioloogilise 4-6 korduse andmepunktide keskväärts ja standardhälve. Statistilisel analüüsil kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos *post-hoc* testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Tüvede kasvukõverate võrdlusgraafikud teistel metallikontsentratsioonidel on esitatud Lisas 2.

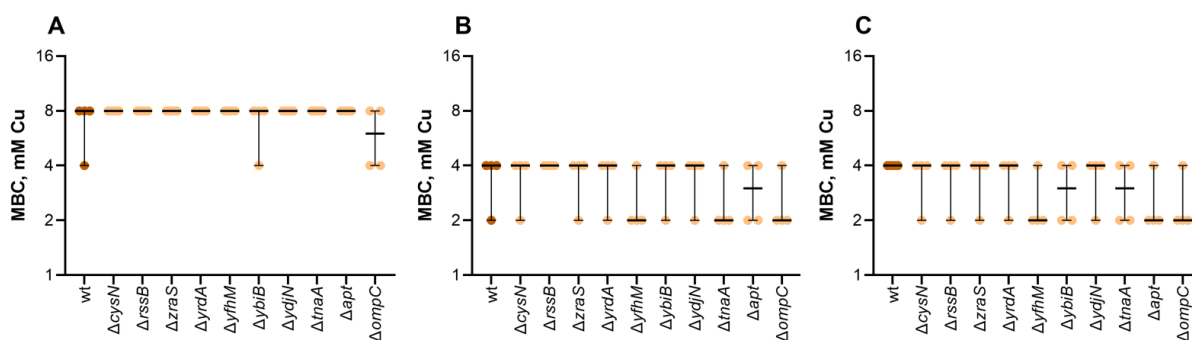
2.3.3. Minimaalne inhibeeriv ja bakteritsiidne kontsentratsioon

Mutantide vase ja hõbeda MIC väärtused erinesid metsiktüvest vähe. Erinevused olid maksimaalselt kahekordsed. Metsiktüvest madalam vase MIC esines $\Delta yfhM$, $\Delta ybiB$, $\Delta tnaA$ ja $\Delta ompC$ mutandil (Joonis 7A). Δapt mutant kasvas metsiktüvest kaks korda kõrgemal hõbeda kontsentratsioonil (Joonis 7B).

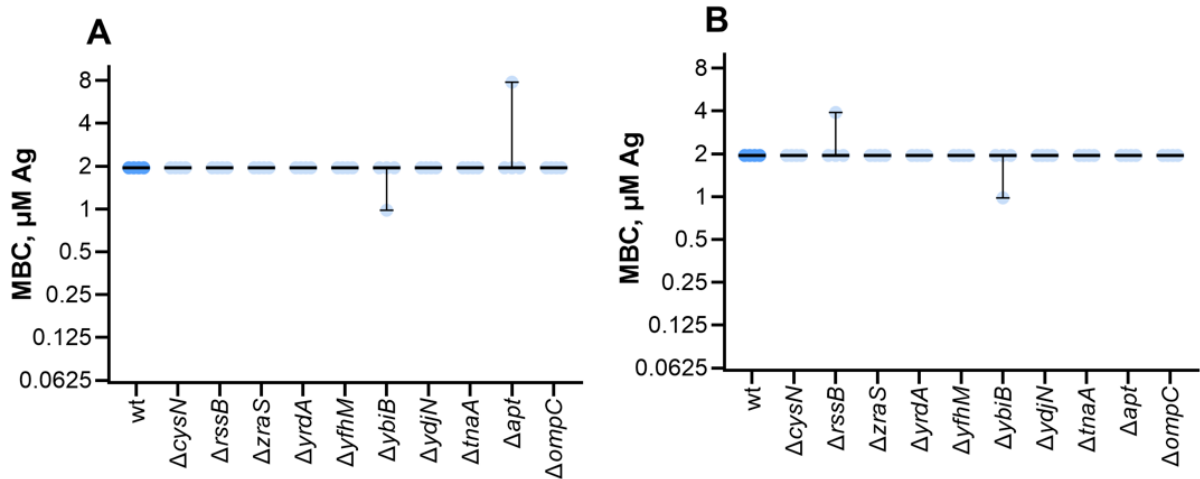


Joonis 7. *E. coli* BW25113 metsiktüve ja katkestusmutantide vase (A) ning hõbeda (B) minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC). Joonisel on esitatud 5-6 bioloogilise korduse andmepunkti mediaan ja variatsiooniulatus peale 24 h inkubatsiooni 37°C juures orbitaalse segamisega.

Mutantide vase MBC väärtused erinesid metsiktüvest maksimaalselt kaks korda ja toksilisus ajas kasvas (Joonis 8). Metsiktüvest madalam vase MBC väärtus pikemates ajapunktides esines *ΔyfhM*, *ΔtnaA*, *Δapt* ja *ΔompC* mutantidel (Joonis 8C). Hõbeda MBC väärtustes erinevusi ei esinenud (Joonis 9). Suure katsetevahelise varieeruvuse tõttu lühikeses ajapunktis, ei ole joonisel 9 esitatud hõbeda 1 h ajapunkti MBC tulemusi.



Joonis 8. *E. coli* BW25113 metsiktüve ja tema katkestusmutantide vase (CuSO_4) minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBC) vähekomplekseerivas minimaalsöötmes. Joonisel on esitatud 4 bioloogilise korduse andmepunktide mediaan ja variatsiooniulatus peale 1 h (A), 24 h (B) ja 48 h (C) staatilist ekspositsiooni 37°C juures.



Joonis 9. *E. coli* BW25113 metsiktüve ja tema katkestusmutantide hõbeda (AgNO₃) minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBC) vähekomplekserivas minimaalsöötmes. Joonisel on esitatud 4 bioloogilise korduse andmepunktide mediaan ja variatsiooniulatus peale 24 h (A) ja 48 h (B) staatilist ekspositsiooni 37°C juures.

