

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

**Antimikroobsetele metallpindadele eksponeeritud *Escherichia coli* ATCC 8739  
fenotüübi iseloomustamine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Sigrit Umerov

Juhendajad PhD Merilin Rosenberg

BSc Sandra Park

TARTU 2024

## INFOLEHT

### **Antimikroobsetele metallpindadele eksponeeritud *Escherichia coli* ATCC 8739 fenotüübi iseloomustamine**

Antimikroobseid metallpindu kasutatakse laialdaselt patogeensete bakterite leviku piiramiseks. Siiski ei ole põhjalikult uuritud, kas krooniline ekspositsioon metallist pindadele võib mõjutada bakterite tundlikkust antimikroobsete ainete suhtes. Käesolevas töös uuriti vase ja hõbeda pindadel adapteerunud *E. coli* ATCC 8739 bakteripopulatsioonide antimikroobset tundlikkust. Leiti, et vase ja hõbeda pindadele eksponeerimine ei muutnud bakterite vase- ja hõbedaioonide tundlikkust ning ei tekitanud ristresistentsust antibiootikumidega. Populatsioonide testimise käigus selekteeriti vedelas katsekeskkonnas kiiresti vase- ja hõbedaioonide väljavoolusüsteeme aktiveerivaid mutatsioone, mis aga ei andnud eelist pinnaekspositsioonis. Seega võivad bakteriaalsed kaitsemehhanismid ja nende selektsioon erinevates ekspositsioonitingimuses üksteisest oluliselt erineda ning krooniline kokkupuude metallpindadega ei pruugi suurendada ristresistentsuse tekkimise ohtu.

Märksõnad: *Escherichia coli*, antimikroobsed pinnad, antibiootikumiresistentsus, vask, hõbe

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

### **Phenotypic characterization of *Escherichia coli* ATCC 8739 exposed to antimicrobial metal surfaces**

Antimicrobial metal surfaces are widely used to limit the spread of pathogenic bacteria. However, it has not been thoroughly studied whether chronic exposure to metal surfaces can affect bacterial susceptibility to antimicrobial agents. This thesis investigated the antimicrobial susceptibility of *E. coli* ATCC 8739 populations adapted on copper and silver surfaces. It was found that exposure to copper and silver surfaces did not affect the bacteria's susceptibility towards copper and silver ions nor did it induce cross-resistance to antibiotics. During testing of the population, mutations activating copper and silver ion efflux systems were rapidly selected for in liquid test environments, which did not confer an advantage in surface exposure. Thus, bacterial defence mechanisms and their selection may differ significantly under different exposure conditions, and chronic exposure to metal surfaces may not increase the risk of developing cross-resistance.

Keywords: *Escherichia coli*, antimicrobial surfaces, antibiotic resistance, copper, silver

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

## SISUKORD

|   |    |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID .....  | 5  |
| SISSEJUHATUS .....  | 6  |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....   | 7  |
| 1.1. <i>Escherichia coli</i> vase- ja hõbedatolerantsuse mehhanismid..... | 7  |
| 1.2. Metall- ja antibiootikumitundlikkuse seos .....                      | 10 |
| 1.3. Metallide mõju mutatsioonide tekkesagedusele .....                   | 12 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....   | 14 |
| 2.1. Töö eesmärgid .....  | 14 |
| 2.2. Materjal ja meetodika.....   | 15 |
| 2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja kasvutingimused .....           | 15 |
| 2.2.2. <i>E. coli</i> ATCC 8739 rifampitsiini tundlikkuse määramine.....  | 17 |
| 2.2.3. Mutatsioonide tekkesageduste leidmine fluktuatsioonitestiga .....  | 17 |
| 2.2.4. Bakterite kasvudünaamika määramine.....                            | 17 |
| 2.2.5. Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramine.....      | 18 |
| 2.2.6. Minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (MBC) määramine .....  | 19 |
| 2.2.7. Divesiniksulfiidi tootmise kvalitatiivne hindamine.....            | 20 |
| 2.2.8. Statistika .....   | 21 |
| 2.3. Tulemused ja arutelu .....   | 22 |
| 2.3.1. Evolutsioneerunud populatsioonide iseloomustamine .....            | 22 |
| 2.3.1.1. Populatsioonide mutatsioonide tekkesagedused .....               | 22 |
| 2.3.1.2. Populatsioonide tundlikkus metallisooladele .....                | 24 |
| 2.3.1.3. Populatsioonide tundlikkus antibiootikumidele .....              | 28 |
| 2.3.2. Tolerantsemate isolaatide täiendav testimine .....                 | 30 |
| 2.3.3. Mutantide iseloomustamine.....                                     | 33 |
| 2.3.3.1. Mutantide tundlikkus metallisooladele .....                      | 33 |
| 2.3.3.2. Mutantide tundlikkus antibiootikumidele .....                    | 36 |
| 2.3.4. Divesiniksulfiidi tootmine hõbedaioonide juuresolekul.....         | 38 |
| KOKKUVÕTE.....  | 41 |
| RESÜMEE/ SUMMARY .....  | 42 |
| TÄNUSÕNAD .....   | 44 |

|                         |    |
|-------------------------|----|
| KIRJANDUSE LOETELU..... | 45 |
| LISAD .....             | 53 |
| Lisa 1 .....            | 53 |
| Lisa 2 .....            | 54 |
| Lisa 3 .....            | 55 |
| Lisa 4 .....            | 56 |
| Lisa 5 .....            | 57 |
| Lisa 6 .....            | 58 |
| Lisa 7 .....            | 59 |
| Lisa 8 .....            | 60 |
| Lisa 9 .....            | 63 |
| Lisa 10 .....           | 64 |
| Lisa 11 .....           | 65 |
| LIHTLITSENTS.....       | 66 |

## KASUTATUD LÜHENDID

Amp – ampitsilliin (*ampicillin*)

Cip – tsiprofloksatsiin (*ciprofloxacin*)

Cst – kolistiin (*colistin*)

DI – deioniseeritud vesi

ECOFF – epidemioloogiline läviväärtus (*epidemiological cut-off value*)

Gen – gentamütsiin (*gentamicin*)

KV – kuiv ja toitainevaene evolutsioonikatse tingimus

LB – *lysogeny broth*

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

MH – Müller-Hintoni sööde

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

MMC – mitomütsiin-C (*mitomycin-C*)

MMR – DNA valepaardumise reparatsioon (*mismatch repair*)

NR – niiske ja toitainerikas evolutsioonikatse tingimus

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

Rif – rifampitsiin (*rifampicin*)

SL – orgaaniline saastelahus (EPA *Soil Load*)

## SISSEJUHATUS

Antimikroobsed pinnakatted leiavad ühe enam kasutust patogeensete bakterite leviku piiramiseks igapäevaselt kasutatavatel puutepindadel või ka spetsiifilisemates rakendustes, näiteks meditsiiniseadmetel. Erilist tähelepanu on ärratanud metallidel põhinevad pinnakatted, mida kasutatakse tänu nende üldtuntud antimikroobsetele omadustele. Küll aga on senini uuritud metallide mõju bakteritele peamiselt metalliioonide ekspositsiooni kaudu vedelas keskkonnas, mis erineb oluliselt tahkest puutepinnast. On hästi teada, et metallpinnad on võimelised inaktiveerima erinevaid baktereid, kuid nende toimemehhanismid ei ole lõpuni selged. Lisaks leiab üha enam tõendust see, et metallpindade antimikroobsed omadused sõltuvad suurel määral keskkonnatingimustest ning osades reaalelulähedastes tingimustes suudavad bakterid metallpinna ekspositsiooni edukalt üle elada.

Bakterid on võimelised antimikroobsete ainetega kiiresti kohanema ning seetõttu võib krooniline ekspositsioon muuta bakterid sama antimikroobse aine suhtes vähem tundlikuks. Lisaks võib krooniline antimikroobne stress ja suurenenud taluvus ühe aine suhtes tahtmatult vähendada tundlikkust ka teiste antimikroobsete ainete suhtes, läbi kaas- või ristresistentsuse (*co-/cross-resistance*) mehhanismide või tolerantsusmehhanismide kaasreguleerimise (*co-regulation*). Muutuvate keskkonnatingimuste ja stressoritega kohanemisele aitab kaasa bakterite suurem geneetiline mitmekesisus ning seetõttu võivad ka kroonilise antimikroobse stressi korral saavutada bakteripopulatsioonides konkurentsieelise mutaatoritüved, mis suudavad suurenenud mutatsioonisageduse tõttu kiiremini omandada tolerantsuseks vajalikke mutatsioone. Seetõttu on antimikroobsete metallpindade laialdase kasutuse valguses oluline hinnata kuidas mõjutab metallpindade ekspositsioon bakterite antimikroobse tolerantsuse fenotüüpi.

Antimikroobsete metallpindade kroonilise ekspositsiooni indutseeritud bakteriaalsete adaptatsioonide uurimiseks viis Sandra Park läbi eksperimentaalse evolutsiooni katse, kus eksponeeris *E. coli* ATCC 8739 tüve 30-tsükli jooksul kontroll- (teras, klaas) ja antimikroobsetele (vask, hõbe) pindadele erinevates keskkonnatingimustes. Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli iseloomustada pindadel evolutsioneerunud *E. coli* populatsioonide ja neist isoleeritud mutantide fenotüüpi, keskendudes antimikroobse tundlikkusega seotud fenotüübiliste tunnuste iseloomustamisele.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *Escherichia coli* vase- ja hõbedatolerantsuse mehhanismid

Metallipõhiste antimikroobsete ainete ja pindade kestva efektiivse kasutamise huvides on oluline hinnata, kui kiiresti on bakterid võimelised neile tolerantseks muutuma. Kuigi puudub ühene arusaam antimikroobsetel metallpindadel baktereid inaktiveerivatest mehhanismidest, mis võivad sõltuvalt ekspositsioonitingimustest ja lisastressoritest varieeruda, ollakse siiski seisukohal, et eelkõige tagavad metallpindade biotsiidse toime pinnalt vabanevad metalliioonid (Molteni *et al.*, 2010; Warnes *et al.*, 2010). Seetõttu on võimalik, et metallpindadega kohanemisel saavad eelise metalliioone efektiivsemalt detoksifitseerivad tüved (Liu & Zhang, 2016; Molteni *et al.*, 2010; Santo *et al.*, 2012).

Vask on rakule vajalik mitmete asendamatute bakteriaalsete ensüümide kofaktorina (Anraku & Gennis, 1987; Cooper *et al.*, 1992), samas on vaseioonide liig bakteritele letaalne. Seetõttu rakendavad bakterid optimaalse vaseioonide taseme säilitamiseks spetsiifilisi homöostaasimehhanisme. Keskkonnas esinevad vaseioonid stabiilses  $\text{Cu}^{+2}$  ja redutseerunud  $\text{Cu}^{+1}$  vormis (Barceloux & Barceloux, 1999) ning raku membraane suudavad tõenäoliselt passiivse difusiooni teel läbida monovalentsed ioonid (Outten *et al.*, 2001). Bakteril on vase toksiliste mõjude vältimiseks võimalik piirata vaseioonide sisenemist raku, siduda vaseioone biomolekulide koostisesse või rakendada aktiivseid väljavoolu süsteeme. *E. coli*'s on kirjeldatud kolme kromosomaalset vaseioonide detoksifitseerimise süsteemi: väljavoolupumbad CopA ja CusCBA ning oksüdaas CueO (Franke *et al.*, 2003; Grass & Rensing, 2001; Rensing *et al.*, 2000). Tsütoplastmast eemaldab vaseioone P-tüüpi ATPaas CopA ning periplasmast prootongradienti rakendav CusCBA valgukompleks (Franke *et al.*, 2003; Rensing *et al.*, 2000). Lisaks vähendab periplasmas reaktiivse  $\text{Cu}^{+1}$  hulka CueO oksüdaas, mis oksüdeerib monovalentsed ioonid vähem toksilisteks divalentseteks ioonideks (Singh *et al.*, 2004). Vaseioonide taset reguleerivate süsteemide ekspressiooni kontrollib kahekomponentne CusRS süsteem, milles sensor kinaas CusS aktiveerub vastusena rakusisestele vase- või hõbedaioonidele ning fosforüleerib CusR regulaatori, mis omakorda vabastab nii CusCFBA kui ka CopA ja CueO ekspressiooni repressioonist (Franke *et al.*, 2001; Munson *et al.*, 2000; Outten *et al.*, 2000).

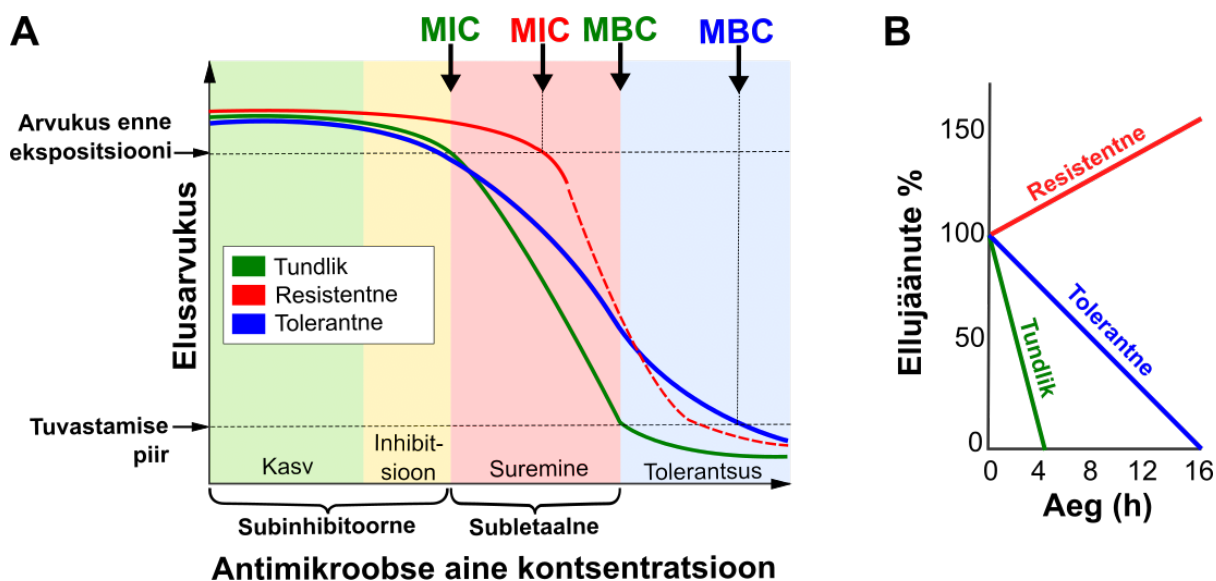
Hõbeda puhul ei ole tegemist rakule vajaliku mikroelemendi, vaid toksilise metalliga, mille sisenemisel raku indutseeritakse bakterites homoloogsete SilRS ja CusRS kahekomponentsete süsteemide vahendusel Sil ja Cus väljavoolupumpade ekspressioon (Franke *et al.*, 2001; Gupta

*et al.*, 1999). Cus süsteemiga homoloogne Sil süsteem koosneb periplasmaatilistest hõbedaioone siduvatest tsäperonidest (SilE ja SilF) ning transmembraanestest väljavoolupumpadest, mis tsütoplasmast (SilP) ja periplasmast (SilCBA) ioone eemaldavad (Franke, 2007). Kui paljudel bakteritel on Sil süsteem kodeeritud plasmiidiselt, siis *E. coli* ATCC 8739 tüvel on see integreerunud genoomi ja kuulub seetõttu kromosomaalsete metallitolerantsuse mehhanismide hulka (Blanco Massani *et al.*, 2018). Mutatsioone eelnevalt mainitud süsteemide regulaatorite (SilRS, CusRS) geenides on seostatud suurenenud ioonse hõbeda tolerantsusega (Blanco Massani *et al.*, 2018; Randall *et al.*, 2015).

Lisaks spetsiifilistele ioonide detoksifitseerimise mehhanismidele on eksperimentaalselt vase või hõbeda resistentsust selekteerides täheldatud ka vähem spetsiifilisi tolerantsusmehhanisme. Näiteks on korduvalt leitud, et mutatsioonid välismembraani poriinide (OmpC/F) või nende regulaatorite (OmpR) geenides vähendavad hõbeda- ja vaseioonide tundlikkust (X. Z. Li *et al.*, 1997; Randall *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2022; F. Xu *et al.*, 2022). Sarnaselt spetsiifilistele ioone siduvatele valkudele, nagu SilF või SilE, on kirjeldatud ka teiste raku metaboliitide osalust metalliioonide detoksifitseerimises. Näiteks on täheldatud, et metallitolerantsed tüved seovad metalliioone lahustumatute sulfiidsoolade koostisesse, mis arvatavasti vähendab metalliioonide bioaadavust ja toksilisust (Aiking *et al.*, 1982; Slawson *et al.*, 1992). Seetõttu on spekulatsioonid, et metallitolerantsusesse võib panustada bakterite võime toota divesiniksulfiidi ( $H_2S$ ), mis on võimeline vabalt läbi membraanide difundeeruma (Riahi & Rowley, 2014) ja oluliselt vähendada mitmete metallide (sh hõbeda ja vase) toksilisust (Essa *et al.*, 2018; Slawson *et al.*, 1994).  $H_2S$ -i toodavad bakterid peamiselt L-tsüsteiini tioolrühma ensümaatilisel eemaldamisel, ning *E. coli*'s katalüüsivad seda reaktsiooni trüptofanaas (TnaA), tsüstatiooni  $\beta$ -lüaas (*Cystathionine beta-lyase*, MetC), tsüsteiini süntaasid A (*Cysteine synthase A*, CysK) ja B (CysM) ning MalY (Awano *et al.*, 2005). Kusjuures on näidatud, et trüptofanaas, mis on eelkõige tuntud L-trüptofaanist indooli tootmise poolest (Newton & Snell, 1964), võib *E. coli*'s olla peamine  $H_2S$ -i tootev ensüüm (Lim *et al.*, 2022;).

Metallitundlikkuse fenotüübi kirjeldamisel ei eristata sageli tolerantsust ja resistentsust, mis on tegelikult erinevad tunnused. Resistentne bakteritüvi suudab kõrgete antimikroobse aine kontsentratsiooni juures paljuneda (Scholar & Pratt, 2000). Resistentsuse tuvastamiseks saab leida antimikroobse aine minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (*minimal inhibitory concentration*, MIC) ehk kontsentratsioon, mis pärsib täielikult bakterite kasvu: resistentse bakteritüve MIC on tundlikust kordades kõrgem (Joonis 1A) (Scholar & Pratt, 2000). Kuigi tolerantne bakteritüvi ei pruugi kõrgematel antimikroobse aine kontsentratsioonidel kasvada (MIC jääb muutumatuks) (Wolfson *et al.*, 1990), iseloomustab tolerantsust eelkõige bakteri

võime jääda ellu lühiajaliselt kõrgematel subletaasetel antimikroobsete aine kontsentratsioonidel (Joonis 1A) või taluda madalamaid subletaalseid toksilisi kontsentratsioone pikemalt (Joonis 1B) (Brauner *et al.*, 2016). Seega võib tolerantsus tänu pikemale eluspüsimine omakorda võimaldada resistentsusmehhanismide aktiveerimist (Levin-Reisman *et al.*, 2017). Kuna aine toksilisus oleneb nii ekspositsiooni kestusest kui ka kontsentratsioonist (Rozman *et al.*, 2010), on tolerantsust võimalik kirjeldada antimikroobse aine minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (*minimal bactericidal concentration*, MBC) kaudu. MBC on madalaim kontsentratsioon, mis tapab kindla ekspositsiooniaja jooksul 99,9% bakteritest (EUCAST, 1998). Erinevalt kitsa toimetehhanismiga antibiootikumidest ei ole mitmete ja lõpuni kirjeldamata toimetehhanismidega antimikroobsete raskemetallide puhul määratletud kindlaid resistentsust tähistavaid MIC läviväärtusi. Ehkki resistentsus on mitmeti defineeritav, käsitletakse käesolevas töös metalliresistentsusena olukorda, kus konkreetne resistentsusmehhanism põhjustab vähemalt 8-kordset tõusu metalliioonide MIC väärtuses ning väiksemat tõusu MIC või MBC väärtustes käsitletakse tolerantsusena.



**Joonis 1. Antimikroobse tolerantsuse ja resistentsuse erinevus.** Paneel A visualiseerib antimikroobse aine kontsentratsiooni tõusu mõju bakterite elusarvukusele. Paneel B visualiseerib antimikroobse aine toksilise kontsentratsiooni mõju bakterite elusarvukusele ajas. Joonis on visandatud Harrison *et al.* ja Westblade *et al.* põhjal (Harrison *et al.*, 2007; Westblade *et al.*, 2020).

Nagu eelnevalt mainitud, on üheks metallpindadel baktereid inaktiveerivaks teguriks pinnalt vabanevad metalliioonid, kuid erinevalt vedelast kasvukeskkonnast, mõjutavad metallipinnal baktereid ka lisastressorid, nagu kuivamine ja osmootne stress (Quaranta *et al.*, 2011; Santo *et al.*, 2008). Võrdlemisi vähe on teada metalliioonide detoksifitseerimise mehhanismide osalusest metallipinnal elus püsimises. On näidatud, et peamiste vase detoksifitseerimise

mehhanismide (*cueO*, *copA*, *cusCFBA*) täielik puudumine muudab *E. coli* vasesulamist pindadele kuivades ekspositsioonitingimustes tundlikumaks (Santo *et al.*, 2008). Samas ei ole senistes bakteriaalse evolutsiooni katsetes vasepinnal täheldatud muutusi evolutsioneerunud bakterite vaseioonide detoksifitseerimise geenides (Bleichert *et al.*, 2020; F. Xu *et al.*, 2022). Samuti on leitud, et vasesulamist müntidelt isoleeritud vase pindadele tolerantset bakterid ei olnud tolerantsemad vaseioonide vastu vedelas katseformaadis (Santo *et al.*, 2010). Seetõttu võib metalliioonide detoksifitseerimise süsteemidel olla metallipinnal elus püsimisel võrreldes vedela keskkonnaga väiksem roll, sest nende aeganõudva ekspressiooni ja piiratud efektiivsuse tõttu ei suuda need bakterit kaitsta pinnal minutitega rakku tungivate miljonite ioonide eest (Bleichert *et al.*, 2020; Thieme *et al.*, 2008).

Hõbedast tahkete pindade antimikroobseid mehhanisme on võrreldes vasega vähem uuritud, mistõttu pole seni teada, kuidas panustavad hõbedaioonide detoksifitseerimise mehhanismid hõbedast pinnal eluspüsimisse. Hõbedast pindadega mõnevõrra sarnaseks võiks lugeda hõbeda nanoosakesi, mille peamiseks toimemehhanismiks peetakse samuti hõbedaioonide vabanemist (Xiu *et al.*, 2012). Kuigi leidub näiteid, kus eksperimentaalne evolutsioon hõbeda nanoosakeste juuresolekul vedelas kasvukeskkonnas põhjustab bakterites võrreldes ioonse hõbeda evolutsiooniga erinevaid geneetilisi muutusi (Dong *et al.*, 2022), täheldatakse osades nanoosakeste evolutsiooni katsetes siiski muutusi teadaolevates ioonse hõbeda detoksifitseerimise mehhanismides (*Cus*) (Graves *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2022).

## 1.2. Metall- ja antibiootikumitundlikkuse seos

Sarnaselt teiste antimikroobsete kemikaalide laialdase kasutamisega on ka metallipõhiste pinnakatete rakendamisel tõstatatud küsimus metallide võimalikust rollist antibiootikumiresistentsuse tekkes ja/või levikus. Samaaegselt vähenenud tundlikkus metallide ja antibiootikumide suhtes võib tekkida kahe peamise mehhanismiga: rist- või kaasresistentsus. Ristresistentsus (*cross-resistance*) on olukord, kus üks molekulaarne mehhanism kaitseb rakku nii metalli kui ka antibiootikumi eest, samas kui kaasresistentsus (*co-resistance*) on põhjustatud eraldiseisvate resistentsusgeenide paiknemisest samas geneetilises elemendis, näiteks plasmiidis (Pal *et al.*, 2017). Kuna käesolevas töös iseloomustatud bakterites ei esinenud resistentsusplasmide, käsitletakse vaid metalli- ja antibiootikumi ristresistentsust, milleks nimetatakse olukorda, kus metallitundlikkus on muutunud vähemalt tolerantse ja antibiootikumitundlikkus resistentsuse tasemel. Antibiootikumiresistentsust määratletakse MIC väärtuste epidemioloogiliste läviväärtuste (*epidemiological cut-off value*, ECOFF) järgi (MIC EUCAST, 2024).

On kirjeldatud mitmeid metalli ja antibiootikumi ristresistentsuse mehhanisme. Näiteks on leitud, et välismembraani poriinide (OmpF/C) defektid või madalam ekspressioon võib passiivselt piirata metalliioonide (Ag, Cu, Zn) ja mitmete antibiootikumide tungimist rakku (X. Li *et al.*, 2019; Y. Xu *et al.*, 2022). Lisaks on kirjeldatud ka mitme kemikaali väljavoolupumpasid nagu MtdABC, mis eemaldavad rakust nii vaseioone kui ka novobiotsiini (Nagakubo *et al.*, 2002; Nishino *et al.*, 2007). Osad metallid osalevad ka antibiootikumiresistentsuse geenide indutseerimises läbi kaasregulatsiooni (*co-regulation*) (Baker-Austin *et al.*, 2006). Näiteks vaseioonid võivad MarR transkriptsiooni repressoriga seondudes kaudselt derepresseerida *marRAB* operoni (Hao *et al.*, 2014). Sellelt operonilt kodeeritud MarA on *E. coli*'s mitmete antibiootikumiresistentsuse geenide, näiteks AcrAB-TolC mitme ravimi väljavoolu pumba geenide, transkriptsiooni aktivaator (Okusu *et al.*, 1996).

