

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

***Escherichia coli* pinnal liikuvuse testsüsteemi väljatöötamine ja liikuvuse analüüs
metallistressi tingimustes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Sandra Vaikla

Juhendaja: teadur Merilin Rosenberg, PhD

TARTU 2022

INFOLEHT

***Escherichia coli* pinnal liikuvuse testsüsteemi väljatöötamine ja liikuvuse analüüs metallistressi tingimustes**

Osade antimikroobsete omadustega metallide ja nende nanoosakeste kasutamine võib mõjutada bakterite liikuvust. Suurenenud liikuvust võib potentsiaalselt patogeensete bakterite puhul seostada suurema virulentsusega, mis on aga antimikroobsetes rakendustes ebasoovitav. Liikuvuse parem mõistmine metallistressi tingimustes võimaldab hinnata antimikroobsete lahenduste kitsaskohti erinevates rakendustes. Käesolevas töös töötati välja testsüsteem *E. coli* ATCC 8739 pinnal liikuvuse uurimiseks eesmärgiga kirjeldada valdkonnas olulise mudelbakteri liikuvust subletaalse metallistressi tingimustes. Tuvastati, et antud tüvi ei kasuta söötme pinnal liikumiseks vibureid ja katsetes positiivse ning negatiivse pinnalaenguga CeO₂ nanoosakestega leiti, et bakterite liikuvuse mõjutamisel olid olulised nii katsetingimused kui ka nanoosakeste pinnalaeng.

Märksõnad: *Escherichia coli*, liikuvus, voogamine, tseerium, nanoosakesed

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

Development of test system for surface motility analysis of *Escherichia coli* and application of the system under metal stress conditions

Some metals and metal-based nanoparticles with antimicrobial properties can enhance bacterial motility. Higher motility is associated with higher virulence of potentially pathogenic bacteria and if such response is induced in antimicrobial application, it would be an unwanted side-effect. Better understanding of bacterial motility in metal stress conditions would allow to evaluate the potential limitations of different antimicrobial applications. In this thesis a test system was developed for surface motility analysis of *E. coli* ATCC 8739 with the purpose of describing motility in sublethal metal stress conditions of an important model strain in the field. It was identified that *E. coli* ATCC 8739 does not use flagella for its motility on agar surface. Also, in experiments with positively and negatively charged CeO₂ nanoparticles it was found that when bacterial motility was affected the outcome depended on experimental conditions as well as surface charge of the nanoparticles.

Keywords: *Escherichia coli*, motility, swarming, cerium, nanoparticles

CERCS kood: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; T150 Material technology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Bakterite liikumisviisid.....	7
1.2. Ujumine	8
1.3. Voogamine.....	8
1.4. Liikumine piilide abil.....	8
1.5. <i>Escherichia coli</i> liikumine pindadel	9
1.6. Antimikroobsete metallide ja metallipõhiste nanoosakeste mõju liikumisvõimeliste bakterite liikuvusele.....	10
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	12
2.1. Töö eesmärgid.....	12
2.2. Materjal ja meetodika	12
2.2.1. Kasutatud bakteritüved	12
2.2.2. Praimerite disain ja <i>in silico</i> kontroll.....	13
2.2.3. Kasutatud kemikaalid, nanoosakesed ja söötmed.....	15
2.2.4. Homoloogne rekombinatsioon	17
2.2.5. Tüvede kontrollimine	17
2.2.6. Liikuvuskatsed.....	18
2.2.7. Kasvukõverad	20
2.2.8. Viburite värvimine.....	20
2.2.9. Statistika	21
2.3. Tulemused ja arutelu.....	22
2.3.1. Keio kollektsiooni metsiktüve <i>Escherichia coli</i> BW25113 ja <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 liikuvuse võrdlus erinevates tingimustes	22
2.3.2. <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 katkestusmutantide konstrueerimine ja kontroll ..	24

2.3.3.	<i>Escherchia coli</i> ATCC 8739 katkestusmutantide liikuvuse iseloomustamine...	26
2.3.4.	Ce liikuvuskatsete tulemused	30
2.3.5.	Liikumine söötme pinnal Ce ekspositsiooni tingimustes	31
2.3.6.	Ujumisvõime Ce ekspositsiooni tingimustes.....	32
KOKKUVÕTE		34
RESÜMEE		35
TÄNUSÕNAD		37
KIRJANDUSE LOETELU.....		38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		45
LISAD		46
Lisa 1	46
Lisa 2	47
Lisa 3	48
Lisa 4	49
Lisa 5	50
LIHTLITSENTS.....		51

KASUTATUD LÜHENDID

$\Delta cheY$ – kemotaktilise vastuse regulaatorvalgu katkestusmutant

$\Delta lafA$ – lateraalse flagelliini katkestusmutant

$\Delta motA$ – viburi pöörlemise eest vastutava mootorvalgu katkestusmutant

Amp – ampitsilliin

ap – aluspaari

fw – pärisuunaline (*foward*)

Km – kanamütsiin

LB – Luria-Bertani

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

NP – nanoosakesed (*nanoparticles*)

nt – nukleotiid

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

rv – vastassuunaline (*reverse*)

TEM – transmissiooni elektronmikroskoopia (*transmission electron microscopy*)

WT – metsiktüvi (*wild-type*)

SISSEJUHATUS

Liikuvus annab bakteritele teatava ökoloogilise eelise olgugi, et liikumine on energeetiliselt kulukas protsess. Evolutsiooni käigus on vastavalt elukeskkonnale välja kujunenud mitmesugused liikumisviisid, mis võivad sõltuda nii bakterite erinevatest jätketest kui ka muudest molekulidest ja mehhanismidest. Liikumine võib olla nii juhuslik kui suunatud ehk kemotaktiline, kus liikumine toimub keemilise signaali suunas või sellest eemale, olgu selleks näiteks toitaine või mürkaine. Liikuvuse ja liikumatuse regulatsioon on oluline ka bakteriaalsetes biokilledes.

Escherichia coli on suure liigisisese varieeruvusega gramnegatiivne bakter. *E. coli* liikuvust on enim uuritud K-12 laboritüvede näitel, kuid praktiliste rakenduste hindamisel on siiski oluline uurida lisaks laboritüvede liikuvusele ka potentsiaalselt patogeensete ja geneetiliselt mitmekesisemate tüvede liikuvust.

Antimikroobsete omadustega metallide ja metallipõhiste nanoosakeste (NP) kasutus antimikroobsetes rakendustes muutub aina laialdasemaks, mistõttu on oluline uurida mitte ainult nimetatute biotsiidseid omadusi, vaid ka nende kõrvalmõjusid, näiteks mõju bakterite liikuvusele subletaalsetes ja subinhibitoorsetes kontsentratsioonides. Liikumisvõimelistel potentsiaalselt patogeensetel bakteritel on suurenenud liikuvust seostatud suurenenud virulentsusega ning on selge, et kui selline vastus indutseeritakse antimikroobse töötamise tulemusel, siis on tagajärg mittesoovitav ja võib kujutada ohtu inimeste tervisele.

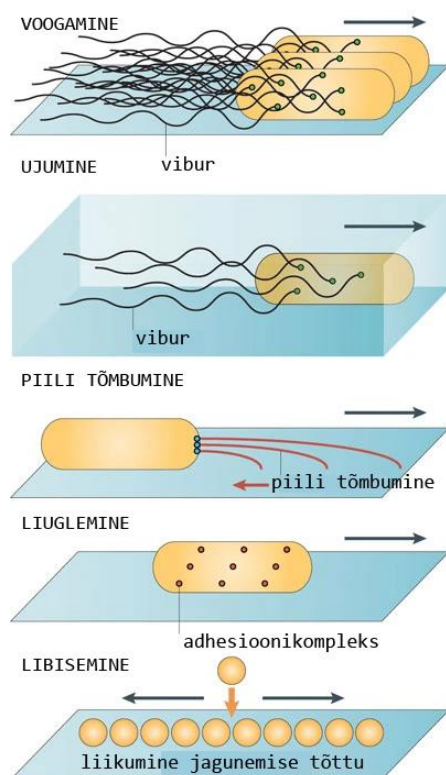
Tseerium on leelismuldmetall, mille ühendeid ja NP-sid on laialdaselt kasutatud mitmetes rakendustes näiteks kütuseelementides, peenpoleerimisel, kuid ka meditsiinis, näiteks põletushaavade ravis antimikroobsete omaduste tõttu. Biomeditsiinistes rakendustes uuritakse enamasti CeO₂ NP-de kasutusvõimalusi.

Selle bakalaureusetöö põhieesmärk oli antimikroobse efektiivsuse hindamisel mudelina kasutatava *Escherichia coli* tüve pinnal liikuvuse testsüsteemi väljatöötamine toetudes varasematele uuringutele kirjanduses ja teostada esialgne liikuvuse analüüs metalli- ja nanostressi tingimustes Ce ionide ja CeO₂ NP-de näitel, kasutades loodud testsüsteemi.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Bakterite liikumisviisid

Liikumisvõimelistele bakteritele on liikumine vajalik nii selleks, et koloniseerida nišše kui ka selleks, et leida toitained või ebasoodsatest tingimustest lahkuda. Kohandumaks keskkonnaga, on bakteritel evolutsiooni käigus tekkinud mitmeid liikumismehhanisme (Joonis 1). Näiteks *E. coli* suudab viburite abil vedelas keskkonnas liikuda ujudes (ingl *swimming*), kuid ka märjal pinnal voogata (ingl *swarming*) (Wadhwa ja Berg, 2021). Viburid on prootongradiendi toimetel pöörlevad helikaalsed jätked (Blair ja Berg, 1990). Lisaks viburitele on osadel bakteritel ka tüüp IV piilid, mille abil suudavad bakterid end mööda pinda edasi tõmmata (ingl *twitching*) (Madigan et al., 2019; Wadhwa & Berg, 2021). Samas suudavad bakterid liikuda mööda pinda ka ilma jätketeta. Sellist adhesiinide abil liikumist nimetatakse liuglemiseks (ingl *gliding*) (Wadhwa ja Berg, 2021). Aktiivse liikumisvõimeta bakterid liiguvad pinnal passiivselt pooldumise käigus (ingl *sliding*) (Wadhwa ja Berg, 2021). Järgnevates alapeatükkides tutvustatakse piilidest ja viburitest sõltuvaid liikumisviise, mis võivad olulised olla valitud mudelbakteri *E. coli* puhul.



Joonis 1. Bakterite peamised liikumisviisid. Joonist on modifitseeritud, algne joonis pärineb Kearnsi artiklist (Kearns, 2010).

1.2. Ujumine

Vesikeskkonnas vaba, individuaalset liikumist viburite abil nimetatakse ujumiseks (Wadhwa ja Berg, 2021). Bakterite ujumine toimub otseliikumiste (ingl *run*) ja juhuslikuks suunavahetuseks vajaliku „kukerpallitamise“ (ingl *tumble*) teel (Madigan et al., 2019; Wadhwa & Berg, 2021). Otse ujumist võimaldab viburite pöörlemine vastupäeva, „kukerpallitamist“ aga viburi pöörlemine päripäeva (Madigan et al., 2019). Lisaks juhuslikule ujumisele on bakterid võimelised ujuma kemotaksise abil keemilise gradiendi suunas või selle vastu, mida iseloomustab „kukerpallitamise“ vähenemine (Madigan et al., 2019). Ujumist uuritakse sageli poolvedelas agariga söötmes torkekülviga, kus agari kontsentratsioon söötmes on kuni 0,3% (nt Inoue *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2020). Kõrgem agari kontsentratsioon söötmes inhibeerib ujuva liikumise, kuid soodustab pinnal liikumist (Kearns, 2010).

1.3. Voogamine

Voogamise puhul on tegu viburite vahendatud kollektiivse pinnal liikumise vormiga (Wadhwa ja Berg, 2021). Voogamisele on iseloomulikud morfoloogilised muutused. Toimub hüperflagellatsioon, st bakteritel on rohkem vibureid võrreldes ujuvate bakteritega, ning filamenteerumine ehk rakud pikenevad, kuid ei suuda poolduda (Harshey ja Matsuyama, 1994). Enamasti on voogamist kirjeldatud 0,4%–0,8% agarisisaldusega pehmel toitainerikkal agarsöötmel, kuid näiteks *Proteus mirabilis* suudab voogata ka tavalisel 1,5% agarisisaldusega söötmel (Partridge ja Harshey, 2013). *E. coli* voogav fenotüüp avaldub eelkõige 0,45%–0,5% agarit sisaldaval söötmel, kus kasutatakse sageli spetsiifilist Eikeni agarit (Eiken Chemical Co., Ltd., Jaapan) (Burkart *et al.*, 1998; Darnton *et al.*, 2010; Harshey ja Matsuyama, 1994; Wu *et al.*, 2020). Eikeni agari kasutamisel jääb tardsöötme pinnale rohkem vaba vett, kui näiteks Bacto™ (Becton, Dickinson and Co., USA) agariga söötmele (Berg, 2005). Niiskem pind soodustab voogavat liikumist. Harshey ja Matsuyama artiklist selgub ka, et Difco™ (Becton, Dickinson and Co., USA) agariga söötmetel on *E. coli* voogamine tagasihoidlikum võrreldes Eikeni agariga söötmetega (Harshey ja Matsuyama, 1994). Sageli lisatakse voogamise soodustamiseks söötmele ka suhkruid, nt glükoosi või arabinoosi (nt Burkart *et al.*, 1998; Darnton *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010) ja surfaktante (Niu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2017).

1.4. Liikumine piilide abil

Piili tõmbumine on pinnal liikumise viis, mis toimub tüüp IV piilide abil (Madigan et al., 2019). Tüüp IV piilide pinnale kinnitumise võime ja kontraktiilsus võimaldab bakteril end mööda

pinda edasi tõmmata. (Wadhwa ja Berg, 2021). Piilide tõmbumist on enim kirjeldatud *Pseudomonas* 'tel, kuid *E. coli* puhul on seda vähe uuritud, kuna tüüpiliselt laboris kasutatavatel K-12 tüvedel tüüp IV piilide geenid laboritingimustes ei ekspresseeru (Sauvonnnet *et al.*, 2000). Piilide vahendatud liikumist uuritakse 1% agarisisaldusega tardsöödet läbiva torkekülviga (Semmler *et al.*, 1999; Turnbull ja Whitchurch, 2014), kusjuures piilidest sõltuv liikuvus peaks ilmema agari ja tassi pinna vahel (Semmler *et al.*, 1999).

1.5. *Escherichia coli* liikumine pindadel

E. coli on gramnegatiivne bakter, millel on olemas nii viburid kui ka erinevat tüüpi piilid (Madigan *et al.*, 2019). Selles töös kasutakse tüve ATCC 8739, mis on on kasutusel antimikroobsete pindade efektiivsuse hindamisel (The International Organisation for Standardisation, 2007, 2019), kuid selle tüve liikuvusest on vähe teada. *E. coli* 'del on üldiselt üks vibursüsteemi geene sisaldav lookus Flag-1. Osadel *E. coli* tüvedel, nt 042 tüvel, on leitud lisaks Flag-1 lookusele ka *Vibrio parahaemolyticuse* lateraalsete vibursüsteemile sarnane lookus Flag-2 (Ren *et al.*, 2005). Ren *et al.* tööst selgus, et Flag-2 lookus oli ilmselt *F* tüvede viimasel ühisel esivanemal olemas, kuid on paljudes tüvedes deleteerunud. Kirjandusest nähtub, et *E. coli* tüvedes, kus Flag-2 lookus esineb, peetakse seda lookust mittefunktsionaalseks (Archer *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2005). Klassikaliselt on *E. coli* liikuvuse kirjeldamiseks kasutatud K-12 tüvesid (nt Inoue *et al.*, 2007), sh ka Keio katkestusmutantide raamatukogu (Baba *et al.*, 2006). K-12 tüvedel, sealhulgas ka näiteks laialdaselt kasutataval MG1655 tüvel, on Flag-2 lookus peaaegu täielikult deleteerunud (Ren *et al.*, 2005). Samas ei saa siiski välistada Flag-2 lookuse komponentide mõju *E. coli* liikuvusele tüvede puhul, kus see on olemas, näiteks tüvi 042 ja ka selles töös kasutatav tüvi ATCC 8739, millel on samuti Flag-2 lookus (Archer *et al.*, 2011). Samuti on vähe uuritud *E. coli* puhul piilidest sõltuvat liikumist ning selle mõju pinnal liikuvusele. Näiteks *P. aeruginosa* puhul on tuvastatud, et bakter võib vajada voogamiseks lisaks viburitele ka tüüp IV piile (Köhler *et al.*, 2000), kuid *E. coli* tüvedes, mis ekspresseerivad laboritingimustes tüüp IV piilide geene, pole seda kirjeldatud. Kokkuvõtlikult öeldes kasutavad erinevad bakterid ja bakteritüved liikumiseks erinevaid mehhanisme ning ka ühe bakteriliigi siseselt oleks vaja uurida võimalikult laia geneetilise varieeruvusega tüvede liikumist. *E. coli* puhul oleks kindlasti oluline uurida lisaks K-12 laboritüvedele ka teiste tüvede liikumist ja liikumismehhanisme.