2.3.4. Tundlikkus hõbeda ja vase pindadele poolkuivades tingimustes

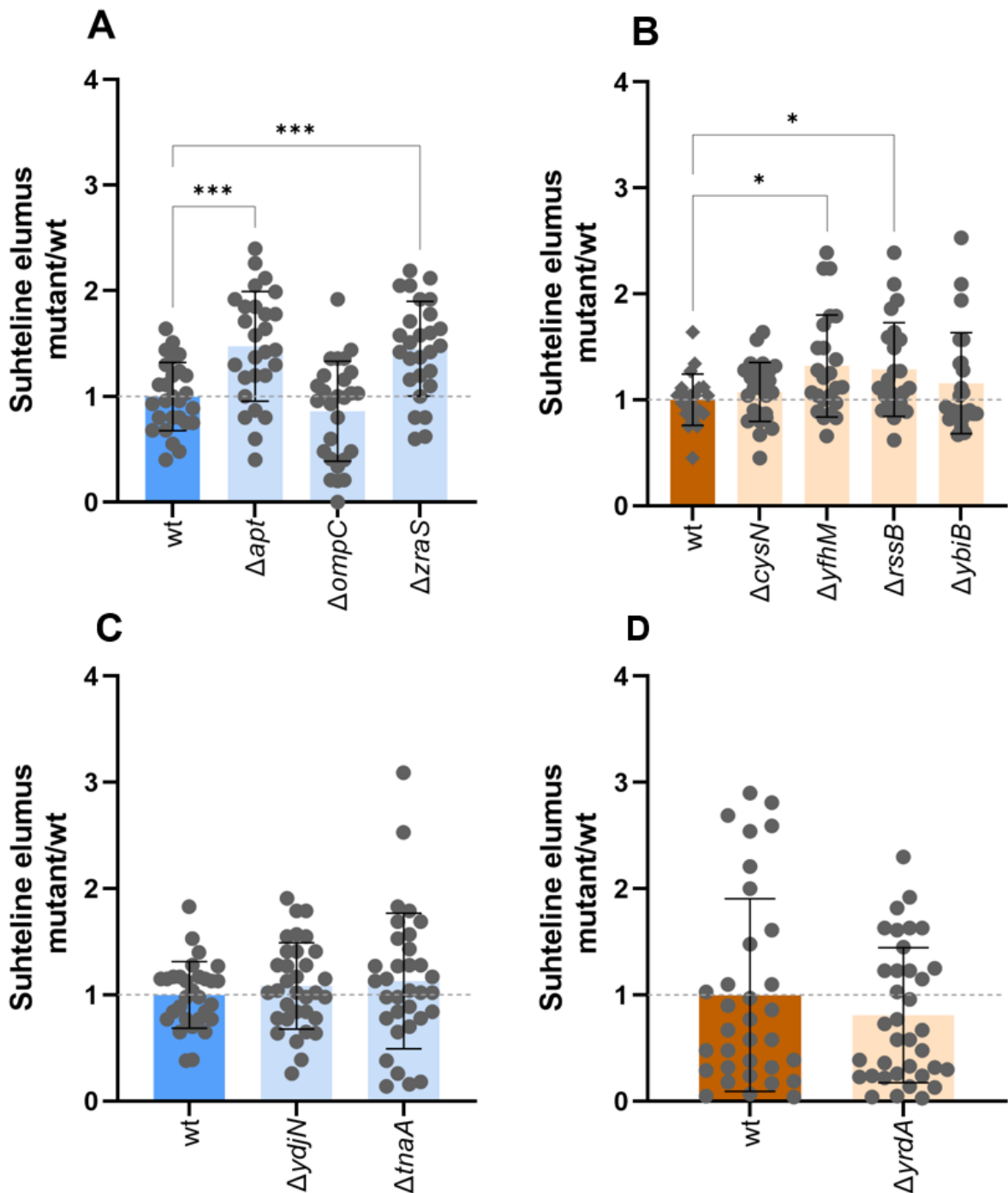
Et testida valitud geenide funktsioonikao mõju *E. coli* vase ja hõbeda pinnal eluspüsimise võimele, testiti metsiktüve ja katkestusmutantide pinnatolerantsust katsetingimustes, kus Sandra Pargi läbi viidud evolutsioonikatses (Rosenberg et al., 2025) vase ja hõbeda pinnal vastavates geenides mutatsioonid akumulerusid. Tabelis 5 on välja toodud vase ja hõbeda pindadel erinevates katsetingimustes kasutatud tüved.

Kuivades orgaanikavaestes tingimustes jäid metsiktüvest statistiliselt oluliselt paremini ellu Δapt ja ΔzraS hõbeda pinnal (Joonis 10A) ning ΔyfhM ja ΔrssB vase pinnal (Joonis 10B).

Niisketes orgaanikarikastes katsetingimustes ei erinenud ühegi vases (ΔyrdA) või hõbedal (ΔtnaA, ΔydjN) testitud katkestusmutandi elumus metsiktüvest (Joonis 10 C-D).

Tabel 5. Pinnakatses kasutatud *E. coli* BW25113 metsiktüvi ja mutandid hõbeda ja vase pindadel kuivades orgaanikavestes ja niisketes orgaanikarikastes katsetingimustes.

Ag, kuiv orgaanikavaene	Ag, niiske orgaanikarikas	Cu, kuiv orgaanikavaene	Cu, niiske orgaanikarikas
<i>ΔompC</i>	<i>ΔtnaA</i>	<i>ΔybiB</i>	<i>ΔyrdA</i>
<i>Δapt</i>	<i>ΔydjN</i>	<i>ΔcysN</i>	wt
<i>ΔzraS</i>	wt	<i>ΔyfhM</i>	
wt		<i>ΔrssB</i>	
		wt	



Joonis 10. *E. coli* BW25113 katkestusmutantide suhteline elumus kuivades orgaanikavaestes (A, B) ja niisketes orgaanikarikastes (C, D) tingimustes hõbeda (A, C) ja vase (B, D) pindadel. Joonisel on esitatud 2-3 bioloogilise katse andmepunktide keskvärtus ja standardhälve. Tulemuste statistilisel analüüsil kasutati ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos *post-hoc* testiga (A-C) või Studenti T-testi (D) usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulised muutused on märgitud * $P<0,05$; *** $P<0,001$.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö käigus kasutati ühe geeni katkestusmutante, et uurida valitud geenide funktsioonikao mõju *E. coli* hõbeda ja vase tundlikkusele erinevates testformaatides. Koondtulemused on esitatud Tabelis 6. Saadud informatsioon aitab mõista, kas vase ja hõbeda pinnal läbi viidud evolutsioonikatses, kus samades geenides mutatsioonid akumulatsioonid, võidi selekteerida konkreetse geeni funktsiooni häirumist. Kaudselt annab see infot nii erinevates katsetingimustes rakenduvate bakteriaalsete vase- ja hõbedavastaste kaitsemehhanismide kohta kui ka metallide toimemehhanismide kohta.

Tabel 6. Koondtulemused suhtelise muutusena metsiktüvest. Esimeses tulbas on välja toodud geenid, mille katkestusmutante töös kasutati ning teises tulbas Sandra Pargi läbi viidud (Rosenberg et al., 2025) evolutsioonikatses geenis esinenud mutatsioonid. Iga tulba kohal on numbriline viide selle töö tabelile või joonisele, kust andmed pärinevad. Oranži värviga on kujutatud katseid vasega ning sinisel taustal hõbedaga. Punane taust koos noole suunaga alla märgistab metsiktüvest kehvemat kasvu või ellu jäämist ja rohelisel taustal noole suunaga üles paremat kasvu või kõrgemat elumust. Kollase taustaga tulbas on välja toodud kasvuparameetrite tulemused ilma metallita. Halli taustaga on märgitud pinnakatse tingimus, kus vastavat katkestusmutanti ei testitud. Tärnidega on tähistatud statistiliselt olulised tulemused, kus *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; **** P<0,0001. Võrdusmärk tähistab metsiktüvega sarnaseid tulemusi.