Arvukad keskkonnamikroobide uuringud on seostanud metalli ja antibiootikumi resistentsusgeenide esinemist. Näiteks on näidatud positiivset korrelatsiooni saastunud veekogudes leiduvate raskemetallide hulga ja bakteriaalsete antibiootikumi resistentsusgeenide esinemissageduse vahel (Komijani *et al.*, 2021). Samuti on leitud, et loomakasvatustest, kus kasutatakse vasesooladega rikastatud sööta, isoleeritud vasetolerantsed bakterid olid võrreldes vasetundlikega sagedamini resistentsed mitmete antibiootikumide suhtes (Tan *et al.*, 2024). Küll aga rakendub saastunud keskkondades bakteritele tõenäoliselt metalli ja antibiootikumi topeltseleksioon, mis võib oluliselt kiirendada rist- või kaasresistentsuse tekkimist. Samas on ka kontrollitud tingimustes näidatud, et vase- ja hõbedaioonide ekspositsioon vedelas kasvukeskkonnas võib rikastada *de novo* tekkinud antibiootikumitolerantseid mutante või koguni indutseerida nende teket (Blanco Massani *et al.*, 2018; Henly *et al.*, 2019; X. Li *et al.*, 2019; X. Z. Li *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2022).

Antimikroobsete metallpindade panust antibiootikumiresistentsuse tekkesse ei ole põhjalikult uuritud, küll aga leidub üksikuid uuringud, kus on hinnatud vasepinnale tolerantsete bakteritüvede antibiootikumitundlikkust. Näiteks on leitud, et vaskmüntidelt isoleeritud vase pindadele tolerantsete grampositiivsete bakterite seas ei esinenud antibiootikumiresistentsust (Santo *et al.*, 2010). Samas *Pseudomonas fluorescens*'iga läbi viidud 320-tsüklilise vase pinnal toimunud evolutsiooni järgselt täheldati evolutsioneerunud populatsioonides eellasest suuremat tobramütsiini tolerantset (F. Xu *et al.*, 2022). Kuigi vedelas kasvukeskkonnas on eksperimentaalse hõbeda- ja vaselelektiooni järgselt tuvastatud samaaegset metalli- ja antibiootikumitolerantsust (X. Z. Li *et al.*, 1997; Y. Xu *et al.*, 2022), ei ole senini nähtud antibiootikumiresistentsuse esile kutsumist vasest pindade kasutamisel olulise riskina (Santo *et al.*, 2010). Osaliselt on see põhjendatav asjaoluga, et kuivades ja toitainevaesetes tingimustes

ei suuda bakterid vase pinnal elus püsida ega kasvada ja seetõttu ka replikatsioonil resistentsusmutatsioone omandada (Santo *et al.*, 2010). Samas on teada, et vasest ja hõbedast pindade antimikroobsed omadused vähenevad oluliselt või kaovad täielikult orgaanikaga saastudes (Kaur *et al.*, 2024), mistõttu ei saa täielikult välistada antibiootikumiresistentsuse tekke võimalust.

### 1.3. Metallide mõju mutatsioonide tekkesagedusele

Subletaalse (<MBC ja >MIC) või subinhibitoorse (<MIC) antimikroobse stressiga kohanemisel võivad bakteripopulatsioonides eelise saada mutaatortüved (*mutator strains*), mis suudavad tolerantsusmehhanisme kiiremini omandada (Mehta *et al.*, 2019; Swings *et al.*, 2017). Kuna on teada, et sagedasem muteerumine suurendab patogeensuse mehhanismide tekke tõenäosust, on kõrgemaid mutatsioonisagedusi seostatud ka patogeensusega (LeClerc *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 2000). Mutaatortüvedel on funktsionikaoga mutatsioonide tõttu DNA valepaardumise reparaatsioonisüsteemi (*mismatch repair*, MMR) geenides oluliselt tõusnud spontaanne mutatsioonisagedus (Heinaru, 2012). Suurem mutatsioonisagedus võimaldab muutuvates oludes suurendada geneetilist mitmekesisust ja kiiremini kohastuda (Leigh, 1970; Sniegowski *et al.*, 1997). Mutatsioonisageduse (*mutation rate*) kaudseks hindamiseks on võimalik fluktuatsioonitestiga leida mutatsioonide tekkesagedus (*mutation frequency*) (Rosche & Foster, 2000). Fluktuatsioonitest näitab spontaanselt tekkivate (nt antibiootikumi resistentsete) mutantide osakaalu testitavas populatsioonis (Luria & Delbrück, 1943; Rosche & Foster, 2000).

Subinhibitoorse ioonse vase ja hõbeda ühekordse ekspositsiooni järgselt on täheldatud bakterite mutatsioonisageduse suurenemist (S. B. I. Schmidt *et al.*, 2022; Shen *et al.*, 2021). Ka pikaajaline subinhibitoorne ekspositsioon vase- ja hõbedasooladele vedelas kasvukeskkonnas suurendab mutatsioonide tekkesagedusi (X. Li *et al.*, 2019) ning indutseerib ulatuslike DNA kahjustustega seotud SOS-vastuse geenide ekspressiooni (Y. Zhang *et al.*, 2018). Katses, kus *E. coli*'t eksponeeriti subletaalsetes tingimustes hõbeda nanoosakestele leiti aga, et ühekordne ekspositsioon ei indutseerinud SOS-vastuse genee ning krooniline subletaalne ekspositsioon ei suurendanud mutatsioonisagedusi (Wu *et al.*, 2022). Sarnaselt ei põhjustanud subletaalne ekspositsioon vasepindadele *E. coli*'s suuremat mutatsioonide tekkesagedust kui ekspositsioon terasest pindadele (Santo *et al.*, 2011).

Kokkuvõttes on varasemad uuringud näidanud, et vedelas keskkonnas võib subinhibitoorne metalliühendite ekspositsioon tõsta bakterite mutatsioonisagedust, kuid subletaalne ekspositsioon ei pruugi mutatsioonisagedusi oluliselt mõjuta. Kuigi ka metallipindade üheks

peamiseks toimemehhanismiks on pinnalt vabanevad metalliioonid, ei ole selgeid seoseid subletaalse pinnaekspositsiooni ja mutatsioonisageduste vahel leitud. Sellegipoolest varieerub antimikroobsetel metallpindadel bakteritele rakenduv antimikroobse stress sõltuvalt keskkonna tingimustest letaalsest kuni mitteinhibeerivani (Kaur *et al.*, 2024). Seetõttu ei saa välistada metallpindade võimalikku mutageenset mõju ega potentsiaali selekteerida stressiga kiiremini kohanevaid mutaanttüvesid.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö põhieesmärkides oli:

1. tuvastada, kas *Escherichia coli* ATCC 8739 tsükliline eksponeerimine antimikroobsetele tahketele metallpindadele suurendab mutatsioonide tekkesagedust;
2. hinnata muutusi evolutsioneerunud populatsioonide vase- ja hõbedaioonide ning antibiootikumide tundlikkuses võrreldes eellasega;
3. iseloomustada töö juhendajate Sandra Pargi ja Merilin Rosenbergi poolt läbi viidud evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonianalüüsist tuvastatud huvipakkuvate mutatsioonide mõju bakterite metalli- ja antibiootikumitolerantsusele;
4. võrrelda kvalitatiivselt eellase ja mutatsioonianalüüsiga tuvastatud *tnaA* M266I mutatsiooni kandva evolutsioneerunud populatsiooni divesiniksulfiidi tootmist ioonse hõbeda juuresolekul.

Selleks, et täita töö eesmäärke:

- hinnati metsiktüüpi *E. coli* ATCC 8739 rifampitsiini tundlikkust;
- leiti fluktuatsioonitestiga eellase ja evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonide tekkesagedused fenotüübilise rifampitsiini resistentsuse näitel;
- määrati eellase ja evolutsioneerunud populatsioonide vasksulfaadi ja hõbenitraadi minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC-d);
- määrati eellase ning vasel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonide vasksulfaadi ja/või hõbenitraadi minimaalsed bakteritsiidsed kontsentratsioonid (MBC-d);
- määrati eellase ja evolutsioneerunud populatsioonide nelja erineva toime mehhanismiga antibiootikumi (ampitsilliin, Amp; gentamütsiin, Gen; tsiprofloksatsiin, Cip; kolistiin, Cst) MIC-id;
- isoleeriti ning testiti täiendavalt evolutsioneerunud populatsioonidest esile kerkinud metallisoolade või antibiootikumide suhtes vähem tundlikke üksikkolooniaid;
- määrati evolutsioneerunud populatsioonidest Sandra Pargi poolt isoleeritud ja konstrueeritud mutantide ning käesolevas töös isoleeritud mutantide vasksulfaadi ja hõbenitraadi MIC-d ja MBC-d ning nelja erineva antibiootikumi MIC-d;
- võrreldi kvalitatiivselt eellase ja *tnaA* M266I mutatsiooni kandva evolutsioneerunud populatsiooni divesiniksulfiidi tootmist hõbedaioonide juuresolekul.

## 2.2. Materjal ja meetoodika

### 2.2.1. Kasutatud söötmed, bakteritüved ja kasvutingimused

Katsetes iseloomustatud bakteripopulatsioonid pärinevad Sandra Pargi magistritöö raames läbi viidud eksperimentaalse evolutsiooni katsest (Lisa 1). Evolutsioonikatseks eksponeeriti *E. coli* ATCC 8739 tüve tsükliliselt antimikroobsetele metall- (vask ja hõbe) ja kontrollpindadele (klaas ja teras) kahes erinevas tingimuses: toitainerikas ja niiske (edaspidi NR) ning toitainevaene ja kuiv (edaspidi KV). Igale testpinnal eksponeeriti viit paralleelset ühisest eellasest (metsiktüübi üksikkoloonia) alguse saanud bakteripopulatsiooni 30-korda. Lisaks kasutati katsetes kummaski tingimuses läbi viidud ekspositsiooni esmaste inokulumide säilitatud materjale, mis pärinesid kahest erinevast metsiktüübi kolooniast (edaspidi KV ja NR eellane). *E. coli* ATCC 8739 (DSM 1576) tüvi oli tellitud DSMZ-st (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH). ATCC 8739 näol on tegemist oportunistlikult patogeense *E. coli* tüvega, mida kasutatakse standardmeetoodika alusel antimikroobsete materjalide tõhususe testimisel (ISO, 2011).

Evolutsioonikatsete tulemiks olid kahes erinevas tingimuses ja neljal erineval pinnal evolutsioneerunud 40 bakteripopulatsiooni, mida hoiustati 20% glütserooli lahuses -80°C juures. Populatsioonide fenotüübi iseloomustamise katsetes kasutatud proovide saamiseks külvati igale katsele eelnevalt sügavkülmutatud säilituskultuure LB (*Lysogeny Broth*) tardsöötmele, inkubeeriti 37 °C juures 18-24 h, ning tekkinud biomass suspendeeriti steriilses fosfaatpuhvrts (phosphate buffered saline, PBS) või deioniseeritud vees (DI). Tardsöötmele kasvatamise eesmärgiks oli minimeerida kiirekasvuliste alampopulatsioonide domineerimist, säilitades seeläbi populatsioonide heterogeensust. Eranditeks olid mutatsioonide tekkesageduste ja kasvukõverate mõõtmise katsed, kus katse formaadi tõttu kasvatati populatsioone ette LB vedelsöötmes.

Populatsioonide metallisoola- ja antibiootikumitundlikkuse määramise katsete käigus isoleeriti üksikuid kolooniaid, mis talusid testitud antimikroobset ainet päritolupopulatsioonist oluliselt paremini. Isolaadid külvati LB tardsöötmetassidele, kasvatati üleöö 37°C juures ning hoiustati säilitusplaatidena 4°C juures täiendavaks testimiseks. Püsiva tolerantsusfenotüübiga isolaatide täisgenoom sekveneeriti ning sekveneerimisandmetega viisid Sandra Park ja Merilin Rosenberg läbi mutatsioonianalüüsi. Testiti ka Sandra Pargi poolt konstrueeritud deletsioonmutandi ja populatsioonidest isoleeritud huvipakkuvaid mutatsioone kandvaid mutantide metalli- ja antibiootikumitundlikkust. Lihtsustavalt nimetatakse Sandra Pargi konstrueeritud/isoleeritud mutante ning valitud püsiva tolerantsusfenotüübiga isolaate mutantideks. Mutantide

mutatsiooniprofiilid on toodud lisades 2 ja 3 ning lisas 4 on toodud mutatsioonide mõjutatud huvipakkuvate geenide funktsiooni annotatsioonid. Isogeensete mutantide antimikroobsete ainete MIC ja MBC hindamisel kasutati bakteriproovide ettevalmistamisel klassikalist meetodikat, kus säilituskultuuri biomassist kasvatati esmalt LB vedelsöötmes üleöö (37 °C, 150 rpm) vedelkultuurid, millest tehti värskes LB vedelsöötmes 50-kordsed lahjendused ja kasvatati eksponentsiaalsesse faasi jõudmiseni (kuni  $OD_{600}=0,6$ ; mõõdetud küvetis).

Agarlahjenduse meetodil antibiootikumide ja metallisoolade MIC-ide määramiseks kasutati Müller-Hintoni (MH) tardsöödet. MH on antimikroobsete ainete tundlikkuse testimisel eelistatuim sööde (EUCAST, 2000), sest söötmes leiduv tärklis seob antibiootikumide tööd häirivaid sekundaarseid metaboliite ning söötme madal tümidiini/tümiini ja P-aminobensoehappe sisaldus väldib antibiootikumide toime inhibeerimist (Aryal, 2015). Metallisoolade MBC-d määrati kahes erinevas toitainesisaldusega keskkonnas (toitainevaene steriilne DI ja toitainerikas orgaaniline saastelahus (EPA *soil load*, SL)), mis imiteerisid evolutsioonikatse tingimusi. Tabelis 1 on toodud kõigi töös kasutatud söötmete ja lahuste koostis.

**Tabel 1.** Kasutatud söötmed ja lahused.

| Sööde  |  | Koostisosad   |
|--|--|---|
| LB   | Vedelsööde                                     | trüptoon 10 g/l; pärmiekstrakt 5 g/l; NaCl 5 g/l  |
|  | Tardsööde                                      | vedelsööde + agar 15 g/l  |
|  | Tardsööde rifampitsiiniga (LB <sub>Rif</sub> ) | tardsööde + rifampitsiin 100 µg/ml  |
| MH tardsööde (Mueller Hinton Agar II, Biolife)                                   |  | veiseekstrakt 2 g/l; kaseiinpepton 17,5 g/l; tärklis 1,5 g/l; agar 17 g/l   |
| Orgaaniline saastelahus (EPA Soil Load, SL) (EPA, 2022)                          |  | pärmiekstrakt 3,5 g/l; veise seerumalbumiin ( <i>bovine serum albumin</i> , BSA) 2,5 g/l; mutsiin 0,8 g/l   |
| Fosfaatpuhver (PBS), pH≈7  |  | NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,81 g/l; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g/l  |
| Modifitseeritud H <sub>2</sub> S-i tuvastamise tardsööde (Vaughn & Levine, 1936) |  | kaseiinpepton 20 g/l; agar 15 g/l; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g/l; (NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ] 0,5 g/l; L-tsüsteiin 1,94 g/l |
| H <sub>2</sub> S-i tuvastamise vedelsööde  |  | SL + (NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ] 0,5 g/l; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4 g/l; L-tsüsteiin 1,94 g/l                               |

### **2.2.2. *E. coli* ATCC 8739 rifampitsiini tundlikkuse määramine**

Metsiktüüpi *E. coli* ATCC 8739 rifampitsiini (Rif) tundlikkuse määramiseks plaaditi 300 µl üleöö vedelkultuuri erineva Rif kontsentratsiooniga LB<sub>Rif</sub> tardsöötmetassidele. Testiti järgnevaid Rif kontsentratsioone: 5, 10, 25, 50, 100 ja 200 µg/ml. Tasse inkubeeriti 37°C juures ning kolooniaid loendati 24 ja 72 h järel. Fluktuatsioonitestis spontaansete Rif-resistentsete (Rif<sup>R</sup>) mutantide tuvastamiseks valiti kontsentratsioon, mille juures mutantide kolooniate arv oli stabiilselt loendatavas vahemikus, kuid mis samaaegselt ei inhibeerinud liigselt resistentsete kolooniate kasvu (koloonia morfoloogiat). Sobiv rifampitsiini kontsentratsioon fluktuatsioonitestiks oli 100 µg/ml.

### **2.2.3. Mutatsioonide tekkesageduste leidmine fluktuatsioonitestiga**

Evolutsioneerunud populatsioonidest ja eellasest kasvatati katsete jaoks vedelkultuurid 24-kaevulistes koekultuuritöötluseta steriilsetes plaatides. Plaadi kaevudesse pipeteeriti 1,5 ml LB vedelsöödet, mis inokuleeriti säilitusplaatidelt pärit evolutsioneerunud populatsiooni või eellase biomassiga. Vedelkultuure inkubeeriti loksutil (150 rpm) 37°C juures 20 h. Seejärel tehti igast vedelkultuurist värskes LB vedelsöötmes 10<sup>7</sup>-kordsed lahjendused, eesmärgiga alustada katset võimalikult väikese arvu rakkudega. Siinkohal jagati eellase vedelkultuur kaheks alikvoodiks, millest ühele lisati mutatsioone indutseeriva positiivse kontrollina 1 µg/ml mitomütsiin-C-d (MMC). Vedelkultuure kasvatati 24-kaevulises plaadis loksutil (150 rpm, 37°C) 20 h, misjärel plaaditi neist 300 µl steriilsete klaasist külvikuulidega LB<sub>Rif</sub> tardsöötmetassidele. Bakterikultuuride elusarvukuse leidmiseks kasutati tilkkülvi meetodit (Miles *et al.*, 1938), ning selleks tehti samadest vedelkultuuridest PBS-is kümnekordsed lahjendused, mis plaaditi 30 µl tilkkülvidena LB tardsöötmetassidele. Kõiki tasse inkubeeriti 24 h 37°C juures, misjärel loendati elusarvukuse ja Rif<sup>R</sup> kolooniad. Iga proovi mutatsioonide tekkesageduse leidmiseks jagati proovi Rif<sup>R</sup> kolooniate arv (CFU/ml) vastava proovi elusarvukusega (CFU/ml). Katsed teostati kümnes bioloogilises ja kahes tehnilises korduses.

### **2.2.4. Bakterite kasvudünaamika määramine**

Evolutsioneerunud populatsioonide ja isoleeritud ning konstrueeritud mutantide kasvudünaamika võrdlemiseks eellasega mõõdeti nende kasvudünaamikat LB vedelsöötmes. Selleks kasvatati kõigist testitud bakteritest LB vedelsöötmes üleöökultuurid, mis lahjendati 10<sup>7</sup>-korda värskes LB vedelsöötmes. Lahjendatud vedelkultuurid kanti 200 µl mahus kahes korduses 96-kaevulise mikrotiiterplaadi kaevudesse. Negatiivse kontrollina kasutati steriilset LB vedelsöödet. Optilist tihedust 600 nm juures mõõdeti 24 h jooksul 15-min intervallidena, kasutades BioTek Synergy H1 plaadilugejat (Agilent Technologies, USA). Terve

mõõtmisprogrammi jooksul loksutati plaati pidevalt (*double orbital continuous shaking*) ning säilitati konstantset temperatuuri (37 °C). Kasvukõverate visualiseerimiseks koostati mõõtmistulemustest arvutiprogrammis Microsoft® Excel versioon 16.84 (Microsoft Corporation, USA) joondiagrammid. Katset teostati kahes tehnilises ja kahes bioloogilises korduses.

### **2.2.5. Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramine**

Metallisoolade ja antibiootikumide minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramiseks kasutati agarlahjendusmeetodit, jälgides *European Society for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) standardprotokolli (EUCAST, 2000). Katsetega määrati testitud bakterite MIC väärtused kahe metallisoola ja nelja erineva antibiootikumi suhtes ning võrreldi neid eellase vastavate MIC väärtustega. Katsetes kasutati vasksulfaat pentahüdraati ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) ja hõbenitraati ( $\text{AgNO}_3$ ), mille metallioonid vastasid evolutsioonikatse antimikroobsetele metallpinadele (vask ja hõbe). Vasksulfaadist tehti 30 g Cu/l vesilahus, lahustades 17,6 grammi tahket soola 50 ml-s deioniseeritud vees. Katsetes kasutati 10,8 g Ag/l hõbenitraadi vesilahust (*silver nitrate* 0,1 M; Fisher Chemical).

Testiti nelja erineva toimemehhanismiga antibiootikumi: gentamütsiin (Gen), kolistiin (Cst), tsiprofloksatsiin (Cip) ja ampitsilliin (Amp). Antibiootikumide valikul lähtuti eelnevalt antimikroobsete kemikaalide indutseeritud antibiootikumiresistentsuse uuringust (Nordholt *et al.*, 2021). Katsetele eelnevalt tehti vesilahustuvatest antibiootikumidest (Gen, Cst ja Amp) säilituslahused steriilses DI-s. Tsiprofloksatsiini säilituslahus tehti 0,1 M soolhappes. Kõik edasised vahelahjendused tehti steriilses DI-s. Säilituslahused filtreeriti 0,2 µm pooriga süstlafiltritega, jaotati alikvootideks ning hoiustati fooliumiga kaetult 4°C juures. Testitud antimikroobset ainet sisaldavate tardsöötmetasside valmistamiseks tehti antibiootikumide- või soolalahustest võrdses mahus kahekordsete lahjenduste seeriad, mis lahustati steriilses MH tardsöötmes. Sobivad antimikroobsete ainete kontsentratsioonide vahemikud (Tabel 2 2) valiti lähtudes metsiktüvega eelnevalt tehtud pilootkatsetest.

Heterogeenseid evolutsioneerunud populatsioone kasvatati MIC määramiseks ette LB agarsöötme tassidel, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.1. Iga populatsiooni LB tardsöötmele kasvanud kolooniad suspendeeriti 5 ml-s steriilses PBS-is. Valitud mutante kasvatati LB vedelsöötmes, nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.1. Bakterisuspensioonidest tehti 96-kaevulises mikrotiiterplaadis PBS-is 300 µl mahus kümne- ja sajakordsed lahjendused, et mõõta nende optilist tihedust lineaarses vahemikus 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) juures mikrotiiterplaadi lugejas Tecan Sunrise™ (Tecan Group Ltd., Šveits). Mõõtmistulemuste järgi arvutati sihitud rakutihedusega  $10^7$  CFU/ml (arvutuslikult  $\text{OD}_{600}$  0,004) suspensioonide valmistamiseks vajalikud algse

bakterisuspensiooni ja PBS-i kogused. Arvutuste järgi lahjendati kõik bakteriproovid võrdse rakutiheduseni. Ühtlustatud rakutihedusega proovid pipeteeriti 3 µl mahus eelnevalt valmistatud antibiootikumi või metallisoola sisaldavatele MH tardsöötmetassidele. Tasse inkubeeriti 48 h 37°C juures ja määrati iga testitud bakteriproovi MIC väärtus testitud antimikroobse aine suhtes peale 24 ja 48 h. MIC väärtuseks loeti aine madalaim kontsentratsioon, mille juures ei ilmnenud nähtavat kasvu. Kõikide antimikroobsete ainetega teostati katsed kolmes bioloogilises ja kahes tehnilises korduses.

**Tabel 2.** Testitud antimikroobsete ainete kontsentratsioonivahemikud MIC katsetes.

| Testitud antimikroobne aine      | Testitud kontsentratsioonivahemik |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Vasksulfaat (CuSO <sub>4</sub> ) | 47 – 3000 mg Cu/l (0,74 – 47 mM)  |
| Höbenitraat (AgNO <sub>3</sub> ) | 1 – 63 mg Ag/l (0,0091 – 0,58 mM) |
| Ampitsilliin (Amp)               | 0,5 – 32 mg/l                     |
| Gentamütsiin (Gen)               | 0,125 – 8 mg/l                    |
| Tsiprofloksatsiin (Cip)          | 0,002 – 0,125 mg/l                |
| Kolistiin (Cst)                  | 0,03 – 8 mg/l                     |

### 2.2.6. Minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (MBC) määramine

Metallisoolade minimaalse bakteritsiidse kontsentratsiooni (MBC) määramiseks kasutati puljongi mikrolahjenduse (*broth microdilution*) meetodit. MBC-d määrati kahes erinevas, evolutsioonikatse tingimusi matkivas keskkonnas: toitainevaeses steriilses DI-s ja toitainerikas SL-s. Katse suure töömahu ja evolutsioneerunud populatsioonide rohkuse tõttu leiti hõbedal ja vasel evolutsioneerunud populatsioonidele MBC-d vaid pinnale vastavale metallisoolale (AgNO<sub>3</sub> või CuSO<sub>4</sub>). Katsetes tehti soolade säilituslahustest 96-kaevulistest mikrotiiterplaatides 100 µl mahus DI-s kahekordsed lahjendused. Testitavad kontsentratsioonivahemike valikul (Tabel 3) tugineti metsiktüvega läbi viidud pilootkatsetele.

Evolutsioneerunud populatsioone kasvatati katseks ette, nagu on kirjeldatud eelmises peatükis (2.2.5). Tardsöötmele kasvanud biomassi suspendeerimiseks kasutati PBS-i asemel steriilset DI-d, et vältida metallisoolade reageerimist PBS-is leiduvate kloriidi ionidega. Isogeenseid mutante kasvatati katse jaoks ette sarnaselt mutantide MIC katsele (kirjeldatud peatükis 2.2.5). Lisaetapina tuli MBC katsetes eemaldada LB ja pesta rakususpensioonist selle jäägid. Selleks kasutati Suppi *et al.* artiklis kirjeldatud meetodikat (Suppi *et al.*, 2015), mille järgi sööde eemaldatakse bakterisuspensioonide tsentrifugimise (antud töös 5000 g, 10 min, 4 °C) järel,

rakke pestakse DI-ga ning suspendeeritakse uuesti DI-s. Bakteriproovide rakutihedused ühtlustati OD<sub>600</sub> mõõtmistulemuste järgi nagu kirjeldatud eelmises peatükis (2.2.5). Esmalt lahjendati proovid steriilses DI-s neljakordse lõpliku soovitud rakutiheduseni (~10<sup>9</sup> CFU/ml; arvutuslik OD<sub>600</sub> 0,4). Seejärel jaotati iga proovi suspensioonid kaheks alikvoodiks, mis lahjendati veelkord poole võrra steriilse DI-s või 4xSL-is. Proovide ettevalmistamise järel kanti 100 µl proovi 96-kaevulises plaadis metallisoola kahekordsete lahjendustereale (100 µl mahus). Ekspositsiooni alguses oli rakutihedus ~3 x 10<sup>8</sup> CFU/ml (vastab arvutuslikult OD<sub>600</sub>-le 0,1). 2- ja 24-h ekspositsiooni järel toatemperatuuril tehti kõigist proovidest 5 µl tilkkülvid LB tardsöötmetassidele. Tasse inkubeeriti 24 h 37°C juures, misjärel määrati MBC väärtused. MBC väärtuseks loeti soola madalaim kontsentratsioon, mille juures ei kasvanud mitteselektiivsele söötmele külvatud proovist välja kolooniaid (Andrews, 2001). Proovide ja metallikontsentratsioonide kombinatsioonide rohkuse tõttu võttis ekspositsiooni algatamine oodatust kauem aega, mistõttu ei olnud populatsioonide testimisel võimalik 2-h ekspositsiooni läbi viia ning seetõttu otsustati 2-h ekspositsioon järgnevatest katsetest välja jätta. Kõik MBC määramise katsed viidi läbi kolmes bioloogilises ja kahes tehnilises korduses.