1.6. Antimikroobsete metallide ja metallipõhiste nanoosakeste mõju liikumisvõimeliste bakterite liikuvusele

Tseeriumiühendeid ja tseeriumipõhiseid NP-sid on kasutatud mitmetes rakendustes alates peenpoleerimisest (Dahle ja Arai, 2015) kuni põletushaavade ravini (Qian *et al.*, 2020). Lisaks uuritakse tseeriumipõhiste NP-de rakenduste kasutusvõimalusi nii biomeditsiinis kui antimikroobsetes rakendustes, sh meie uurimisgrupis (Nefedova *et al.*, 2022). Liikumisvõimelistel patogeensetel bakteritel on liikuvus virulentsuseks vajalik (Josenhans ja Suerbaum, 2002) ja suurenenud liikuvust saab seostada suurenenud virulentsusega. Seega, kui mõjutada baktereid ainetega, nt antimikroobsete metallide või NP-de subletaalsete kontsentratsioonidega, mis võivad suurendada liikuvust, võime tahtmatult suurendada ka ellu jäänud patogeenide virulentsust. NP-d on erinevad looduslikud ja sünteetilised osakesed, mille vähemalt üks mõõde jääb alla 100 nm (European Commission, 2011). Metallidel ja sama metalli põhistel NP-del võib mikroobidele olla erinev toime, seda nii antimikroobse efektiivsuse osas (Slavin *et al.*, 2017) kui ka sõltuvalt bakteri liikumisvõimest (Stabryla *et al.*, 2021). Oluline roll NP-de antimikroobsetes omadustes on pinnalaengul, kuna elektrostaatiliselt interaktsioonid negatiivselt laetud bakteriraku pinna ja positiivselt laetud NP-de vahel võivad suurendada NP-de biotsiidset toimet (Vihodceva *et al.*, 2021). On näidatud, et *Pseudomonas aeruginosa* ja *Bradyrhizobium diazoefficiens* puhul suurendasid CeO₂ NP-d subtoksilistes kontsentratsioonides bakterite liikuvust (Mortimer *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). *B. diazoefficiens* puhul on tuvastatud, et CeO₂ NP-de ekspositsiooni korral on flagelliinide geenide ekspressioon üles reguleeritud (Mortimer *et al.*, 2020), mis võiks viidata viburite olulisusele NP-de juuresolekul. Samas on *P. aeruginosa* liikuvuse suurenemist näidatud ka subletaalse hõbeda NP-de kontsentratsiooni korral (Saeki *et al.*, 2021). Kui eelnevalt kirjeldatud näidetes suurendavad NP-d liikuvust, siis võib aset leida ka vastupidine ehk bakteritüve liikumisvõime võib mõjutada bakteri tundlikkust antimikroobsetele NP-dele. Näiteks on hiljuti näidatud, et *E. coli* tüvede liikumisvõime mõjutab nende vastuvõtlikkust hõbeda NP-dele, kuid mitte hõbedaioonile (Stabryla *et al.*, 2021). Stabryla *et al.* tööst selgus, et *E. coli* hüperflagelleerunud tüvi omandas NP-de vastu resistentsuse, kuid mitteliikuv jäi NP-dele tundlikuks. Mõlemad tüved olid hõbeda ioonidele tundlikud, mis viitab, et vähenenud tundlikkus NP-dele oli ilmselt nanoosakestest endist ja mitte üldisemalt hõbedast tulenev efekt. Kuna bakterite pinnal liikuvust on väga raske uurida enamasti vedelikus läbi viidavates ekspositsioonitingimustes, viiakse katsed enamasti läbi kaheastmelisena. Metallistressi mõju liikuvusele uuritakse sageli inkubeerides baktereid koos kemikaalidega üleöö (Garuglieri *et al.*,

2016) või lühema perioodi jooksul (Xu *et al.*, 2018) optimaalsel temperatuuril ning seejärel külvatakse tardsöötme pinnale tilkkülvina või söötmesse torkekülvina.

Kirjandusest ja eelnevatest tulemustest lähtuvalt otsustati käesolevas bakalaureusetöös koostada testsüsteem *E. coli* ATCC 8739 pinnal liikuvuse uurimiseks metallistressi tingimustes. Selles töö eksperimentaalses osas keskendutakse liikuvuse testsüsteemi välja töötamisele ning $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ ja CeO_2 NP-de mõju hindamisele *E. coli* liikuvusele.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö hüpoteesiks on järgnev: Ce^{3+} ioonid ja/või CeO_2 nanoosakesed mõjutavad antimikroobsete ainete ja pindade standardtestides kasutatava *E. coli* ATCC 8739 tüve liikuvust.

Tulenevalt hüpoteesist olid käesoleva bakalaureusetöö eesmärgid järgmised:

1. Luua testsüsteem *E. coli* vibursõltuva liikumise kirjeldamiseks metallide ja nende NP-de subletaalse ekspositsiooni tingimustes.
2. Hinnata $Ce(NO_3)_3$ (Ce^{3+} iooni allikana) ja CeO_2 NP-de mõju *E. coli* ATCC 8739 pinnal liikuvusele ja ujumisvõimele.

Eesmärkide saavutamiseks tuli teha järgmist:

- a. Võrrelda *E. coli* ATCC 8739 tüve liikuvust *E. coli* liikumise uurimiseks enim kasutatud K-12 laboritüvede liikumisvõimega.
- b. Testida kirjandusest leitu põhjal erinevaid bakterite pinnal liikumist soodustavaid strateegiaid.
- c. Konstrueerida *E. coli* ATCC 8739 tüve vibursõltuva liikumise katkestusmutandid. Kontrollida saadud tüvesid.
- d. Testida saadud tüvede liikuvust tardsöötmel erineva agarisisalduse ja glükoosi kombinatsioonides.
- e. Testida saadud tüvede ujumisvõimet poolvedelas söötmes.
- f. Testida $Ce(NO_3)_3$ ja CeO_2 NP-de mõju *E. coli* ATCC 8739 liikuvusele.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved

Tabel 1 annab ülevaate töös kasutatud bakteritüvedest. *E. coli* ATCC 8739 (sünonüümid Crooks, DSM 1576) metsiktüvi on tellitud DSMZ-st (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH). ATCC 8739 tüve mutandid ja plasmidi sisaldav tüvi ATCC 8739[pAJ172] on konstrueeritud töö autori poolt. Keio ühe geeni katkestusmutantide raamatukogu (Baba *et al.*, 2006) metsiktüvi K-12 BW25113 on saadud Niilo Kaldalult (TÜ tehnoloogiainstituut). Edaspidises tekstis nimetatakse ATCC 8739 katkestusmutante lühidalt järgmiselt: $\Delta lafA$, $\Delta cheY$ ja $\Delta motA$.

Tabel 1. Kasutatud tüved

Liik	Tüvi	Mutant
<i>E. coli</i>	BW25116	-
	ATCC 8739	$\Delta lafA$:Km
		$\Delta cheY$:Km
		$\Delta motA$:Km
ATCC 8739[pAJ172]	-	

2.2.2. Praimerite disain ja *in silico* kontroll

Datsenko ja Wanneri meetodikast lähtuvalt disainiti polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) tarbeks hübriidpraimerid, mis koosnesid soovitud geeni algusest 50 nt ja kanamütsiini resistentsuse ekspressioonikasseti pärisuunalisest praimerist (*fw* hübriidpraimer) ning soovitud geeni lõpuosa 50 nt ja ekspressioonikasseti vastassuunalisest praimerist (*rv* hübriidpraimer). Lisaks disainiti geenisisesed praimerid, et oleks võimalus kontrollida katkestuse sisseviimist. Praimerite disainiks kasutati Primer3'1 põhinevat tööriista NCBI Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). *E. coli* ATCC 8739 *lafA*, *cheY* ja *motA* geenide järjestused pärinevad ATCC (American Type Culture Collection) Genome Portal'ist (<https://genomes.atcc.org/genomes/b9d91f150db449de>). Saadud praimerite korrektset seondumist kontrolliti *E. coli* ATCC 8739 genoomi vastu *in-silico* (San Millán *et al.*, 2013). Praimerid on tellitud Microsynth AG-st (Šveits).

Tabelis 2 on toodud töös kasutatud hübriidpraimerid, mida kasutati homologseks rekombinatsiooniks vajalike PCR-i produktide amplifitseerimiseks. Lisaks on tabelis toodud ka geenisisesed kontrollpraimerid, et kontrollida geeni katkemist ning kanamütsiini praimerid (saadud Heili Ilveselt, TÜ molekulaar- ja rakubioloogiainstituut), et kontrollida kanamütsiini geeni olemasolu mutandis. Kontrollpraimerite abil amplifitseeritavate PCR-i produktide suurused on järgnevad: geen *lafA* – 221 aluspaari (ap), *cheY* – 192 ap, *motA* – 237 ap, Km – 257 ap.

Tabel 2. Kasutatud praimerid

Praimer	Järjestus (5' → 3')	Kasutus
h-lafA-km-fw	ATGTTATCTATTAACACCAATAACGCCT CAATGGCCGCCGTTAATGCAATGAATTC CCCGGATCCGTC	geeni <i>lafA</i> katkestamiseks vajaliku rekombinatsiooni
h-lafA-km-rv	TTACTGCAGCAGGCTGGAACCATGCT GGACATGCTGTTGGACTGTTTCATTAGA AAACTCATCGAGCAT	konstrukti amplifitseerimise hübriidpraimerid
h-cheY-km-fw	ATGGCGGATAAAGA ACTTAAATTTTTGG TTGTGGATGACTTTTCCACCATGAATTC CCCGGATCCGTC	geeni <i>cheY</i> katkestamiseks vajaliku rekombinatsiooni
h-cheY-km-rv	TCACATGCCAGTTTCTCAAAGATTTTG TTGAGTTTTTCTCCAGCGTCGTTAGAA AAACTCATCGAGCAT	konstrukti amplifitseerimise hübriidpraimerid
h-motA-km-fw	GTGCTTATCTTATTAGGTTACCTGGTTGT TCTCGGTACAGTTTTTCGGCGGGAATTCC CCGGATCCGTC	geeni <i>motA</i> katkestamiseks vajaliku rekombinatsiooni
h-motA-km-rv	TCATGCTTCCTCGGTTGTCGTCTGTTGTT GCGGATTTTTACCCGCACGCATTAGAAA AAACTCATCGAGCAT	konstrukti amplifitseerimise hübriidpraimerid
lafA-fw	TTTCAAGCCA ACTGAATACC	geeni <i>lafA</i> katkestuse
lafA-rv	GTCGTT CAGACGGTTAATAG	kontrollpraimerid
cheY-fw	AAAGAGCTGGGATTCAATAA	geeni <i>cheY</i> katkestuse
cheY-rv	TTCTGCAGTCACCATTAAC	kontrollpraimerid
motA-fw	TGATGGATGAAGAGATTGAG	geeni <i>motA</i> katkestuse
motA-rv	TCGCTAATGGGGAAATAAAT	kontrollpraimerid
pKTPvu	AACAGCGATCGCGTATTTTCG	kanamütsiini geeni olemasolu
KmVan	TGGTATCGGTCTGCGATTCC	kontrollpraimerid

2.2.3. Kasutatud kemikaalid, nanoosakesed ja söötmed

Tabel 3 annab ülevaate töös kasutatud ainete ja osakeste omadustest. Töös kasutatud NP-de kontsentratsioonid on esitatud Ce või Si nominaalsete kontsentratsioonidena. *E. coli* ATCC 8739 ja K-12 BW25113 tüve võrdluse puhul kasutati CeO₂(-) NP-de kontsentratsioone vahemikus 0–1000 mg Ce/l. *E. coli* ATCC 8739 mutantide liikuvuse hindamiseks kasutati Ce(NO₃)₃ ja CeO₂(-) NP-de lõppkontsentratsioone 0 mg Ce/l ning 500 mg Ce/l ning vastavalt isomolaarse kontsentratsiooniga SiO₂(-) NP-i 0 mg Si/l ja 100 mg Si/l. Testkontsentratsioon 500 mg Ce/l valiti eelnevate pilootkatsete põhjal (uurimisgrupi eelnevad publitseerimata andmed) nii, et see ei inhibeeriks bakteri kasvu ühegi testitud aine osas, kuid demonstreeriks valitud ekspositsioonitingimustes ja kontsentratsioonigradiendi rehakülvides (vt 2.2.6.) veel muutust liikuvuses. SiO₂(-) NP-sid on kasutatud antibakteriaalsete omadusteta negatiivse kontrollina (Nefedova *et al.*, 2022). Kemikaalide ja nanoosakeste lahjendused tehti steriilses deioniseeritud vees.

Tabel 3. Liikuvuskatsetes kasutatud ained ja nanoosakesed. Kasutatud NP-d on iseloomustatud TÜ füüsikainstituudis (Nefedova *et al.*, 2022). Elektrokineetiline potentsiaal ehk ζ-potentsiaal iseloomustab NP-de efektiivset pinnalaengut vesilahuses. Primaarsuurused on mõõdetud transmissiooni elektronmikroskoopia (TEM) piltidelt.

Aine/osake	Elektrokineetiline potentsiaal, mV	Primaarsuurus, nm	Päritolu
CeO ₂ (-) NP	-53 ± 4	3,2 ± 0,4	Nefedova <i>et al.</i> , 2022
CeO ₂ (+) NP	+41 ± 2	3,3 ± 0,4	
SiO ₂ (-) NP	-34 ± 3	16,3 ± 1,9	
Ce(NO ₃) ₃	-	-	Sigma-Aldrich, Saksamaa

Tabelis 4 on toodud selles töös kasutatud söötmed ning nende retseptid. Kollase värvi intensiivsus viitab agari protsendile söötmes. Söötmed steriiliti autoklaavimise teel 121° C juures 15 minutit. Seleksioonita agarsöötmeid kasutati liikuvuskatsetes, seleksiooniga söötmeid kasutati tüvede konstrueerimisel ning vedelsöötmeid bakterite ettekasvatuseks ja ekspositsiooniks. Liikuvuskatsetes on tardsöötmete lisanditena kasutatud mitteioonset surfaktanti TWEEN® 80 (Sigma-Aldrich, Prantsusmaa) ja glükoosi.

Tabel 4. Kasutatud söötmed. Tabelis toodud tulp „Seleksioon“ viitab seleksioonimarkerina kasutatud antibiootikumile söötmes.

Sööde	Koostisosad						
	Trüptoon	Pärmiekstrakt	NaCl	Agar	Glükoos	TWEEN [®] 80	Seleksioon
Luria-Bertani (LB) vedelsööde	10 g/l	5 g/l	5 g/l	-	-	-	-
2x LB vedelsööde	20 g/l	10 g/l	10 g/l	-	-	-	-
LB + 0,2% agar	10 g/l	5 g/l	5 g/l	2 g/l	-	-	-
LB + 0,5% agar	10 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	-	-	-
LB + 0,5% agar + 0,5% glükoos	10 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	-	-
LB + 0,5% agar + 0,5% glükoos + 0,05% TWEEN [®] 80	10 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	5 g/l	500 µl/l	-
LB tardsööde (+ 1,5% agar)	10 g/l	5 g/l	5 g/l	15 g/l	-	-	-
LB tardsööde + 0,5% glükoos	10 g/l	5 g/l	5 g/l	15 g/l	5 g/l	-	-
LB tardsööde ampitsiliiniga (Amp)	10 g/l	5 g/l	5 g/l	15 g/l	-	-	100 µg/ml
LB tardsööde kanamütsiiniga (Km)	10 g/l	5 g/l	5 g/l	15 g/l	-	-	50 µg/ml

2.2.4. Homoloogne rekombinatsioon

Töös kasutatud tüvede konstrueerimiseks lähtuti Datsenko ja Wanneri homoloogsel rekombinatsioonil põhinevast kromosomaalsete geenide katkestamise metoodikast (Datsenko ja Wanner, 2000). Elektroporatsiooniks valmistati kompetentsed rakud ette vastavat Datsenko ja Wanneri (2000) töös toodule. λ Red homoloogset rekombinatsioonisüsteemi sisaldav plasmiid pAJ172 (publitseerimata, konstrueerinud Marje Kasari (TÜ tehnoloogia instituut), Datsenko ja Wanneri pKD46 arabinoosi induktsioon on asendatud anhüdrotetratsükliini induktsiooniga) transformeeriti kompetentsetesse *E. coli* ATCC 8739 (Tabel 1) rakkudesse elektroporatsiooni teel. Elektroporatsiooniks kasutati Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) poraatori eelseadistatud programmi „*E. coli* - 2mm - 2,5 kV“. Vahetult peale elektroporatsiooni lisati rakkudele 1 ml sooja steriilset LB söödet ning inkubeeriti selektsioonita 1,5 ml tuubis 37° C juures 2 h. Transformante selekteeriti pindkylvina LB+Amp tardsöötmele (Tabel 4).