		KEIO kollektiooni katkestusmutandid												
		Kasv ilma metallita	MIC Cu	MBC Cu	Kasv Cu 2 mM	Kasv Cu 4 mM	Pind Cu KV	Pind Cu NR	MIC Ag	MBC Ag	Kasv Ag 0,24 µM	Kasv Ag 0,49 µM	Pind Ag KV	Pind Ag NR
Tabel/joonis	1	2	7A	8	5	6A, B	10B	10D	7B	9	4	6C, D	10A	10B
<i>cysN</i>	Q440*	↓ ****	=	=	=	=	=	=	=	=	↓ ?	↓		
<i>rssB</i>	V120F	↓ *	=	=	=	=	↑ *		=	=	=	↓		
<i>zraS</i>	E145D	↓ ****	=	=	=	↑			=	=	↓ ?	↓	↑ ***	
<i>yrdA</i>	ülesvoolu 53 bp→54 bp	=	=	=	=	=		=	=	=	=	↓		
<i>yfhM</i>	T986I	=	↓	↓	=	↓	↑ *		=	=	=	↓		
<i>ybiB</i>	G13R	↓ **	↓	=	=	↓	↑ ?		=	=	↓ ?	↓		
<i>ydjN</i>	::IS1 ; G44D	=	=	=	↑	↑			=	=	=	↓		=
<i>tnaA</i>	M266I	=	↓	↓	=	↓			=	=	=	↓		=
<i>apt</i>	Q19K	=	=	↓	=	=			↑	=	=	↑ ?	↑ ***	
<i>ompC</i>	Y343*	=	↓	↓	↓	↓			=	=	↓	↓	=	

$\Delta rssB$, $\Delta yfhM$, $\Delta zraS$ ja Δapt mutantide metsiktüvest kõrgem elumus metallpindadel evolutsioonikatse tingimustes (Joonis 10) viitab, et evolutsioonikatses neis geenides akumulatsioonid missensmutatsioonid (Tabel 1) võisid rikkuda geenide funktsiooni. *RssB* kodeerib statsionaarse faasi sigma faktori σ^S -i lagundamist reguleerivat valku ning *rssB* geeni funktsioonikao korral suureneb σ^S tase (Bougdoor et al., 2006), mida on ka varasemas kirjanduses seostatud bakterite kõrgema stressitaluvusega (Fontaine et al., 2008). *YfhM*

kodeerib eukarüootset päritolu periplasmaatilist α 2-makroglobuliini, mis osaleb bakteriraku kaitse reaktsioonides peptidaaside vastu (Budd et al., 2004), kuid mille funktsioonikao seos vähenenud metallitundlikkusega ei ole selge. *ZraS* kodeerib sensoorset histidiinkinaasi, mis on osa membraanistressi signaaliseerimises osalevast *ZraSR* kahekomponentsest süsteemist (Petit-Härtlein et al., 2015). Mutatsioonid *ZraS*-i sensordomeenis võivad mõjutada sensori afiinsust ka teiste metallide suhtes lisaks juba teadaolevatele tsingile ja vasele (Taher & De Rosny, 2021). *Apt* kodeerib adeniini fosforsüültransferaasi, mis osaleb adeniini metabolismis ning mille funktsiooni häirimise korral on näidatud adeniini akumulereerumist rakus ja vähenenud vasetundlikkust tõenäoliselt vase adeniiniga sidumise tõttu (Norambuena et al., 2023). Käesolevas töös ilmnes vase puhul hoopis muutumatu või veidi metsiktüvest suurem vasetundlikkus (Joonis 8), kuid vähenenud hõbedatundlikkus MIC testis (Joonis 7B), mis võiks samuti olla seotud hõbeda detoksifitseerimisega akumulereerunud adeniini abil.

Võimalik, et ka *ybiB* puhul selekteeriti evolutsioonikatses funktsioonikadu, mis tagas veidi kõrgema elumuse vaskpinnal (Joonis 10B), kuid muutus on väiksem, kui antud töös kasutatud meetoodika statistiliselt usaldusväärselt tuvastada võimaldas. *YbiB* on LexA poolt reguleeritud DNA-ga seonduv valk, mille funktsioonist pole palju teada teada, kuid tema roll metallitundlikkuses võiks olla seotud SOS-vastusega (Schneider et al., 2015).

Ükski katkestusmutant ei demonstreerinud vase või hõbeda pinnal metsiktüvest suuremat suremust (Tabel 6), mistõttu võib järeldada, et nende funktsioon ei ole antimikroobse metallpinna talumises kriitiliselt vajalik või ei olnud väikesed muutused pinnatundlikkuses elusarvukuse määramise meetoodika tulemi varieeruvuse tõttu tuvastatavad. Mõnel juhul võiks aga kahtlustada funktsioonikao kahjulikkust metallitundlikkuse kontekstis. Näiteks, kuigi $\Delta ompC$ elumus vase pinnal oli väga varieeruv (Joonis 10A) ja ei erinenud statistiliselt oluliselt metsiktüvest, kasvas see katkestusmutant metsiktüvest üldise trendina veidi kehvemini nii vase kui hõbeda juuresolekul (Joonis 4-6). Samuti iseloomustasid $\Delta ompC$ metsiktüvest madalamad vase MIC (Joonis 7) ja MBC (Joonis 8) väärtused. Sandra Pargi evolutsioonikatses (Rosenberg et al., 2025) tuvastati stoppkoodon *ompC* geeni lõpuosas, mis ei pruugi põhjustada täielikku funktsioonikadu, vaid vastava trimeerse välismembraani poriini pooriparameetrite muutust, mis takistab metalliioonide rakku pääsemist. Sellest võis tuleneda kõrgem elumus hõbeda pinnal kuivades orgaanikavaestes tingimustes. Varasemalt on näidatud, et *OmpC* seob hästi metalliioone (Maruthamuthu et al., 2018), mis võiks toimida metalliioonide detoksifitseerijana, isegi kui poriin on välismembraanis mittefunktsionaalne. Selleks peaks katkestusmutanti võrdlema trunkeeritud valku kodeeriva mutandiga. Varasemate uuringute tulemused *ompC*

geeni mõju kohta metallitundlikkusele on olnud vastuolulised. Mõnedes uuringutes ei ole *ompC* geeni puudumisel täheldatud vase- ja hõbedasoolade suhtes tundlikkuse vähenemist (X. Z. Li et al., 1997), samas kui teistes on täheldatud suurenenud tolerantsust hõbeioonide ja -nanoosakeste suhtes (Radzig et al., 2013). Sellised erinevused võivad tuleneda varieeruvatest katsetingimustest või kasutatud bakteritüvedest.