**Tabel 3.** Testitud antimikroobsete ainete kontsentratsioonivahemikud MBC määramisel.

|                                  | Toitainevaeses<br>ekspositsioonitingimuses (DI) | Toitainerikas<br>ekspositsioonitingimuses (SL) |
|----------------------------------|---|--|
| Vasksulfaat (CuSO <sub>4</sub> ) | 0,69 mg – 11 g Cu/l<br>(0,011 – 180 mM)         | 2,7 mg – 45 g Cu/l<br>(0,043 – 710 mM)         |
| Höbenitraat (AgNO <sub>3</sub> ) | 0,11 – 27 mg Ag/l<br>(0,00097 – 0,25 mM)        | 0,053 – 110 mg Ag/l<br>(0,00049 – 1,0 mM)      |

### 2.2.7. Divesiniksulfiidi tootmise kvalitatiivne hindamine

*TnaA* geenis mutatsiooni kandva evolutsioneerunud populatsiooni (NR.H4) divesiniksulfiidi (H<sub>2</sub>S) tootmise kvalitatiivseks hindamiseks hõbeda juuresolekul kasutati kolorimeetrilist testsüsteemi tard- ja vedelsöötmes. Indikaatorina kasutati raud(III)ammooniumtsitraati ((NH<sub>4</sub>)<sub>5</sub>[Fe(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>]), mille reageerimisel H<sub>2</sub>S-iga moodustub must sade (Davis & Pezzlo, 2023).

Tardsöötme retsept oli modifitseeritud Vaughn ja Levine'i retsepti järgi (Tabel 1) (Vaughn & Levine, 1936). Autoklaavitud sööde pipeteeriti 24-kaevulise plaadi kaevudesse ning söötmesse lisati kahekordsete lahjenduste seeriana AgNO<sub>3</sub>, suspendeeriti ning lasti 30 min bioohutuskapis fooliumiga kaetult tarduda. Bakteriproovide ettevalmistamiseks kasvatati LB vedelsöötmes üleöö vedelkultuurid, mis lahjendati PBS-is rakutiheduseni ~4x10<sup>7</sup> cfu/ml (OD<sub>600</sub>=0,1;

mõõdetud küvetis). Optimeeritud rakutihedusega proovidest tehti agarisse torkekülvid. Inkubatsioon toimus toatemperatuuril pimedas 48 h, mille jooksul jäädvustati värvusreaktsioon erinevates (12, 18, 24 ja 48 h) ajapunktides.

H<sub>2</sub>S tootmise hindamiseks vedelas keskkonnas kasutati katsekeskkonnana kahekordse kontsentratsiooniga SL-i, kuhu lisati indikaator (raud(III)ammooniumtsitraat), väävliallikas (L-Cys) ja puhversool (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Tabel 1). Sööde jaotati kultuurituubidesse ning söötme alikvootidele lisati kahekordsete lahjenduste seeriana AgNO<sub>3</sub>. Bakteriproovid kasvatati ette nagu eelnevalt kirjeldatud, lahjendati OD-le 0,2 (~8x10<sup>7</sup> CFU/ml) ning segati söötmega vahekorras 1:1. Kultuurituubide kaaned suleti õhukindlalt ning neid inkubeeriti staatiliselt 37°C inkubaatoris 24 h. Inkubatsioonaja jooksul jäädvustati kultuurituubides toimunud värvusreaktsioonid erinevates ajapunktides (2, 4, 6 ja 24 h) piltidena.

### **2.2.8. Statistika**

Kvantitatiivsete tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software Inc., USA) tarkvarapaketi ühe- või kahefaktorilist dispersioonanalüüsi (ANOVA) koos Dunnet'i *post-hoc* testiga. Mutatsioonide tekkesagedusi analüüsiti log<sub>10</sub> transformeerituna. Populatsioonide ja sekundaarsete isolaatide metallisoola MBC väärtused esitati korduskatsete vahelise varieeruvuse vähendamiseks kordse muutusena eellase vastavast MBC väärtusest ( $MBC_{\text{evolutsioneerunud}}/MBC_{\text{eellane}}$ ). Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks kasutati usaldusnivood  $\alpha=0,05$ .

## 2.3. Tulemused ja arutelu

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli iseloomustada vase- ja hõbeda pindadel läbi viidud 30-tsüklilise eksperimentaalse evolutsiooniga kaasnenud muutusi *E. coli* ATCC 8739 fenotüübis, keskendudes eelkõige antimikroobse tolerantsusega seostatud tunnuste iseloomustamisele. Selleks leiti pindadel evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonide tekkesagedused ning määrati populatsioonide tundlikkuse profiilid ionsete metallide ja antibiootikumide suhtes. Eksperimentaalse evolutsiooni tagajärjel omandatud antimikroobse tolerantsuse fenotüübi muutuste tuvastamine võimaldab kaudselt hinnata, kas antimikroobsete metallpindade kasutamine võib tahtmatult suurendada metallitolerantsuse ja antibiootikumiresistentsuse tekke riski.

### 2.3.1. Evolutsioneerunud populatsioonide iseloomustamine

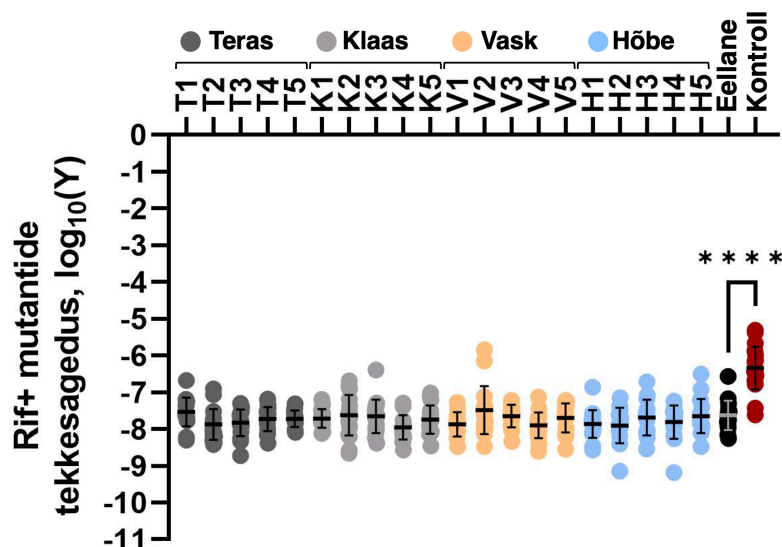
Antimikroobsete metallpindade kroonilise ekspositsiooni mõjude uurimiseks viis Sandra Park oma magistritöö raames läbi laborievolutsiooni katse, kus eksponeeris *E. coli* ATCC 8739 30-tsükli vältel vasest, hõbedast, klaasist ja terasest pindadele kahes erinevas tingimuste komplektis (niiske ja toitainerikas – NR; kuiv ja toitainevaene – KV) (Lisa 1). Käesolevas töös iseloomustati laborievolutsiooni tagajärjel tekkinud muutusi populatsioonide antimikroobsete ainete tolerantsuses ja mutatsioonide tekkesageduses.

#### 2.3.1.1. Populatsioonide mutatsioonide tekkesagedused

Sarnaselt teiste antimikroobsete ühenditega kohanemisega võivad metallpindadele eksponeeritud bakteripopulatsioonides saada eelise mutaatori fenotüübiga bakterid, mis on võimelised kõrgema spontaanse mutatsioonisageduse tõttu tolerantsusmehhanisme kiiremini omandama (Swings *et al.*, 2017). Mutaatori fenotüübi tuvastamiseks määrati NR tingimustes pindadel evolutsioneerunud populatsioonide spontaansed mutatsioonide tekkesagedused rifampitsiini resistentsuse tekkesageduste kaudu.

Vase ja hõbeda pinnal evolutsioneerunud populatsioonide spontaansed mutatsioonide tekkesagedused ei olnud võrreldes eellase ega kontrollpindadel (klaas, teras) evolutsioneerunud populatsioonidega statistiliselt oluliselt tõusnud (Joonis 2). Kõigi populatsioonide spontaansed mutatsioonide tekkesagedused olid suurusjärgus 1 mutant  $10^6$ - $10^7$  raku kohta ja ei esinenud mutaatori fenotüüpi, millele viitaks vähemalt 1000-kordne tõus metsiktüübi mutatsioonide tekkesagedusest (LeClerc *et al.*, 1996). Katsetulemused olid kooskõlas evolutsioneerunud populatsioonide sekveneerimisandmetega: NR tingimustes antimikroobsetel pindadel (vask, hõbe) evolutsioneerunud populatsioonides ei olnud akumulunud oluliselt rohkem mutatsioone kui kontrollpindade (teras, klaas) populatsioonides (Lisa 5). Samuti ei tuvastatud

mutaatori genotüüpi (MMR süsteemi mutatsioonid) (Lisa 2). Kuna ka KV tingimustes vasel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonide sekveneerimisandmetest ei tuvastatud mutaatori genotüüpi ega kontrollpopulatsioonidest suuremat mutatsioonide arvu (Lisa 5), ei peetud vajalikuks KV populatsioonidele fluktuatsioonitestiga mutatsioonitekkedageduste leidmist.



**Joonis 2. Spontaansete Rif-resistentsete (Rif<sup>R</sup>) mutantide tekkesagedused** niisketes ja toitainerikastes tingimustes kontroll- (teras, klaas) ja antimikroobsetel (vask, hõbe) pindadel evolutsioneerunud populatsioonides ja nende eellases (●). Positiivse kontrollina (●) kasutati eellase kultuuri, millele lisati mitomütsiin-C-d. Mutantide tekkesagedus väljendab Rif<sup>R</sup> mutantide osakaalu testitud populatsiooni kultuuris ( $\text{Rif}^{\text{R}} \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} / \text{elusarvukus} \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}$ ). Joonisel on andmepunktidena toodud 10 bioloogilise ja 2 tehnilise kordusega leitud mutantide tekkesagedused log<sub>10</sub> transformeerituna, sageduste keskvaärtused ja standardhälbed. Statistilisel analüüsi võrreldi evolutsioneerunud populatsioonide ja positiivse kontrolli tulemusi eellasega, kasutades selleks ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Joonisel on esitatud vaid statistiliselt olulised erinevused (\*\*\*\*P<0,0001).

Kirjanduses leidub vasepindadel toimunud evolutsiooni indutseeritud mutatsioonide akumulatsioonikohta vastuolulisi tulemusi. Bleichert *et al.* artiklis leiti, et 41 vasepinna ekspositsioonitsükli järel tekkinud vase pinnaekspositsioonile tolerantsetes *E. coli* mutandis olid üle 80% sagedusega fikseerunud vaid neli SNP-d, millest ükski ei mõjutanud MMR süsteemi geene (Bleichert *et al.*, 2020). Samas leiti teises vasepindadel läbiviidud evolutsiooni artiklis, et vasel 320 ekspositsioonitsükli läbinud *Pseudomonas fluorescens*'i populatsioonides oli fikseerunud (üle 70% sagedusega) neli korda rohkem SNP-sid kui ilma pinnaselektioonita kontrollpopulatsioonis (F. Xu *et al.*, 2022). Kusjuures leiti Xu *et al.* artiklis, et nii vasel evolutsioneerunud kui ka kontrollpopulatsioonides esinesid mutatsioonid MMR süsteemi geenides. Seejuures jäi antud artiklis ebaselgeks, miks oli kõigis ilma selektsioonita LB vedelsöötmes 320 passaaži läbinud kontrollpopulatsioonides fikseerunud mutaatori genotüüp

ning võib arvata, et kirjeldatud katses võis kõigi evolutsioneerunud populatsioonide ühine eellane olla mutaator.

Kuigi hõbedapindade mutageenset efekti ei ole teadaolevalt kirjeldatud, on hõbeda nanoosakeste juuresolekul läbi viidud laborievolutsiooni järgselt leitud, et krooniline subletaalne hõbedastress ei suurendanud *E. coli*'s akumuleerunud mutatsioonide hulka (Wu *et al.*, 2022). Käesolevas töös leitu, et vase ja hõbeda pindadel evolutsioneerumine ei tekitanud bakteripopulatsioonides püsivalt tõusnud mutatsioonide tekkesagedusi, on seega kooskõlas varasemate uuringutega, mis näitavad, et krooniline subletaalne vase ja hõbeda stress ei selekteeri mutaatortüvesid ega mõjuta oluliselt mutatsioonisagedusi.

### 2.3.1.2. Populatsioonide tundlikkus metallisooladele

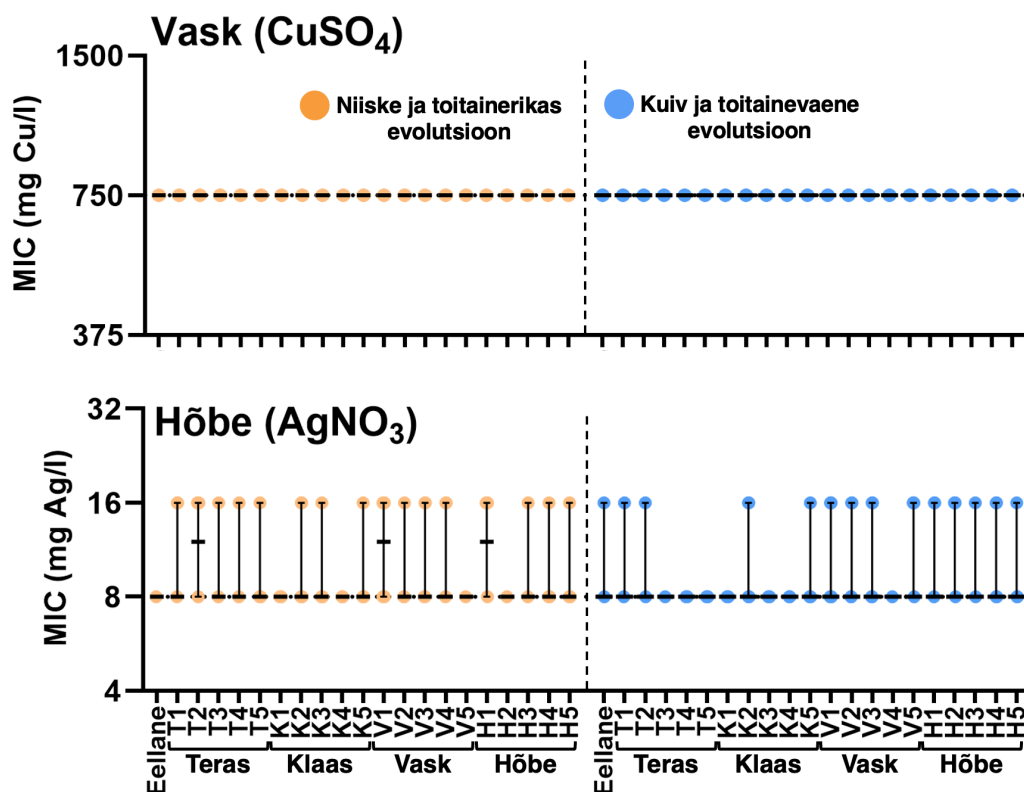
Kuna ionide vabanemist peetakse metallipindade peamiseks toimemehhanismiks, võiks efektiivsem metalliioonide detoksifitseerimise võime ka metallpinnal kasulik olla. Selleks, et hinnata antud töös kirjeldatud muutusi evolutsioneerunud populatsioonide metallitundlikkuses, leiti populatsioonide CuSO<sub>4</sub> ja AgNO<sub>3</sub> MIC (Joonis 3) ja MBC (Joonis 4) väärtused, mida võrreldi evolutsiooni eellase vastava väärtusega (Tabel 4).

**Tabel 4. Niiske ja toitainerikka (NR) ning kuiva ja toitainevaese (KV) evolutsioonikatse eellase vasksulfaadi ja hõbenitraadi minimaalsed inhibeerivad ja bakteriitsidised kontsentratsioonid (MIC ja MBC) katsetingimustes.** Tabelis on toodud välja 3 bioloogilise ja 2 tehnilise kordusega määratud MBC-de ja MIC-de mood ning sulgudes variatsiooniulatus.

|                   |                 | Vasksulfaat, CuSO <sub>4</sub> |                       | Hõbenitraat, AgNO <sub>3</sub> |                           |
|-------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|
|                   |                 | mg Cu/l                        | mM                    | mg Ag/l                        | mM                        |
| <b>NR eellane</b> | MIC             | <b>750</b>                     | 12                    | <b>7,9</b>                     | 0,073                     |
|                   | 24h MBC<br>DI-s | <b>5,5</b><br>(5,5-22)         | 0,086<br>(0,086-0,35) | <b>0,84</b><br>(0,42-0,84)     | 0,0078<br>(0,0039-0,0078) |
|                   | 24h MBC<br>SL-s | <b>700</b><br>(350-700)        | 11<br>(5,5-11)        | <b>27</b><br>(6,8-54)          | 0,25<br>(0,063-0,50)      |
| <b>KV eellane</b> | MIC             | <b>750</b>                     | 12                    | <b>7,9</b><br>(7,9 – 16)       | 0,073<br>(0,073-0,15)     |
|                   | 24h MBC<br>DI-s | <b>11</b><br>(2,7-11)          | 0,17<br>(0,043-0,17)  | <b>0,42</b><br>(0,42-1,7)      | 0,0039<br>(0,0039-0,016)  |
|                   | 24h MBC<br>SL-s | <b>700</b><br>(350-1400)       | 11<br>(5,5-22)        | <b>14</b><br>(6,8-27)          | 0,125<br>(0,063-0,25)     |

Joonisel 3 on näha, et ühegi pindadel evolutsioneerunud populatsiooni ioonse vase ega hõbeda MIC ei erinenud oluliselt vastava evolutsioonikatse eellastest. Samuti ei erinenud omavahel antimikroobsetel ja kontrollpindadel evolutsioneerunud populatsioonide tundlikkus kummalegi metallisoolale. Järelikult ei selekteeritud vase ega hõbeda pinnal baktereid, mis suudaksid vedelas katseformaadis pinnatüübile vastavate metalliioonide juuresolekul edukamalt kasvada.

Katse tulemused on kooskõlas eelnevate vasepindadel läbiviidud evolutsioonikatsetega, milles on leitud, et vasel eluspüsimise põhjal selekteeritud gramnegatiivsete bakteritüvede ja -populatsioonide vaseioonide MIC väärtused olid eelasega kas identsed (Bleichert *et al.*, 2020) või väga vähesel määral (1,08- kuni 1,15-korda) tõusnud (F. Xu *et al.*, 2022).



**Joonis 3. Erinevates tingimustes evolutsioneerunud populatsioonide vasksulfaadi ja hõbenitraadi minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC).** Joonisel on andmepunktidena toodud 3 bioloogilise ja 2 tehnilise korduskatsega agarlahjenduse meetodil leitud MIC-d log<sub>2</sub> skaalal, nende mediaan ja variatsiooniulatus (*range*). Statistilisel analüüsil võrreldi evolutsioneerunud populatsioonide tulemusi vastava evolutsioonikatse eellasega, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Ühelgi kontrollpinnal (teras, klaas) ega antimikroobsel pinnal (vask, hõbe) evolutsioneerunud populatsiooni ioonse vase ja hõbeda MIC väärtused ei erinenud oluliselt eellasest ( $P>0,05$ ).

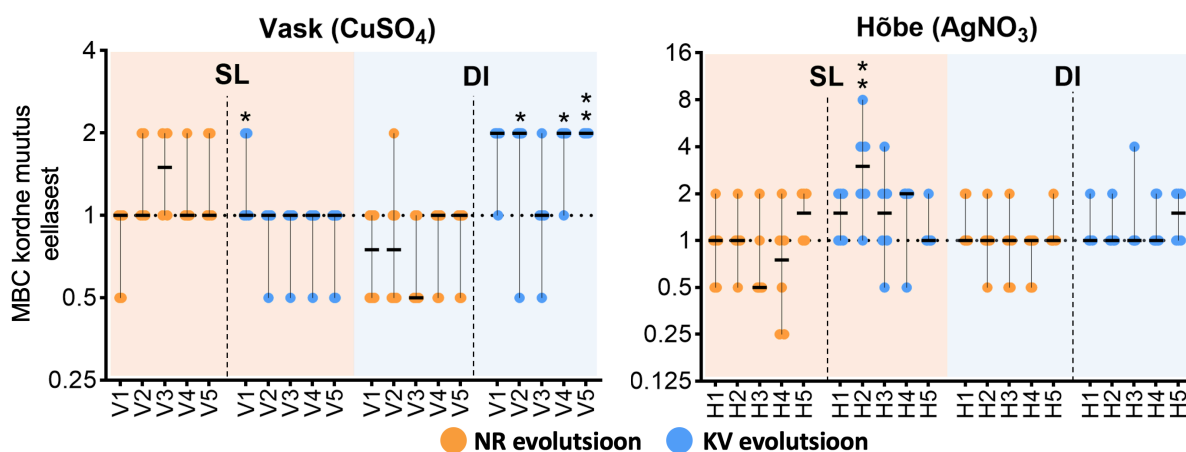
Lisaks muutustele ioonsete metallide kasvuinhibitsioonis (MIC) pindadel evolutsioneerunud populatsioonides, hinnati ka muutusi metalliioonide biotsiidse toime talumises (MBC) toitainevaeses (DI) ja -rikkas (SL) keskkonnas. Tabelis 4 on toodud evolutsioonikatse eellaste AgNO<sub>3</sub> ja CuSO<sub>4</sub> MBC-d, mis olid võrreldavas suurusvahemikus Suppi *et al.* artiklis leitud *E. coli* MG1655 metallisoolade MBC-dega DI-s ja MH vedelsöötmes (Suppi *et al.*, 2015). Huvitaval kombel erinesid aga töös kasutatud kahe eellase hõbeda MBC-d üksteisest: NR eellane talus hõbedat nii SL-s kui ka DI-s KV eellasest kaks korda paremini. Katsetes kasutatud eellaste säilituskultuurid said alguse erinevatest juhuslikult valitud metsiktüüpi *E. coli* ATCC 8739 üksikkolooniatest, ning eellaste võrdlemisel leiti, et NR eellase kultuur sisaldas 90%

sagedusega mutatsiooni *FliI* viburi ATPaasi kodeerivas geenis, mis põhjustas enneaegse stoppkoodoni tekke ja liikumisvõimetuse (Lisa 6). Geen *fliI* kodeerib viburi ATPaasi ning on näidatud, et selle deleteerimine põhjustab liikumisvõimetust (Fan & Macnab, 1996). Sarnast antimikroobse tolerantsuse ja liikumisvõimetuse seost on kirjeldatud *Salmonella enterica* FliC flagelliini mitte-ekspresseerivates populatsioonides, mis olid võrreldes FliC-d ekspresseerivate populatsioonidega vähem tundlikud bakteritsiidsete antibiootikumide suhtes (Lyu *et al.*, 2021). Liikumisvõimetute suuremat tolerantsust põhjendati Lyu *et al.* artiklis viburite tööst tingitud rakusisese prootonite kontsentratsiooni suurenemisega, mis tõenäoliselt vähendas prootongradienti ning pärssis antibiootikumi väljavoolupumpade tööd. Kuna ka hõbedaioonide väljavoolupumbad Sil ja Cus rakendavad prootongradienti võis antud töös tuvastatud NR eellase vähenenud hõbeda tundlikkust põhjustada liikumisdefekt.

Üksikud vassel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonid talusid vedelas katsekeskkonnas pinnale vastavate ionide ekspositsiooni statistiliselt oluliselt paremini kui eellane (Joonis 4), kuid bioloogilise efekti suurus jäi väikeseks. Lisaks tuvastati statistilisel analüüsil MBC tulemusi evolutsioonikeskkonna ja pinnatüübi kaupa grupeerides, et evolutsioonikatse ekspositsioonitingimus omab väikest efekti metallisoolade MBC-dele. Nimelt taluvad KV tingimustes vassel evolutsioneerunud populatsioonid grupina paremini vaseioone toitainevaese DI-s (kooskõlas evolutsiooni keskkonnaga), kuid KV tingimustes hõbedal evolutsioneerunud populatsioonid taluvad hõbedaioone paremini toitainerikkas SL-is (vastuolus evolutsiooni keskkonnaga). Kuigi tuvastatud vastupidine keskkonnaefekt ei ole üheselt seletatav tuvastatud mutatsioonidega, ei saa välistada, et selle põhjus oleks bioloogiline. Näiteks võis pinnal toimunud ekspositsiooni järgset metallitolerantsust põhjustada mittegeneetilise „mälu“ (*bacterial memory*) efekt, mida on eelnevalt kirjeldatud erinevate antimikroobsete ainete tolerantsuses ning mis seisneb stressoriga kokkupuutel omandatud füsioloogiliste muutuste lühiajalises pärandumises (C. Zhang *et al.*, 2023). Mitte-geneetilise mälu efekti on kirjeldatud näiteks *S. enterica* sapisoola tolerantsuses, ning on leitud, et eelnev subinhibitoorne eksponeerimine naatrium deoksükolaadile (sapisool) põhjustab ajutiselt kuni kahekordset tõusu sama aine MIC-s (Hernández *et al.*, 2012). Kui Hernandez *et al.*, artiklis kirjeldatud sapisoola tolerantsus kadus peale ühekordset ümberkülvi ilma selektsioonita keskkonnas, siis kroonilise tsingiühendite ekspositsiooni järgselt avaldunud mittegeneetilised muutused *E. coli* antibiootikumitolerantsuses püsisid kuni 20 ümberkülvi ilma selektsioonita keskkonnas (Rihacek *et al.*, 2023). Seega võib spekuloida, et kroonilisel antimikroobsel ekspositsioonil võivad mittegeneetiliselt päranduvad muutused füsioloogias ning geeniekspressioonis olla püsivamad kui ühekordsel ekspositsioonil ning on võimalik, et need muutused panustasid ka

antud töös heterogeensete evolutsioneerunud populatsioonide edukasse metallitolerantsusesse teatud tingimustes.