Rekombinatsioonikonstruktide saamiseks amplifitseeriti pGP704LKM plasmiidilt hübriidpraimeritega (Tabel 2) kanamütsiini resistentsuse ekspresioonikassett. Plasmiid pGP704LKM on saadud Heili Ilveselt. Rekombinatsiooni konstrukti saamiseks kasutati Phusion DNA polümeraasi (Phusion Hot-Start II DNA Polymerase, Thermo Scientific™) vastavalt tootja juhendile. Saadud PCR-i produktide suurust ja olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil pingel 150 V (6,25 V/cm). Seejärel puhastati PCR-i produktid kasutades PCR- produkti puhastuskomplekti (FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit, Favorgen Biotech Corp., Taiwan) vastavalt tootja juhendile.

Rekombinaasi ekspressiooni induktsiooniks kasvatati LB vedelsöötmes (Tabel 4) *E. coli* ATCC 8739[pAJ172] eksponentsiaalsesse kasvufaasi anhüdrotetratsükliini (200 ng/ml) juuresolekul. Anhüdrotetratsükliin on saadud Marje Kasarilt. Anhüdrotetratsükliini lisati kultuurile 1,5 h peale inkokulatsiooni ning seejärel inkubeeriti veel 1 h. Seejärel transformeeriti ülalkirjeldatud viisil kompetentsetesse *E. coli* ATCC 8739[pAJ172] rakkudesse rekombinatsioonikonstruktid. Transformante selekteeriti pindkylvina LB+Km tardsöötmele (Tabel 4).

2.2.5. Tüvede kontrollimine

Saadud ühe geeni katkestusmutante kontrolliti PCR-iga ja fenotüübi järgi (ujumisvõime). Kuna koloonia-PCR ei andnud nende bakterite puhul ästi korratavaid tulemusi, kasutati PCR-i jaoks matriitsina genoomset DNA-d, mis eraldati kultuurist DNA puhastamise komplektiga (PureLink™ Microbiome DNA purification kit, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, USA) järgides tootja protokollit. PCR-i praimeritena kasutati kanamütsiini praimereid homoloogse

rekombinatsiooni toimumise positiivse kontrollina ning katkestatud geeni järjestuse spetsiifilisi primereid negatiivse kontrollina (Tabel 2). PCR- jaoks kasutati Phusion DNA polümeraasi (Phusion Hot-Start II DNA Polymerase, Thermo Scientific™) vastavalt tootja juhendile. Saadud produktide olemasolu ja pikkust kontrolliti geelelektroforeesil. Saadud tüved säilitati LB+Km tardsöötmeil (Tabel 4) ja kasutati liikuvuskatseteks. Mutantide ujumisvõimet kontrolliti funktsionaalse testiga, milleks oli torkekülv 0,2% agariga LB söötmesse.

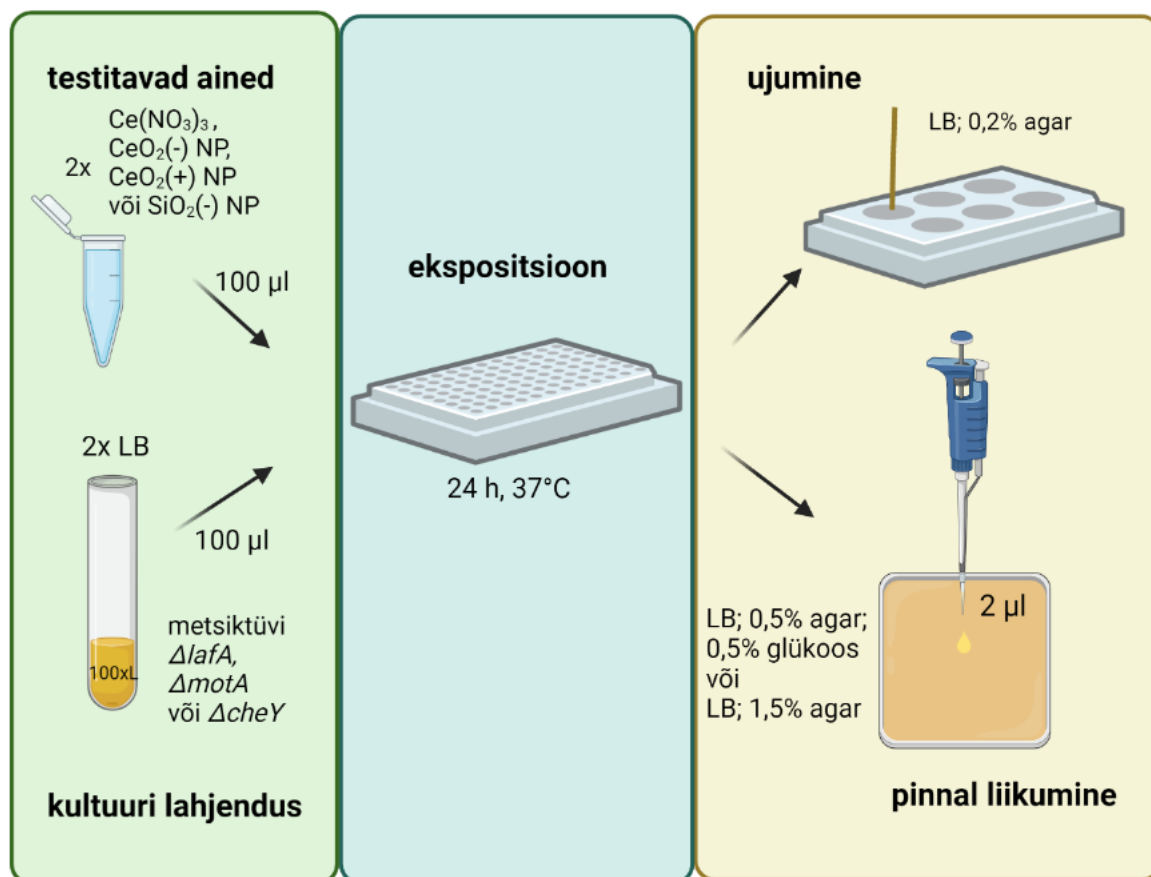
2.2.6. Liikuvuskatsed

Käesolevas töös uuriti bakterite liikuvust tardsöötme pinnal ja poolvedelas söötmes. Töös on lähtunud mitmest varasematest kirjanduse allikatest. Pinnal liikuvuse uurimise testsüsteemi aluseks on sobiv agari sisaldus söötmes ja glükoosi sisaldus, kuid ka külvitilga suurus (Darnton *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017). Ujumist on uuritud mitmetel viisidel. Siin on toodud allikad, mille metoodikat on osaliselt kasutatud testsüsteemi koostamise jaoks (Sudarshan *et al.*, 2021; Wiles *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018). Metallistressi katsete läbi viimisel võeti aluseks nii tööühma varasemad teadmised kui ka infot allikatest (Garuglieri *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2018).

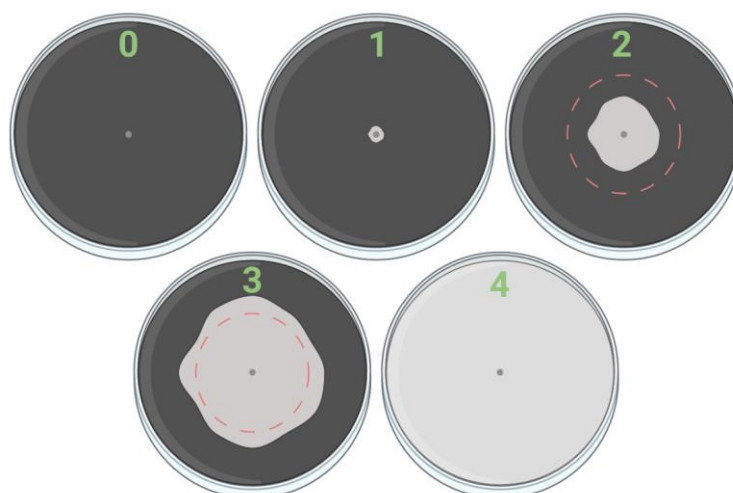
Liikuvuskatsetes kasutati selektsioonita tardsöötmeid (Tabel 4), sealjuures glükoos ja TWEEN® 80 lisati söötmesse vahetult enne tasside valamist. Söötmed valati 10 cm x 10 cm kandilistesse Petri tassidesse (82.9923.422, Sarstedt AG&Co, Saksamaa), lastes tassidel avatuna töötavas bioohutuskapis 30 minutit tahkuda. Valatud tasse kasutati olenevalt katsest vahetult peale valmistamist või säilitati 24 h toatemperatuuril. 0,2% agariga sööde pipeteeriti 10 ml kaupa 6-kannulistesse koekultuuritöötluseta plaatidesse, mis suleti kohe peale söötme pipeteerimist ning peale tahkumist hoiustati toatemperatuuril.

Katsetes kasutatud tüvesid (Tabel 1) kasvatati üleöö LB vedelsöötmes (Tabel 4). Tüvede liikuvust hinnati nii kemikaalidele ja nanoosakestele eksponeeritult, kui ka ilma. Ekspositsiooni mõju liikuvusele uuriti tehes üleöökultuurist 100x lahjendus 2x LB söötmesse, mis lisati 96-kannulisse kemikaale ja nanoosakesi (vt 2.2.3.) sisaldavasse mikrotiiterplaati, suhtes 1:1 (lõppmaht 200 µl). Analoogselt antimikroobse efektiivsuse testidele, eksponeeriti baktereid kemikaalidele 24 h 37 °C juures, loksutamata. Eksponeeritud bakterikultuur külvati pinnal liikuvuse uurimiseks 2 µl tilkadena tardsöötme pinnale 2 x 2 maatriksina või rehakülvina ja ujumisvõime hindamiseks torkekülvina 0,2% agariga LB söötmesse (Tabel 4). Ekspositsioonikatset illustreerib joonis 2. Ilma kemikaalide ja NP-de ekspositsioonita liikuvuskatsete jaoks kasutati üleöökultuuri. Bakter külvati samal moel nagu eksponeeritud

bakterikultuur. Tilkadel lasti avatud tassidel imenduda, mille järgselt inkubeeriti söötmeplaate 37 °C juures kuni 1 nädal. Pinnakülvi makrokolooniate diameetreid mõõdeti nihiku abil kuni 1 nädala jooksul olenevalt katsest. Ujumisfenotüüpi hinnati ujumistsooni ulatuse alusel skaalal 0–4 kuni (joonis 3) 1 nädala jooksul.



Joonis 2. Ekspositsiooni katset selgitav skeem.



Joonis 3. Visuaaliseeritud ujumisfenotüübi hindamise skaala. Joonisel tähistab punane punktiirjoon poolt kannu raadiusest.

- 0 – liikuvus puudub, kasv ainult piiritletult torkekülvi joonel
- 1 – ujumine torkekülvi vahetus ümbruses vaevumärgatav, torkekülvi joon hägune
- 2 – ujumise ulatus vähem kui pool kannu raadiusest
- 3 – ujumise ulatus rohkem kui pool kannu raadiusest
- 4 – maksimaalne võimalik ujumise ulatus (kannu servani)

2.2.7. Kasvukõverad

Tuvastamaks konstrueeritud tüvede ja metsiktüve kasvu dünaamikat ning ekspositsioonide toksilist mõju, lisati üleökultuuri 100x lahendus 2x LB-s kemikaale ja nanoosakesi (kontsentratsioonid vastavalt 2.2.3. toodule) sisaldavasse 96-kaevulisse mikrotiiterplaati suhtes 1:1. Negatiivse kontrollina kasutati steriilset LB vedelsöödet (tabel 4). Katset korrati 3 bioloogilises korduses. Kasvukõverate saamiseks kasutati mikrotiiterplaadilugejat POLARstar® Omega (BMG LABTECH, Saksamaa). Kasvukõverate jaoks koguti andmeid üleöö 37 °C juures. Tulemused visualiseeriti joondiagrammi abil.

2.2.8. Viburite värvimine

Viburite visualiseerimiseks valgusmikroskoobis värviti loksutamata üleökultuuri vedelikusambast võetud bakterirakke Heimbrook'i järgi (Heimbrook *et al.*, 1989). Viburivärv on saadud Merike Jõesaarelt (TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituut). Viburite vaatlemiseks kasutati mikroskoobi Olympus BX41 (Jaapan) 100x suurendusega immersioonobjektiivini ning fotode jäädvustamiseks digitaalset mikroskoobi kaamerat Olympus DP71 (Jaapan) ja Cell^B 2.6 tarkvara.

2.2.9. Statistika

Liikuvuskatsete tulemuste statistiliseks analüüsiks on kasutatud kahesuunalist ANOVA analüüsi. Statistiliselt olulisuste erinevuste tuvastamiseks kontrollist (olenevalt katsest, metsiktüve või 0 kontsentratsiooni vastu) kasutati Holm-Šidáki mitmese võrdluse testi usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliste testide läbiviimiseks kasutati GraphPad Prism 9.3.1 tarkvarapaketti.

2.3. Tulemused ja arutelu

E. coli ATCC 8739 suurenenud liikuvust agari pinnal märgati empiiriliselt meie laboris läbi viidud katsetes CeO₂ NP-dega, kus kirjeldati viimaste antimikroobseid omadusi (publitseerimata tähelepanek Nefedova *et al.*, 2022 katsete käigus), mille tõttu tekkis vajadus CeO₂ nanosakeste mõju *E. coli* liikuvusele edasi uurida. Publitseerimata tulemustes nähti NP-de efekti 1,5% agaril, mistõttu kaasati see agaritüüp katsetesse. Küll aga selleks, et tuvastada nii potentsiaalselt suurenenud kui ka vähenenud bakterite pinnal liikuvust tuli luua süsteem, kus bakterite liikuvus oleks juba esialgselt intensiivne. Kuna sooviti heita valgust ka muutuse mehhanismile, oleks olnud mugav kasutada Keio ühe geeni katkestusmutantide raamatukogu (Baba *et al.*, 2006). Selleks tuli esmalt võrrelda ATCC 8739 tüve liikuvust K-12 tüvega BW25113 erinevates tingimustes ja optimeerida mudelsüsteemi nii glükoosi kui ka agari sisalduse osas.