On tähelepanuväärne, et kuigi $\Delta rssB$, $\Delta zraS$, $\Delta yfhM$ ja $\Delta ybiB$ jäävad paremini ellu vask- või hõbepindadel (Joonis 10), ilmnevad neil kasvufektid vedelsöötmes (Joonis 2), mis illustreerib lõivsuhet efektiivsema kasvu ja biotsiidse stressi talumise vahel. Ka varem on täheldatud, et näiteks vasepinnale tolerantsemad bakterid on aeglasema kasvuga (Xu et al., 2022). $\Delta zraS$ katkestusmutandi kasvufektid vedelsöötmes vähenesid vasekontsentratsiooni suurenedes söötmes kuni metsiktüvest efektiivsema kasvuni kõige kõrgemal MIC-i eelsel kontsentratsioonil (Joonised 5 ja 6). Kasvufektid ei kadunud hõbeda juuresolekul vedelsöötmes (Joonised 4 ja 6), mis viitab nende metallide erinevatele toimemehhanismidele ja sellest lähtuvalt erinevatele bakteriaalsetele kaitsemehhanismidele. Lisaks ilmneb, et vähenenud tundlikkus vase pinnale kuivades orgaanikavaestes tingimustes ei ole ennustatav kasutades klassikalisi bakteriostaatilise ja bakteritsiidse toime hindamise meetodeid vedelsöötmes. Näiteks on $\Delta yfhM$ mutandil metsiktüvest madalamad vase MIC (Joonis 7A) ja MBC (Joonis 8) väärtused, kuid kõrgem elumus vase pinnal (Joonis 10B). See viitab, et vase ja hõbeda pindade toimemehhanism ei baseeru ainult pinnalt vabanevate ionide toimel, vaid oluline on ka bakterite otsekontakt pinnaga ja/või ekspositsioonitingimustest tulenev lisastress, nagu on demonstreeritud või arutletud ka varasemates töödes (Bleichert et al., 2020; Rosenberg et al., 2018, 2025).

0,5 mM vase juuresolekul vedelsöötmes esineb hormeetiline efekt, kus nii metsiktüvel kui kõigil katkestusmutantidel on saagis suurem kui ilma vaseta (Lisa 1). Kuigi ilma vase juuresolekuta jääb peale $\Delta zraS$ -i ja $\Delta cysN$ -i kõigil katkestusmutantidel saagis metsiktüvest väiksemaks, siis hormeetilisel 0,5 mM vase kontsentratsioonil saavutab enamik katkestusmutante metsiktüvest kõrgema saagise. Erinevalt teistest katkestusmutantidest ja metsiktüvest esineb $\Delta ydjN$ -il hormeetiline efekt nii 0,5 mM kui ka 1 mM kontsentratsioonil, mis võiks viidata selle mutandi paremale kasvule madalatel vase kontsentratsioonidel (Lisad 1 ja 2). Kuigi $\Delta ydjN$ ei demonstreerinud oluliselt väiksemat suremust hõbeda pinnal evolutsioonikatse tingimustes (Joonis 10C) kasvas ta metsiktüvest oluliselt paremini kõrgetel vasekontsentratsioonidel (Joonised 5 ja 6). Sandra Pargi *E. coli* evolutsioonikatses (Rosenberg et al., 2025) akumulerus niisketes orgaanikarikastes tingimustes hõbeda pinnal

bakteripopulatsioonis *ydjN* katkestus IS-elementi poolt, mis suure tõenäosusega tähendab funktsioonikadu. Evolutsioonikatses isoleeritud *ydjN* katkestust kandev isolaat jäi niisketes orgaanikarikastes tingimustes eellaastüvest paremini ellu nii vase kui hõbeda pinnal ja samuti oli tal kõrgem vase MBC väärtus, mis ei lange üheselt kokku käesolevas töös $\Delta ydjN$ -iga saadud tulemustega, aga siinkohal tuleb arvestada, et käesolevas töös ja evolutsioonikatses kasutati erinevat *E. coli* tüve ning evolutsioonikatses isoleeritud IS insertiooni kandvas genoomis esines teisigi mutatsioone, mille geneetiline kontekst võis samuti metallitundlikust mõjutada

Lisaks täheldati, et hõbe ja vask mõjuvad nii metsiktüve kui ka selle katkestusmutantidele kasvu erinevalt (Joonis 3, Lisad 1 ja 2). Hõbeda kontsentratsiooni tõustes kasvusöötmes pikenes latentsiaeg, kuid vase puhul langes pigem saagis ja maksimaalne kasvukiirus (Joonis 3). Sellest saab järeldada, et kuigi bakterite teadaolevad vase ja hõbeda vastased kaitsemehhanismid on vähemalt osaliselt kattuvad, võivad nende metallide antibakteriaalsed toimetehhanismid olla erinevad.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas *E. coli* tsüklilisel vase ja hõbeda pindadele eksponeerimisel kõrge sagedusega akumulunud mutatsioonide puhul võis potentsiaalse metallitolerantsuse suurenemise põhjuseks olla muteerunud geeni funktsiooni osaline või täielik funktsioonikadu. Eksperimentaalses töös kasutati *E. coli* ühe geeni katkestusmutante, et hinnata huvipakkuvate geenide täieliku funktsioonikao mõju vase- ja hõbedatundlikkusele erinevates katsetingimustes.

Mitmed katkestusmutandid (nt $\Delta rssB$, $\Delta zraS$, $\Delta yfhM$, Δapt , $\Delta ybiB$) jäid hõbeda või vase pinnal metsiktüvest paremini ellu nendes ekspositsioonitingimustes, millistes neis geenides eelnevates evolutsioonikatsetes mutatsioone akumulerus. Seetõttu võib nendes geenides algselt tuvastatud mutatsioonide puhul olla tegemist metallitundlikkust vähendava osalise või täieliku funktsioonikaoga. Samas ei esinenud metallpindadel ühelgi mutandil metsiktüvest kõrgemat suremust, viidates, et uuritud geenid ei ole metallpindade talumisel kriitiliselt vajalikud.

Mitmed katkestusmutandid ($\Delta rssB$, $\Delta yfhM$, $\Delta zraS$, Δapt), millel esines metsiktüvest kõrgem elumus vask- või hõbepinnal, kasvasid inhibeeriva metallilisandita vedelsöötmes metsiktüvest kehvemini, mis osutab võimalikule lõivsuhtele kasvuefektiivsuse ja stressitaluvuse vahel. Huvitaval kombel ei ennustanud klassikalised MIC ja MBC testid metallisooladega vedelsöötmes alati bakterite tundlikkust vastavatele metallpindadele, mille peamiseks toimemehhanismiks peetakse ionide vabanemist, mis omakorda viitab, et vask- ja hõbepindade antimikroobne toime ei põhine üksnes lahustuvatel ioonidel, vaid ka otsesel kokkupuutel pinnamaterjaliga või tingib keskkonnatingimustest tulenev lisastress olulisi muutusi bakteri kaitsemehhanismide rakendamises. Lisaks avastati töö käigus, et kuigi vase- ja hõbedavastaseid bakteriaalseid kaitsemehhanisme peetakse suuresti kattuvateks, pärssisid vase- ja hõbedaioonid bakterite kasvu vedelsöötmes erinevalt, mis viitab erinevusele nende metallide antibakteriaalsetes toimemehhanismides.

Saadud tulemused on olulised, sest aitavad paremini mõista bakteriaalseid vase ja hõbeda vastaseid kaitsemehhanisme erinevates ekspositsioonitingimustes, mida saab arvesse võtta tõhusamate antimikroobsete materjalide välja töötamisel ja antimikroobsete materjalide kasutamise seotud riskide hindamisel.