Samas esines populatsioonide MBC tulemustes suhteliselt suur varieeruvus, mistõttu on keeruline hinnata, kas väikese efektiivsusega muutused (maksimaalselt 2- kuni 4-kordsed) metallisoolade tundlikkuses olid tegelikud pinnaekspositsioonil omandatud bioloogilised erinevused või katsetingimuste varieeruvusest tingitud artefaktid. Näiteks võis SL-is metallisoolade MBC-sid mõjutada metalliioonide reageerimine SL-i komponendi BSA-ga (Alhazmi, 2019; Jing *et al.*, 2022), mis võis nende toksilisus oluliselt väheneda. Teine keskkonnaparameeter, mis võis mõjutada bakterite tundlikkust metalliioonidele on pH. Leiti, et SL-i vasksulfaadi lisamisel muutus selle pH happeliseks (Lisa 7). Happešokk võiks aidata selgitada, miks ei andnud pinnaekspositsiooni taust eelist populatsioonide vaseioonide talumisele SL-is.



**Joonis 4. Vasel ja hõbedal evolutsioneerunud populatsioonide vasksulfaadi ja hõbenitraadi minimaalsete bakteritsiidsete kontsentratsioonide (MBC) kordne muutus eellasest. Joonisel on toodud niisketes ja toitainerikastes (NR, ●) ning kuivades ja toitainevaesetes (KV, ●) tingimustes vasel (V) ja hõbedal (H) evolutsioneerunud populatsioonide MBC kordne muutus eellase vastavast väärtusest log<sub>2</sub> skaalal. CuSO<sub>4</sub> MBC määrati vasel ja AgNO<sub>3</sub> MBC hõbedal evolutsioneerunud populatsioonidele 24-h ekspositsiooniga toitainerikkas SL-is (kollasel taustal) ja toitainevaeses DI-s (sinisel taustal). Joonisel on andmepunktidena toodud 3 bioloogilise ja 2 tehnilise kordusega leitud MBC kordsed muutused eellasest, nende mediaan ja variatsiooniulatus. Statistilisel analüüsil võrreldi evolutsioneerunud populatsioonide tulemusi eellasega nii individuaalselt (ühefaktoriline ANOVA, Dunett'i *post-hoc* test,  $\alpha=0,05$ ) kui ka evolutsioonikeskkonna ja pinnatüübi kaupa grupeerituna (kahefaktoriline ANOVA, Dunett'i *post-hoc* test,  $\alpha=0,05$ ). Joonisel on toodud populatsioonide individuaalsel võrdlemisel kajastunud statistiliselt olulised muutused eellasest (\* $P<0,05$  ja \*\* $P<0,01$ ).**

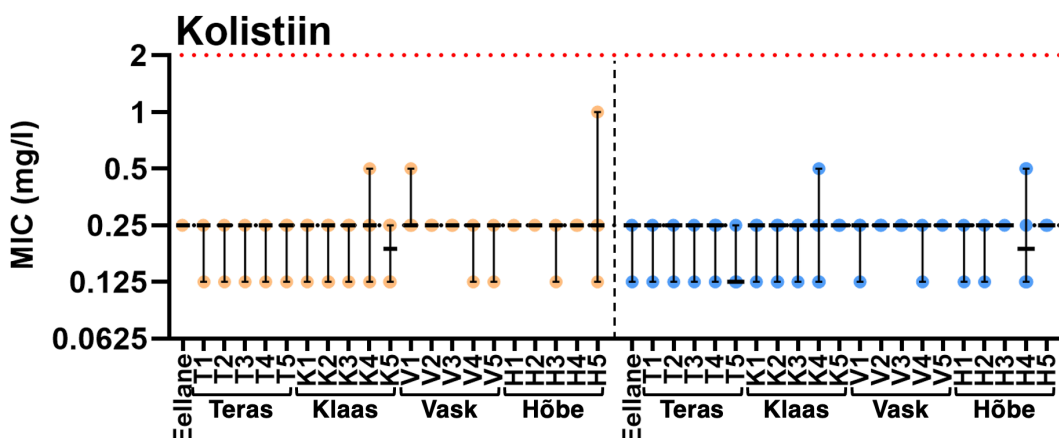
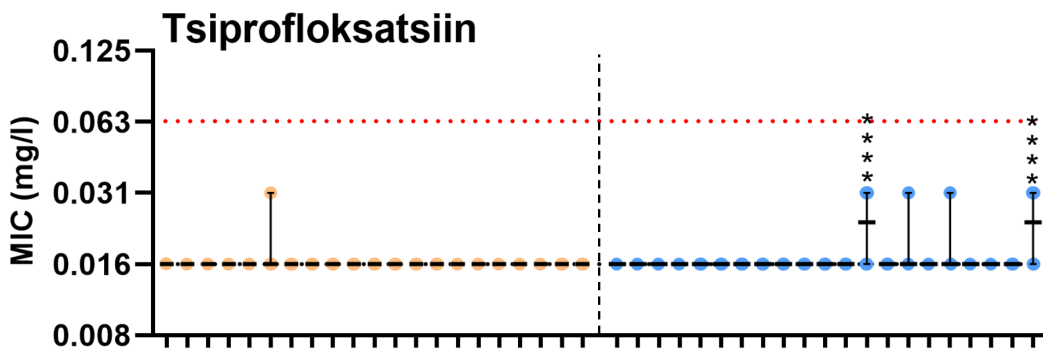
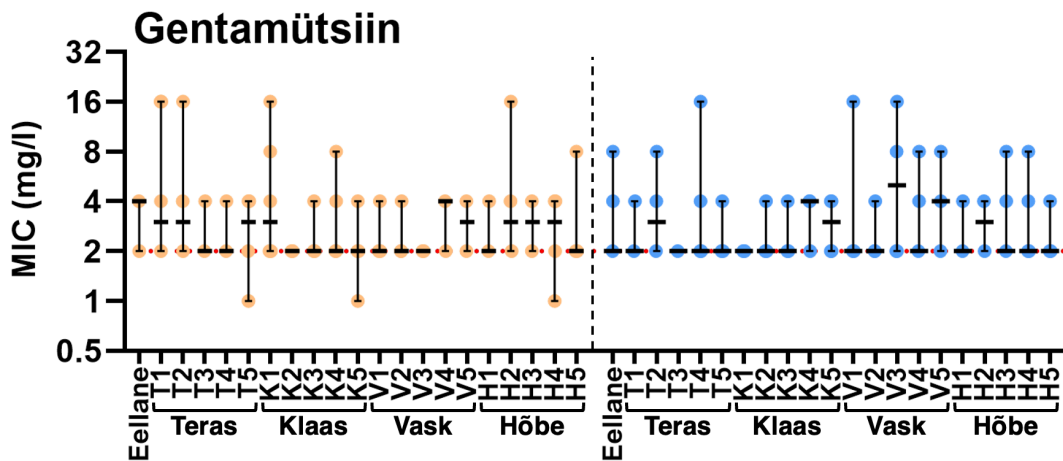
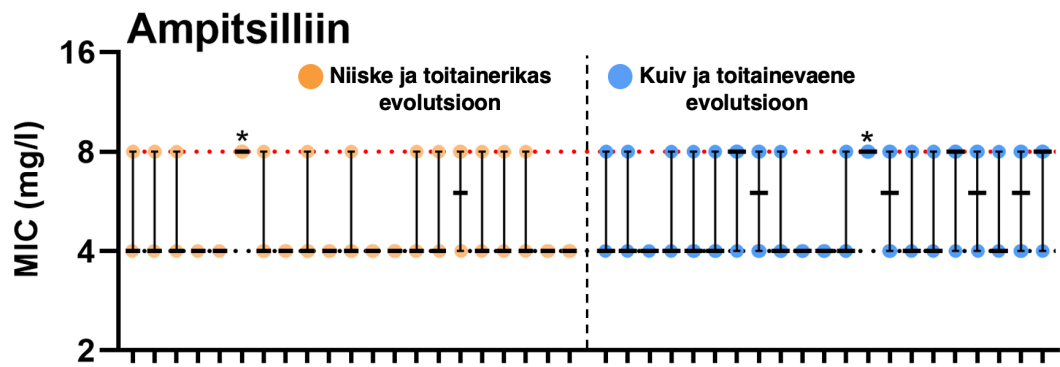
Evolutsioneerunud populatsioonide metallisoolade tundlikkuse katsetes leiti, et 30-tsüklilise vase ja hõbeda pinnaekspositsiooni järgselt ei suutnud bakterid pinnalt vabanevate metalliioonide juuresolekul märkimisväärselt paremini kasvada ja/või pikaajalist (24 h) metalliioonide ekspositsiooni üle elada. Kuigi üksikute evolutsioneerunud populatsioonide

metallisoola MBC väärtused olid eellasest statistiliselt olulisel määral muutunud, oli nende muutuste kasutegur antimikroobse tolerantsuse seisukohalt siiski väike. Samuti ei olnud üksikute populatsioonide suurenenud metallitolerantsus üheselt seletatav populatsioonis tuvastatud mutatsioonidega (Lisa 2). Eeltoodust järeldub, et bakterite krooniline eksponeerimine hõbeda- ja vasepindadele ei pruugi muuta bakterite tundlikkust metalliioonide vastu vedelas katseformaadis ning seetõttu oleks evolutsioonijärgseid muutusi metallitundlikkuses adekvaatsem hinnata pinnaformaadis, kus rakenduvad lisaks metalliioonidele ka teised pinnaekspositsioonile omased stressorid.

### **2.3.1.3. Populatsioonide tundlikkus antibiootikumidele**

Eelnevalt on omavahel seostatud vähenenud metalli- ja antibiootikumitundlikkust, mida võivad põhjustada ristresistentsuse mehhanismid, nagu vähenenud rakuseina permeaablus või väljavoolupumpade aktiveerimine. Seetõttu on oluline hinnata antimikroobsete metallpindade kasutamise võimalikku panust antibiootikumiresistentsuse tekkes. Käesolevas töös määrati agarlahjenduse meetodil nelja erineva toimemehhanismiga antibiootikumi (Amp, Gen, Cip, Cst) MIC väärtused antimikroobsetel (vask, hõbe) ja kontrollpindadel (klaas, teras) evolutsioneerunud *E. coli* populatsioonidele eesmärgiga tuvastada evolutsiooniga omandatud muutusi eellasest ning tuvastada antibiootikumiresistentsus. Resistentsuse tuvastamiseks võrreldi individuaalsete populatsioonide antibiootikumi MIC väärtusi EUCAST-i poolt määratud epidemioloogiliste läviväärtusega (*epidemiological cut-off value*, ECOFF) (MIC EUCAST, 2024) ning resistentseks loeti populatsioon juhul, kui selle MIC väärtuste mood oli suurem ECOFF-ist (Kahlmeter *et al.*, 2003). Siinkohal on oluline mainida, et kuigi EUCAST määrab läviväärtused puljongilahjenduse (*broth dilution*) meetodil leitud MIC-ide põhjal, võrreldakse antud töös läviväärtusi agarlahjendus meetodil leitud MIC-dega, sest eelnevalt on näidatud, et Amp-i, Gen-i, Cip-i ja Cst-i puljongi- ja agarilahjenduse meetodil leitud MIC-d on võrreldavad (Baker *et al.*, 1991; Turlej-Rogacka *et al.*, 2018).

Joonisel 5 on toodud nii evolutsioneerunud populatsioonide kui ka eellaste nelja testitud antibiootikumi MIC väärtused. Jooniselt on näha, et mõlemad eellased olid tundlikud Amp-i, Cip-i ja Cst-i suhtes. Küll aga olid eellaste gentamütsiini MIC-d võrdsed või suuremad ECOFF-ist (2 mg/l), millest järeldub, et *E. coli* ATCC 8739 võib olla gentamütsiini suhtes tolerantsem kui teised *E. coli* tüved ning seda on ka eelnevalt täheldatud (Blanco Massani *et al.*, 2018).



**Joonis 5. Erinevates tingimustes pindadel evolutsioneerunud populatsioonide antibiootikumide minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC). Joonisel on log<sub>2</sub> skaalal andmepunktidena toodud 3 bioloogilise ja 2 tehnilise korduskatsega agarilahjenduse meetodil leitud MIC väärtused, nende mediaan ning variatsiooniulatus. Punane punktiirjoon märgistab antibiootikumi MIC epidemioloogilist läviväärtust. Statistilises analüüsis võrreldi evolutsioneerunud populatsioonide MIC väärtusi eellase vastavate väärtustega, kasutades**

ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Joonisel on märgitud vaid statistiliselt olulised muutused ( $P^* < 0,05$  ja  $****P < 0,0001$ ).

Üksikud evolutsioneerunud populatsioonid talusid võrreldes eellasega statistiliselt oluliselt paremini Amp-i või Cip-i (Joonis 5), kusjuures antibiootikumitolerantsem fenotüüp ei olnud põhjustatud teadaolevate Amp-i või Cip-i resistentsusgeenide esinemisest vastavas populatsioonis (Lisa 2). Ühegi evolutsioneerunud populatsiooni testitud antibiootikumide (va Gen) MIC väärtused ei ületanud epidemioloogilisi läviväärtusi ehk ei esinenud resistentsust. Küll aga oli mitme populatsiooni Amp-i MIC jõudnud läviväärtuse tasemele (= ECOFF), mis võib viidata madalatasemelisele (*low-level*) resistentsusele (Goldstein, 2007). Kirjeldatud madalatasemeline Amp-i resistentsus esines kõige sagedamini KV tingimustes ning eriti sagedasti hõbedal evolutsioneerunud populatsioonides. Kuigi evolutsioonis omandatud Amp-i MIC muutused eellasest olid väikese (2-kordse) efektsuurusega on eelnevalt spekulatsioonid, et madalatasemeline resistentsus võib olla esmaseks sammuks täieliku resistentsuse tekkes (Baquero, 2001). Vähenenud beetalaktaamsete antibiootikumide tundlikkust võib põhjustada aeglasem kasv (Tuomanen *et al.*, 1986), kuid kuna ühelgi antud töös kirjeldatud populatsioonil ei esinenud üldisi kasvudefekte toitainerikas söötmes (Lisa 8a ja 8b), on väikeseid muutusi evolutsioneerunud populatsioonide antibiootikumi tundlikkuses keeruline üheselt põhjendada.

Eelnevates metalliühendite eksperimentaalse evolutsiooni katsetes on samuti kirjeldatud väikeseid efekte bakterite antibiootikumi tundlikkusele. Näiteks leiti Wu *et al.* artiklis, kus *E. coli*'t eksponeeriti krooniliselt hõbeda nanoosakestele, et nanoosakestele tolerantsem mutandid talusid eellasest veidi paremini ampitsilliini, kuid mitte resistentsuse tasemel (Wu *et al.*, 2022). Sellegipoolest on tähelepanuväärne, et hõbeda ekspositsiooni on sarnaselt käesolevas töös leituga ka eelnevalt kokku viidud vähenenud ampitsilliini tundlikkusega. Varasemates vase pinnaevolutsiooni katsetes ei ole antibiootikumitundlikkust testitud (Bleichert *et al.*, 2020) või on kirjeldatud suurenenud tobramütsiini (aminoglükosiid) tolerantsemust (F. Xu *et al.*, 2022).

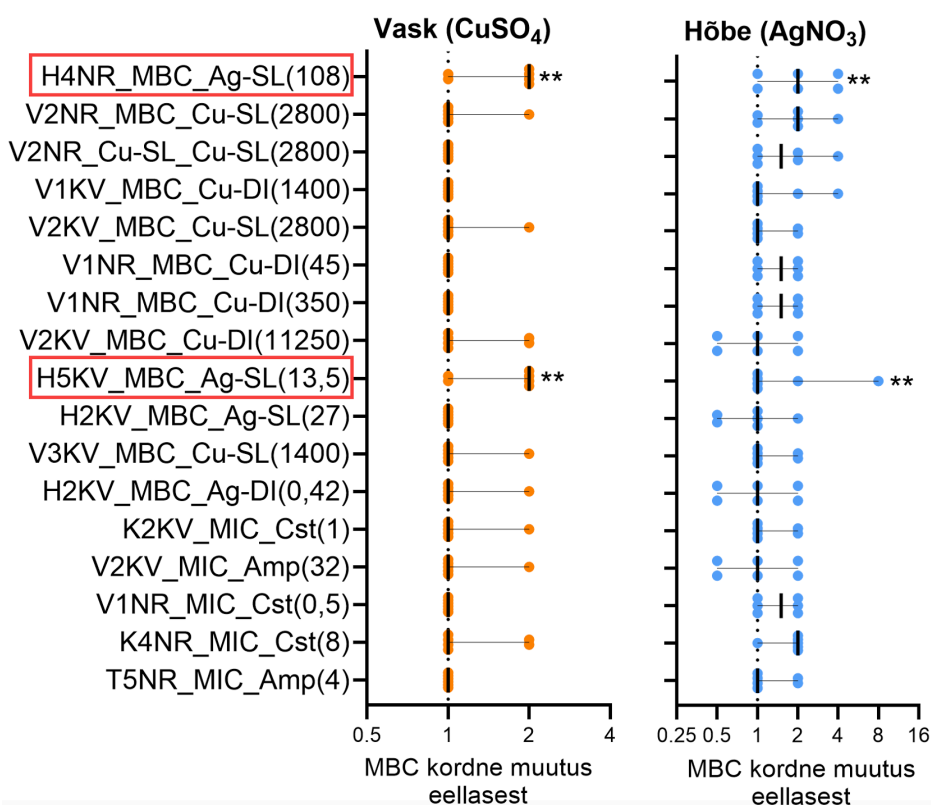
Kuigi kirjeldatud muutused tsükliliselt pindadele eksponeeritud *E. coli* antibiootikumitundlikkuses olid üksikudel juhtudel statistiliselt olulised, on nende ennustatav kasutegur päriselulistest antibiootikumide kasutamise olukordades väike ning need ei taga bakteritele antibiootikumiresistentsust. Samuti ei esinenud kõrgem antibiootikumitolerantsus koos kõrgema metallitolerantsusega..

### **2.3.2. Tolerantsemate isolaatide täiendav testimine**

Evolutsioneerunud populatsioonidega läbi viidud metallisoolade- ja antibiootikumitundlikkuse määramise katsetes isoleeriti 34 üksikkolooniat, mis suutsid võrreldes ülejäänud populatsiooniga testitud antimikroobse aine juuresolekul märkimisväärselt paremini kasvada

(MIC) või elus püsida (MBC). Selleks, et hinnata, kas isolaatide vähenenud tundlikkuse fenotüüp oli stabiilne, testiti isolaate täiendavalt. Kuna kolooniad isoleeriti MIC ja MBC katsete väljakülvidest, ei ole võimalik eristada evolutsioonikatses tekkinud mutante MIC või MBC katse käigus tekkinud *de novo* mutantidest ning seetõttu nimetatakse neid edaspidi eristavalt sekundaarseteks isolaatideks. Sekundaarsete isolaatide nimetamisel järgiti ühtset süsteemi, kus isolaadi nimetus kajastab järgmist informatsiooni:

- päritolu evolutsioneerunud populatsioonist (esimene väli: T, K, V või H vastavalt terasel, klaasil, vasel või hõbedal evolutsioneerunud; liini number; evolutsiooni tingimus: KV või NR),
- katse, mille käigus isoleeriti (teine väli: MBC – metallisoolade MBC; MIC – antibiootikumide MIC),
- antimikroobne aine, mille tolerantsuse põhjal selekteeriti (kolmas väli: antibiootikum või metall koos MBC katse keskkonnaga (SL või DI)),
- antimikroobse aine MIC või MBC väärtus (mg/l).



**Joonis 6. Sekundaarsete isolaatide hõbenitraadi (AgNO<sub>3</sub>) ja vasksulfaadi (CuSO<sub>4</sub>) minimaalsete bakteritsiidsete kontsentratsioonide (MBC) kordsed muutused eellasest. MBC-d määrati 24-h ekspositsiooniga DI-s. Joonisel on log<sub>2</sub> skaalal toodud isolaatide 3 bioloogilise ja 2 tehnilise korduskatse andmepunktid, nende mediaan ja variatsiooniulatus. Statistilises analüüsis võrreldi isolaatide MBC väärtusi eellasega, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Punase kastiga on märgitud isolaadid, mille MBC väärtuste muutus eellasest oli statistiliselt oluline (\*\*P<0,01) ning mis kaasati edasistesse mutantide kirjeldamise katsetesse.**

Sekundaarsete isolaatide esmaseks testimiseks määrati nende  $\text{AgNO}_3$  ja  $\text{CuSO}_4$  MBC-d 24 h ekspositsiooniga DI-s, järgides populatsioonide kirjeldamisel kasutatud meetodikat, kus bakteriproovid valmistati ette tardsöötme kultuuride biomassi suspendeerimisel. Esimese korduskatse järel elimineeriti isolaadid, mille vähenenud metallisoola tundlikkus ei olnud korratav. Ülejäänutega korrati MBC katset veel kaks korda. Kõigist testitud sekundaarsetest isolaatidest kerkisid esile H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) ja H4NR\_MBC\_Ag-SL(108), mis talusid võrreldes eellasega oluliselt paremini nii vase- kui ka hõbedaioone (Joonis 6), ning seetõttu sekveneeriti nende täisgenoom ja sekveneerimisandmetega viidi Sandra Pargi ja Merilin Rosenbergi poolt läbi mutatsioonianalüüs (Lisa 3).

Populatsioonide antibiootikumi MIC määramise katsetest isoleeritud antibiootikumitolerantsemate üksikkolooniate testimiseks määrati neile agarlahjenduse meetodil Amp-i, Gen-i, Cip-i ja Cst-i MIC väärtused, mida võrreldi evolutsiooni eellasega. Lisaks testiti püsiva metallitolerantse fenotüübiga isolaatide antibiootikumi tundlikkust eesmärgiga tuvastada ristresistentsust. Enamiku vähenenud antibiootikumi tundlikkuse põhjal valitud sekundaarse isolaatide tolerantsuse fenotüüp (kõrgem MIC) ei olnud korratav. Iseäranis palju esines ühekordset näilist Cst tolerantsust: kõigi Cst tolerantsuse põhjal valitud sekundaarsete isolaatide Cst MIC oli täiendavalt testimisel võrdne evolutsioonikatse eellasega. Evolutsioneerunud populatsioonide Cst MIC väärtuste varieeruvust ja isolaatide ühekordset tolerantsust võis põhjustada katioonse antibiootikumi varieeruv seondumine katsetes kasutatud polüstüreenist laboriplastikuga, mis võib oluliselt vähendada antibiootikumilahuse efektiivset kontsentratsiooni (Karvanen *et al.*, 2017). Teisalt võis ühekordset Cst tolerantsust põhjustada evolutsioneerunud populatsioonide MIC katse meetodika, kus evolutsioneerunud populatsioone kasvatati heterogeensuse säilitamise eesmärgiga katseks ette tardsöötmele ning MIC katses kasutati geneetiliselt ja füsioloogiliselt heterogeenseid biomassi suspensioone. Seetõttu võis tardsöötmele kasvanud sessiilsetes bakteripopulatsioonides esineda Cst heteroresistentsus (*heteroresistance*), kus üldjoontes antibiootikumi tundliku populatsiooni sees esinevad resistentsed alampopulatsioonid (Liao *et al.*, 2020; Rinder, 2001). On leitud, et heteroresistentsete alampopulatsioonide resistentsusfenotüüp kaob selektsiooni puudumisel kiiresti (25 kuni 27 generatsiooniga) (Andersson *et al.*, 2019). See selgitaks, miks sekundaarsete isolaatide Cst tolerantsust ei olnud täiendavalt testimisel korratav. Osade isolaatide Amp-i, Gen-i või Cip-i tundlikkus oli statistiliselt olulisel määral eellasest muutunud (Lisa 9) ning üksikute sekundaarsed isolaadid olid resistentsed ( $\text{MIC} > \text{epidemioloogiline läviväärtus}$ ). Töömahu optimeerimiseks ei kaasatud edasistesse katsetesse antibiootikumiresistentseid isolaate, kellel ei esinenud samaaegselt metallitundlikkuse muutusi.

### 2.3.3. Mutantide iseloomustamine

Selleks, et hinnata evolutsioneerunud populatsioonidest tuvastatud mutatsioonide mõju bakterite metalli- ja antibiootikumitundlikkusele hinnati töö juhendajate Sandra Pargi ja Merilin Rosenbergi poolt läbi viidud mutatsioonianalüüsis tuvastatud mutatsioonide, mille funktsioon metalli stressivastuses oli huvipakkuv ning esinemissagedus populatsioonides oli vähemalt 20% (Lisa 2), mõju antimikroobsele tundlikkusele. Mutantide testimisse kaasati Sandra Pargi poolt populatsioonidest isoleeritud huvipakkuvaid mutatsioone kandvad isolaadid (eristavalt primaarsed isolaadid), Pargi konstrueeritud mitme geeni deletsioonmutant ja eelnevalt tuvastatud kaks metallitolerantset sekundaarset isolaati. Lihtsustavalt nimetatakse valitud sekundaarseid ja primaarseid isolaate ning konstrueeritud deletsioonmutanti edaspidi mutantideks. Lisas 4 on toodud täiendavasse testimisse kaasatud mutantide nimetused, nendes leiduvate huvipakkuvate mutatsioonide lookused, mõjutatud geenid ning nende funktsiooni annotatsioonid. Mutantide täielikud mutatsiooniprofiilid on toodud lisas 2.