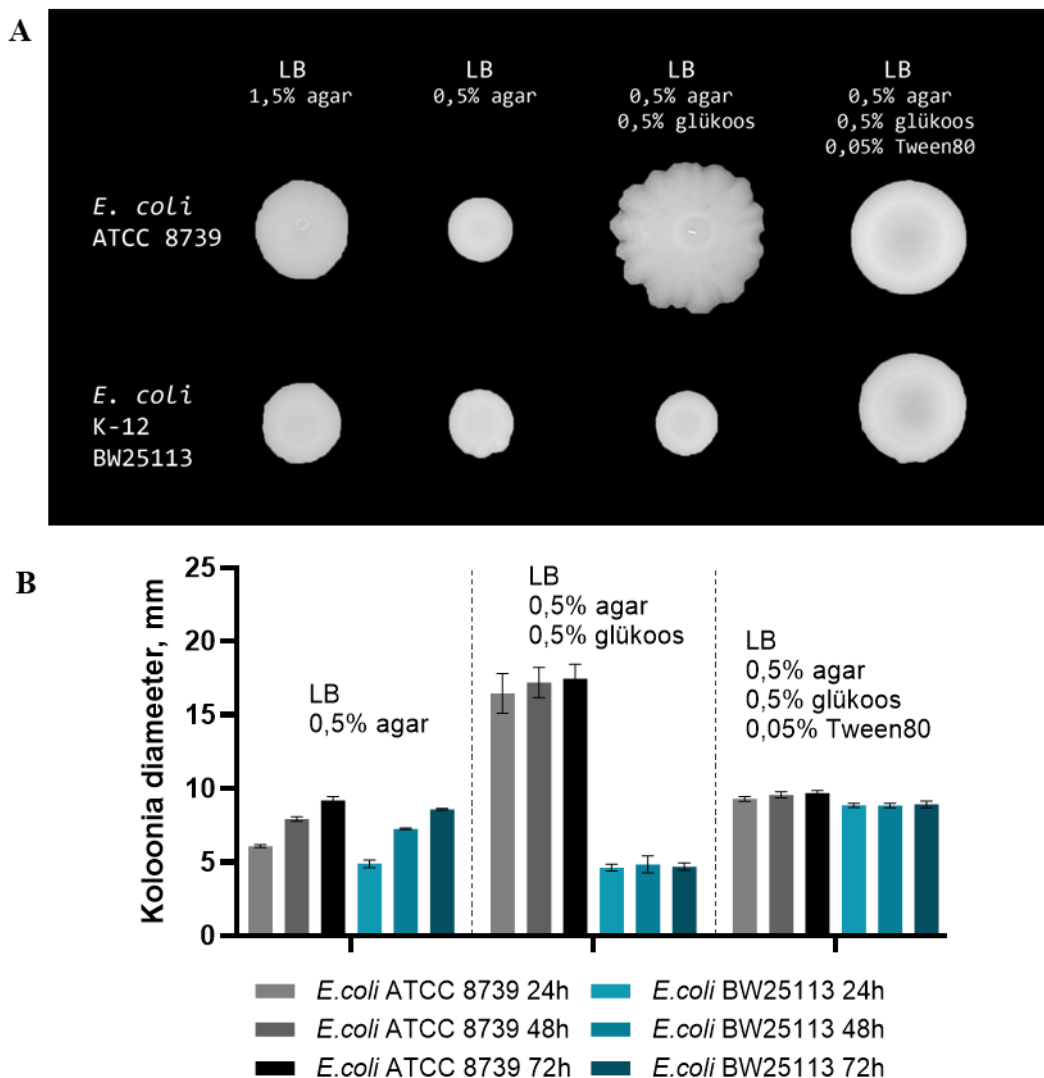
2.3.1. Keio kollektiooni metsiktüve *Escherchia coli* BW25113 ja *Escherchia coli* ATCC 8739 liikuvuse võrdlus erinevates tingimustes

Kuna varasemalt on Keio ühe geeni katkestusmutantide raamatukogu liikuvuse uurimiseks kasutatud (Inoue *et al.*, 2007), siis planeeriti seda kasutada ka liikuvuse uurimiseks metalli- ja/või metallipõhiste NP-de ekspositsiooni tingimustes. Selleks tuli esmalt Keio katkestusmutantide raamatukogu metsiktüve *Escherchia coli* BW25113 ja antimikroobsete pindade testimisel kasutatava *Escherchia coli* ATCC 8739 (The International Organisation for Standardisation, 2007, 2019) koloonia morfoloogiat võrrelda erinevatel LB agarsöötmetel ja efekti liikuvusele CeO₂(-) NP-dega inkubeerides.

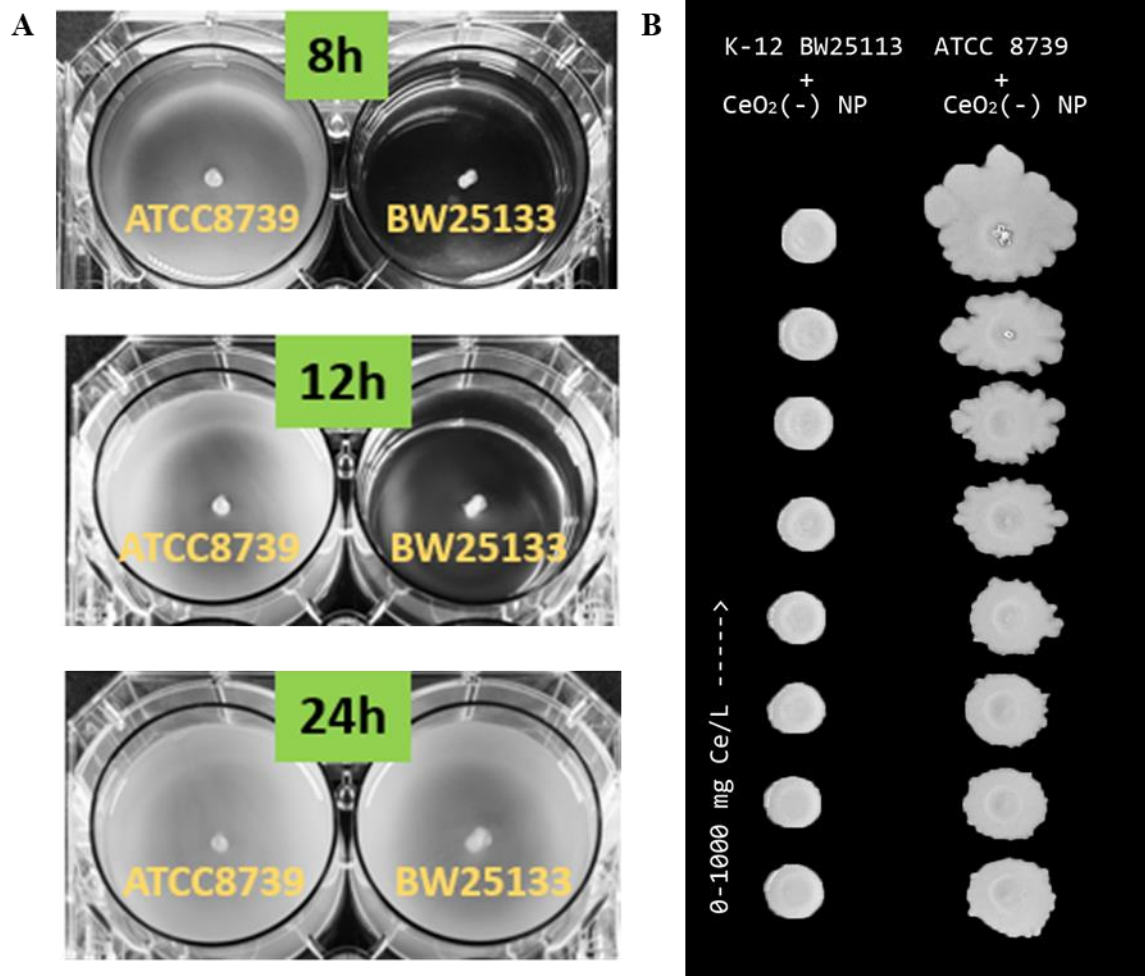
Sageli on voogava liikuvuse uurimiseks kasutatud spetsiifilist Eikeni agarit (Eiken Chemical Co., Ltd., Jaapan) (nt Darnton *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2020) ja glükoosi lisamist pooltahkele tardsöötmele (nt Burkart *et al.*, 1998; Harshey ja Matsuyama, 1994; Inoue *et al.*, 2007). Eelmainitud kombinatsioon soodustab voogavat liikuvust. Eikeni agarit ei olnud aga võimalik Eestisse tellida. Analoogse voogamist soodustava efekti saavutamiseks on kirjanduses kasutatud ka mitteioonsete surfaktantide lisamist agarsöötmele (Niu *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2017). Niu *et al.* soovitatud mitteioonse surfaktandi TWEEN® 80 kasutamine ei suurendanud selle töö katsetes voogavat liikumist (Joonis 4A, 4B), mistõttu ei kasutatud surfaktanti edaspidistes katsetes.

Võrdluses selgus, et Keio ühe geeni katkestusmutantide raamatukogu metsiktüve liikuvus on ATCC 8739 tüvest üsna erinev: BW25113 ujub aeglasemalt (Joonis 5A), koloonia diameeter

agari pinnal on väiksem ja morfoloogia glükoosiga agarsöötmetel on erinev ATCC 8739 tüvest (Joonis 4A). CeO₂(-) NP-de kontsentratsiooni gradiendi katses, ei mõjutanud CeO₂(-) NP-d Keio metsiktüve liikuvust tardsöötmetel pinnal, kuid ATCC 8739 puhul oli liikuvuse suurenemist märgata kontsentratsiooni tõustes (Joonis 5B).



Joonis 4. *E. coli* tüvede ATCC 8739 ja BW25133 pinnal liikuvuse võrdlus. (A) Koloonia morfoloogia esinduslikud näited erinevatel söötmetel. Joonisel toodud söötmetüüpidele külvati tilkkülvina 2 µl üleöö kultuuri kummastki tüvest ja inkubeeriti 37° C juures. Fotod koloonia morfoloogiast jäädvustati peale 24 h inkubeerimist. Kolooniade suuruste suhe on hoitud muutumatuna. Morfoloogiliselt on näha, et voogav fenotüüp avaldus ainult ATCC 8739 puhul ja seda 0,5% agariga ja glükoosiga LB tardsöötmetel. (B) Pinnal liikuvuse hindamiseks mõõdeti koloonia diameetreid 24 h, 48 h ja 72 h möödumisel. Joonisel on toodud võrdluseks 0,5% agarisisaldusega söötmete mõju koloonia diameetrile, kus samuti nähtub glükoosiga agarsöötme suurim mõju ATCC 8739 koloonia diameetrile. Tulpdiagrammil toodud andmed kolme bioloogilise korduse keskväärtused, vearibadena on kasutatud standardhälvet.



Joonis 5. *E. coli* tüvede ATCC 8739 ja BW25133 ujumisvõime võrdlus ja CeO₂(-) NP-de mõju pinnal liikuvusele. (A) 0,2% agariga LB söötmesse tehti üleöökuultuurist torkekülv ning vaadeldi liikuvust 8, 12 ja 24 h möödumisel. ATCC 8739 nähtav kasv kaevu servani oli tuvastatav 8 tunni ning BW25133 24 tunni möödumisel. (B) Tüvesid inkubeeriti 1 h CeO₂(-) NP-de juuresolekul. Eksponeeritud bakterikultuurist tehti 2 µl mahus rehakülvid 0,5% agari ja 0,5% glükoosiga LB söötmele, kus kõige alumine täpp vastab 0 mg Ce/l ja ülemine 1000 mg Ce/l, külviplaat inkubeeriti 37 °C juures 48 h. ATCC 8739 tüve koloonia diameeter suureneb Ce kontsentratsiooni tõustes.

2.3.2. *Escherchia coli* ATCC 8739 katkestusmutantide konstrueerimine ja kontroll

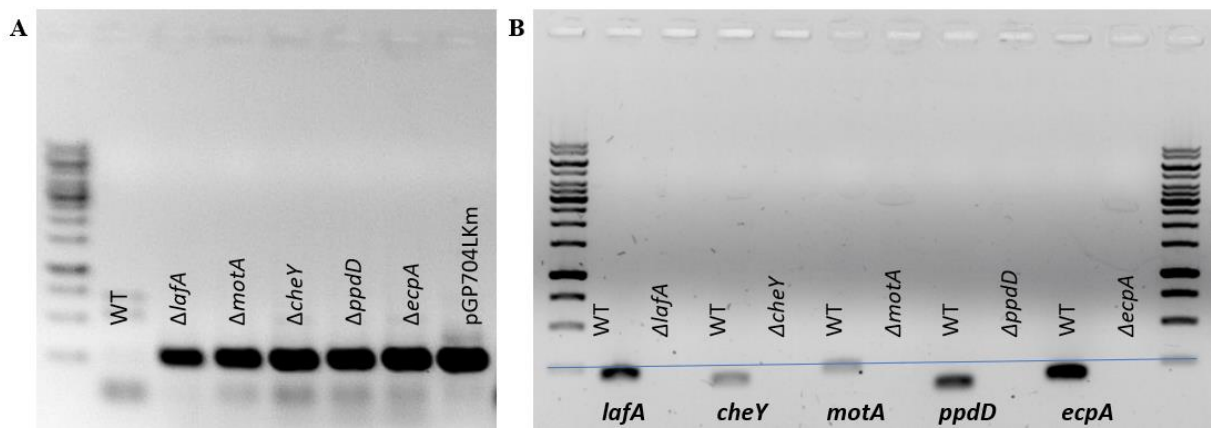
Suurte erinevuste tõttu Keio ühe geeni katkestusmutantide raamatukogu metsiktüvest, otsustati teha *E. coli* ATCC 8739 tüvest ühe geeni katkestusmutandid homoloogse rekombinatsiooni abil (vt 2.2.4.) Esialgsete liikuvuskatsete läbi viimiseks valiti järgmised eelkõige vibursõltuva liikuvusega seotud genid:

1. *lafA*, mis kodeerib Flag-2 lateraalse vibursüsteemi viburite flagelliini (Stewart ja McCarter, 2003). $\Delta lafA$ puhul võiks bakteritel puududa Flag-2 lateraalsed viburid, kuid olla olemas klassikalised Flag-1 lookuselt kodeeritud *fliC* geeni kodeeritud flagelliinist koosnevad viburid.

2. *motA* on üks Flag-1 viburi mootorvalkude geenidest, mis vastutab viburikompleksi varustamise eest prootongradiendi energiaga, mis omakorda paneb viburi pöörlema (Blair ja Berg, 1990). Δ *motA* puhul peaks vibur olema olemas, kuid ei pöörle.
3. *cheY* on kemotaktilise vastuse regulaator, mis vastutab Flag-1 viburi pöörlemise suuna muutmise eest (Burkart *et al.*, 1998). Δ *cheY* puhul võiks vibur küll liikuda, kuid viburi pöörlemise suunda kemotaktiliselt ei muudeta. *Che* geenide roll Flag-2 vibursüsteemist sõltuva liikumise puhul ei ole teada, siiski on Ren *et al.* arutlenud *E. coli* 042 näitel, et Flag-1 ja Flag-2 lookusel võib olla ühine kemotaksise regulatsioon (Ren *et al.*, 2005)

Regine Hengge grupp on korduvalt näidanud, et viburid on koloonia biofilmis struktuurselt olulised (Serra, Richter, ja Hengge, 2013; Serra, Richter, Klauck, *et al.*, 2013) ning seetõttu valiti esialgsetes katsetes Flag-1 lookuse viburite inaktiveerimiseks *motA* mutant, et säilitada küll viburid, kuid muuta need liikumisel mittefunktsionaalseteks. Flag-2 lookuse lateraalse flagelliini geen *lafA* valiti, et selgitada Flag-2 lookuse mõju liikumisel, kuid ka seetõttu, et Flag-2 lookuse mootorvalkudest ja kemotaktilisest regulatsioonist on *E. coli* tüvede puhul vähe teada. *V. parahaemolyticus*el, mille Flag-2 süsteemi on enim uuritud, on mootorvalgu geeniks H^+ asemel Na^+ gradienti kasutav *motY*, mis aga puudub *E. coli* tüvedel (Ren *et al.*, 2005).

Homoloogse rekombinatsiooni teel (Datsenko ja Wanner, 2000) saadud ühe geeni katkestusmutantide soovitud geenide puudumist kontrolliti PCR-iga võrrelduna metsiktüvega, mis kinnitas geenide katkestamist mutantide korral (Joonis 6). Kõigil tüvedel tuvastati kanamütsiini geen (Joonis 6A) ning metsiktüvel olid olemas kõik sihtmärkgeenide signaalid, mis vastava sihtmärkgeeni mutandil samades reaktsioonitingimustes puudusid (joonis 6B).



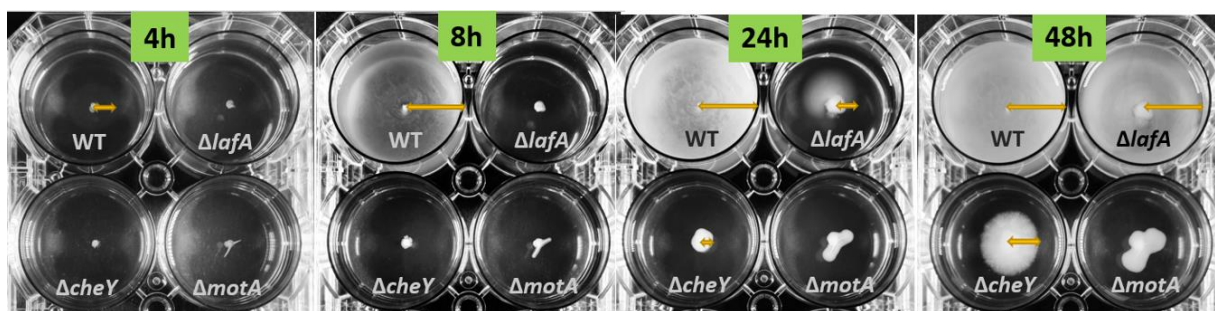
Joonis 6. Homoloogse rekombinatsiooniga saadud tüvede geenispetsiifiliste PCR-i produktide olemasolu ja suuruse kontroll agarosgeelil. Legend: WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemotaksise keskse regulaatorvalgu mutant ja $\Delta motA$ – viburi pöörlemise eest vastutava mootorvalgu mutant, $\Delta ppdD$ ja $\Delta ecpA$ – piilimutandid, mis konstrueeriti, kuid sellesse töösse ei kaasatud, pGP704LKm – kanamütsiini kasseti päritoluplasmiid. Suurusmarkerina on kasutatud GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific). Kõige väiksem suurusmarkeri jaotis on 250 ap. Kasutatud praimerite nimekirja vt Tabel 2. (A) Kanamütsiini geeni olemasolu kontroll tüvedes. (B) Geenisiseste praimerite abil tüvede õigsuse kontroll. Joonise alumises osas on toodud geeni nimi, mille praimereid kasutati kontrolliks.