RESÜMEE/SUMMARY

The effect of loss of function in selected genes on *Escherichia coli* metal tolerance in different test formats

Carmen Marianne Teär

Summary

Antimicrobial surfaces are widely applied to prevent the spread of potentially pathogenic microbes, particularly in public spaces and in healthcare settings. Most used are metal-based antimicrobial surface coatings, e.g. silver and copper, whose antimicrobial properties have been known for centuries. Most research has focused on the antibacterial activity of metals in liquid environments, which does not accurately reflect conditions on solid contact surfaces, where the mechanisms of antimicrobial action may differ. It has also been found that the antibacterial efficacy depends on exposure conditions, including contact time, temperature, relative humidity, organic soiling *etc.*

Sandra Park has previously conducted evolution experiments in which *E. coli* ATCC 8739 was cyclically exposed to copper and silver surfaces in different semi-dry test conditions. High-frequency mutations in the evolved populations were suspected to be potentially selectively accumulated due to the role of the affected genes in antimicrobial metal tolerance. The main objective of this study was to characterize the effect loss-of-function of the described genes in silver and copper tolerance. For that, single gene knockout mutants from the *E. coli* BW25113 KEIO collection were used to study how the mutants respond to growth inhibition and biocidal exposures caused by silver and copper ions or solid surfaces compared to the wild-type strain.

Minimal inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC, respectively) values of the wild-type and mutants were determined to assess the differences between bacteriostatic and bactericidal activity in liquid growth medium. In parallel with MIC assay, kinetic growth parameters were studied at concentrations causing partial growth inhibition. Subsequently, surface tolerance assays were conducted on copper and silver surfaces under low-organic dry and high-organic humid exposure conditions.

This study found that several knockout mutants, including $\Delta rssB$, $\Delta yfhM$, $\Delta zraS$, Δapt , and $\Delta ybiB$, exhibited improved survival on copper and/or silver surfaces, suggesting that the selective advantage of the mutations in these genes during the prior evolution experiments may have been caused by adaptive loss-of-function. This is particularly evident for the *rssB* gene,

whose loss has been described to lead to increased σ^S levels and enhanced bacterial stress tolerance. Similar associations can be hypothesized for *zraS* and *apt* mutations, although the mechanisms may differ — for example, loss of *apt* function may lead to intracellular accumulation of adenine, which in turn could reduce metal ion toxicity via sequestering mechanism previously described for copper.

At the same time, all knockout mutants tested showed at least equivalent survival compared to the wild type, indicating that the studied genes are not critically required for bacterial survival on silver and copper surfaces. However, increased sensitivity was observed in growth medium, *e.g.* for the $\Delta ompC$ mutant, which displayed lower MIC and MBC values for both silver and copper, and impaired growth in the presence of metals compared to wild-type. This suggests that the *ompC* gene plays a role in metal sensitivity but it was probably not loss-of-functions that provided selective advantage in the prior evolution experiments.

Interestingly, several mutants with improved survival on metal surfaces exhibited growth defects in liquid medium, indicating a possible trade-off between stress tolerance and growth rate, as also reported in previous research. Furthermore, classical bactericidal and bacteriostatic assays (*e.g.*, MIC, MBC) in liquid media may not adequately predict bacterial response to antimicrobial active agents and materials in semi-dry conditions such as on antimicrobial surfaces.

For example, the $\Delta yfhM$ mutant showed lower MIC and MBC values for ionic copper in growth medium but better survival on copper surfaces, implying that the antimicrobial effect of the copper surfaces is not solely based on ion release but also significantly influenced by direct contact with the metal surface.

In summary, the results confirm that genetic changes leading to increased metal tolerance can be caused by loss-of-function mutations, but their effects strongly depend on growth environment and exposure conditions. Moreover, the findings suggest that classical laboratory tests used to evaluate antimicrobial efficacy may not sufficiently predict bacterial behavior on dry antimicrobial surfaces, where the mechanism of antibacterial action and bacterial defense strategy may be more complex and multifactorial.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajat Merilin Rosenbergi, kes oli alati suureks toeks ja teadis vastuseid igale küsimusele. Lisaks tänan ma kõiki uurimisgrupi liikmeid, kes võtsid mu soojalt vastu ning aitasid alati.

Täname väga Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis Niilo Kaldalut, kelle käest pärinesid antud töös kasutatud KEIO kolleksioonist pärit *E. coli* BW25113 katkestusmutandid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Adeyemi, O. S., Shittu, E. O., Akpor, O. B., Rotimi, D., & Batiha, G. E.-S. (2020). Silver nanoparticles restrict microbial growth by promoting oxidative stress and DNA damage. *EXCLI Journal*; 19:Doc492; ISSN 1611-2156. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2020-1244>
- ASTM International. (2018). *Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) In Polymeric or Hydrophobic Materials*. ASTM International. <https://doi.org/10.1520/E2180-18>
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., & Takagi, H. (2005). Identification and Functional Analysis of *Escherichia coli* Cysteine Desulhydrases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4149–4152. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4149-4152.2005>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- 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>
- Bougdour, A., Wickner, S., & Gottesman, S. (2006). Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of σ^S stability in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 20(7), 884–897. <https://doi.org/10.1101/gad.1400306>
- Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J., Lee, B. T. O., & Rouch, D. A. (1995). Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Molecular Microbiology*, 17(6), 1153–1166. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17061153.x
- Budd, A., Blandin, S., Levashina, E. A., & Gibson, T. J. (2004). Bacterial α 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>
- Cavenaghi, L. A., Biganzoli, E., Danese, A., & Parenti, F. (1992). Diffusion of teicoplanin and vancomycin in agar. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 15(3), 253–258. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(92\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0732-8893(92)90121-9)
- Dutta, P. (2011). Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: Release of silver ions and mechanism of antibacterial action. *International Journal of Nanomedicine*, 1833. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24019>
- EPA. (2022). *Test Method for Evaluating the Efficacy of Antimicrobial Surface Coatings MB-40-00*.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3)