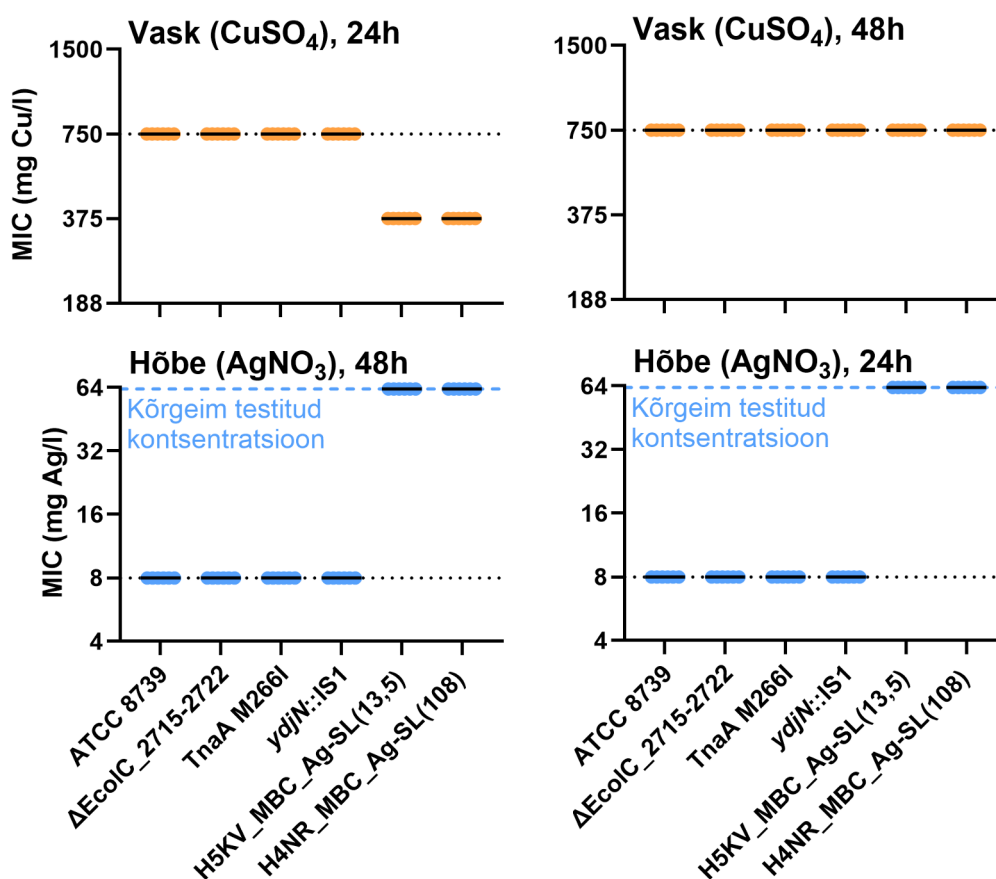
#### 2.3.3.1. Mutantide tundlikkus metallisooladele

Kõikidele mutantidele leiti agarlahjenduse meetodil AgNO<sub>3</sub> ja CuSO<sub>4</sub> MIC väärtused. MIC katse tulemustest selgus, et populatsioonides esinenud mutantide (TnaA M266I; *ydjN*::IS1 ja ΔEcolC\_2715-2722) ioonse vase ja hõbeda MIC väärtused ei erinenud metsiktüübist (Joonis 7) On võimalik, et nimetatud mutatsioone selekteeriti evolutsioonis, sest annavad metallpinnal eluspüsimisel teatava eelise, kuid ei taga paremat kasvamisvõimet pinnalt vabanevate metalliioonide juuresolekul MIC testi formaadis või on muutus nii väike, et parem kasvamisvõime ei ole kasutatud testiformaadiga tuvastatav.

Märkimisväärselt oli aga muutunud sekundaarsete isolaatide H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) ja H4NR\_MBC\_Ag-SL(108) metallitundlikkus. Nimetatud isolaatide mutatsioonianalüüsist selgus, et mõlemad neist omasid erinevaid punktmutatsioone *silS* ning isolaat H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) lisaks ka *cusA* geenis (Lisa 3). SilS ja CusA kuuluvad *E. coli* ATCC 8739 kromosomaalsete hõbeda- ja vaseioonide detoksifitseerimise süsteemidesse (Lisa 4) (Blanco Massani *et al.*, 2018; Randall *et al.*, 2015). Küll aga ei tuvastatud Sil süsteemi geenide mutatsioone metallpinnal evolutsioneerunud populatsioonides (Lisa 2), mistõttu võib eeldada, et need mutatsioonid tekkisid juhuslikult peale evolutsioonikatset ning andsid selge eelise ioonse hõbeda ekspositsioonil MBC testi formaadis, kuid mitte hõbeda pinnaekspositsiooni tingimustes.

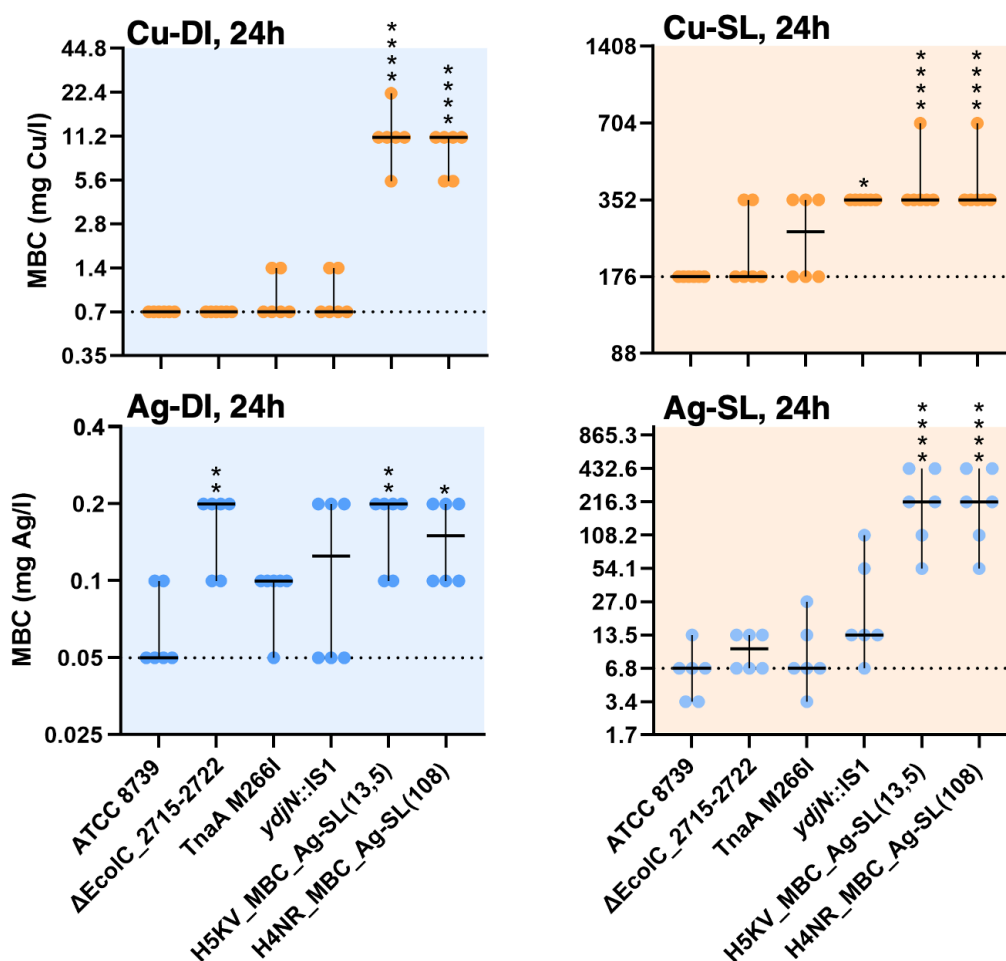
*SilS* mutantide hõbeda MIC oli metsiktüübiga võrreldes vähemalt 8-korda tõusnud ning mõlemad isolaadid suutsid kasvada kõige kõrgemal testitud AgNO<sub>3</sub> kontsentratsioonil (63 mg

Ag/l) (Joonis 7). Erinevates patogeensetes *Enterobacteriaceae* perekonna bakterites on tähendatud, et muutused *silS* geenis põhjustavad võrreldes metsiktüübiga 16- kuni 32-korda kõrgemaid hõbeda MIC väärtusi (Elkrewi *et al.*, 2017; Woolley *et al.*, 2022). Huvitaval kombel ilmnes, et vask inhibeeris *silS* mutantide kasvu: MIC oli 24 h inkubatsiooni järel metsiktüübist kaks korda madalam, kuid pikemal inkubatsioonis (48 h) osutus metsiktüübiga võrdseks. Kuigi agarlahjenduse standardprotokolli järgi määratakse antimikroobse aine MIC 24-tunnise inkubatsiooni järel (EUCAST, 2000), siis vasksulfaadi MIC testimisel leidub kirjanduses näiteid 48 h inkubatsioonist (Santo *et al.*, 2010; F. Xu *et al.*, 2022). Teadaolevalt ei ole eelnevalt kirjeldatud vase pärssivat mõju *Sil/Cus* süsteemi mutantide kasvule. Küll aga on leitud, et *Klebsiella pneumoniae silS* mutantidel ei esinenud üldisi kasvudefekte rikastussöötmes (Woolley *et al.*, 2022), mis kehtis ka antud töös kirjeldatud *silS* mutantide puhul (Lisa 8c).



**Joonis 7. Mutantide vase (CuSO<sub>4</sub>) ja hõbeda (AgNO<sub>3</sub>) minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC) 24 ja 48 h inkubatsiooni järel.** Joonisel on toodud metsiktüüpi *E. coli* ATCC 8739, deletsioonmutant (ΔEcolC\_2715-2722), 2 populatsioonidest isoleeritud mutanti (TnaA M266I ja ydjN::IS1) ning 2 populatsioonide metallisoolade MBC määramise katsetes isoleeritud sekundaarset isolaati (H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) ja H4NR\_MBC\_Ag-SL(108)). Andmepunktidena on esitatud korduskatsetes (3 bioloogilist, 2 tehnilist) agarlahjenduse meetodiga leitud MIC väärtused log<sub>2</sub> skaalal. Hõbeda (Ag) graafikutele on sinise punktiirjoonega tähistatud kõrgeim testitud AgNO<sub>3</sub> kontsentratsioon (64 mg Ag/l).

Sarnaselt MIC katsega leiti ka MBC katsetes, et *silS* mutandid talusid hõbeda ioonide ekspositsiooni paremini nii toitainevaeses DI-s kui ka toitainerikkas SL-s, kuid MBC kordne muutus metsiktüves oli oluliselt suurem SL-s (Joonis 8). Kuigi vaseioonid pärssisid *silS* mutantide kasvu tardsöötmel, siis MBC katsetes talusid mõlemad mutandid vaseioonide ekspositsiooni metsiktüübist statistiliselt oluliselt paremini nii SL-s kui ka DI-s, kuid vase puhul oli MBC kordne muutus metsiktüübist suurem DI-s (Joonis 8). Kusjuures *Sil* mutantide vase ja hõbeda MBC-des avaldunud vastupidine keskkonna efekt oli sarnane populatsioonides kirjeldatuga, mis võib viidata ühisele põhjusele. Nagu eelnevast arutlusest selgus ei ole sellise vastupidise efekti põhjus lihtsasti selgitatav. On võimalik, et olulist rolli mängib vaseioonidele iseloomulik SL keskkonna hapestamine. Samuti ei saa välistada, et vase ja hõbeda tundlikkuse vastupidine keskkonnaefekt on põhjustatud erinevustest hõbeda- ja vaseioonide põhjustatud stressivastuses.



**Joonis 8. Mutantide vase (CuSO<sub>4</sub>) ja hõbeda (AgNO<sub>3</sub>) minimaalsed bakteriitsidised kontsentratsioonid (MBC), määratud 24-h ekspositsiooni järel toitainerikkas SL-is (kollasel taustal) ja toitainevaeses DI-s (sinisel taustal). Joonisel on näha metsiktüüpi *E. coli* ATCC 8739, deletsioonmutandi (ΔEcolC\_2715-2722), 2 populatsioonidest isoleeritud mutandi (TnaA M266I ja *ydjN*::IS1) ja 2 populatsioonide metallisoolade MBC määramise katsetest isoleeritud sekundaarse isolaadi (H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) ja H4NR\_MBC\_Ag-SL(108)). Andmepunktidena on esitatud korduskatsetes (3 bioloogilist, 2 tehnilist) leitud MBC väärtused**

log<sub>2</sub> skaalal. Välja on toodud MBC-de mediaan ja variatsiooniuulatus. Tulemuste statistilisel analüüsil võrreldi kõigi mutantide metallisoola MBC väärtusi metsiktüve vastu, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Märgitud on vaid statistiliselt olulised muutused  $P^* < 0,05$ ;  $**P < 0,01$  ja  $****P < 0,0001$ .

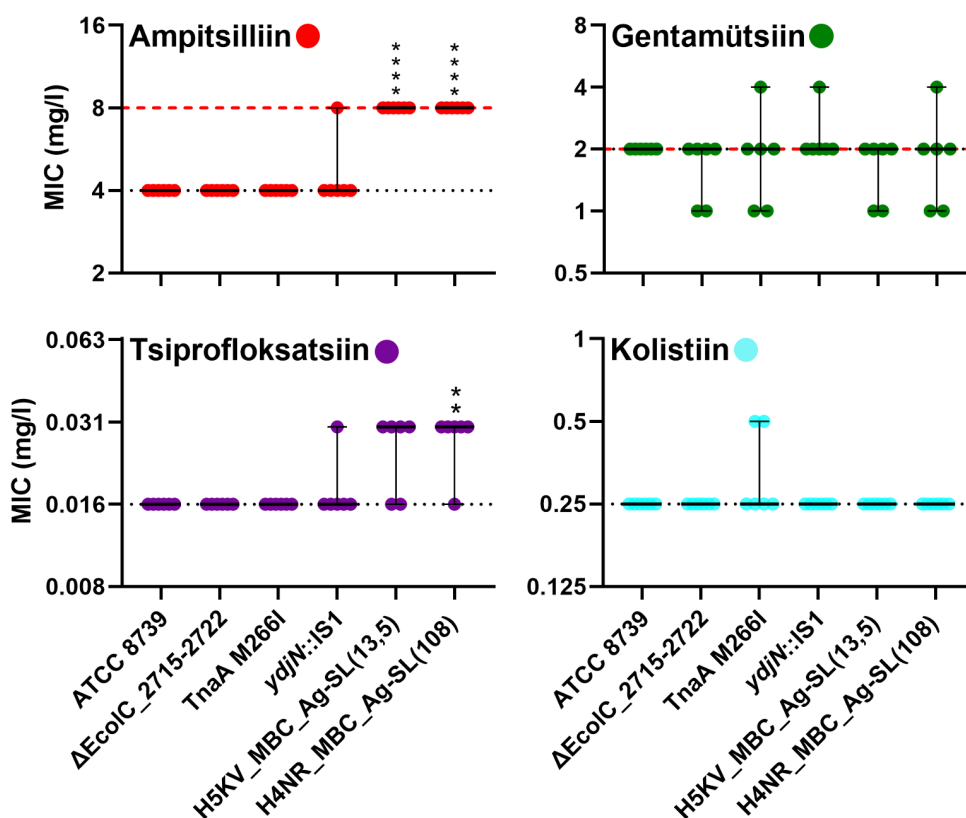
Populatsioonides esinenud mutantidest talus näiteks *ydjN*::IS1 vaseioone metsiktüübist oluliselt paremini SL-s. On näidatud, et *ydjN* tsüstiini/tsüsteiini transporterit kodeeriva geeni deleteerimine vähendab *E. coli* tundlikkust toksilisele metalliühendile L-selenotsütiin (Deutch *et al.*, 2014). Sarnaselt seleenile reageerib ka vask väävlit sisaldavate aminohapete ja nende derivaatidega (Furia & Sindona, 2010; Selden *et al.*, 2024), seetõttu on võimalik, et insertioon *ydjN* geenis põhjustab selle funktsioonikao, mille tulemusel ei transpordita rakku väävlit sisaldavate aminohapetega seotud vaske. Kuigi ka mitme geeni deletsioonmutant  $\Delta EcolC_{2715-2722}$  talus DI-s hõbedat metsiktüübist statistiliselt oluliselt paremini, oli tulemuste katsetevahelise varieeruvuse tõttu selle võimalikku bioloogilist mõju keeruline hinnata. Lühikese metalliekspositsiooniga (2 h) ilmnesid mutantide metallitaluvuses sarnased trendid, kuid suurem andmegruppide sisene varieeruvus raskendas sisuliste järelduste tegemist, mistõttu on lühikeses ajapunktis määratud MBC tulemused toodud lisades (Lisa 10).

Eelkirjeldatud mutantide metallitundlikkuse kirjeldamisega suudeti tuvastada vase- ja hõbedatundlikkust oluliselt mõjutavaid mutatsioone. Eriliselt kerkisid esile kaks populatsioonide iseloomustamise katsetest valitud sekundaarset isolaati, mis olid mutatsioonide tõttu *silS* geenis resistentsed hõbedaioonide suhtes ning teatud tingimustes tolerantsemad ka vaseioonide suhtes. Küll aga ei esinenud metallitolerantsust tagavad *Sil* süsteemi mutatsioonid pindadel evolutsioneerunud populatsioonides, vaid tekkisid *de novo* populatsioonide hõbeda MBC määramise katse käigus, kus need mutatsioonid andsid kõrge ioonse hõbeda kontsentratsiooni juures eelise. Kuigi MIC ja MBC katseformaatides andsid *silS* mutatsioonid bakteritele märkimisväärse eelise, siis hõbeda ja vase pinnaekspositsioonis ei omanud need olulist kaitsvat efekti (Lisa 11), ning tõenäoliselt ei akumulierenud need seetõttu ka evolutsioonikatsetes. Kuigi evolutsioneerunud populatsioonides esinenud mutatsioonide (*tnaA*, *ydjN*, *cspD*, *clpS*) mõju bakterite ioonse vase või hõbeda tundlikkusele oli võrreldes *silS* mutantidega väike, ei saa välistada, et need omasid kroonilisel metalli pinnaekspositsioonil olulist bioloogilist mõju.

### **2.3.3.2. Mutantide tundlikkus antibiootikumidele**

Hinnati mutantide antibiootikumitundlikkuse muutusi metsiktüübist. Deletsioonmutandi ja primaarsete isolaatide tundlikkus testitud antibiootikumide suhtes ei erinenud metsiktüübist, küll aga talusid mõlemad sekundaarsed isolaadid oluliselt paremini Amp-i ja isolaat H5KV\_MBC\_Ag-SL(108) ka Cip-i (Joonis 9). Isolaatides leiduvaid *Sil* süsteemi mutatsioone

on ka eelnevalt seostatud Amp-i ja Cip-i tolerantsusega, kusjuures Massani *et al.* (Blanco Massani *et al.*, 2018) töös olid *silR* mutandi Amp-i ja Cip-i MIC kordne muutus metsiktüvest võrreldavad antud töös leituga. Senini pole selgitust leidnud molekulaarne mehhanism, kuidas mutatsioonid *Sil* Ag-väljavoolu süsteemis võiksid vähendada antibiootikumide toksilisust. Üks mõeldav põhjendus *silS* mutantide Amp-i ja Cip-i tolerantsusele on, et *SilS* regulaator suudab lisaks Ag-väljavoolule reguleerida ka teiste kemikaalide tolerantsusmehhanisme. Näiteks sarnaselt *Salmonella enterica*'s kirjeldatud BaERS regulaatorvalkudele, mis indutseerivad kahte eraldiseisvat antibiootikumi väljavoolu süsteemi AcrD ja MdtABC, mis muuhulgas panustavad ka metallitolerantsusesse (Cu, Zn) (Nishino *et al.*, 2007).



**Joonis 9. Mutantide antibiootikumide minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIC).** Joonisel on toodud metsiktüüpi *E. coli* ATCC 8739, deletsioonmutant ( $\Delta$ EcolC\_2715-2722), 2 populatsioonidest isoleeritud mutanti (TnaA M266I ja *ydjN*::IS1) ning 2 populatsioonide metallisoolade MBC määramise katsetes isoleeritud sekundaarset isolaati (H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) ja H4NR\_MBC\_Ag-SL(108)). Andmepunktidena on log<sub>2</sub> skaalal esitatud korduskatsetes (3 bioloogilist, 2 tehnilist) agarlahjenduse meetodiga leitud antibiootikumide MIC väärtused, nende mediaan ja variatsiooniulatus. Punane punktiirjoon tähistab antibiootikumi resistentsuse epidemioloogilist piirväärtust. Statistilises analüüsis võrreldi mutantide antibiootikumi MIC-e metsiktüübi vastavate väärtustega, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Märgitud on statistiliselt olulised muutused  $P^{**}<0,01$  ja  $P^{****}<0,0001$ .

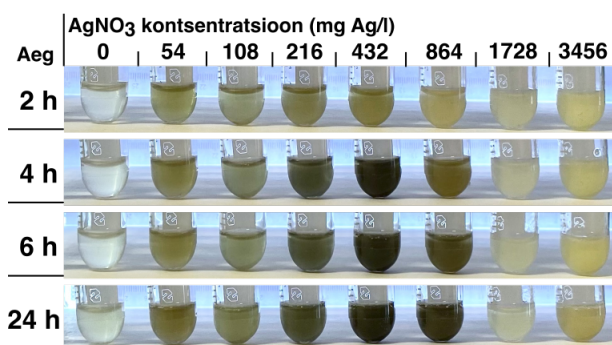
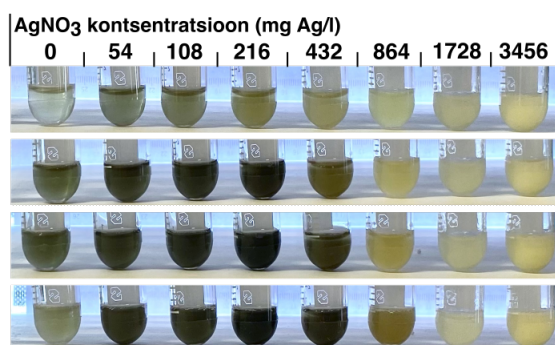
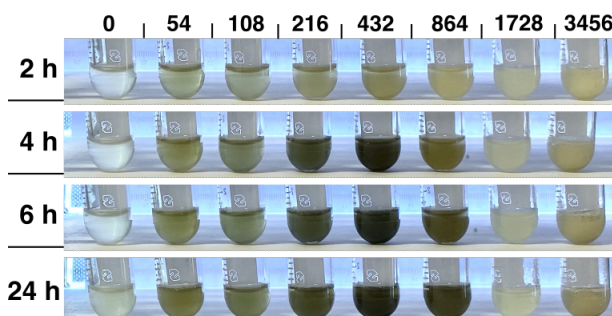
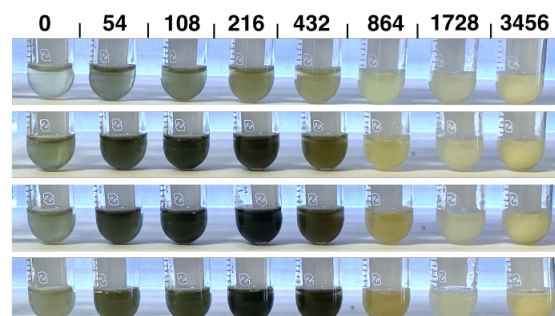
Mutantide antibiootikumitundlikkuse katse tulemustest saab järeldada, et vase ja hõbeda pinnaevolutsiooniga kinnistunud mutatsioonid (*tnaA*, *ydjN*, *cspD* geenides) ei põhjustanud

resistentsust testitud antibiootikumide suhtes. Küll aga olid hõbedaioonide resistentsed *silS* mutandid oluliselt vähem tundlikud ampitsilliini ja tsiprofloksatsiini suhtes, kuid arvestades, et *silS* mutatsioonid ei kinnistunud pinnaevolutsiooniga on antibiootikumiresistentsuse tekke risk antimikroobsete vasest ja hõbedast pindade kasutamisel vähe tõenäoline.

#### **2.3.4. Divesiniksulfiidi tootmine hõbedaioonide juuresolekul**

Evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonianalüüsis kerkis esile spetsiifiline missenssmutatsioon (Met → Ile) trüptofanaasi ensüümi kodeerivas *tnaA* geenis, mis esines varieeruva sagedusega kõigis NR tingimustes hõbedal evolutsioneerunud populatsioonides (Lisa 2). Kuna mutatsioon põhjustas ensüümi aktiivsenti läheduses hõbedatundliku metioniini asendumist hõbedatundetuma isoleutsiiniga (Clem Gruen, 1975) tõstatus hüpotees, et mutatsiooni toimel säilitatakse rakus hõbedastressi tingimustes trüptofanaasi aktiivsust. Trüptofanaas on eelkõige tuntud L-trüptofaani indooliks, püruvaadiks ja ammooniumiks lagundamise reaktsiooni poolest, kuid metallistressi kontekstis võiks olulisem olla L-tsüsteiini lagundamise reaktsioonis tekkiv divesiniksulfiid (H<sub>2</sub>S) (Newton & Snell, 1964). Nimelt on eelnevalt bakterites H<sub>2</sub>S-i tootmist seostatud mitmete raskemetallide (Ag, Hg, Cd) detoksifitseerimisega, läbi lahustumatute sulfiidsoolade moodustumise (Aiking *et al.*, 1982; Pan-Hou & Imura, 1981; Slawson *et al.*, 1992). Hüpoteesi testimiseks võrreldi kvalitatiivselt 70% sagedusega *tnaA* M266I mutatsiooni kandva evolutsioneerunud populatsiooni (NR-H4) ja metsiktüübi toodetud H<sub>2</sub>S-i hulka AgNO<sub>3</sub> juuresolekul.

Esimestes katsetes seati eesmärgiks metsiktüübi ja *tnaA* mutantse populatsiooni H<sub>2</sub>S-i tootmist võrrelda tardsöötmes, kuhu lisati ensüümi substraat L-tsüsteiin, H<sub>2</sub>S-i indikaator raud(III)ammooniumtsitraat ning kahekordsete lahjendustena AgNO<sub>3</sub>. Hüpoteesi kohaselt säilitaks *tnaA* mutantne populatsioon hõbedal MIC lähedases kontsentratsioonis trüptofanaasi katalüütilist aktiivsust, ning toodaks metsiktüübist rohkem H<sub>2</sub>S-i, mida saaks tuvastada söötmes raudsulfiidi tõttu moodustuva intensiivsema musta värvuse järgi. Katse käigus selgus, et bakterid suutsid kasvada kõrgeimal testitud AgNO<sub>3</sub> kontsentratsiooni juures (4x MIC), millest järeldati, et tsüsteiini lisamine testsüsteemi komplekseeris hõbedaiooni ning vähendas nende toksilisust (Vickery & Leavenworth, 1930). Kuna agarlahjenduse meetod ei võimaldanud testida kõrgeid hõbedal kontsentratsioone, mis kompenseeriks tsüsteiini mõju, modifitseeriti katseskeemi vedela katsekeskkonna jaoks.