2.3.3. *Escherchia coli* ATCC 8739 katkestusmutantide liikuvuse iseloomustamine

Mutantide ja metsiktüve liikuvust kirjeldati nii ujumisvõime kui tardsöötme pinnal liikuvuse osas. Ujumist uuriti torkekülviga 0,2% agariga LB söötmesse, pinnal liikuvust uuriti aga tilkkülviga mahus 2 μ l ning 0,5% ja 1,5% agariga LB tardsöötmele nii 0,5% glükoosiga kui ilma (vt 2.2.6.). Pinnal liikuvust uuriti pilootkatses ka 90% suhtelise õhuniiskuse juures kliimakapis (Lisa 1), kuid suurt erinevust kolooniate diameetrites ei nähtud, mistõttu jätkati katseid tavalises ilma õhuniiskuse regulatsioonita inkubaatoris.

Ujumisekatses selgus, et võrreldes metsiktüvega $\Delta motA$ ei ujunud, kuid $\Delta lafA$ ja $\Delta cheY$ puhul oli ujumisvõime vähenenud (Joonis 7). $\Delta motA$ ujumisvõime puudumist võiks selgitada sellega, et staatorvalgu MotA interaktsioon FliG valguga on vajalik pöördemomendi tekitamiseks, on otseselt seotud viburi liikumisega (Zhou ja Blair, 1997). Lateraalse viburi filamendita $\Delta lafA$ ujumisvõime vähenemine võrreldes metsiktüvega ei ole ootuspärane, kuna Flag-2 lookust, mis on ka olemas ATCC 8739 tüvel olemas (Archer *et al.*, 2011), on *E. coli* puhul peetud mittefunktsionaalseks (Ren *et al.*, 2005). Oletades, et Flag-2 süsteem on siiski ATCC 8739 tüves funktsionaalne, siis võiks eeldada, et mõlemal vibursüsteemid kasutavad sama staatorvalgu kompleksi, kuna $\Delta motA$ ujumise fenotüüp ei avaldunud. Kui nende viburisüsteemide staatorvalgukompleks oleksid eraldiseisvad võinuks $\Delta motA$ mutant olla liikuv. Võrreldes $\Delta lafA$ ja $\Delta cheY$ liikuvust, ujus $\Delta lafA$ paremini kui $\Delta cheY$. Kirjandusest

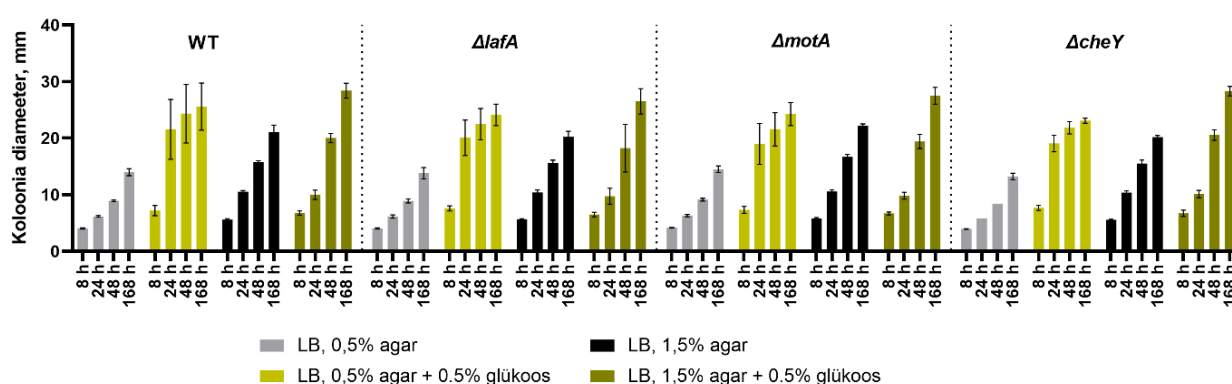
lähtudes võib arutleda, et lateraalse flagelliini geeni mutant ujub paremini, kuna kemotaksis ja Flag-1 kodeeritud viburid jäid rakule alles. $\Delta cheY$ ei suuda ujuda samaväärselt, kuna võib mõjutada nii Flag-1 kui Flag-2 vibursüsteemi kemotaktilist liikuvust (Ren *et al.*, 2005). Jättes kõrvale väiksema ujumisvõimekuse võrreldes lateraalse flagelliini mutandiga, on $\Delta cheY$ fenotüüp kirjandusest nähtuvalt oodatav – mutant ei ole kemotaktiline, kuid suudab siiski liikuda (Lane *et al.*, 2005). Selleks, et klassikalise Flag-1 ja lateraalse Flag-2 vibursüsteemi rolli ujumises paremini kirjeldada, tuleks konstrueerida lisaks $\Delta lafA$ mutandile ka $\Delta fliC$ mutant ja mõlema geeni topeltmutant. Seejärel on vajalik hinnata ujumist agarsöötmes ning liikuvust tardsöötme pinnal, kuna *V. parahaemolyticuse* puhul on lateraalse vibursüsteemi rolli kirjeldatud just pinnal liikumises (Stewart ja McCarter, 2003). Veel peaks uurima potentsiaalseid Flag-2 mootorvalke ning ka teisi ujumisvõime säilitamisel olulisi funktsionaalseid gene ja välistama mutatsioonide võimalikud pleiotroopsed efektid plasmiidse ekspressiooni komplementatsiooniga.



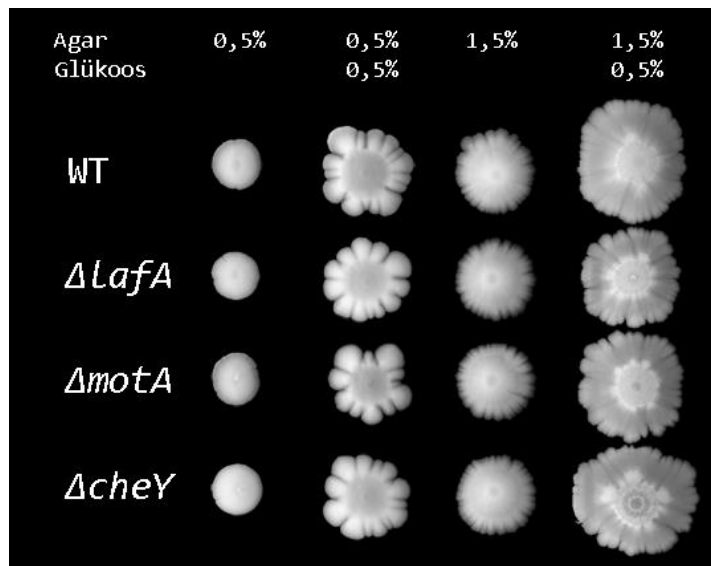
Joonis 7. Katse *E. coli* ATCC 8739 mutantide ujumise testimiseks, kus WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemotaksise keskse regulaatorvalgu mutant ja $\Delta motA$ – viburi pöörlemise eest vastutava mootorvalgu mutant. Tüvede üleöö kultuurist tehti torkekülvl 0,2% agariga LB tardsöötmesse ning inkubeeriti 37 °C juures. Kollased nooled joonisel näitavad ujumistsooni ulatust erinevates ajapunktides. WT liikumine muutub nähtavaks 4 h möödudes, $\Delta lafA$ ja $\Delta cheY$ (vähesel määral) puhul avaldub fenotüüp 24 h tunni möödudes.

Pinnal liikuvuse uurimisel selgus, et kõvemal tardsöötmele liikusid bakterid paremini kui pehmemal tardsöötmele (Joonis 8, hall ja must). Kuigi pinnal liikuvust on enamasti uuritud pehmetel agaritel ei ole parem liikuvus tahkema agaril täiesti üllatuslik. Song *et al.* näitasid, et *E. coli* liigub paremini tahkema pinnal, kui pehmemal pinnal (Song *et al.*, 2017). Glükoosisisaldus soodustas samuti liikumist võrreldes sama agarisisaldusega ilma glükoosita söötmeaga (Joonis 8, rohelised toonid), mida on ka värskest kirjanduses *E. coli* puhul täheldatud (Sudarshan *et al.*, 2021). Viburliikumise mutantide kolooniate diameetrid (Joonis 8) ega morfoloogia (Joonis 9) ei erinenud samal söötmetüübil metsiktüve omadest, millest võib järeldada, et kumbki vibursüsteem ei olnud nendes tingimustes pinnal liikumiseks vajalik. See võib olla tingitud sellest, et nähtud pinnal liikumine ei ole klassikaline voogamine ja ainult

vibursõltuv liikumine. See viitab omakorda sellele, et söötme pinnal liikumises võivad osaleda ka piilid. Nagu kirjanduse ülevaatuses mainitud, võib ATCC 8739 tüvi kasutada pinnal liikumiseks kasutada sarnaselt *Pseudomonas* 'tele tüüp IV piile (Köhler *et al.*, 2000). Tüvel ATCC 8739 on BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) otsingu alusel olemas *ppdD/hcpA* (Ledesma *et al.*, 2010) tüüp IV piilide monomeeri geen. *ppdD/hcpA* mõju on nähtud piilide abil liikumises (*twitching*) (Xicohtencatl-Cortes *et al.*, 2009). Samas on näidatud ka tüüp I piilide osalust pinnal liikumises (Kurihara *et al.*, 2011). Lisaks võib viburisõltuva liikuvuse süsteemide manipuleerimine mõjutada ka piilide geenide ekspressiooni. Täpsema mõjuri välja selgitamiseks tuleks liikuvuskatsetesse kaasata ka piilide katkestusmutandid ning luua piilide ja viburite geenide topeltmutante.

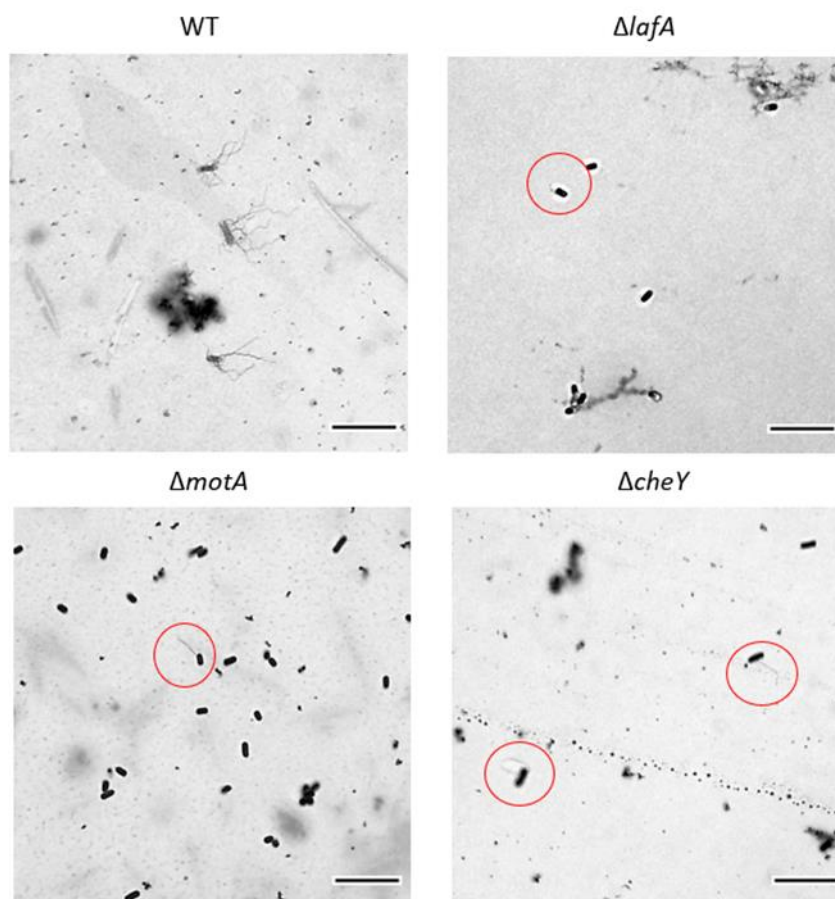


Joonis 8. Pinnal liikuvuse võrdluses vaadeldi kasutatud tüvede (WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – lateraalse flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemotaksise keskse regulaatorvalgu mutant ja $\Delta motA$ – viburi pöörlemise eest vastutava mootorvalgu mutant) liikuvust erinevatel agaritüüpidel. Selleks mõõdeti 8, 24, 48 ja 168 tunni möödudes koloonia diameetreid, kust selgus, et glükoosi juuresolek (rohelistes tulbad) ning tahkem agarsööde (tumedamad tulbad) suurendasid koloonia diameetrit. Joonisel on toodud 3 bioloogilise korduse keskvärtus koos standardhälvetega. Statistiliselt väga olulist ($P < 0,0001$) erinevust tüvede siseselt nähti 0,5% agarsöötme ja 0,5% agarsöötmele glükoosiga vahel (hall vs heleroheline) igas ajapunktis alates 24 h. Samuti nähti statistiliselt väga olulist erinevust ($P < 0,0001$) 0,5% agarsöötme ja 1,5% agarsöötmele (hall ja must) kasvanud bakterite koloonia diameetrites tüve siseselt alates 48 h. Võrreldes koloonia diameetreid erineva agarisisaldusega glükoosiga söötmetel (heleroheline vs tumeroheline), täheldati väga olulist erinevust ($P < 0,0001$) ainult 24 h ajapunktis. 168 ajapunktiks olid statistilised erinevused vähenenud või kadunud.



Joonis 9. Pildid representatiivsetest kolooniatest. On näha, et koloonia morfoloogia ei sõltu mutandist, kuid oleneb kasutatavast söötmetüübist. Kolooniate fotod on jäädvustatud 168 h vanustest kolooniatest, kuna selles ajapunktis oli kõige paremini väljendunud koloonia morfoloogia iseärasused. Kolooniate suuruse suhe pildil on hoitud muutumatuna.

Lisaks liikuvuse uurimisele vaadeldi ka üksikraku morfoloogiat (Joonis 10). Rakud kasvatati ja värviti peatükis 2.2.8. toodud viisil. Metsiktüve preparaates oli enamikul rakkudel palju pikki vibureid, mis paiknesid peritrihhina. Preparaadis oli näha ka palju vibureid, mis ei olnud enam bakteri küljes. $\Delta lafA$ puhul oli üksikutel rakkudel lühike subpolaarne „saba“. Nii $\Delta cheY$ kui $\Delta motA$ mutandi rakkudel oli üksikutel rakkudel näha ühte pikemat viburit. Saadud tulemused olid üllatavad, kuna ei olnud ootuspärane, et $lafA$ geeni mutandil viburid peaaegu täielikult puuduvad. Ka mootorvalgu ja kemotaksise mutandi viburite väike arvukus ja morfoloogia oli ootamatu. Põhjuslikke seoseid ei ole teada, kuid võib arvata, et põhjused võivad olla reguleerivad. Kuna kõigil mutantidel valgusmikroskoobiga vaadeldes viburid peaaegu puuduvad, siis tuleks uurida tüvede morfoloogiat ka TEM-i abil ja saada parem ülevaade ka valgusmikroskoobis tuvastamatute jätkete, sh piilide, olemasolust. Lisaks sellele tuleks katkestatud geen plasmidi abil komplementeerida ja viia läbi liikuvuskated, et välistada pleiotroopsete efektide mõju mutantide konstrueerimisel.



Joonis 10. Metsiktüve ja mutantide viburid. WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – lateraalse flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemotaksise keskse regulaatorvalgu mutant ja $\Delta motA$ – viburi pöörlemise eest vastutava mootorvalgu mutant. Viburid on värvitud Heimbrook'i (1989) järgi. Punase ringiga on ümbritsetud mutantide rakud, millel võis näha jätket. Mõõtjoone pikkus on 3 μm .