- Fontaine, F., Stewart, E. J., Lindner, A. B., & Taddei, F. (2008). Mutations in two global regulators lower individual mortality in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *67*(1), 2–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05988.x>
- 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>
- Giannousi, K., Lafazanis, K., Arvanitidis, J., Pantazaki, A., & Dendrinou-Samara, C. (2014). Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles: Antimicrobial screening and interaction with DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.12.009>
- Gomes, I. B., Simões, L. C., & Simões, M. (2019). The role of surface copper content on biofilm formation by drinking water bacteria. *RSC Advances*, *9*(55), 32184–32196. <https://doi.org/10.1039/C9RA05880J>
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). Genes Involved in Copper Homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *183*(6), 2145–2147. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2145-2147.2001>
- Gupta, A., Matsui, K., Lo, J.-F., & Silver, S. (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in Salmonella. *Nature Medicine*, *5*(2), 183–188. <https://doi.org/10.1038/5545>
- ISO. (2011). 22196: 2011-Measurement of Antibacterial Activity on Plastics and Other Non-Porous Surfaces. *BSI British Standards: London, UK*, 1–15.
- Ivanova, E. P., Hasan, J., Webb, H. K., Truong, V. K., Watson, G. S., Watson, J. A., Baulin, V. A., Pogodin, S., Wang, J. Y., Tobin, M. J., Løbbe, C., & Crawford, R. J. (2012). Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of *Pseudomonas aeruginosa* Cells by Cicada Wings. *Small*, *8*(16), 2489–2494. <https://doi.org/10.1002/smll.201200528>
- 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>
- Kirakosyan, G., Trchounian, K., Vardanyan, Z., & Trchounian, A. (2008). Copper (II) Ions Affect *Escherichia coli* Membrane Vesicles' SH-Groups and a Disulfide-Dithiol Interchange Between Membrane Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *51*(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s12013-008-9014-7>
- Käkinen, A., Bondarenko, O., Ivask, A., & Kahru, A. (2011). The Effect of Composition of Different Ecotoxicological Test Media on Free and Bioavailable Copper from CuSO₄ and CuO Nanoparticles: Comparative Evidence from a Cu-Selective Electrode and a Cu-Biosensor. *Sensors*, *11*(11), 10502–10521. <https://doi.org/10.3390/s111110502>
- Li, X., Shi, J., Sun, H., & Lin, Z. (2020). Hormetic dose-dependent response about typical antibiotics and their mixtures on plasmid conjugative transfer of *Escherichia coli* and its relationship with toxic effects on growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *205*, 111300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111300>
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Williams, K. E. (1997). Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *Journal of Bacteriology*, *179*(19), 6127–6132. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6127-6132.1997>

- Long, F., Su, C.-C., Zimmermann, M. T., Boyken, S. E., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., & Yu, E. W. (2010). Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature*, *467*(7314), 484–488. <https://doi.org/10.1038/nature09395>
- Maitz, S., Poelzl, S., Dreisiebner, D., Zarschenas, E., & Kittinger, C. (2024). Antimicrobial non-porous surfaces: A comparison of the standards ISO 22196:2011 and the recently published ISO 7581:2023. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1400265. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1400265>
- Maruthamuthu, M. K., Selvamani, V., Nadarajan, S. P., Yun, H., Oh, Y.-K., Eom, G. T., & Hong, S. H. (2018). Manganese and cobalt recovery by surface display of metal binding peptide on various loops of OmpC in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *45*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1989-x>
- Moore, L. R., Caspi, R., Boyd, D., Berkmen, M., Mackie, A., Paley, S., & Karp, P. D. (2024). Revisiting the y-ome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *52*(20), 12201–12207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae857>
- 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>
- 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>
- 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 in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(33), 30670–30677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104122200>
- Paspaltsis, I., Kotta, K., Lagoudaki, R., Grigoriadis, N., Poulis, I., & Sklaviadis, T. (2006). Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions. *Journal of General Virology*, *87*(10), 3125–3130. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81746-0>
- Petersen, C., & Møller, L. B. (2000). Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene*, *261*(2), 289–298. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00509-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00509-6)
- 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>
- 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:

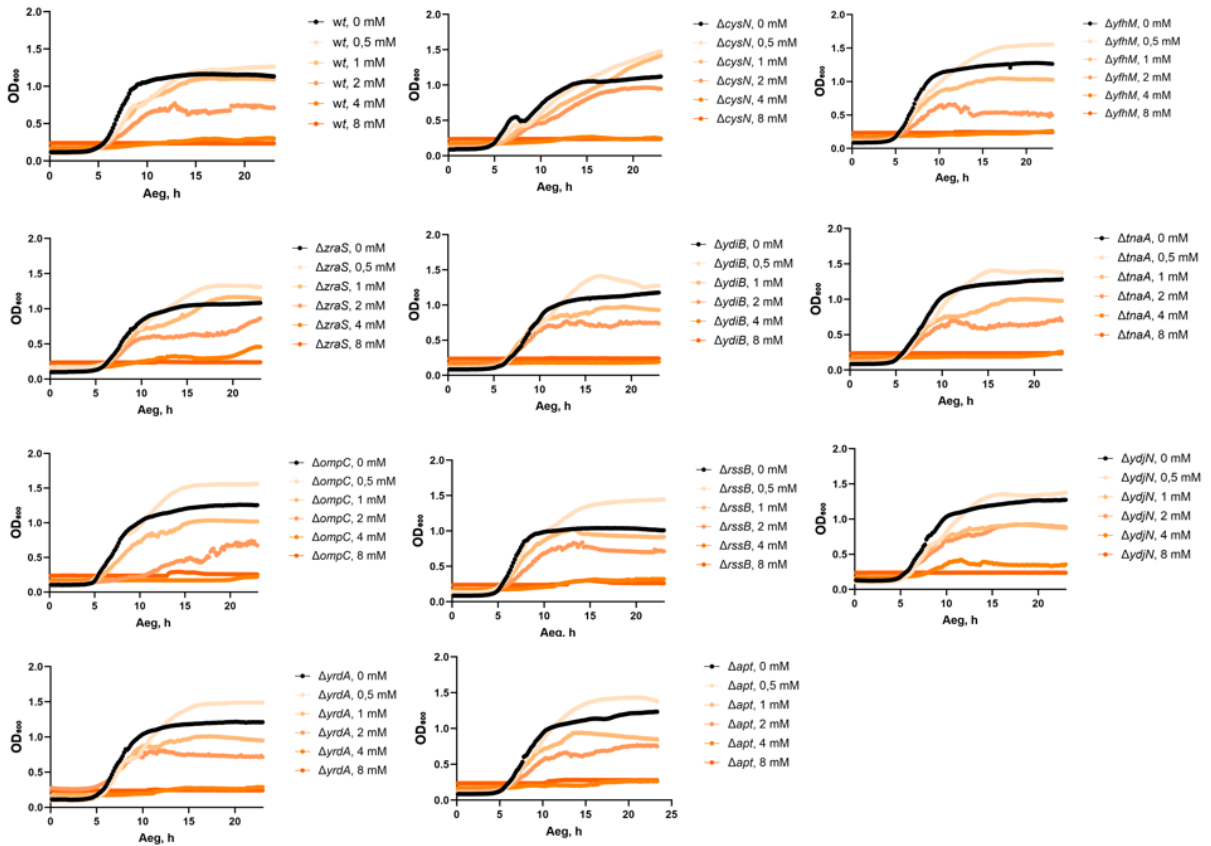
- Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>
- Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., & O’Neill, A. J. (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(4), 1037–1046. <https://doi.org/10.1093/jac/dku523>
- Reiter, M. A., & Vorholt, J. A. (2024). Dashing Growth Curves: A web application for rapid and interactive analysis of microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*, 25(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12859-024-05692-y>
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., & Rosen, B. P. (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 652–656. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.652>
- Rosenberg, M., Park, S., Umerov, S., & Ivask, A. (2025). Experimental evolution of *Escherichia coli* on semi-dry silver, copper, stainless steel, and glass surfaces. *Microbiology Spectrum*, 13(4), e02173-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02173-24>
- Rosenberg, M., Vija, H., Kahru, A., Keevil, C. W., & Ivask, A. (2018). Rapid in situ assessment of Cu-ion mediated effects and antibacterial efficacy of copper surfaces. *Scientific Reports*, 8(1), 8172. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26391-8>
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
- Santo, C. E., Lam, E. W., Elowsky, C. G., Quaranta, D., Domaille, D. W., Chang, C. J., & Grass, G. (2011). Bacterial Killing by Dry Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 794–802. <https://doi.org/10.1128/AEM.01599-10>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 290(32), 19527–19539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620575>
- Shen, J., Weng, Y., Shimada, T., Karan, M., Watson, A., Medernach, R. L., Young, V. B., Hayden, M. K., & Hartmann, E. M. (2024). Hospital environments harbor chlorhexidine tolerant bacteria potentially linked to chlorhexidine persistence in the environment. <https://doi.org/10.1101/2024.10.07.24315058>
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C., & Montfort, W. R. (2004). Cuprous Oxidase Activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7815–7817. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7815-7817.2004>
- 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>
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., & Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>