**A *E. coli* ATCC 8739****B *E. coli* ATCC 8739 + Fe<sup>3+</sup>****C *tnaA* mutatsiooniga populatsioon****D *tnaA* mutatsiooniga populatsioon + Fe<sup>3+</sup>**

**Joonis 10. Vesiniksulfiidi (H<sub>2</sub>S) tootmine hõbenitraadi juuresolekul.** Joonisel on näha *E. coli* ATCC 8739 metsiktüüp (A ja B) ning toitainerikkas ja niiskes hõbeda pinnal evolutsioneerunud populatsioon, milles esines kõrge sagedusega mutatsioon trüptofanaasi (*tnaA*) geenis (C ja D). H<sub>2</sub>S-i tootmist indikeerib must sade (sulfiidsool) kasvukeskkonnas (orgaaniline saastelahus + L-tsüsteiin). Kasvukeskkonda lisati kahekordsete lahjendustena hõbenitraati (AgNO<sub>3</sub>). Esitatud on erinevates ajapunktides jäädvustatud värvusreaktsioonid, mis tekkisid indikaatori (raud(III)ammooniumtsitraat) lisamisel (B ja D) ning indikaatorist sõltumatu värvusreaktsioon eeldatavasti hõbeda toimel (A ja C).

Vedelaks katsekeskkonnaks valiti evolutsioonikatses kasutatud SL, millele lisati L-tsüsteiin, raud(III)ammooniumtsitraat, AgNO<sub>3</sub> lahjendused ja dikaaliumfosfaat (puhversool). Selleks, et minimeerida H<sub>2</sub>S-i kadu katsekeskkonnast kasutati suletud korgiga kultuurituube. Joonisel 10B on näha, et *E. coli* ATCC 8739 toodab H<sub>2</sub>S-i nii hõbeda juuresolekul kui ka puudumisel. Kuna ka *tnaA* mutantne populatsioon tootis H<sub>2</sub>S-i, saab väita, et tegu ei olnud H<sub>2</sub>S-i tootmist oluliselt pärssiva mutatsiooniga (Joonis 10D). Küll aga ei olnud kasutatud testsüsteemiga võimalik tuvastada erinevusi metsiktüve ja *tnaA* mutatsiooni kandva populatsiooni H<sub>2</sub>S-i tootmises hõbedaioonide juuresolekul ja seda mitmel põhjusel. Esiteks vähendas tsüsteiini lisamine ioonse hõbeda toksilisust ning bakterid kasvasid MBC-st 64-korda kõrgemate AgNO<sub>3</sub> kontsentratsioonide juures. Sedavõrd kõrgetel hõbeda kontsentratsioonidel reageerisid omavahel kasvukeskkonna erinevad komponendid, mille sadenemisest tingitud turbiidsus segas kolorimeetrilist analüüsi. Turbiidsust tekitab ka bakterite kasvav biomass, mis muutis tihedas kultuuris musta värvuse näiliselt heledamaks, näiteks nagu on näha joonisel 10B ilma hõbedata 6 h ja 24 h ajapunkti värvuste võrdlemisel. Kasvust tulenevat turbiidsust võib aga omakorda mõjutada hõbeda lisamisest tulenev kasvuinhibitsioon. Joonisel 10A ja 10C on näha, et ka hõbe

ise reageeris H<sub>2</sub>S-iga, mille tulemusel tekkis raudsulfiidist eristamatu must sade. Seetõttu ei olnud võimalik kindlaks määrata, kas intensiivsem värvusreaktsioon hõbeda kontsentratsiooni tõustes tulenes intensiivsemast H<sub>2</sub>S-i tootmisest, väiksemast biomassi turbiidsusest inhibeeriva aine juuresolekul või pelgalt sellest, et keskkonnas leidis rohkem H<sub>2</sub>S-iga reageerides musta sadet moodustavaid ioone. Sarnase järelduseni jõudsid ka Slawson *et al.*, kes võrdlesid hõbedaresistentse ja -tundliku *Pseudomonas stutzeri* tüve H<sub>2</sub>S-i tootmist ioonse hõbeda juuresolekul. Leiti, et kuigi hõbedatundliku tüve kultuurist suudeti pliiatsetaat paberitega tuvastada rohkem H<sub>2</sub>S-i, tekkis samas hõbedaresistentse tüve kasvukeskkonda rohkem musta sadet (eeldatavasti hõbesulfiid), ning sellest järeldati, et hõbeda juuresolekul ei ole võimalik tuvastada erinevusi tüvede H<sub>2</sub>S-i tootmises (Slawson *et al.*, 1994).

Kuigi ei saa välistada, et *tnaA* M266I mutantsed bakterid suudavad hõbedastressi korral toota metsiktüübist rohkem H<sub>2</sub>S-i, on mutatsiooni põhjustatud muutused liiga väikesed, et neid kasutatud testsüsteemiga tuvastada. Leidub allikaid, mille väitel on pliiatsetaat H<sub>2</sub>S-i tuvastamiseks tundlikum kui rauasoolad (ZoBell & Feltham, 1934), ning võibolla oleks pliiatsetaat paberite kasutamisel võimalik tuvastada väiksemaid erinevusi *tnaA* mutantsete ja metsiktüüpi bakterite toodetud H<sub>2</sub>S-i kogustes. Suurem tundlikkus võimaldaks vähendada ka söötmesse lisatava L-Cys hulka mis aitaks vähendada hõbeda komplekseerumist. Samas ei lahendaks pliiatsetaat paberite kasutamine hõbeda ja H<sub>2</sub>S-i reageerimise probleemi ega erinevusi kasvuinhibitsioonis.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli iseloomustada tsükliliselt antimikroobsetele metallpindadele eksponeeritud *Escherichia coli* ATCC 8739 fenotüüpi, keskendudes antimikroobse tolerantsuse ja selle tekkega seotud tunnuste tuvastamisele. Lisaks kirjeldati evolutsioneerunud populatsioonide mutatsioonianalüüsist tuvastatud huvipakkuvate mutatsioonide mõju bakterite ioonsete metallide ja antibiootikumide tolerantsuses.

Leiti, et vase ja hõbeda pindadel evolutsioneerunud populatsioonid ei suutnud eellasega võrreldes pindadelt vabanevate metallioonide juuresolekult märkimisväärselt paremini kasvada ega mööduvat metalliioonide ekspositsiooni edukamalt üle elada. Samuti ei olnud kroonilise pinnaekspositsiooniga oluliselt muutunud bakteripopulatsioonide tundlikkus erineva toimemehhanismiga antibiootikumide suhtes ning populatsioonidel ei ilmnenud mutaatori fenotüüpi, mis võimaldaks kiiremini omandada antimikroobse tolerantsuse kui ka üldisi patogeensuse mehhanisme. Antimikroobsete metallipindade efektiivse kasutamise vaatenurgast on töös leitud positiivne, sest näitab, et metallpindade kasutamine ei pruugi kiirendada bakterites antimikroobsete ühendite tolerantsuse teket.

Laborievolutsiooni katse käigus tekkinud ning kinnistunud huvipakkuvad mutatsioonid *tnaA*, *ydjN* ja *cspD* geenides ei mõjutanud märkimisväärselt *E. coli* vase- ja hõbedaioonide tundlikkust. Sellest võib järeldada, et mutatsioonid nimetatud geenides andsid eelise metalli pinnaekspositsioonis, kuid mitte vedelas katseformaadis või on see eelis liiga väike, et kasutatud meetodikatega tuvastada. Sarnaselt ei osutunud divesiniksulfiidi tootmise kvalitatiivseks tuvastamiseks kasutatud testi formaat piisavalt tundlikuks, et tuvastada erinevusi hõbeda pinnaevolutsiooniga kinnistunud trüptofanaasi mutatsiooni kandva populatsiooni ja evolutsiooni eellase H<sub>2</sub>S-i tootmise võimes hõbedastressi tingimustes. Märkimisväärne tolerantsuse fenotüüp avaldus aga populatsioonide metallisoola tundlikkuse kirjeldamise käigus isoleeritud *silS* mutantidel, kes olid metsiktüübiga võrreldes resistentsed ioonse hõbeda ja tolerantsed vaseioonide suhtes ning lisaks ka tolerantsemad ampitsilliini ja tsiprofloksatsiini suhtes. Sellele vaatamata ei talunud *silS* mutandid metsiktüübist oluliselt paremini hõbeda ja vase pinnaekspositsiooni, mis selgitab, miks neid mutatsioone ei selekteeritud pinnaevolutsiooni katses ning rõhutab ekspositsioonitingimuste olulisust metalli tolerantsusmehhanismide selektsioonil.

## RESÜMEE/ SUMMARY

### **Phenotypic characterization of *Escherichia coli* ATCC 8739 exposed to antimicrobial metal surfaces**

Sigrit Umerov

#### Summary

In the light of the increasing spread of antimicrobial resistance among pathogenic bacteria, there is a growing interest in utilizing alternative methods, such as antimicrobial metal-based surfaces to control the potential pathogen carryover. Even though antimicrobial metals have been used for centuries, the precise mechanisms by which they deactivate bacteria is not completely understood. Additionally, not much is known about how prolonged sublethal exposure of bacteria to metal surfaces may induce the development of undesirable phenotypic traits, such as metal tolerance, leading to decreased efficacy over time or even the emergence of multidrug tolerance. While long-term exposure experiments have been conducted on bacteria growing in liquid environments in the presence of various antimicrobial metals, it is recognized that the stresses bacteria experience on solid surfaces are distinct from those in liquid environments. Therefore, exposure to solid metal surfaces may result in unforeseen adaptations in bacteria.

To better the understanding of bacterial adaptations for survival on antimicrobial metal surfaces, the supervisor of this study, Sandra Park, conducted an experimental evolution experiment, where *E. coli* ATCC 8739 was exposed to copper, silver, glass, and steel surfaces in different exposure conditions for 30 cycles. The aim of the present thesis was to characterize the antimicrobial resistance phenotype of the bacterial populations obtained from the evolution experiment. The evolved populations were screened for ionic metal tolerance, antibiotic cross-resistance and emergence of mutator phenotype, which could accelerate the development of increased tolerance.

Firstly, the fluctuation test was used to ascertain the spontaneous mutation frequency of populations that had evolved on surfaces under high-organic humid conditions, which were then compared to the ancestor of the evolution experiment. From the results of the fluctuation test it was apparent that the mutation frequencies of the evolved populations were not statistically significantly increased. This suggests that the mutator phenotype did not emerge during the evolution experiment. In efforts to employ high-throughput methods for evaluating bacterial susceptibility to metals, minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) tests were used to determine the susceptibility of the evolved populations towards ionic copper and silver. The MIC tests indicated no statistically significant

changes in evolved populations compared to the ancestor, suggesting chronic surface exposure may not have favoured enhanced growth in the presence of metal ions, or the MIC method may lack sensitivity to detect smaller advantageous changes. In MBC tests, some populations displayed statistically significantly increased tolerance to metal ions respective to the evolution surface compared to the ancestor. Although these small changes weren't associated with identified mutations, they could potentially arise from non-genetic physiological adaptations due to prior metal exposure. Regarding the possibility of metal surfaces selecting for a multidrug tolerance phenotype, no changes were observed in the susceptibility of the evolved populations against four antibiotics with varying modes of action.

Furthermore, the impact of specific mutations identified in the mutation analysis of evolved populations on susceptibility to ionic metals and antibiotics was investigated by comparing the MIC and/or MBC values with wild-type *E. coli* ATCC 8739. Despite their selection in the surface evolution experiment, these mutations did not confer significant advantages in evading the inhibitory or bactericidal effects of ionic metals, nor did they alter antibiotic susceptibility. Conversely, when susceptibility of two silver ion efflux system (*silS*) mutants isolated from the MBC experiment of evolved populations, was tested a substantial increase in ionic silver and copper tolerance, along with enhanced tolerance of ampicillin and ciprofloxacin, was observed. However, the *silS* mutations were not detected in any of the surface-evolved populations: instead, they emerged *de novo* during the MBC experiment. When the *silS* mutants were tested on silver surfaces by Sandra Park, no differences from wild type were observed, which further emphasizes the difference in bacterial defence mechanisms and selection dynamics between antimicrobial metal exposure in liquid *versus* surface format.

In the present thesis it was observed that prior exposure of *E. coli* ATCC 8739 to antimicrobial metal surfaces did not induce increased mutation frequency via a mutator phenotype. Furthermore, it did not result in increased susceptibility towards metal ions respective to the surfaces, nor did it lead to antibiotic cross-resistance. The mutations acquired during evolution did not confer antimicrobial tolerance traits comparable to those seen with mutations in the *Sil*-system selected through a single round of high silver exposure in a liquid environment. These results suggest that chronic exposure to metal surfaces may not expedite the emergence of antimicrobial tolerance in bacteria.

## **TÄNUSÕNAD**

Ennekõike soovin tänada oma juhendajaid Merilin Rosenbergi ja Sandra Parki, nende suurepärase juhendamise ja väärtuslike teadmiste jagamise eest. Samuti olen tänulik kõigile meie uurimisgrupi liikmetele nende abi ja toetuse eest. Lõpetuseks tänan uurimisgrupi juhti Angela Ivaskit kaasamast mind niivõrd huvitavasse uurimisprojekti.

Töö on seotud Eesti Teadusagentuuri projektid PRG1496 ja Haridus- ja Teadusministeeriumi projektiga TK210.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Aiking, H., Kok, K., van Heerikhuizen, H., & van 't Riet, J. (1982). Adaptation to Cadmium by *Klebsiella aerogenes* Growing in Continuous Culture Proceeds Mainly via Formation of Cadmium Sulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 938–944. <https://doi.org/10.1128/aem.44.4.938-944.1982>
- Alhazmi, H. A. (2019). FT-IR Spectroscopy for the Identification of Binding Sites and Measurements of the Binding Interactions of Important Metal Ions with Bovine Serum Albumin. *Scientia Pharmaceutica*, 87(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/scipharm87010005>
- Andersson, D. I., Nicoloff, H., & Hjort, K. (2019). Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature Reviews Microbiology*, 17(8), 479–496. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0218-1>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5–16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Anraku, Y., & Gennis, R. B. (1987). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 262–266. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90131-9](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90131-9)
- Aryal, S. (2015, august 24). *Mueller Hinton Agar (MHA) – Composition, Principle, Uses and Preparation*. Microbiology Info.Com. <https://microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-composition-principle-uses-and-preparation/>
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., & Takagi, H. (2005). Identification and Functional Analysis of *Escherichia coli* Cysteine Desulfhydrases. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4149-4152.2005>
- Baker, C. N., Stocker, S. A., Culver, D. H., & Thornsberry, C. (1991). Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 533–538. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.3.533-538.1991>
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.006>
- Baquero, F. (2001). Low-level antibacterial resistance: A gateway to clinical resistance. *Drug Resistance Updates*, 4(2), 93–105. <https://doi.org/10.1054/drup.2001.0196>
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Copper. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 217–230. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102421>
- Blanco Massani, M., Klumpp, J., Widmer, M., Speck, C., Nisple, M., Lehmann, R., & Schuppler, M. (2018). Chromosomal Sil system contributes to silver resistance in *E. coli* ATCC 8739. *BioMetals*, 31(6), 1101–1114. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0143-1>
- Bleichert, P., Bütöf, 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>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>

- Clem Gruen, L. (1975). Interaction of amino acids with silver(I) ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 386(1), 270–274. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90268-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90268-8)
- Cooper, R. A., Knowles, P. F., Brown, D. E., McGuirl, M. A., & Dooley, D. M. (1992). Evidence for copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine quinone cofactors in an amine oxidase from the gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal*, 288(Pt 2), 337–340.
- Davis, R., & Pezzlo, M. (2023, mai 9). 3.17.24 Kligler's Iron Agar Test and Triple Sugar Iron Agar Test | 3.17 Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. <https://www.clinmicronow.org/doi/10.1128/9781683670438.CMPH.ch3.17-24>
- Deutch, C. e., Spahija, I., & Wagner, C. e. (2014). Susceptibility of *Escherichia coli* to the toxic L-proline analogue L-selenaproline is dependent on two L-cystine transport systems. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), 1487–1499. <https://doi.org/10.1111/jam.12623>
- Dong, F., Quevedo, A. C., Wang, X., Valsami-Jones, E., & Kreft, J.-U. (2022). Experimental evolution of *Pseudomonas putida* under silver ion versus nanoparticle stress. *Environmental Microbiology*, 24(2), 905–918. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15854>
- EPA. (2022). *Test method for evaluating the efficacy of antimicrobial surface coatings MB-40-00*. U.S. Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/system/files/documents/2022-09/MB-40-00.pdf>
- Essa, A. M. M., Al Abboud, M. A., & Khatib, S. I. (2018). Metal transformation as a strategy for bacterial detoxification of heavy metals. *Journal of Basic Microbiology*, 58(1), 17–29. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700143>
- EUCAST. (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9), 509–515. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x>
- EUCAST. (1998). Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. *Clinical Microbiology and Infection*, 4(5), 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1998.tb00061.x>
- Fan, F., & Macnab, R. M. (1996). Enzymatic Characterization of FliI: AN ATPase INVOLVED IN FLAGELLAR ASSEMBLY IN SALMONELLA TYPHIMURIUM\*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 31981–31988. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.31981>
- Franke, S. (2007). Microbiology of the Toxic Noble Metal Silver. D. H. Nies & S. Silver (Toim), *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (1k 343–355). Springer. [https://doi.org/10.1007/7171\\_2006\\_084](https://doi.org/10.1007/7171_2006_084)
- Franke, S., Grass, G., & Nies, D. H. (2001). The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology*, 147(4), 965–972. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-965>
- 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>
- Furia, E., & Sindona, G. (2010). Complexation of L-Cystine with Metal Cations. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(9), 2985–2989. <https://doi.org/10.1021/jc901042y>

- Goldstein, F. (2007). The potential clinical impact of low-level antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(1), 1–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl429>
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 902–908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5474>
- Graves, J. L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S. H., & Barrick, J. E. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in Genetics*, 6, 42. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>
- Gupta, A., Matsui, K., Lo, J.-F., & Silver, S. (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature Medicine*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/5545>
- Hao, Z., Lou, H., Zhu, R., ... Chen, P. R. (2014). The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1380>
- Harrison, J. J., Ceri, H., & Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 928–938. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1774>
- Heinaru, A. (2012). Geneetika. Õpik kõrgkoolile. (lk 361). Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Henly, E. L., Dowling, J. A. R., Maingay, J. B., Lacey, M. M., Smith, T. J., & Forbes, S. (2019). Biocide Exposure Induces Changes in Susceptibility, Pathogenicity, and Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(3), e01892-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01892-18>
- Hernández, S. B., Cota, I., Ducret, A., Aussel, L., & Casadesús, J. (2012). Adaptation and Preadaptation of *Salmonella enterica* to Bile. *PLOS Genetics*, 8(1), e1002459. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002459>
- ISO. (2011). *ISO 22196:2011 measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous*.
- Jing, P. P., Li, Y. X., Su, Y. H., Liang, W. L., & Leng, Y. X. (2022). The role of metal ions in the behavior of bovine serum albumin molecules under physiological environment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267, 120604. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120604>
- Karp, P. D., Paley, S., Caspi, R., ... Paulsen, I. (2023). The EcoCyc Database (2023). *EcoSal Plus*, 11(1), eesp00022023. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0002-2023>
- Karvanen, M., Malmberg, C., Lagerbäck, P., Friberg, L. E., & Cars, O. (2017). Colistin Is Extensively Lost during Standard In Vitro Experimental Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), 10.1128/aac.00857-17. <https://doi.org/10.1128/aac.00857-17>
- 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>
- Kobayashi, N., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2001). Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5639–5644. <https://doi.org/10.1128/jb.183.19.5639-5644.2001>
- Komijani, M., Shamabadi, N. S., Shahin, K., Eghbalpour, F., Tahsili, M. R., & Bahram, M. (2021). Heavy metal pollution promotes antibiotic resistance potential in the aquatic

- environment. *Environmental Pollution*, 274, 116569. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116569>
- LeClerc, J. E., Li, B., Payne, W. L., & Cebula, T. A. (1996). High Mutation Frequencies Among *Escherichia coli* and *Salmonella* Pathogens. *Science*, 274(5290), 1208–1211. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1208>
- Leigh, Egbert Giles. (1970). Natural Selection and Mutability. *The American Naturalist*, 104(937), 301–305. <https://doi.org/10.1086/282663>
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, 355(6327), 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>
- Li, X., Gu, A. Z., Zhang, Y., Xie, B., Li, D., & Chen, J. (2019). Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis. *Journal of Hazardous Materials*, 369, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.006>
- Li, X. Z., Nikaido, H., & Williams, K. E. (1997). Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins. *Journal of Bacteriology*, 179(19), 6127–6132. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6127-6132.1997>
- Liao, W., Lin, J., Jia, H., Zhou, C., Zhang, Y., Lin, Y., Ye, J., Cao, J., & Zhou, T. (2020). Resistance and Heteroresistance to Colistin in *Escherichia coli* Isolates from Wenzhou, China. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3551–3561. <https://doi.org/10.2147/IDR.S273784>
- Lim, D. R. X., Chen, Y., Ng, L. F., Gruber, J., & Gan, Y. (2022). Glutathione catabolism by Enterobacteriaceae species to hydrogen sulphide adversely affects the viability of host systems in the presence of 5'fluorodeoxyuridine. *Molecular Microbiology*, 117(5), 1089–1103. <https://doi.org/10.1111/mmi.14893>
- Liu, S., & Zhang, X.-X. (2016). Small colony variants are more susceptible to copper-mediated contact killing for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10), 1143–1151. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000348>
- Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics*, 28(6), 491–511.
- Lyu, Z., Yang, A., Villanueva, P., Singh, A., & Ling, J. (2021). Heterogeneous Flagellar Expression in Single *Salmonella* Cells Promotes Diversity in Antibiotic Tolerance. *mBio*, 12(5), 10.1128/mbio.02374-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.02374-21>
- Mehta, H. H., Prater, A. G., Beabout, K., Elworth, R. A. L., Karavis, M., Gibbons, H. S., & Shamoo, Y. (2019). The Essential Role of Hypermutation in Rapid Adaptation to Antibiotic Stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(7), 10.1128/aac.00744-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00744-19>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749.
- MIC EUCAST. (2024) Antimicrobial wild type distributions of microorganisms [andmebaas] <https://mic.eucast.org/search/> (21.05.2024)
- Molteni, C., Abicht, H. K., & Solioz, M. (2010). Killing of Bacteria by Copper Surfaces Involves Dissolved Copper. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 4099–4101. <https://doi.org/10.1128/AEM.00424-10>
- Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W., & O'Halloran, T. V. (2000). Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5864–5871. <https://doi.org/10.1128/jb.182.20.5864-5871.2000>

- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2002). The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of *Escherichia coli* via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC. *Journal of Bacteriology*, *184*(15), 4161–4167. <https://doi.org/10.1128/jb.184.15.4161-4167.2002>
- 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>
- Nishino, K., Nikaido, E., & Yamaguchi, A. (2007). Regulation of Multidrug Efflux Systems Involved in Multidrug and Metal Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *189*(24), 9066–9075. <https://doi.org/10.1128/jb.01045-07>
- Nordholt, N., Kanaris, O., Schmidt, S. B. I., & Schreiber, F. (2021). Persistence against benzalkonium chloride promotes rapid evolution of tolerance during periodic disinfection. *Nature Communications*, *12*, 6792. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27019-8>
- Ohtsu, I., Kawano, Y., Suzuki, M., Morigasaki, S., Saiki, K., Yamazaki, S., Nonaka, G., & Takagi, H. (2015). Uptake of L-cystine via an ABC transporter contributes defense of oxidative stress in the L-cystine export-dependent manner in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, *10*(4), e0120619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120619>
- Okusu, H., Ma, D., & Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*, *178*(1), 306–308. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.306-308.1996>
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., & Blázquez, J. (2000). High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science*, *288*(5469), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A., & O'Halloran, T. V. (2001). The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(33), 30670–30677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104122200>
- Outten, F. W., Outten, C. E., Hale, J., & O'Halloran, T. V. (2000). Transcriptional Activation of an *Escherichia coli* Copper Efflux Regulon by the Chromosomal MerR Homologue, CueR \*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 31024–31029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006508200>
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. G. J., & Hobman, J. L. (2017). Chapter Seven—Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. R. K. Poole (Toim), *Advances in Microbial Physiology* (Kd 70, lk 261–313). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>
- Pan-Hou, H. S. K., & Imura, N. (1981). Role of hydrogen sulfide in mercury resistance determined by plasmid of *Clostridium cochlearium* T-2. *Archives of Microbiology*, *129*(1), 49–52. <https://doi.org/10.1007/BF00417179>
- Quaranta, D., Krans, T., Santo, C. E., Elowsky, C. G., Domaille, D. W., Chang, C. J., & Grass, G. (2011). Mechanisms of Contact-Mediated Killing of Yeast Cells on Dry Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(2), 416–426. <https://doi.org/10.1128/AEM.01704-10>
- Randall, C. P., Gupta, A., Jackson, N., Busse, D., & O'Neill, A. J. (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: A dissection of endogenous and exogenous mechanisms.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(4), 1037–1046.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dku523>
- Rensing, C., 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 of the United States of America*, 97(2), 652–656.
- Riahi, S., & Rowley, C. N. (2014). Why Can Hydrogen Sulfide Permeate Cell Membranes? *Journal of the American Chemical Society*, 136(43), 15111–15113.  
<https://doi.org/10.1021/ja508063s>
- Rihacek, M., Kosaristanova, L., Fialova, T., ... Cihalova, K. (2023). Zinc effects on bacteria: Insights from Escherichia coli by multi-omics approach. *mSystems*, 8(6), e00733-23.  
<https://doi.org/10.1128/msystems.00733-23>
- Rinder, H. (2001). Hetero-resistance: An under-recognised confounder in diagnosis and therapy? *Journal of Medical Microbiology*, 50(12), 1018–1020.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-12-1018>
- Rosche, W. A., & Foster, P. L. (2000). Determining Mutation Rates in Bacterial Populations. *Methods*, 20(1), 4–17. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0901>
- Rozman, K. K., Doull, J., & Hayes, W. J. (2010). Chapter 1—Dose and Time Determining, and Other Factors Influencing, Toxicity. R. Krieger (Toim), Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition) (1k 3). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00001-X>
- Santo, C. E., Morais, P. V., & Grass, G. (2010). Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1341–1348. <https://doi.org/10.1128/AEM.01952-09>
- Santo, C. E., Quaranta, D., & Grass, G. (2012). Antimicrobial metallic copper surfaces kill Staphylococcus haemolyticus via membrane damage. *MicrobiologyOpen*, 1(1), 46–52.  
<https://doi.org/10.1002/mbo3.2>
- Santo, C. E., Taudte, N., Nies, D. H., & Grass, G. (2008). Contribution of Copper Ion Resistance to Survival of Escherichia coli on Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 977–986. <https://doi.org/10.1128/AEM.01938-07>
- Schmidt, R., Zahn, R., Bukau, B., & Mogk, A. (2009). ClpS is the recognition component for Escherichia coli substrates of the N-end rule degradation pathway. *Molecular Microbiology*, 72(2), 506–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06666.x>
- Schmidt, S. B. I., Rodríguez-Rojas, A., Rolff, J., & Schreiber, F. (2022). Biocides used as material preservatives modify rates of de novo mutation and horizontal gene transfer in bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129280.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129280>
- Scholar, E. M., & Pratt, W. B. (2000). *The Antimicrobial Drugs*. Oxford University Press.
- Selden, C. R., Schilling, K., Godfrey, L., & Yee, N. (2024). Metal-binding amino acid ligands commonly found in metalloproteins differentially fractionate copper isotopes. *Scientific Reports*, 14(1), 1902. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52091-7>
- Shen, H., Liu, Y., Liu, Y., Duan, Z., Wu, P., Lin, Z., & Sun, H. (2021). Hormetic dose-responses for silver antibacterial compounds, quorum sensing inhibitors, and their binary mixtures on bacterial resistance of Escherichia coli. *Science of The Total Environment*, 786, 147464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147464>
- 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>