2.3.4. Ce liikuvuskatsete tulemused

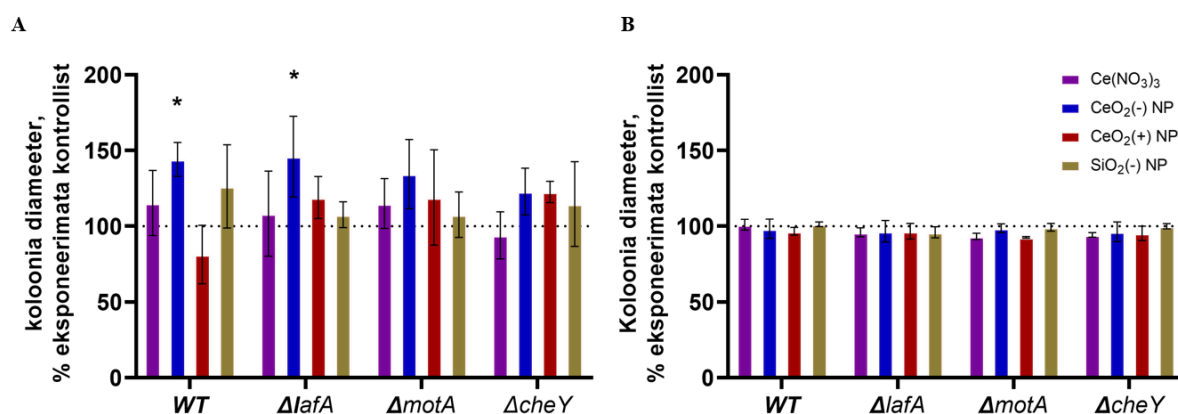
Pinnal liikuvuse uurimiseks valiti 3 tardsöödet: 0,2% agariga LB sööde, 0,5% agariga ja 0,5% glükoosiga LB tardsööde ning 1,5% agariga tardsööde (vt 2.2.3). 0,2% agariga sööde on vajalik ujumise uurimiseks. 0,5% agari ja 0,5% glükoosiga LB sööde valiti seetõttu, et seda söötmetüüpi kasutatakse *E. coli* voogamise uurimiseks kõige sagedamini. 1,5% agariga tardsöödet kasutati, sest see on kõige sagedamini laboris kasutatav sööde ning sellel söötmel nähti ka esialgset $\text{CeO}_2(-)$ NP-de mõju *E. coli* liikuvusele. Ce^{3+} iooni ja CeO_2 NP-de mõju liikuvusele uuriti ajapunktides 4, 8, 24, 48 ja 168 h (Lisa 2 ja 3), kuid töö põhiosas esitatakse ainult suurima erinevusega ajapunktid (Joonis 11 ja 12). Selleks, et kindlaks teha, et tüvede kasv ei olnud oluliselt inhibeeritud Ce^{3+} ioonile või CeO_2 NP-dele eksponeerimise tõttu, uuriti tüvede kasvu kemikaalide juuresolekul ja ilma (vt 2.2.7.). Selgus, et ühegi tüve ega potentsiaalselt toksilise ekspositsiooni puhul ei olnud kasutatud kontsentratsioonides märgata tugevat kasvuinhibitsiooni (Lisa 4 ja 5) ehk kemikaali kontsentratsioon oli kindlasti alla

minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni (MIC). Sellest võib järeldada, et makrokolooniate diameetrid ei olnud oluliselt mõjutatud väljakülvi elusrakkude arvukuse erinevustest ega kasvufaasist.

2.3.5. Liikumine söötme pinnal Ce ekspositsiooni tingimustes

Pinnal liikuvuse puhul suurendasid CeO₂(-) NP-d 0,5% agari ja 0,5% glükoosiga tardsöötme üldise trendina liikuvust kõigil tüvedel, kuid statistiliselt oluline oli liikuvuse suurenemine metsiktüvel ja lateraalse flagelliini mutandil (Joonis 11A). On võimalik, et metsiktüve puhul CeO₂(+) NP-d vähendavad liikuvust, kuid kolooniate diameetrite suure varieeruvuse tõttu ei ole tulemus selle korduste arvu juures statistiliselt oluline. 1,5% agariga tardsöötme ühelgi testitud ainel ega nanoosakesel *E. coli* pinnal liikuvusele efekti ei olnud (Joonis 11B), mis on vastuolus hüpoteesi aluseks oleva tähelepanekuga. Potentsiaalselt võis erinevuse tingida erinev ekspositsioon ning külvitilga suurus või söötme pinna erinev niiskustase tulenevalt labori keskkonnatingimustest. Varasemalt on näidatud, et negatiivse pinnalaenguga CeO₂ NP-d soodustasid *P. aeruginosa* pinnal liikuvust (Mortimer *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2018), kuid seni puudusid andmed CeO₂ NP-de mõjust *E. coli* pinnal liikuvusele. Kirjanduses on ka leitud, et *E. coli* tüvede liikumisvõime mõjutab nende vastuvõtlikkust hõbeda NP-dele, kuid mitte hõbedaioonile (Stabryla *et al.*, 2021). Ka käesolevas töös nägime potentsiaalset Ce³⁺ ionide ja nanoosakeste erinevat mõju liikuvusele, kuid see ei olenenud viburi funktsioonist. Ce(NO₃)₃ ega SiO₂(-) NP-de efekti liikuvusele ei tuvastatud. SiO₂(-) NP-de mõju puudumine liikuvusele on ootuspärane, sest tegemist oli katses mittetoksilise (Nefedova *et al.*, 2022) inertse kontrolliga. Vihodceva *et al.* (2021) tööst selgub, et positiivse pinnalaenguga NP-d võiksid olla toksilisemad, kui negatiivse pinnalaenguga NP-d, kuna esimesed seonduvad elektrostaatiliselt negatiivselt laetud raku pinnale (Vihodceva *et al.*, 2021) ja põhjustavad sellega suurema lokaalse kontsentratsiooni raku vahetus läheduses. Samas Nefedova *et al.* on näidanud, et CeO₂(+) NP-d ei ole *E. coli*'le toksilisemad kui CeO₂(-) NP-d. Selles töös kasutati NP-de subinhibitoorseid kontsentratsioone (Lisa 5), mistõttu ei saa CeO₂(-) NP-de ja CeO₂(+) NP-de mõju erinevust liikuvusele tingida biotsiidne efekt, küll aga võib olla mõju elektrostaatilistel jõududel. Ce(NO₃)₃ kasutati Ce³⁺ ionide allikana samuti subinhibitoorses kontsentratsioonis (Lisa 5), kuid kuna iooni mõju liikuvusele ei tuvastatud, võib CeO₂(-) NP-d mõju liikuvusele olla nanospetsiifiline ja tuleneda NP-de keemilis-füüsikalistest omadustest, sh suurusest ja pinnalaengust (vt Tabel 3). Viimast eriti, kuna eeldatavasti CeO₂ NP-d keskkonda arvestataval määral Ce ioone ei vabasta. Tulemustest võib järeldada, et CeO₂(-) NP-d suurendavad metsiktüve ja lateraalste viburite mutandi liikuvust pehmel glükoosiga agarsöötme, mis vihjab sellele, et negatiivse pinnalaenguga osakesed mõjutavad liikuvust suhteliselt vibursõltumatult.

Samas ei ole võimalik, et negatiivse laenguga CeO₂ NP-de ja negatiivse laenguga rakupinna/viburite vahel toimuv tõukumine suurendab liikuvust füüsikaliste põhjustel. Teisisõnu võivad CeO₂(-) NP-d toimida „elektrokeemilise surfaktandina“. Kuna katsete lõikes oli kolooniadiameetrite varieeruvus suur, on tarvis testsüsteemi veel optimeerida. Selleks saaks proovida reguleerida tardsöötme valamisega seotud aspekte ning inkubatsiooni ja ekspositsiooni tingimusi. Lisaks võiks katsetada Ce ühendite ja NP-de mõju liikuvusele gradientsöötmel, kuid siinkohal on oluline meele pidada, et mittelahustuvate metallipõhiste nanoosakeste, nagu seda on CeO₂ NP-d, söötmesse segamisel võib problemaatiliseks osutuda NP-de ja bakterite vahelise kontakti saavutamine.

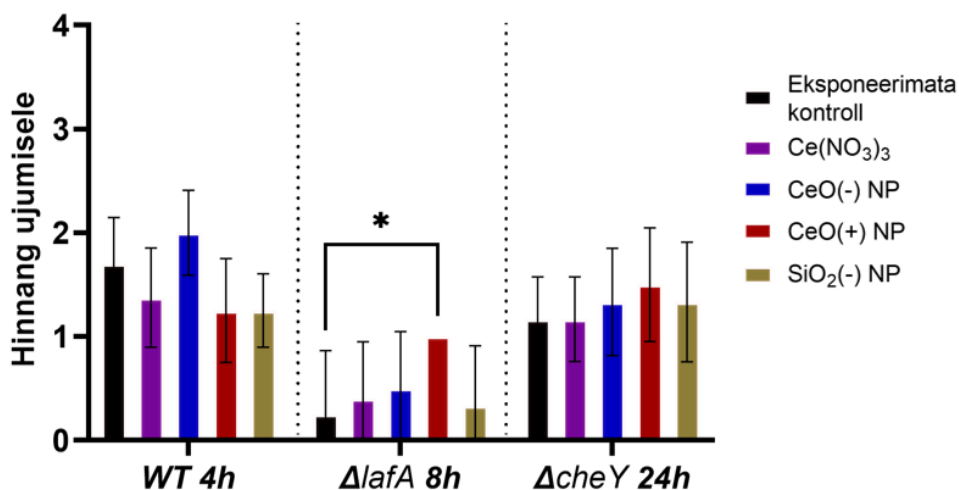


Joonis 11. Kemikaali mõju *E. coli* ATCC 8739 pinnal liikuvusele 48 h ajapunktis. Joonisel toodud tüved: WT – metsiktüvi, *ΔlafA* – lateraalse flagelliini mutant, *ΔcheY* – kemotaksise mutant ja *ΔmotA* – viburi mootorvalgu mutant. Katsed on läbi viidud vastavalt peatükis 2.2.6. toodule. Joonisel on toodud 3 bioloogilise korduse keskvaartused ja vearibadena standardhälbed. (A) 0,5% agari ja 0,5% glükoosiga LB tardsöötmel tuvastati statistiline erinevus koloonia diameetris WT ja *ΔlafA* tüvedel CeO₂(-) NP-de ekspositsiooni korral, P väärtused vastavalt 0,0219 ja 0,0157 (*P<0,05) (B) 1,5% agariga LB tardsöötmel ei tuvastatud liikuvuses statistiliselt olulisi erinevusi.

2.3.6. Ujumisvõime Ce ekspositsiooni tingimustes

Ujumiskatsetest selgus, et metsiktüve puhul ühelgi testitud kemikaalil ega nanoosakesel bakteri ujumisvõimele statistiliselt olulist mõju ei olnud (Joonis 12). Võimalik, et probleemiks oli ka ujumisraadiuste suur varieeruvus. Kirjanduses on CeO₂(-) NP-de ujumist soodustavat efekti siiski demonstreeritud *P. aeruginosa* metsiktüve puhul (Xu *et al.*, 2018). Samas on näidatud nii *E. coli* kui *P. aeruginosa* ujumisvõime suurenemist näiteks hõbeda NP-de puhul (Garuglieri *et al.*, 2016 Saeki *et al.*, 2021). *ΔlafA* puhul suurendavad positiivse laenguga CeO₂ NP-d bakteri ujumisvõimet (Joonis 11), mis on selgelt erinev pinnal liikuvusest ja demonstreerib lateraalse vibursüsteemi rolli liikuvuses Ce ekspositsiooni tingimustes. Kirjanduses ei olnud siiani infot positiivse pinnalaenguga CeO₂ NP-de mõjust *E. coli* liikuvusele. *ΔcheY* puhul ei olnud Ce-le eksponeerimisel olulist mõju ujumisvõimele (Joonis 12), kuid võis täheldada, et kõik bakterid,

ka kemikaalidele eksponeerimata kontroll, ujusid oluliselt aeglasemalt kui metsiktüübi või $\Delta lafA$ puhul. Kuna katsete lõikes oli tulemuste varieeruvus suur tuleb veel testsüsteem optimeerida. Varieeruvus võib väheneda, kui kvantifitseerida pildistades ja mõõtes ujumisala pindala suhtelise hinnangu asemel. Lisaks on võimalik kolorimeetriselt hinnata pH muutust ujumisplaadil, mis võimaldaks tuvastada liikumise varakult ootamata silmaga nähtavat kasvu. Viimase ettepanekuna võiks ka proovida lisada uuritavaid metalliühendeid ja NP-sid otse ujumissöötmele.



Joonis 12. Kemikaali mõju *E. coli* ATCC 8739 ujumisvõimele valitud ajapuntides. Joonisel toodud tüved: WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – lateraalse flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemotaksise mutant ja $\Delta motA$ – viburi mootorvalgu mutant. Katsed on läbi viidud vastavalt peatükis 2.2.6. toodule. Joonisel on toodud 6 bioloogilise korduse keskvaartused ja vearibadena standardhälbed. Tüvede kõrval olev ajapunkt viitab ajahetkele, mil ujumisvõime oli juba hinnatav, kuid ujumistsoon ei olnud veel jõudnud kaevu ääreni. Ujumise uurimiseks kasutati 0,2% agariga LB söödet ja torkekülvi. $\Delta lafA$ puhul leiti statistiliselt oluline erinevus võrreldes eksponeerimata kontrolliga CeO₂(+) NP-de ekspositsiooni korral P=0,0367 (*P<0,05).

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli välja töötada testsüsteem *Escherichia coli* pinnal liikuvuse uurimiseks ja kasutada testi rakenduslikult, et uurida metallistressi mõju eelkõige bakterite pinnal liikuvusele.

Võrreldes antimikroobsete ainete ja pindade efektiivsuse hindamisel kasutatava mudeltüve *E. coli* ATCC 8739 liikuvust *E. coli* liikumise uurimiseks enim kasutatud K-12 laboritüvede liikumisvõimega selgus, et *E. coli* ATCC 8739 liigub paremini nii pinnal, ujumist soodustavas keskkonnas kui ka CeO₂(-) NP juuresolul. Pinnal liikumist soodustavate söötmekomponentide puhul leiti, et antud katsetingimustes surfaktant TWEEN® 80 ei soodustanud pinnal liikumist, küll aga soodustas pinnal liikuvust glükoos.

Tüvede võrdlusest selgunud ATCC 8739 tüve erinevusest tingituna loodi samast tüvest vibursõltuva liikumise hindamiseks tüve mõlema vibursüsteemi (Flag-1 ja Flag-2) valitud geenide katkestusmutandid. Edasi iseloomustati saadud mutanttüvede pinnal liikuvust võrreldes metsiktüvega. Selleks testiti *E. coli* liikuvust nii pehmel kui ka tahkel söötmel nii glükoosiga kui ilma erinevates ajapunktides. Selgus, et nii glükoosi olemasolu kui ka tahkem sööde soodustasid pinnal liikumist. Pinnal liikuvuse katsetest selgus ka, et antud tingimustes ei ole tegemist klassikalise vibursõltuva liikuvusega. Ujumiskatsetes tuvastati, et nii kemotaksise regulaatori kui lateraalse flagelliini mutandi liikuvus oli vähenenud, kuid mootorvalgu mutant jäi antud katsetingimustes liikumatuks.

Ce³⁺ iooni või CeO₂ NP-de mõju hindamiseks *E. coli* tardsöötme pinnal liikuvusele valiti kaks söötmetüüpi. Ce³⁺ iooni või CeO₂ NP-te ekspositsiooni tingimustes avaldus kemikaali efekt ujumisele ujumissöötmes ja pinnal liikumisele pehmel glükoosiga söötmel, kuid mitte tahkemal glükoosita söötmel. Tuvastati, et subinhibitoorses kontsentratsioonis suurendasid negatiivse pinnalaenguga CeO₂ NP-d koloonia diameetrit metsiktüvel ja lateraalse flagelliini mutandil. Ujumiskatses oli näha, et lateraalse flagelliini mutandi liikuvus suurenes positiivse pinnalaenuga CeO₂ NP-dega inkubeeritult, mis kokkuvõttes vihjab sellele, et nanoosakeste pinnalaeng mõjutab liikuvust erinevalt olenevalt liikumistüübist. Täpsemate tulemuste saamiseks tuleb veel testsüsteemi optimeerida. Eelnevast tulenevalt on oluline edaspidi antimikroobsete rakendustes arvesse võtta nii rakenduse kasutuskeskkonda kui seda koloniseerivate bakterite liikuvust. Lisaks on oluline arvestada ka rakendustes kasutatavate (metallipõhiste) NP-de pinnalaenguga, et vältida ebasoovitavaid efekte toimeaine subletaalse ja/või subinhibitoorse kontsentratsiooniga niššides.

RESÜMEE

Development of test system for surface motility analysis of *Escherichia coli* and application of the system under metal stress conditions.