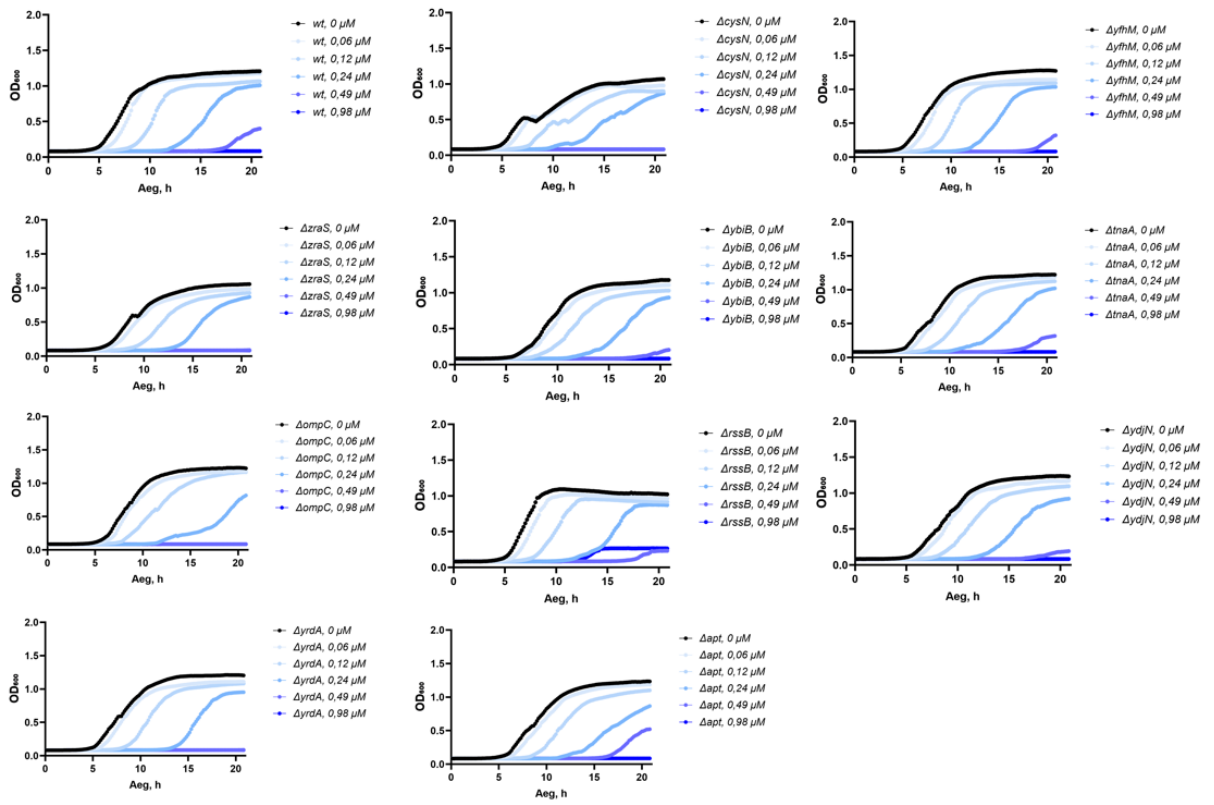
- Smith, T. P., Clegg, T., Ransome, E., Martin-Lilley, T., Rosindell, J., Woodward, G., Pawar, S., & Bell, T. (2024). High-throughput characterization of bacterial responses to complex mixtures of chemical pollutants. *Nature Microbiology*, 9(4), 938–948. <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01626-9>
- Staehlin, B. M., Gibbons, J. G., Rokas, A., O’Halloran, T. V., & Slot, J. C. (2016). Evolution of a heavy metal homeostasis/resistance island reflects increasing copper stress in Enterobacteria. *Genome Biology and Evolution*, evw031. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw031>
- Stoyanov, J. V., Magnani, D., & Solioz, M. (2003). Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a *lux* biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 546(2–3), 391–394. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00640-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00640-9)
- Suppi, S., Kasemets, K., Ivask, A., Künnis-Beres, K., Sihtmäe, M., Kurvet, I., Aruoja, V., & Kahru, A. (2015). A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.027>
- Zakharova, O. V., Godymchuk, A. Yu., Gusev, A. A., Gulchenko, S. I., Vasyukova, I. A., & Kuznetsov, D. V. (2015). Considerable Variation of Antibacterial Activity of Cu Nanoparticles Suspensions Depending on the Storage Time, Dispersive Medium, and Particle Sizes. *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/412530>
- 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>
- Wang, D., Ding, X., & Rather, P. N. (2001). Indole Can Act as an Extracellular Signal in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(14), 4210–4216. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4210-4216.2001>
- Wang, H., Yang, X., Wang, M., Hu, M., Xu, X., Yan, A., Hao, Q., Li, H., & Sun, H. (2020). Atomic differentiation of silver binding preference in protein targets: *Escherichia coli* malate dehydrogenase as a paradigm. *Chemical Science*, 11(43), 11714–11719. <https://doi.org/10.1039/D0SC04151C>
- Wang, X., Liu, S., Li, M., Yu, P., Chu, X., Li, L., Tan, G., Wang, Y., Chen, X., Zhang, Y., & Ning, C. (2016). The synergistic antibacterial activity and mechanism of multicomponent metal ions-containing aqueous solutions against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 163, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.019>
- Warnes, S. L., & Keevil, C. W. (2016). Lack of Involvement of Fenton Chemistry in Death of Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Strains of *Staphylococcus aureus* and Destruction of Their Genomes on Wet or Dry Copper Alloy Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2132–2136. <https://doi.org/10.1128/AEM.03861-15>
- Xu, F., Liu, S., Naren, N., Li, L., Ma, L. Z., & Zhang, X. (2022). Experimental evolution of bacterial survival on metallic copper. *Ecology and Evolution*, 12(8), e9225. <https://doi.org/10.1002/ece3.9225>

LISAD

Lisa 1. Kasvuparameetrid erinevatel vase ja hõbeda kontsentratsioonidel tüvede kaupa