- Slawson, R. M., Lohmeier-Vogel, E. M., Lee, H., & Trevors, J. T. (1994). Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 7(1), 30–40. <https://doi.org/10.1007/BF00205191>
- Slawson, R. M., Trevors, J. T., & Lee, H. (1992). Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology*, 158(6), 398–404. <https://doi.org/10.1007/BF00276299>
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J., & Lenski, R. E. (1997). Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature*, 387(6634), Article 6634. <https://doi.org/10.1038/42701>
- 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>
- Swings, T., Van den Bergh, B., Wuyts, S., Oeyen, E., Voordeckers, K., Verstrepen, K. J., Fauvart, M., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2017). Adaptive tuning of mutation rates allows fast response to lethal stress in *Escherichia coli*. *eLife*, 6, e22939. <https://doi.org/10.7554/eLife.22939>
- Zhang, C., Kong, Y., Xiang, Q., Ma, Y., & Guo, Q. (2023). Bacterial memory in antibiotic resistance evolution and nanotechnology in evolutionary biology. *iScience*, 26(8), 107433. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107433>
- Zhang, Y., Gu, A. Z., Cen, T., Li, X., He, M., Li, D., & Chen, J. (2018). Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environmental Pollution*, 237, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.032>
- ZoBell, C. E., & Feltham, C. B. (1934). A Comparison of Lead, Bismuth, and Iron as Detectors of Hydrogen Sulphide Produced by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 28(2), 169–176.
- Tan, Y., Zhao, K., Yang, S., ... Zou, L. (2024). Insights into antibiotic and heavy metal resistance interactions in *Escherichia coli* isolated from livestock manure and fertilized soil. *Journal of Environmental Management*, 351, 119935. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119935>
- Thieme, D., Neubauer, P., Nies, D. H., & Grass, G. (2008). Sandwich Hybridization Assay for Sensitive Detection of Dynamic Changes in mRNA Transcript Levels in Crude *Escherichia coli* Cell Extracts in Response to Copper Ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7463–7470. <https://doi.org/10.1128/AEM.01370-08>
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O., & Tomasz, A. (1986). The Rate of Killing of *Escherichia coli* by  $\beta$ -Lactam Antibiotics Is Strictly Proportional to the Rate of Bacterial Growth. *Microbiology*, 132(5), 1297–1304. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-5-1297>
- Turlej-Rogacka, A., Xavier, B. B., Janssens, L., Lammens, C., Zarkotou, O., Pournaras, S., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2018). Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(2), 345–353. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3140-3>
- Vaughn, R., & Levine, M. (1936). Hydrogen Sulfide Production as a Differential Test in the Colon Group. *Journal of Bacteriology*, 32(1), 65–73. <https://doi.org/10.1128/jb.32.1.65-73.1936>

- Vickery, H. B., & Leavenworth, C. S. (1930). THE BEHAVIOR OF CYSTINE WITH SILVER SALTS. *Journal of Biological Chemistry*, 86(1), 129–143. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)76911-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)76911-1)
- Warnes, S. L., Green, S. M., Michels, H. T., & Keevil, C. W. (2010). Biocidal Efficacy of Copper Alloys against Pathogenic Enterococci Involves Degradation of Genomic and Plasmid DNAs. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 5390–5401. <https://doi.org/10.1128/AEM.03050-09>
- Westblade, L. F., Errington, J., & Dörr, T. (2020). Antibiotic tolerance. *PLOS Pathogens*, 16(10), e1008892. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008892>
- Wolfson, J. S., Hooper, D. C., McHugh, G. L., Bozza, M. A., & Swartz, M. N. (1990). Mutants of Escherichia coli K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10), 1938–1943. <https://doi.org/10.1128/aac.34.10.1938>
- Woolley, C. A., Sutton, J. M., & Wand, M. E. (2022). Mutations in SilS and CusS/OmpC represent different routes to achieve high level silver ion tolerance in Klebsiella pneumoniae. *BMC Microbiology*, 22(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02532-y>
- Wu, K., Li, H., Cui, X., ... Long, H. (2022). Mutagenesis and Resistance Development of Bacteria Challenged by Silver Nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(10), e00628-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00628-22>
- Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H. L., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. J. (2012). Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Letters*, 12(8), 4271–4275. <https://doi.org/10.1021/nl301934w>
- Xu, F., Liu, S., Naren, N., Li, L., Ma, L. Z., & Zhang, X.-X. (2022). Experimental evolution of bacterial survival on metallic copper. *Ecology and Evolution*, 12(8), e9225. <https://doi.org/10.1002/ece3.9225>
- Xu, Y., Tan, L., Li, Q., Zheng, X., & Liu, W. (2022). Sublethal concentrations of heavy metals Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> can induce the emergence of bacterial multidrug resistance. *Environmental Technology & Innovation*, 27, 102379. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102379>
- Yamanaka, K., Zheng, W., Crooke, E., Wang, Y.-H., & Inouye, M. (2001). CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1572–1584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02345.x>
- Yu, S., Wang, Y., Shen, F., Fang, H., & Yu, Y. (2022). Copper-based fungicide copper hydroxide accelerates the evolution of antibiotic resistance via gene mutations in Escherichia coli. *Science of The Total Environment*, 815, 152885. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152885>

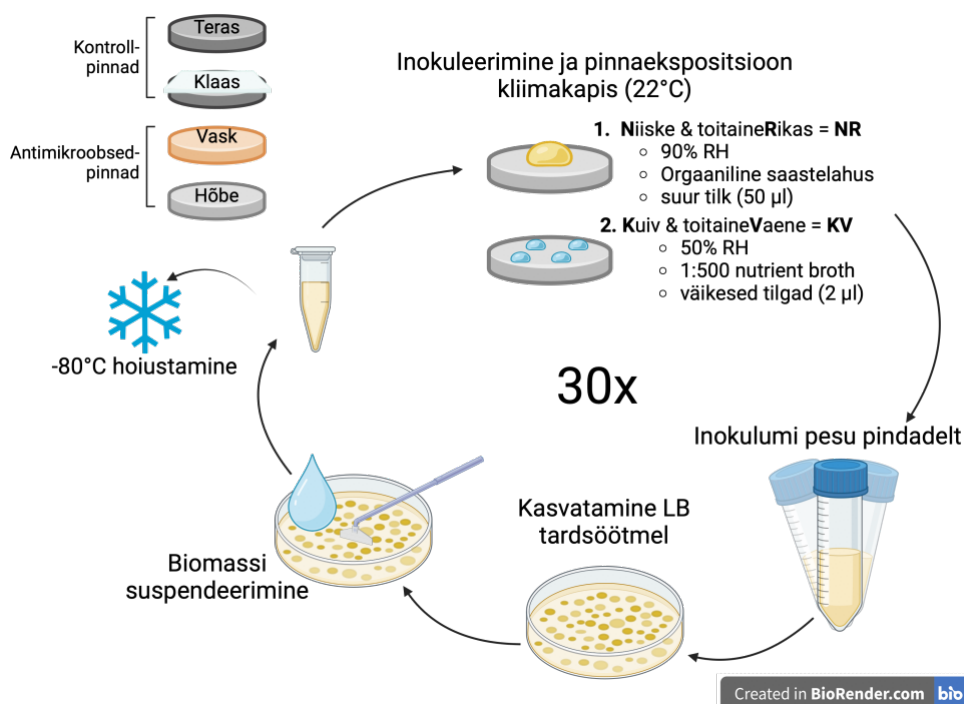
## LISAD

### Lisa 1

Sandra Pargi magistritöö raames viidi läbi eksperimentaalne evolutsiooni katse, kus *E. coli* ATCC 8739 eksponeeriti erinevates tingimustes tsükliliselt antimikroobsetele (vask, hõbe) ja kontroll- (klaas, teras) pindadele. Ekspositsioon pindadele toimus toatemperatuuril, kahes erinevas tingimuses:

- 1) niiske ja toitainerikas (NR), kus ekspositsioon toimus orgaanilises saastelahuses (EPA, 2022) kõrge õhuniiskuse (90% RH) juures ühes suures 50 µl tilgas;
- 2) kuiv ja toitainevaene (KV), kus ekspositsioon toimus 1:500 NB-s (lihaekstrakt 0,006 g/L; pepton 0,02 g/L; 0,01 g/L NaCl) (ISO, 2011) madala õhuniiskuse (50% RH) juures viies väikeses 2 µl tilgas.

Ekspositsiooni järel pesti pindadelt ellujäänud bakterid ning neid kasvatati LB tardsöötmetassidel 48 h. Tardsöötmele kasvanud kolooniad suspendeeriti PBS-is, ning saadud bakterisuspensioonidega algatati uus ekspositsioonitsükkel. 30. tsükli järel saadud evolutsioneerunud populatsioonide suspensioonid säilitati -80°C juures 20% glütserooli lahuses ning nende fenotüüpi iseloomustati käesolevas töös. Kokku saadi evolutsioonikatse järel 40 neljal erineval pinnal (teras, klaas, vask, hõbe) viies paralleelis ning kahes erinevas tingimuses (NR ja KV) evolutsioneerunud populatsiooni.



Ekspimentaalse evolutsioonikatse ülevaatlisk skeem. Joonis on visandatud Sandra Pargi avaldamata magistritöö joonise järgi. Loodud saidil BioRender.com



### Lisa 3

Sandra Park ja Merilin Rosenberg viisid huvipakkuvaid mutatsioone sisaldavate primaarsete (*tnaA* M266I; *ydjN*::IS1) ja sekundaarsete isolaatide (*silS/pqiA* ehk isolaat H4NR\_MBC\_Ag-SL(108); *silS/cusA* ehk isolaat H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5)) täisgenoomi sekveneerimisandmetega läbi mutatsioonianalüüsi. Allpool olevas tabelis on välja toodud kõik isolaatides tuvastatud geneetilised muutused. Halli tausta ja plussmärgiga on tähistatud isolaadis esinenud mutatsioon.

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

Tabel on koostatud Merilin Rosenbergi poolt.

## Lisa 4

Fenotüübiliseks iseloomustamiseks valitud mutandid ja nendes leiduvate huvipakkuvate geenide lookused ja funktsiooni annotatsioonid.

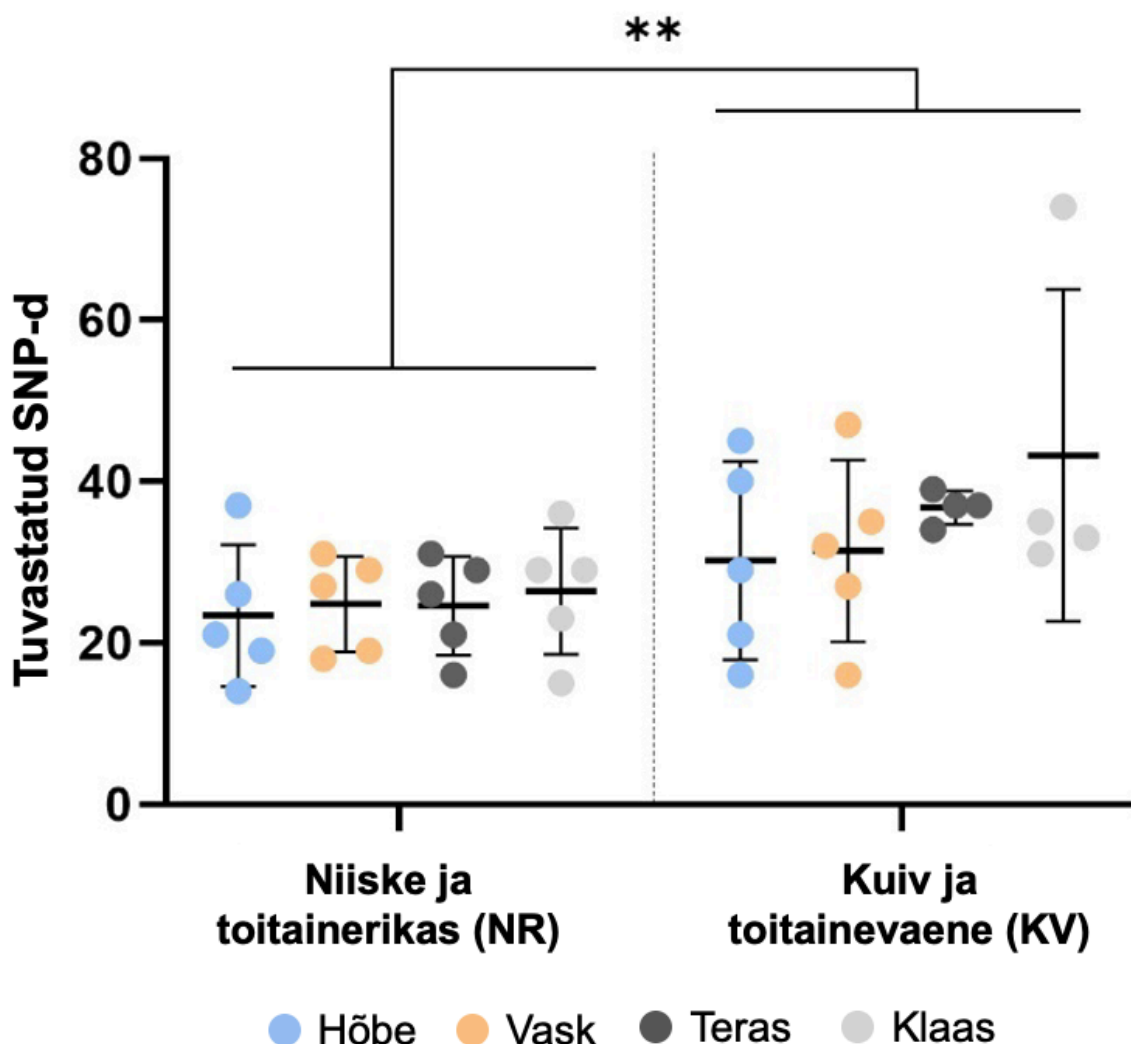
| Mutandi nimetus      | Mutatsiooni(de) lookus(ed) | Mõjutatud geen(id) | Funktsiooni annotatsioon  |
|----------------------|----------------------------|--------------------|---|
| ΔEcolC_2715-2722     | EcolC_2715                 | <i>clpS</i>        | ClpAP proteolüüsi kompleksi adaptorvalk (R. Schmidt <i>et al.</i> , 2009)   |
|                      | EcolC_2716                 | <i>cspD</i>        | Toksiin, replikatsiooni inhibiitor (Yamanaka <i>et al.</i> , 2001)  |
|                      | EcolC_2717-2718            | <i>macB, macA</i>  | MacAB-TolC makroliidide väljavoolu pumba valgud (Kobayashi <i>et al.</i> , 2001)  |
|                      | EcolC_2719                 | <i>ybjX</i>        | Iseloomustamata valk (Karp <i>et al.</i> , 2023)  |
|                      | EcolC_2720                 | <i>ybjD</i>        | Iseloomustamata valk (Karp <i>et al.</i> , 2023)  |
|                      | EcolC_2721                 | <i>aqpZ</i>        | Akvaporiin (Karp <i>et al.</i> , 2023)  |
|                      | EcolC_2722                 | <i>ybjE</i>        | L-lüsiini transporter (Karp <i>et al.</i> , 2023)   |
| TnaA M266I           | EcolC_4286                 | <i>tnaA</i>        | Trüptofanaas, tsüsteiini lüaas (Newton & Snell, 1964)   |
| <i>ydjN</i> ::IS1    | EcolC_1903                 | <i>ydjN</i>        | L-tsüstiini/tsüsteiini transporter (Ohtsu <i>et al.</i> , 2015)   |
| H5KV_MBC_Ag-SL(13,5) | EcolC_3071                 | <i>cusA</i>        | CusCFBA Cu <sup>+</sup> transmembraanse väljavoolupumba subühik (Outten <i>et al.</i> , 2000)   |
|                      | EcolC_3427                 | <i>silS</i>        | Transmembraanne histidiini kinaas, mis aktiveerib regulaatorvalku SilR, mis omakorda derepresseerib SilCFBA Ag <sup>+</sup> -väljavoolu süsteemi ekspressiooni (Randall <i>et al.</i> , 2015) |
| H4NR_MBC_Ag-SL(108)  | EcolC_3427                 | <i>silS</i>        | — " —   |
|                      | EcolC_2646                 | <i>pqiA</i>        | Intermembraanne transpordivalk (Karp <i>et al.</i> , 2023)  |

Tabel on koostatud Sandra Pargi ja Merilin Rosenbergi läbi viidud mutatsioonianalüüsi andmete (Lisa 2; Lisa 3) põhjal.

## Lisa 5

Sandra Park ja Merilin Rosenberg viisid evolutsioneerunud populatsioonide (Lisa 1) täisgenoomi sekveneerimisandmetega läbi mutatsioonianalüüsi. Allpool oleval joonisel on andmepunktidena toodud NR ja KV tingimustes pindadel evolutsioneerunud paralleelsetes populatsioonides tuvastatud ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP-de) arv, iga pinna populatsioonide SNP-de arvu keskväärtus ja standardhälve. Statistilisel analüüsil võrreldi tingimuste (NR või KV) siseselt antimikroobsete pindade (vask, hõbe) populatsioonide ja kontrollpindade (teras, klaas) populatsioonide SNP-de arvukust, kasutades selleks kahefaktorilist ANOVA analüüsi koos *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ .

Nii NR kui ka KV tingimustes antimikroobsetel pindadel evolutsioneerunud populatsioonide SNP-de arv ei erinenud oluliselt kontrollpindade populatsioonide SNP-de arvust.

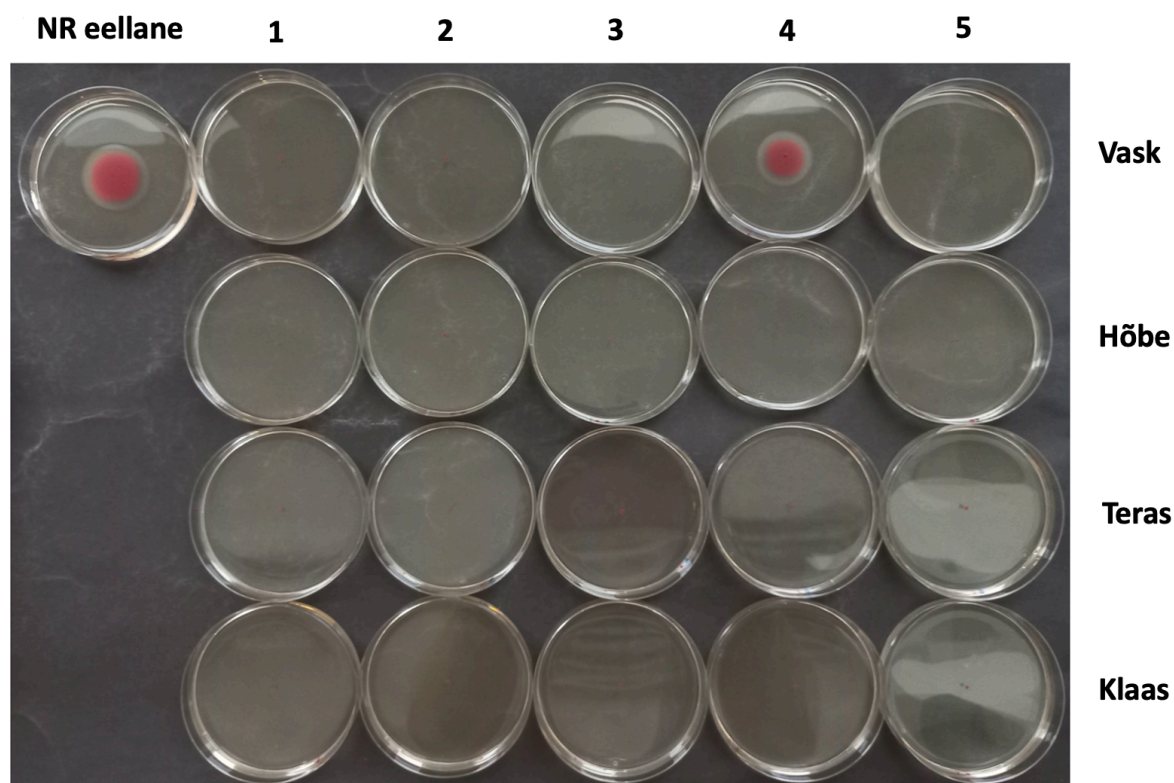


Joonis on koostatud Merilin Rosenbergi poolt.

## Lisa 6

Merilin Rosenbergi ja Sandra Pargi poolt läbi viidud evolutsiooni eellase säilituskultuuri sekveneerimisandmete mutatsioonianalüüsist tuvastati, et NR eellase säilituskultuuris oli 90% sagedusega fikseerunud nonsenssmutatsioon *FliI* viburi ATPaasi kodeerivas geenis, mis omakorda põhjustas liikumisvõimetust. Mutatsioon *fliI* geenis oli täielikult fikseerunud (100%) kõigis NR tingimustes evolutsioneerunud populatsioonides. Joonisel on näha NR tingimustes pindadel (vask, hõbe, teras, klaas) evolutsioneerunud populatsioonide ja nende eellase (NR eellane) ujumisliikumine 0,3% agarisisaldusega LB tardsöötmes, kuhu oli lisatud 0,005% trifenüültetrasooliumkloriidi (TTC), mis värvub hingamisahela aktiivsuse tulemusena punaseks ja visualiseerib ujumist. Jooniselt on näha, et enamik NR populatsioone olid *fliI* nonsenssmutatsiooni tõttu liikumisvõimetud. NR eellase liikumine võis olla tingitud liikumisvõimeliste bakterite sattumises katseks kasutatud proovi (10% olid liikumisvõimelised) või stoppkoodoni reverteerumisest.

### NR evolutsioneerunud populatsioonide liikumine peale 12 h inkubatsiooni 35°C juures



Joonis on visandatud Sandra Pargi avaldamata magistritöö joonise järgi.

## Lisa 7

Hinnati metallisoolade mõju MBC katses kasutatud kahe ekspositsioonikeskkonna (SL ja DI) pH-le. Selleks mõõdeti SL ja DI, kuhu oli lisatud MBC lähedastes kontsentratsioonides  $\text{CuSO}_4$  või  $\text{AgNO}_3$ , pH-d kasutades kaaliumkloriidist klaaselektroodiga pH-meetrit (Mettler Toledo, USA).

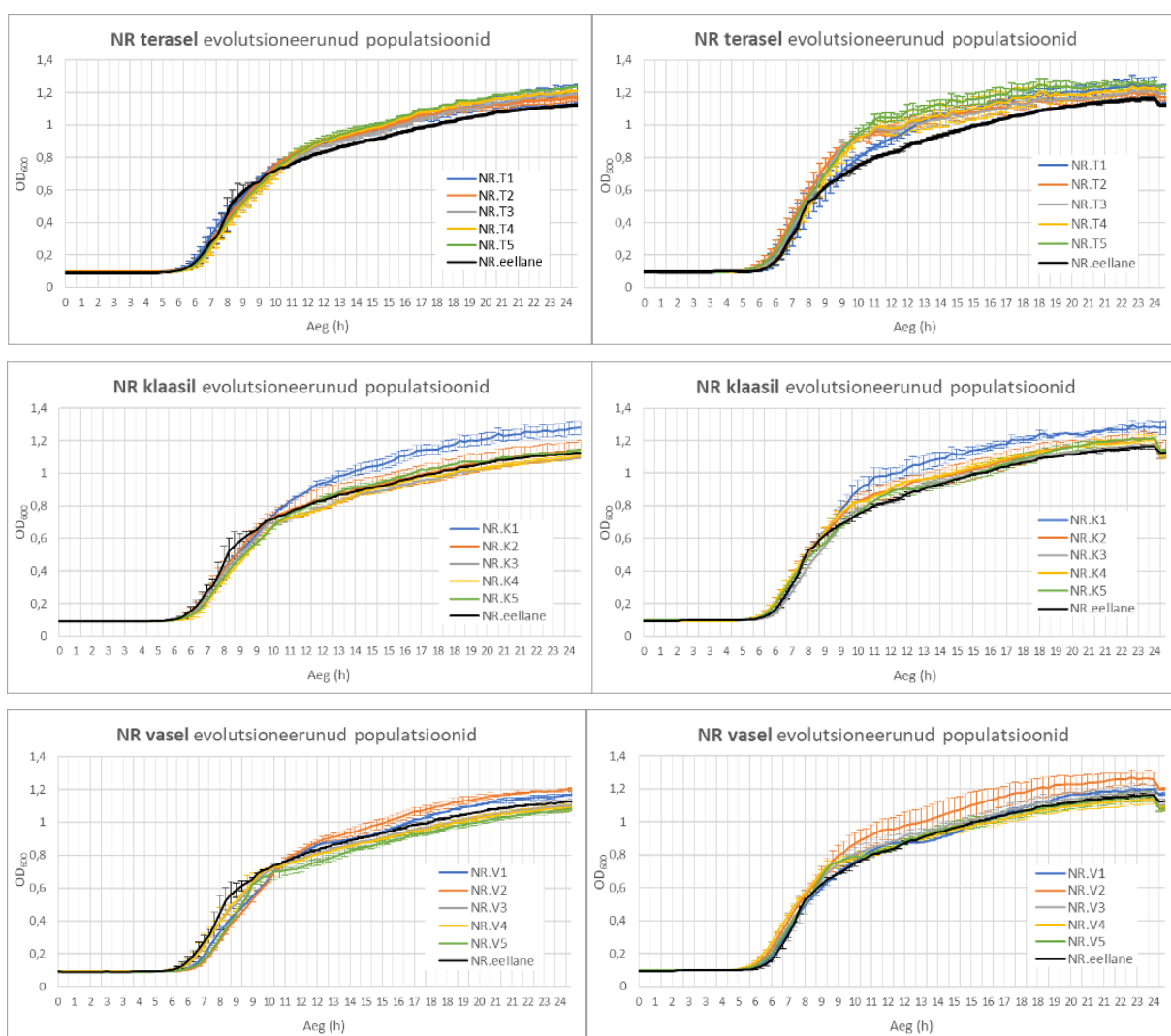
$\text{CuSO}_4$  lisamine hapestab orgaanikarohket SL-i.