Sandra Vaikla

Summary

Escherichia coli is a Gram-negative species that is widely used as model organism. *E. coli* strain ATCC 8739 is commonly used in the field on efficacy testing of antimicrobial substances and surfaces. It is known that some antimicrobial metals and metal-based nanoparticles can enhance bacterial motility. Enhanced motility can be sign of higher virulence in potentially pathogenic bacteria, and if such response is induced in antimicrobial application, it would be an unwanted side-effect. Therefore, a test system was developed for studying metal stress effect on swimming and surface motility. After setting up the test system it was initially tested with CeO₂ nanoparticles (NPs) and Ce(NO₃)₃ as a source of ionic Ce.

Firstly, motility of two different *E. coli* strains were compared: ATCC 8739 and K-12 BW25113. Latter of which it the wild-type strain of Keio single gene mutant library used for previous surface motility studies of *E. coli*. It was demonstrated that ATCC 8739 was a better swimmer and more motile on surfaces with or without added toxicant. Single gene mutants of ATCC 8739 were constructed of genes that could potentially affect flagella-mediated motility.

Thereafter, a surface motility test was carried out on solid and semi-solid agar medium with or without glucose along with swimming motility test in semi-liquid medium. It was revealed that harder agar medium and glucose increased surface motility of ATCC 8739. However, it was shown that enhanced surface motility was not flagella-mediated as rapid surface motility of bacteria is usually defined. There is a possibility that demonstrated motility is mediated by flagella as well as pili or fimbria or all of them. From swimming motility test it was concluded that swimming of flagellar stator gene mutant $\Delta motA$ was not detected, which is probably due the fact that MotA protein interaction with motor complex is necessary for torque of the flagellar motor. Chemotaxis mutant $\Delta cheY$ could swim, but non-chemotactically, which means swimming motility was less intensive than wildtype's motility. Interestingly, it was revealed that lateral flagellin gene mutant $\Delta lafA$ could swim better than chemotaxis mutant $\Delta cheY$, which could indicate some regulatory effect on swimming motility or role of both Flag-1 and Flag-2

flagellar complexes in motility of the wildtype *E. coli* ATCC 8739. Therefore, it is necessary to study Flag-2 flagellar system more thoroughly as well as the role of pili in surface motility.

Following characterization of the constructed strains, two agar mediums were chosen for surface motility test with sublethal concentration of positively or negatively charged CeO₂ NPs, Ce(NO₃)₃ as a source of ionic Ce and negatively charged SiO₂ NPs as an inert control. In parallel, same exposed bacterial cultures were used for swimming motility test. NPs with opposite surface charges are expected to demonstrate different electrostatic interactions with the negatively charged bacterial cell surface and surface-exposed structures such as appendages. It was found that CeO₂ NPs with negative surface charge enhanced surface motility of *E. coli* ATCC 8739 on semisolid agar with glucose, however CeO₂ NPs with positive surface charge enhanced swimming motility of lateral flagellin gene mutant and not the wild-type. However, for better understanding of *E. coli* ATCC 8739 motility after exposure to metals or metal-based nanoparticles the system needs to be further optimized.

Two noteworthy conclusions arose from this thesis. Firstly, flagellar function was not needed for surface motility of *E. coli* ATCC 8739 on any agar media tested. Secondly, subinhibitory concentrations of CeO₂ NPs affected motility of *E. coli* ATCC 8739 in a way that was dependent on surface charge of the NPs and environmental criteria of the test. CeO₂(-) NPs enhanced surface motility of wild-type and lateral flagellar mutant on semi-solid agar with glucose and not on solid agar medium while CeO₂(+) NPs enhanced swimming motility of the lateral flagellar mutant only. The latter knowledge needs to be considered in the light of developing new antimicrobial or medical applications when ceria NPs are used.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada esmalt oma juhendajat Merilin Rosenbergi, kes lisaks suurepärasele juhendamisoskusele on ka teadlasena suureks eeskujuks. Tänan ka kõiki TÜ MRI, TI ja FI töötajaid, kes käesoleva töö valmimisele kaasa aitasid. Nimeliselt soovin tänu avaldada Niilo Kaldalule (*E. coli* tüve BW25115), Heili Ilvesele (kanamütsiini praimerid ja plasmiid pGP704LKm), Marje Kasarile (plasmiid pAJ172 ja anhüdrotetratsükliin) ja Merike Jõesaarele (viburivärv). Soovin tänada ka koostöö partnereid TÜ füüsika instituudist sünteesitud nanoosakeste eest. Viimasena soovin tänada uurimisgrupi juhti Angela Ivaskit mind uurimisgruppi kaasamast.

Töö on seotud Tartu Ülikooli Arengufondi grantiprojektiga PLTFYARENG53 (Vambola Kisand, TÜ TI) ja Eesti Teadusagentuuri projektiga PRG1496 (Angela Ivask, TÜ MRI).

Joonised 2 ja 3 on loodud BioRender.com abil.

KIRJANDUSE LOETELU

- 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)
- Archer, C. T., Kim, J. F., Jeong, H., Park, J. H., Vickers, C. E., Lee, S. Y., & Nielsen, L. K. (2011). The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): Comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. *BMC Genomics*, 12, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-9>
- 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, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Berg, H. C. (2005). Swarming Motility: It Better Be Wet. *Current Biology*, 15(15), R599–R600. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.042>
- Blair, D. F., & Berg, H. C. (1990). The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell*, 60(3), 439–449. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90595-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90595-6)
- Burkart, M., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (1998). The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2568–2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2568>
- Dahle, J. T., & Arai, Y. (2015). Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), 1253–1278. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201253>

- Darnton, N. C., Turner, L., Rojevsky, S., & Berg, H. C. (2010). Dynamics of Bacterial Swarming. *Biophysical Journal*, 98(10), 2082–2090. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.053>
- 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>
- European Commission. (2011). *COMMISSION RECOMMENDATION of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial*. Official Journal of the European Union.
- Garuglieri, E., Cattò, C., Villa, F., Zanchi, R., & Cappitelli, F. (2016). Effects of sublethal concentrations of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anaerobic conditions. *Biointerphases*, 11(4), 04B308. <https://doi.org/10.1116/1.4972100>
- Harshey, R. M., & Matsuyama, T. (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(18), 8631–8635. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.18.8631>
- Heimbrook, M. E., Wang, W. L., & Campbell, G. (1989). Staining bacterial flagella easily. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(11), 2612–2615.
- Inoue, T., Shingaki, R., Hirose, S., Waki, K., Mori, H., & Fukui, K. (2007). Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 950–957. <https://doi.org/10.1128/JB.01294-06>
- Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>

- Kurihara, S., Suzuki, H., Oshida, M., & Benno, Y. (2011). A novel putrescine importer required for type 1 pili-driven surface motility induced by extracellular putrescine in *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10185–10192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176032>
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechère, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990–5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>
- Lane, M. C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J., Hebel, J. R., Johnson, D. E., & Mobley, H. L. T. (2005). Role of Motility in the Colonization of Uropathogenic *Escherichia coli* in the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, 73(11), 7644–7656. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7644-7656.2005>
- Ledesma, M. A., Ochoa, S. A., Cruz, A., Rocha-Ramírez, L. M., Mas-Oliva, J., Eslava, C. A., Girón, J. A., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2010). The Hemorrhagic Coli Pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 Is an Inducer of Proinflammatory Cytokine Secretion in Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 5(8), e12127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012127>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2019). Microbial Cell Structure and Function. *Brock Biology of Microorganisms* (15., Global edition tr, lk 71–103). Pearson Education Limited.
- Mortimer, M., Li, D., Wang, Y., & Holden, P. A. (2020). Physical Properties of Carbon Nanomaterials and Nanoceria Affect Pathways Important to the Nodulation Competitiveness of the Symbiotic N₂-Fixing Bacterium *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Small*, 16(21), 1906055. <https://doi.org/10.1002/sml.201906055>
- Nefedova, A., Rausalu, K., Zusinaite, E., Vanetsev, A., Rosenberg, M., Koppel, K., Lilla, S., Visnapuu, M., Šmits, K., Kisand, V., Tätte, T., & Ivask, A. (2022). *Antiviral efficacy of*

- cerium oxide nanoparticles*. (eprintsenseerimata preprint, esitatud ajakirjale *Scientific Reports*)<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1382761/v1>
- Niu, C., Graves, J. D., Mokuolu, F. O., Gilbert, S. E., & Gilbert, E. S. (2005). Enhanced swarming of bacteria on agar plates containing the surfactant Tween 80. *Journal of Microbiological Methods*, 62(1), 129–132. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.013>
- Partridge, J. D., & Harshey, R. M. (2013). Swarming: Flexible roaming plans. *Journal of Bacteriology*, 195(5), 909–918. <https://doi.org/10.1128/JB.02063-12>
- Qian, L.-W., Evani, S. J., Chen, P., Brandenburg, K. S., Weaver, A. J., Fourcaudot, A. B., Abercrombie, J. J., Sebastian, E. A., & Leung, K. P. (2020). Cerium Nitrate Treatment Provides Eschar Stabilization through Reduction in Bioburden, DAMPs, and Inflammatory Cytokines in a Rat Scald Burn Model. *Journal of Burn Care & Research*, 41(3), 576–584. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irz199>
- Ren, C.-P., Beatson, S. A., Parkhill, J., & Pallen, M. J. (2005). The Flag-2 Locus, an Ancestral Gene Cluster, Is Potentially Associated with a Novel Flagellar System from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1430–1440. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1430-1440.2005>
- Saeki, E. K., Yamada, A. Y., de Araujo, L. A., Anversa, L., Garcia, D. de O., de Souza, R. L. B., Martins, H. M., Kobayashi, R. K. T., & Nakazato, G. (2021). Subinhibitory Concentrations of Biogenic Silver Nanoparticles Affect Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 656984. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.656984>
- San Millán, R. M., Martínez-Ballesteros, I., Rementeria, A., Garaizar, J., & Bikandi, J. (2013). Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Research Notes*, 6(1), 513. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-513>

- Sauvonnet, N., Gounon, P., & Pugsley, A. P. (2000). PpdD Type IV Pilin of *Escherichia coli* K-12 Can Be Assembled into Pili in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *182*(3), 848–854. <https://doi.org/10.1128/JB.182.3.848-854.2000>
- Semmler, A. B., Whitchurch, C. B., & Mattick, J. S. (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, *145* (Pt 10), 2863–2873. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2863>
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *195*(24), 5540–5554. <https://doi.org/10.1128/JB.00946-13>
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013). Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm. *mBio*, *4*(2), e00103-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00103-13>
- 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>
- Song, F., Brasch, M. E., Wang, H., Henderson, J. H., Sauer, K., & Ren, D. (2017). How Bacteria Respond to Material Stiffness during Attachment: A Role of *Escherichia coli* Flagellar Motility. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *9*(27), 22176–22184. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04757>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00929-w>
- Stewart, B. J., & McCarter, L. L. (2003). Lateral Flagellar Gene System of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, *185*(15), 4508–4518. <https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4508-4518.2003>

- Sudarshan, S., Hogins, J., Ambagaspitiye, S., Zimmern, P., & Reitzer, L. (2021). Nutrient and Energy Pathway Requirements for Surface Motility of Nonpathogenic and Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 203(11), e00467-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00467-20>
- Zhang, R., Turner, L., & Berg, H. C. (2010). The upper surface of an *Escherichia coli* swarm is stationary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 288–290. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912804107>
- Zhou, J., & Blair, D. F. (1997). Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor¹¹ Edited by M. Gottesman. *Journal of Molecular Biology*, 273(2), 428–439. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1316>
- The International Organisation for Standardisation. (2007). *Plastics-Measurment of antibacterial activity on plastic surfaces*. The International Organisation for Standardisation.
- The International Organisation for Standardisation. (2019). *Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics)—Test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materjals*. The International Organisation for Standardisation.
- Turnbull, L., & Whitchurch, C. B. (2014). Motility Assay: Twitching Motility. A. Filloux & J.-L. Ramos (Toim), *Pseudomonas Methods and Protocols* (1k 73–86). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_9
- Vihodceva, S., Šutka, A., Sihtmäe, M., Rosenberg, M., Otsus, M., Kurvet, I., Smits, K., Bikse, L., Kahru, A., & Kasemets, K. (2021). Antibacterial Activity of Positively and Negatively Charged Hematite (α -Fe₂O₃) Nanoparticles to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio fischeri*. *Nanomaterials*, 11(3), 652. <https://doi.org/10.3390/nano11030652>
- 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>

- Wiles, T. J., Schlomann, B. H., Wall, E. S., Betancourt, R., Parthasarathy, R., & Guillemin, K. (2020). Swimming motility of a gut bacterial symbiont promotes resistance to intestinal expulsion and enhances inflammation. *PLOS Biology*, *18*(3), e3000661. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000661>
- Wu, Z., He, R., Zhang, R., & Yuan, J. (2020). Swarming Motility Without Flagellar Motor Switching by Reversal of Swimming Direction in *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01042>
- Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Saldaña, Z., Ledesma, M. A., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2009). The Type 4 Pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Are Multipurpose Structures with Pathogenic Attributes. *Journal of Bacteriology*, *191*(1), 411–421. <https://doi.org/10.1128/JB.01306-08>
- Xu, Y., Wang, C., Hou, J., Wang, P., You, G., & Miao, L. (). Mechanistic understanding of cerium oxide nanoparticle-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(34), 34765–34776. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3418-8>
- Yang, A., Tang, W. S., Si, T., & Tang, J. X. (2017). Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*, *112*(7), 1462–1471. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.02.019>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://biorender.com/> Kasutatud 16.03.22

<https://genomes.atcc.org/genomes/b9d91f150db449de> Kasutatud 15.10.21

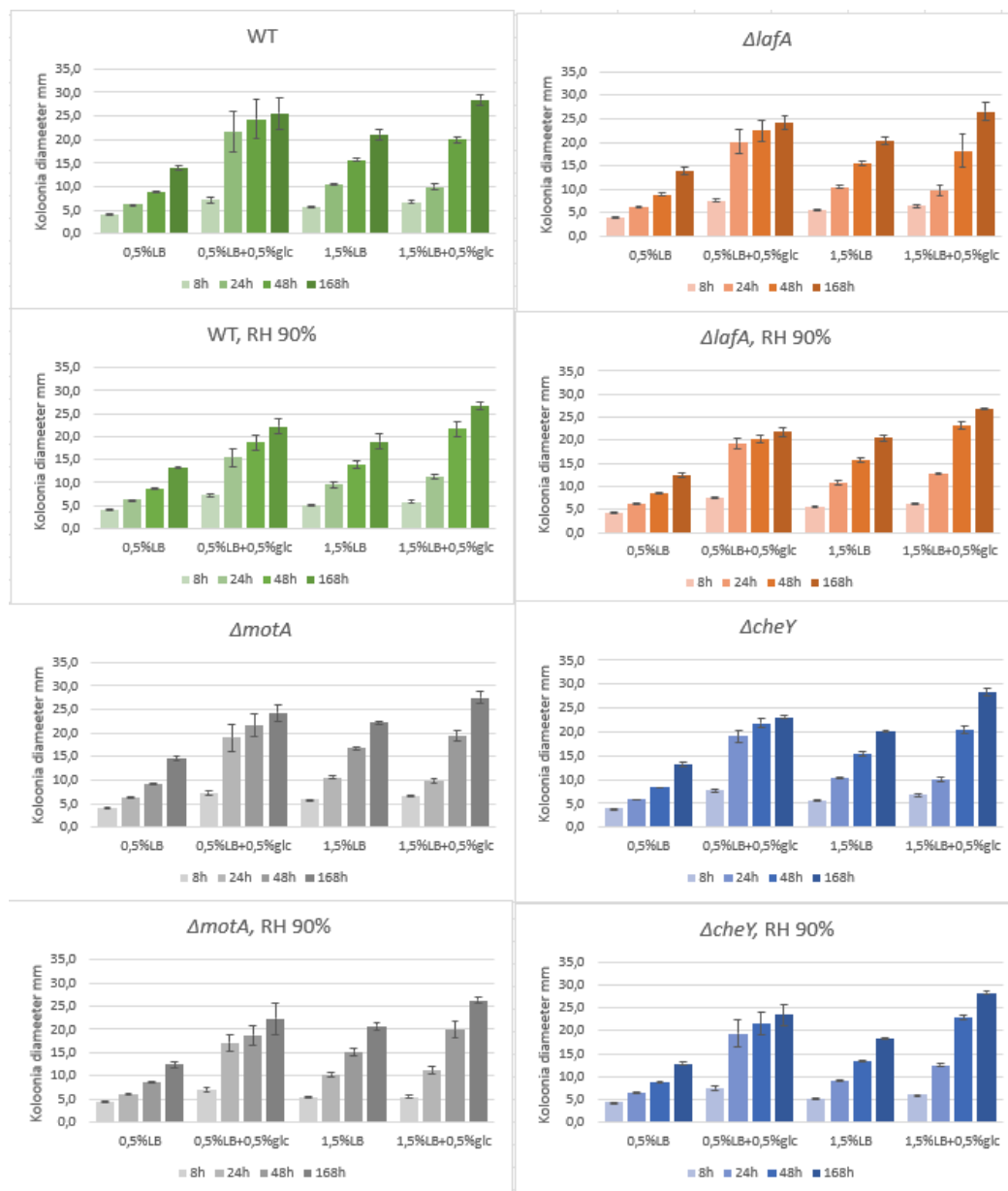
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome Kasutatud 16.10.21