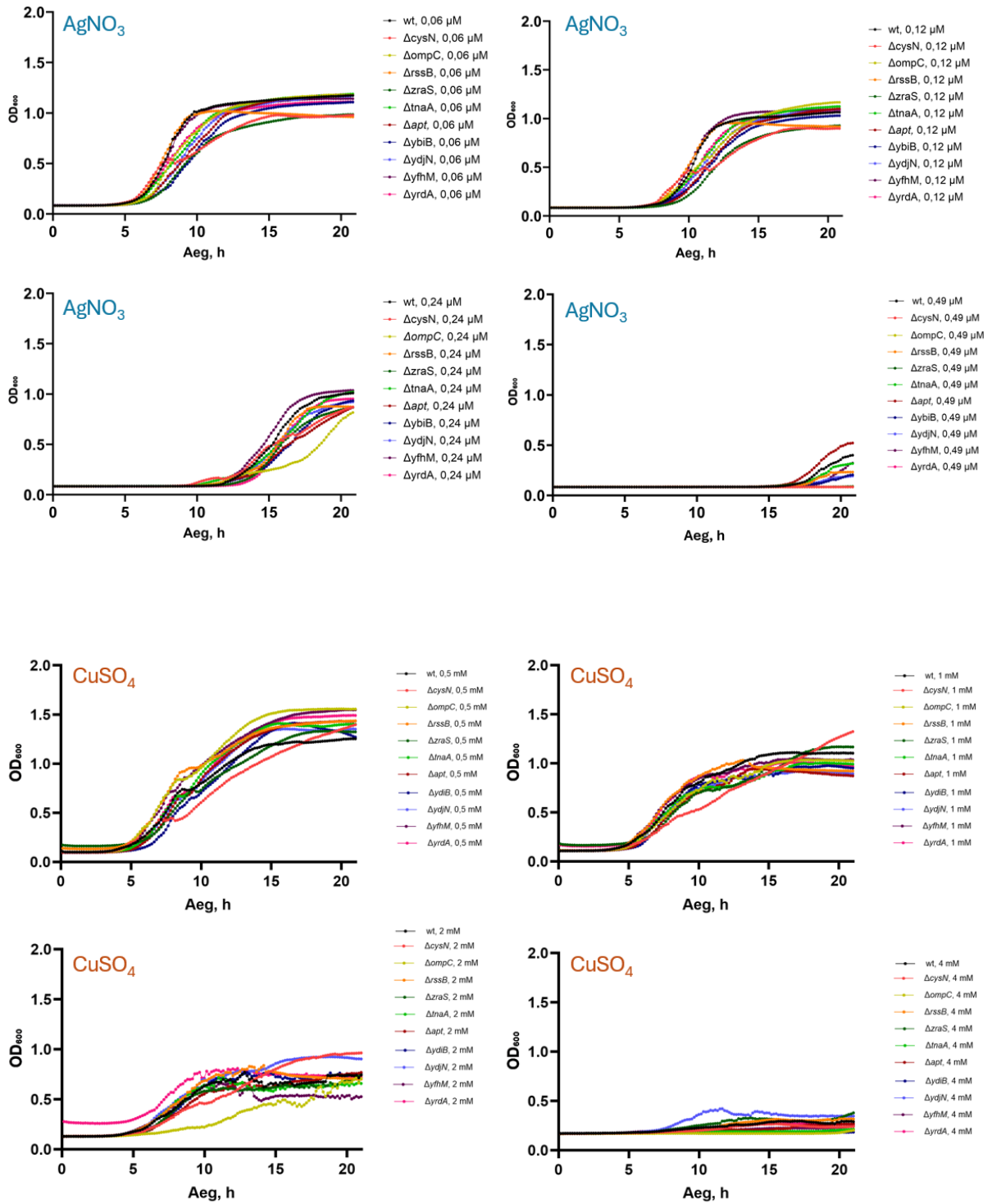
Metsiktüve ja tema katkestusmutantide keskmised kasvukõverad tüvede kaupa hõbeda (sinine) ja vase (oranž) kontsentratsioonidel, kus vähekomplekseerivas minimaalsöötmes täieliku kasvuinhibitsioonini. Graafikud on esitatud tüvede kaupa, et paremini välja tuua inhibitsiooni dünaamika erinevatel kontsentratsioonidel. Kasvukõveratelt ei ole eemaldatud tausta illustreerimaks metallisoola värvuse mõju optilise tiheduse väärtusele.





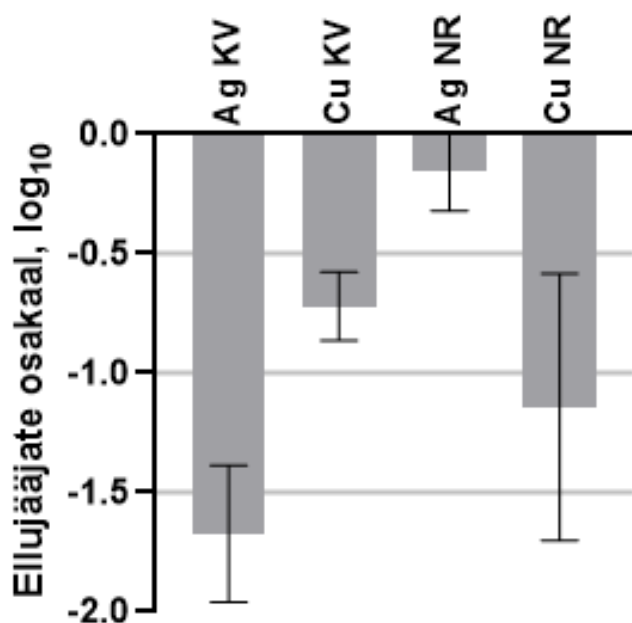
Lisa 2. Tüvede kasvukõverad vase ja hõbeda juuresolekul kontsentratsioonide kaupa.

Metsiktüve ja tema katkestusmutantide keskmised kasvukõverad kõikidel hõbeda ja vase kontsentratsioonidel, kus vähekomplekseerivas minimaalsöötmes esines kasv. Graafikud on esitatud metallikontsentratsiooni kaupa, et lihtsustada tüvede võrdlemist.



Lisa 3. Ellujääjate osakaal pinnatestides

Metsiktüve elusarvukuse osakaal peale ekspositsiooni hõbeda (Ag) või vase (Cu) pindadel kuivades orgaanikavaestes (KV) ja niisketes orgaanikarikastes (NR) tingimustes. Osakaalu arvutamiseks jagati elusarvukus pinna kohta peale ekspositsiooni elusarvukusega pinna kohta enne ekspositsiooni ja logaritmiti. Suurem negatiivne väärtus väljendab suuremat suremust. Ekspositsiooniajad olid Ag KV 1 h, Cu KV 15 min, Ag NR 6 h ja Cu NR 30 min.



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Carmen Marianne Teär,

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **Valitud geenide funktsioonikao mõju *Escherichia coli* metallitundlikkusele erinevates testformaatides**, mille juhendaja on **Merilin Rosenberg**, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi 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, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Carmen Marianne Teär

21.05.2024