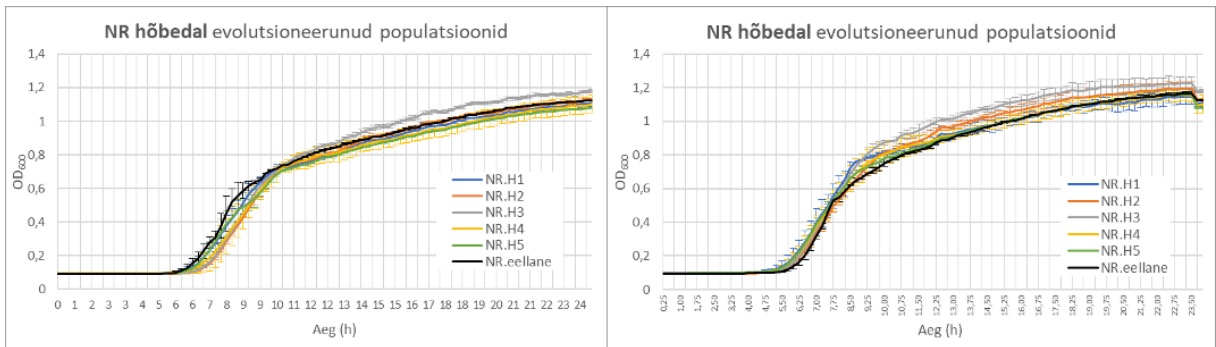
| MBC ekspositsioonikeskkond   | Testitud sool   |        | Soola kontsentratsioon (mg Me/l) | pH  |
|------------------------------|-----------------|--------|----------------------------------|-----|
| Orgaanilise saastelahus (SL) | -               | -      | 0                                | 6,3 |
|                              | $\text{CuSO}_4$ | MBC    | 700                              | 4,0 |
|                              |                 | 2x MBC | 1400                             | 3,8 |
|                              | $\text{AgNO}_3$ | MBC    | 27                               | 6,2 |
|                              |                 | 2x MBC | 54                               | 6,3 |
| Deioniseeritud vesi (DI)     | -               | -      | 0                                | 5,5 |
|                              | $\text{CuSO}_4$ | MBC    | 5,5                              | 5,3 |
|                              |                 | 2x MBC | 11                               | 5,1 |
|                              | $\text{AgNO}_3$ | MBC    | 0,84                             | 5,3 |
|                              |                 | 2x MBC | 1,7                              | 5,4 |

## Lisa 8

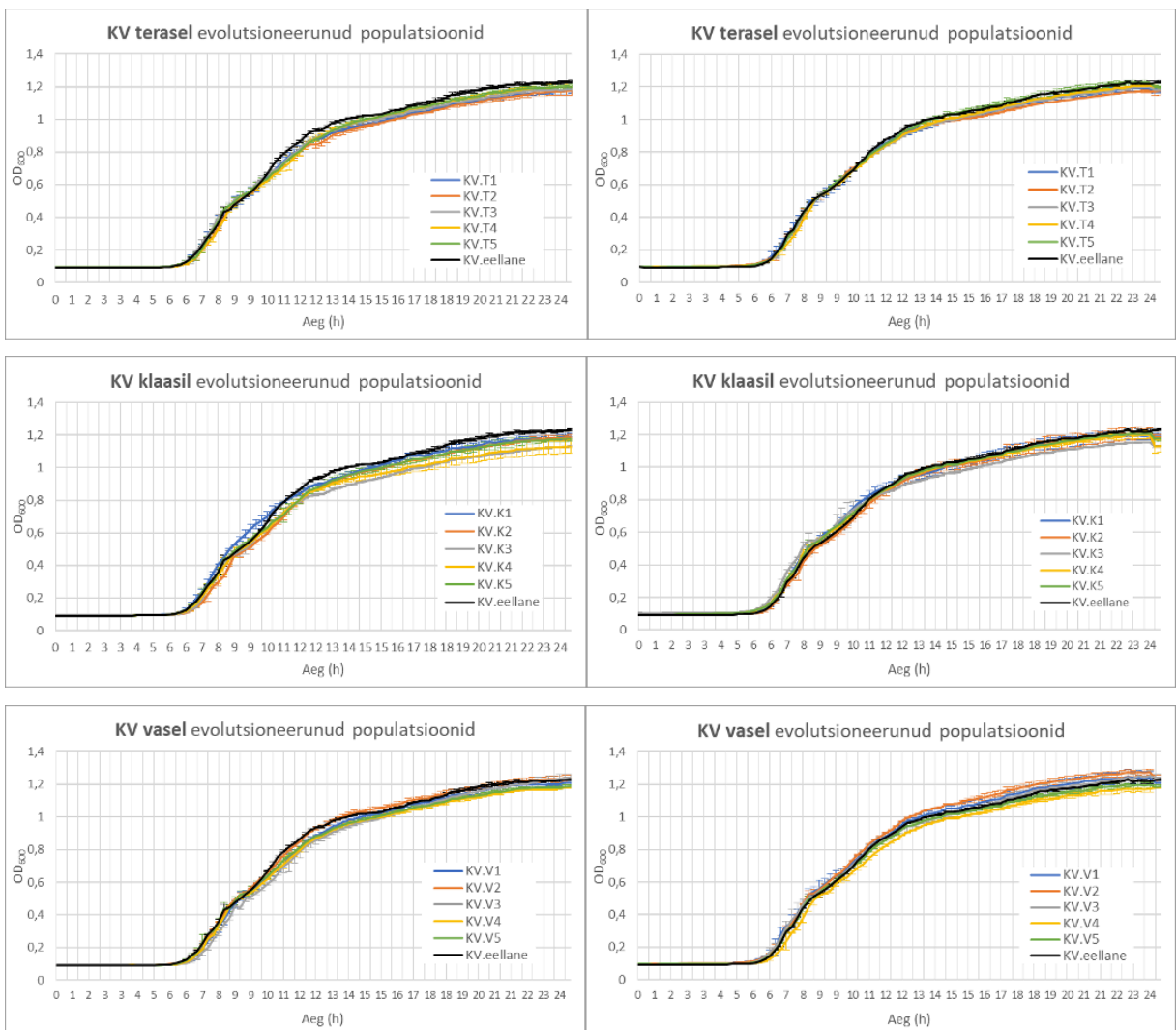
Mõõdeti evolutsioneerunud populatsioonide ja mutantide kasvudünaamikat LB vedelsöötmes, et seda võrrelda eellasega. Kõigil kasvukõveratel on kahe eraldi joonisena toodud igal pinnatüübil evolutsioneerunud paralleelsete populatsioonide või mutantide kasv kahes bioloogilises korduses. Kasvukõverad on visualiseeritud kahe tehnilise kordusega mõõdetud keskmistest optilistest tihedustest ning neile on välja toodud standardhälbed. Kasvu mõõdeti 96-kaevulises mikrotiiterplaadis, 37°C juures.

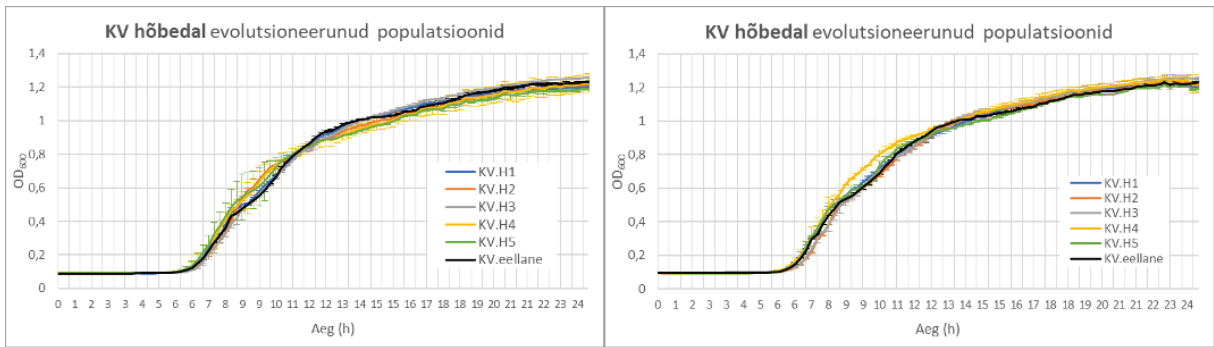
- a. Niisketes ja toitainerikaste (NR) tingimustes kontroll- (teras, klaas) ja antimikroobsetel pindadel (vask, hõbe) evolutsioneerunud populatsioonide ja nende ühise eellase kasvukõverad. Ühelgi NR tingimustes pindadel evolutsioneerunud populatsiooni kasv ei erinenud oluliselt eellasest.



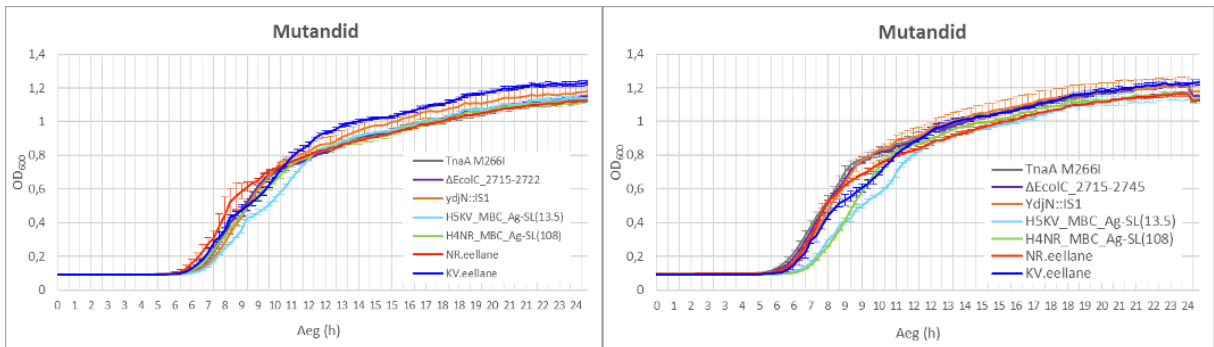


b. Kuivades ja toitainevaeses (KV) tingimustes kontroll- (teras, klaas) ja antimikroobsetel pindadel (vask, hõbe) evolutsioneerunud populatsioonide ja nende ühise eellase kasvukõverad. Ühelgi KV tingimustes pindadel evolutsioneerunud populatsiooni kasv ei erinenud oluliselt eellasest.



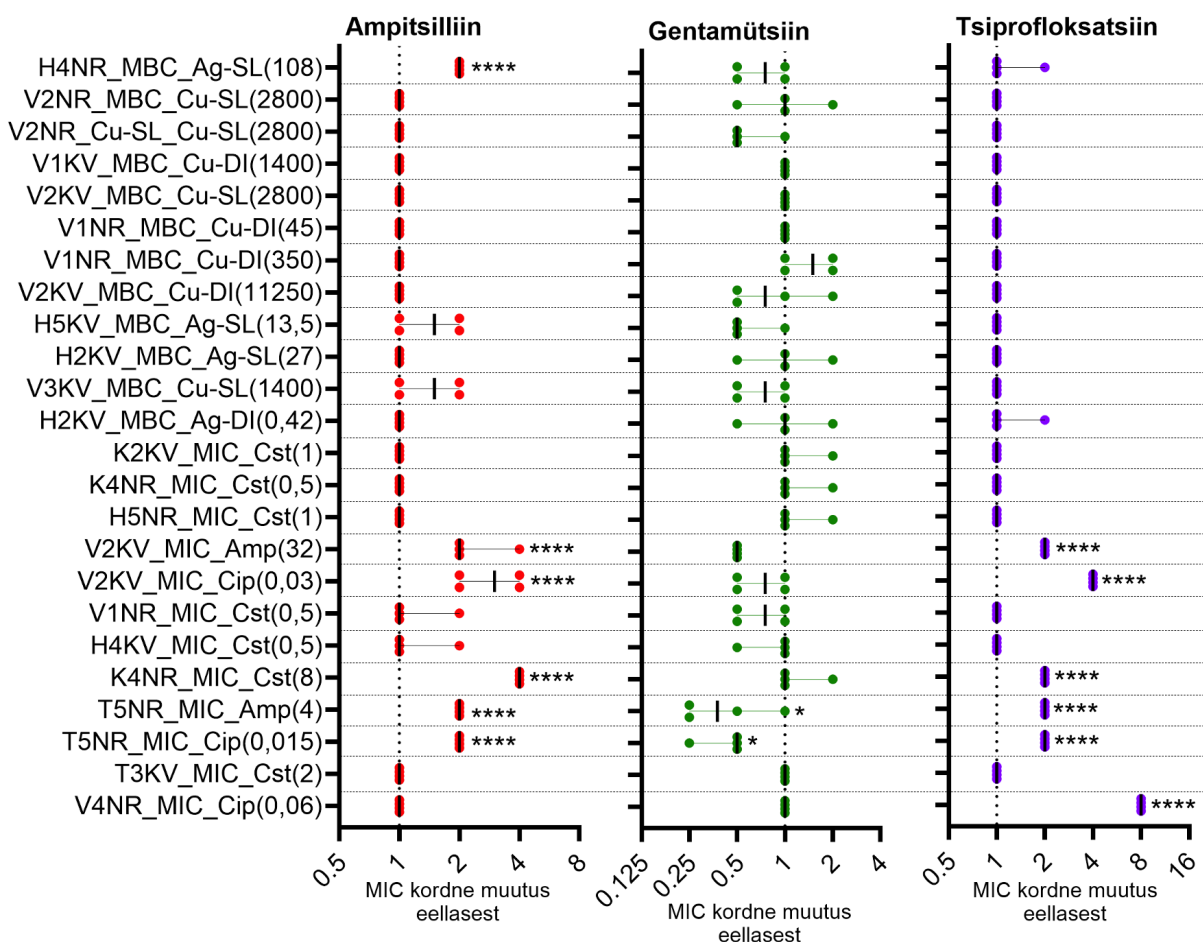


- c. Sandra Pargi poolt evolutsioneerunud populatsioonidest isoleeritud mutantide (TnaA M266I; *ydjN*:IS1), konstrueeritud mitme geeni deletsioonmutandi ( $\Delta$ EcolC\_2715-27122) ning antud töös populatsioonide metallisoola tundlikkuse kirjeldamise käigus isoleeritud mutantide (H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5); H4NR\_MBC\_Ag-SL(108)) kasvukõverad. Ühelgi mutandi kasv ei erinenud oluliselt evolutsioonikatse eellastest.



## Lisa 9

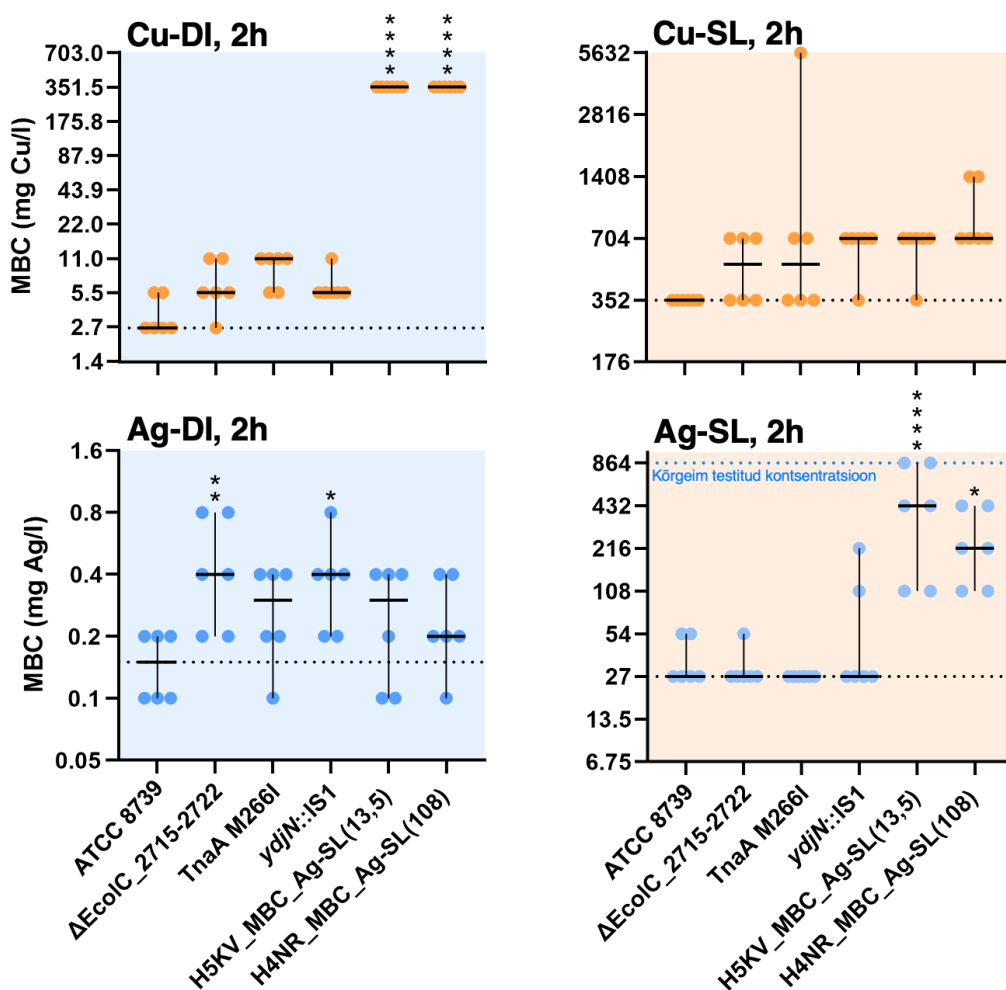
Antibiootikumitolerantsuse ja püsiva metallitolerantsuse põhjal isoleeriti evolutsioneerunud populatsioonide iseloomustamise katsetest üksikkolooniaid (sekundaarsed isolaadid), kelle antibiootikumitundlikkust testiti täiendavalt. Allpool oleval joonisel on toodud isolaatide Amp-i, Gen-i ja Cip-i antibiootikumi MIC-d, mis on esitatud kordse muutusena eellasest. Joonisel on andmepunktidena toodud 2 bioloogilise ja 2 tehnilise korduskatsega agarlahjenduse meetodil leitud MIC-de kordne muutus eellasest, nende mediaan ja variatsiooniulatus. Statistilises analüüsis võrreldi isolaatide MIC kordseid muutusi vastava evolutsioonikatse eellasest, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Märkitud on vaid statistiliselt olulised muutused  $P^* < 0,05$  ja  $****P < 0,0001$ . Testiti ka Cst MIC-d, mis oli kõigil isolaatidel võrdne eellasega.



## Lisa 10

Leiti mutantide vasksulfaadi (Cu) ja hõbenitraadi (Ag) MBC-d lühiajalisel (2 h) ekspositsioonil deioniseeritud vees (DI) ja orgaanilises saastelahuses (SL). Andmepunktidena on esitatud korduskatsetes (3 bioloogilist, 2 tehnilist) leitud MBC väärtused log<sub>2</sub> skaalal. Välja on toodud MBC-de mediaan ja variatsiooniulatus. Tulemuste statistilisel analüüsil võrreldi kõigi mutantide metallisoola MBC väärtusi metsiktüve vastu, kasutades ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Dunett'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ . Märkitud on vaid statistiliselt olulised muutused P\* < 0,05; \*\*P < 0,01 ja \*\*\*\*P < 0,0001.

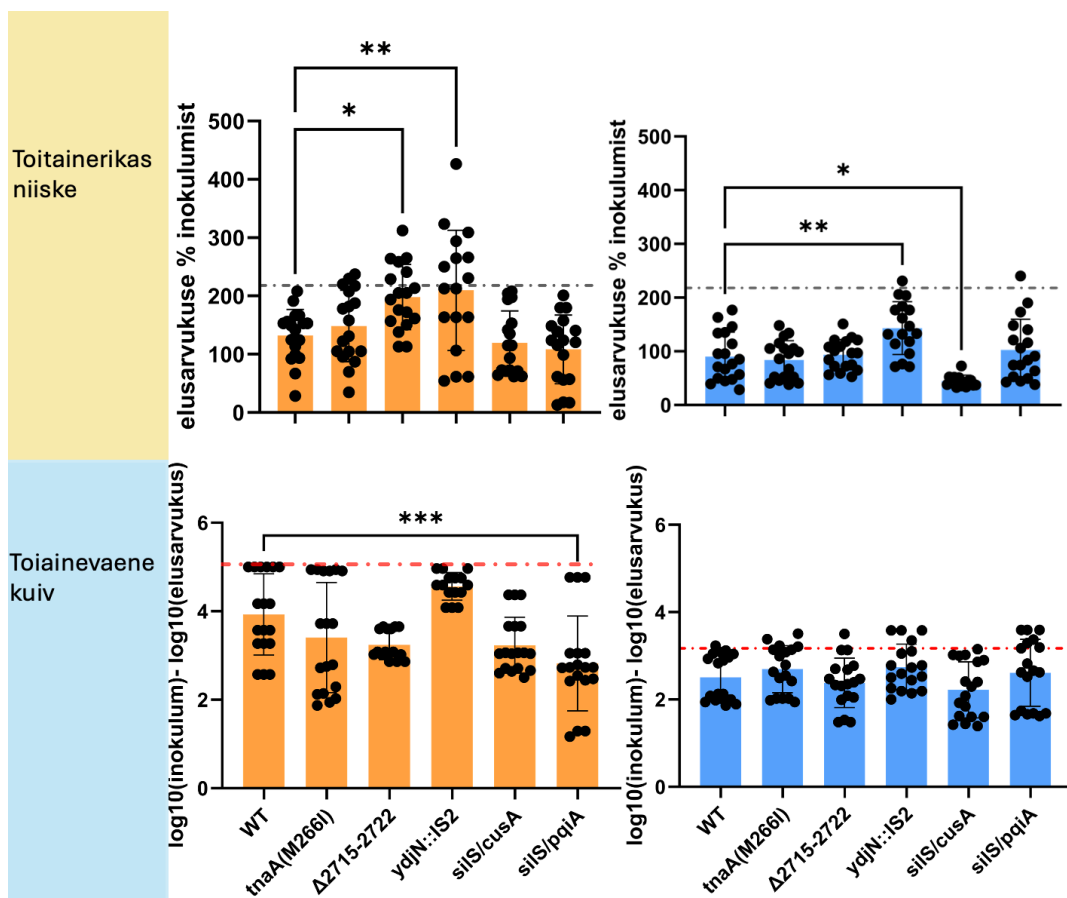
Isolaatide H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5); H4NR\_MBC\_Ag-SL(108) MBC-des tuleb võrreldes pika ajapunktiga (24 h) isegi tugevamini välja vase ja hõbeda keskkonna vastupidine efekt. Kuigi ilmnevad statistiliselt olulised muutused ka deletsioon- ja *ydjN* mutandi hõbeda talumises DI-s on suure varieeruvuse tõttu keeruline välistada, et tegu ei ole vähestest kordustest tingitud artefaktiga.



## Lisa 11

Sandra Park hindas oma magistritöös mutantide tundlikkust vase ja hõbeda pinnaekspositsioonile kuivades ja toitainevaesetes (letaalsetes) ning niisketes ja toitainerikastes (kasvu inhibeerivates) tingimustes. Joonisel on toodud konstrueeritud mitme geeni deletsioonmutant  $\Delta EcolC\_2715-2722$ , kaks populatsioonidest isoleeritud mutandi TnaA M266I ja *ydjN::IS1* ning 2 populatsioonide  $AgNO_3$  MBC määramise katsetes isoleeritud sekundaarse isolaadi H5KV\_MBC\_Ag-SL(13,5) ja H4NR\_MBC\_Ag-SL(108), kes omasid mutatsioone vastavalt *silS/cusA* ja *silS/pqiA* geenides. Statistilisel analüüsil võrreldi mutantide kasvu (elusarvukuse protsent inokulumist) või suremist (logaritmitud elusarvukuse vähenemine inokulumist) metallpinnal metsiktüübi vastava väärtusega, kasutades selleks ühefaktorilist ANOVA analüüsi koos Holm-Šidák'i *post-hoc* testiga usaldusnivool  $\alpha=0,05$ .

Jooniselt on näha, et *silS* mutantsed sekundaarsed isolaadid ei talu hõbeda pinnaekspositsiooni kuivades ja toitainevaesetes tingimustes metsiktüübist oluliselt paremini ning toitainerikastes ja niisketes tingimustes on ühe isolaadi (*silS/cusA*) kasv hõbeda pinnal metsiktüübiga võrreldes isegi rohkem inhibeeritud. Vase pinnal toitainevaesetes ja kuivades tingimustes sureb üks sekundaarne isolaat (*silS/pqiA*) statistiliselt olulisel määral vähem kui metsiktüüp.



Joonis pärineb Sandra Pargi avaldamata magistritööst.

## LIHTLITSENTS

### Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

**Mina, Sigrít Umerov,**

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **Antimikroobsetele metallpindadele eksponeeritud *Escherichia coli* ATCC 8739 fenotüübi iseloomustamine**, mille juhendajad on **Merilin Rosenberg ja Sandra Park**, 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 **22.05.2025** 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.

*Sigrít Umerov*

*26.05.2024*