<http://insilico.ehu.es/PCR/index.php?mo=Escherichia> Kasutatud 25.10.21

LISAD

Lisa 1

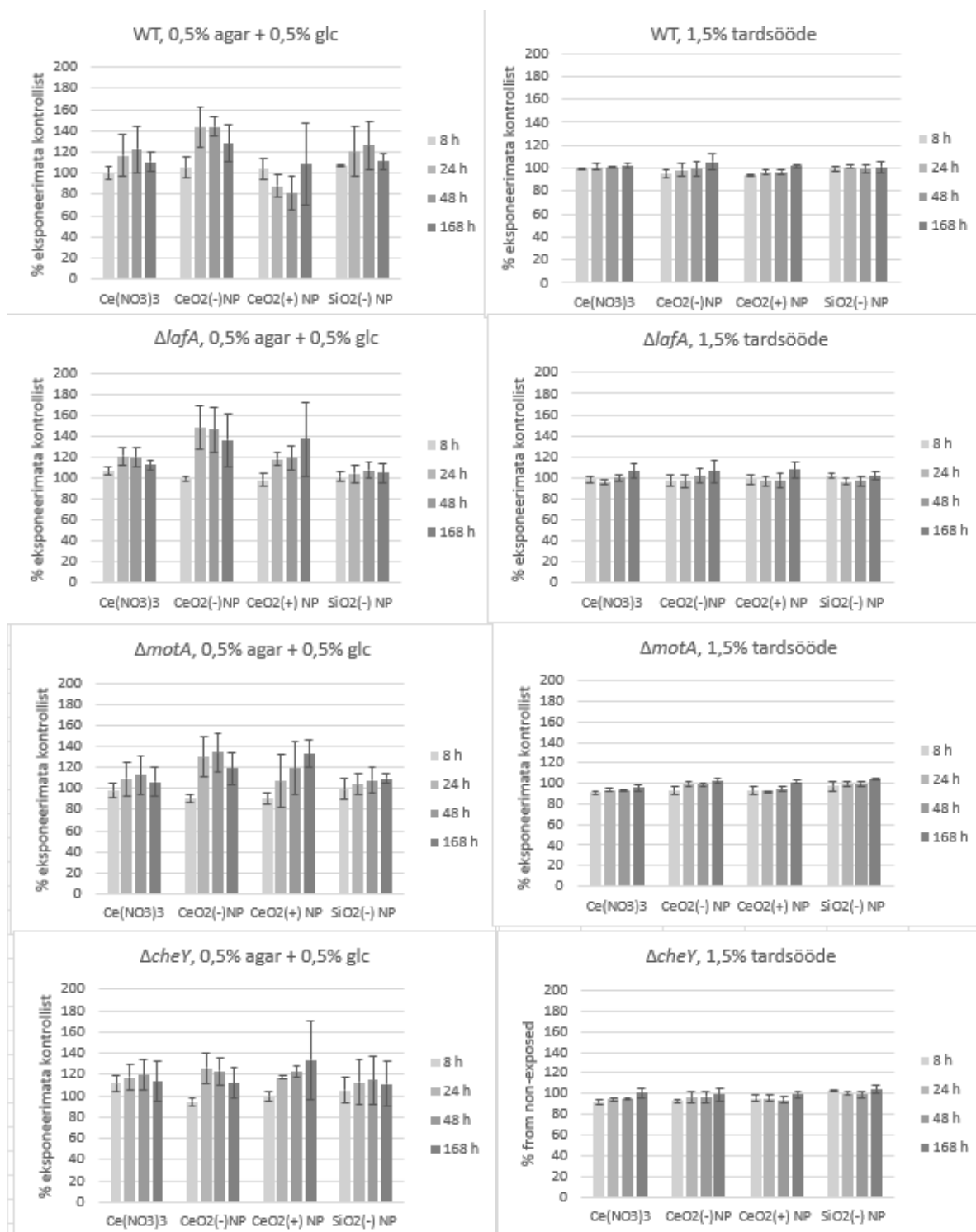
Katsetati õhuniiskuse mõju pinnal liikuvusele: tavalises 37 °C inkubaatoris ning 90% suhtelise õhuniiskuse ja 37 °C juures kliimakapist. Selgus, et õhuniiskusel ei olnud olulist mõju koloonia diameetril nendes katse tingimuste puhul ei olnud, mistõttu tehti edaspidised katsed tavalises inkubaatoris.



RH 90% - suhtelist õhuniiskus 90%, WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – lateraalse flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemotaksise mutant ja $\Delta motA$ – viburi mootorvalgu mutant. X-teljel on toodud tardsöötme tüübid, y-teljel on kolooniadiameetri suurus mm. Graafikul on kolme katse kolooniadiameetri keskväärts, veapiiridena on kasutatud standardhälvet.

Lisa 2

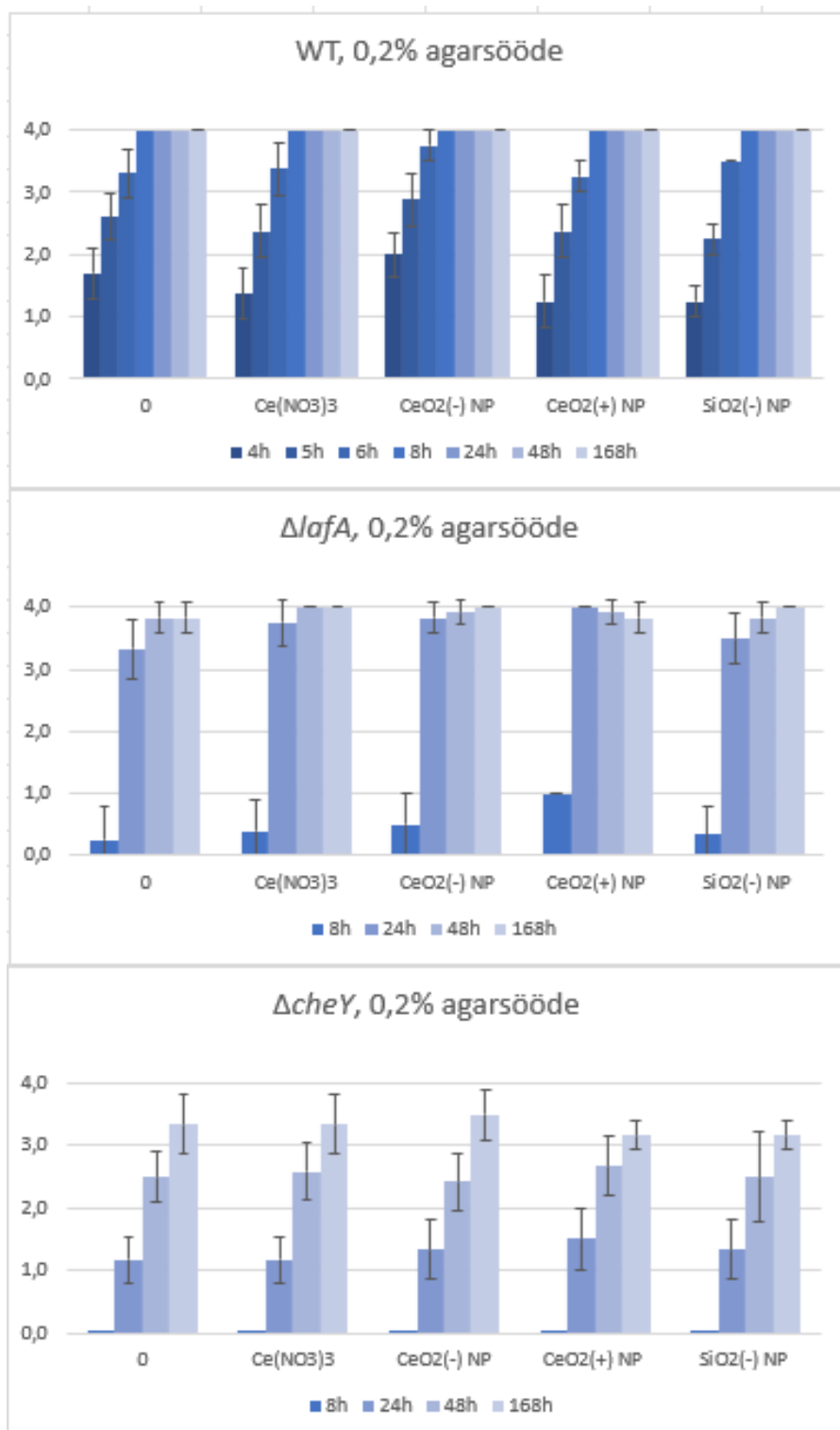
Pinnal liikuvus Ce ekspositsioon tingimustes: kõik ajapunktid mõlemal söotmel



WT – metsiktüvi, *ΔlafA* – lateraalse flagelliini mutant, *ΔcheY* – kemotaksise mutant ja *ΔmotA* – viburi mootorvalgu mutant. X-teljel on toodud kasutatud ained. Graafikul olevad tulbad esindavad 3 katse keskväärtsi, veapiiridena on kasutatud standardhälvet.

Lisa 3

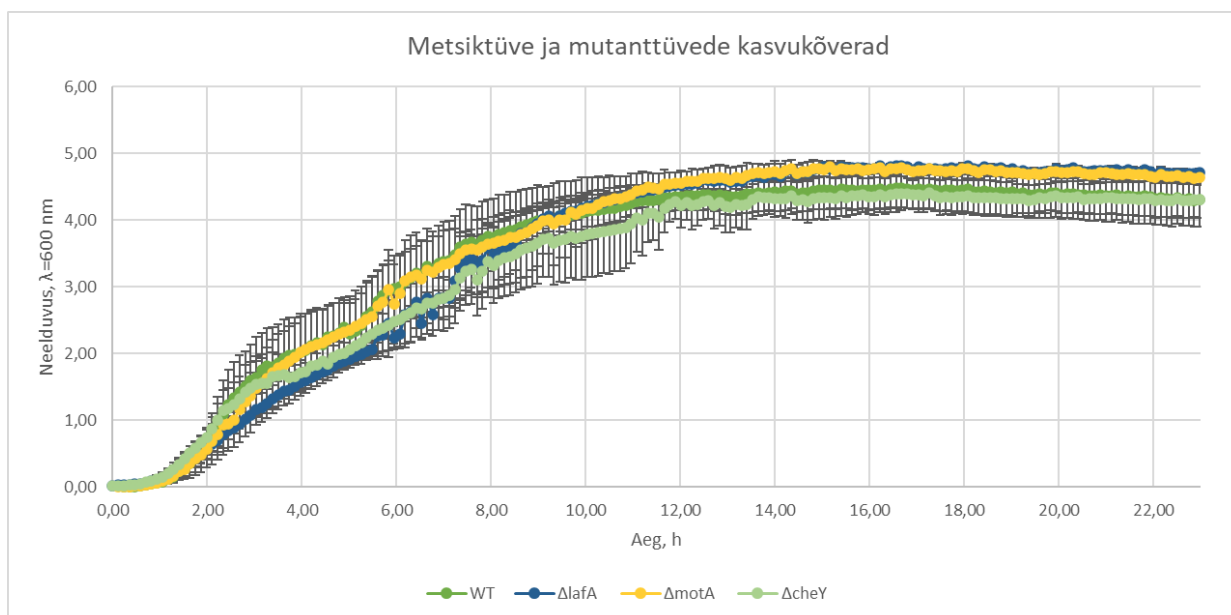
Ujumiskatse Ce ekspositsiooni tingimustes. Siit joonistub välja tüvede erinev ujumisvõime.



WT – metsiktüvi, $\Delta lafA$ – lateraalse flagelliini mutant, $\Delta cheY$ – kemo-taksise mutant. Ujumist on hinnatud peatükis 2.2.6. toodud viisil. X-teljel on toodud kasutatud ained, kuid esimene andmesari igal tulppiagrammil iseloomustab eksponeerimata bakteri ujumisvõimet. Diagrammidel on toodu 6 katse keskvaärtus ja standardhälve.

Lisa 4

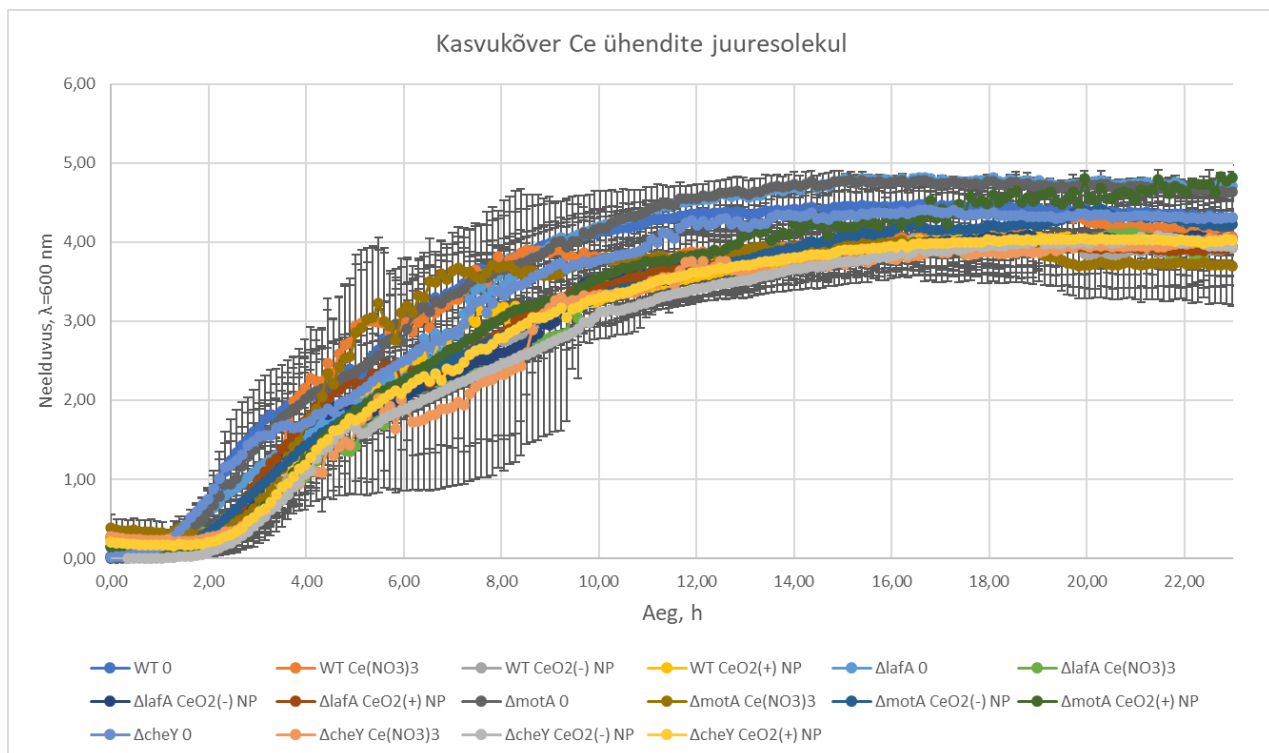
ATCC 8739 tüvede kasvukõrverad. Metsiktüve ja ühe geeni katkestusmutantide kasvus ei ole olulisi erinevusi.



WT – metsiktüvi, Δ lafA – lateraalse flagelliini mutant, Δ cheY – kemotaksise mutant ja Δ motA – viburi mootorvalgu mutant. Graafikul on toodud 3 katse keskvaärtused ja standardhälbed.

Lisa 5

Kasvukõver Ce ühendite juuresolekul. Ükski kasutatud aine ei mõjunud tüvele tugevalt kasvu inhibeerivalt.



WT – metsiktüvi, Δ lafA – lateraalse flagelliini mutant, Δ cheY – kemotaksise mutant ja Δ motA – viburi mootorvalgu mutant. Tüve kõrval toodud keemilise aine lühend. Graafikul on toodud 3 katse keskvaartused ja standardhälbed.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sandra Vaikla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose ***Escherichia coli* pinnal liikuvuse testsüsteemi väljatöötamine ja liikuvuse analüüs metallistressi tingimustes**, mille juhendaja on **Merilin Rosenberg**, 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 **01.06.2023** 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.

Sandra Vaikla

25.05.2022