

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

**Antimikroobsete ainete mõju *E. coli* CSH26 ja *P. putida* KT2440 vahelise konjugatsiooni
efektiivsusele**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Laura Maria Pella

Juhendajad teadur Hanna Ainelu, PhD
professor Angela Ivask, PhD

TARTU 2025

INFOLEHT

Antimikroobsete ainete mõju *E. coli* CSH26 ja *P. putida* KT2440 vahelise konjugatsiooni efektiivsusele

Antibiootikumiresistentsus on ülemaailmne probleem, mida süvendavad antibiootikumide ebakorrektned ja liigne kasutamine. Üheks põhiliseks resistentsusgeenide leviku mehhanismiks bakteripopulatsioonides on horisontaalne geeniülekanne, täpsemalt konjugatsioon. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida, kas mõnel üldlevinud antimikroobsel ainel, nagu hõbedal, vasel või bensalkooniumkloriidil, on mõju *Escherichia coli* CSH26 (pKJK5) ja *Pseudomonas putida* KT2440 tn7 GFP vahelisele konjugatsioonile. Katsed viidi läbi nii vedelates tingimustes kui tahketel pindadel, kasutades iga ühendi kolme eelnevalt valitud kontsentratsiooni lisaks kontrollile. Transkonjugantide isoleerimiseks kasutati selektiivset LB tardsöödet. Tulemused näitasid, et antud katsetingimustes ja kontsentratsioonidel testitud ühendid konjugatsioonile märkimisväärset mõju ei avaldanud.

Märksõnad: konjugatsioon, antimikroobsed ained, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, antibiootikumiresistentsus

CERCS kood: 230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Effect of antimicrobials on conjugation efficiency between *E. coli* CSH26 and *P. putida* KT2440

Antibiotic resistance is a worldwide problem, accelerated by the misuse and overuse of antibiotics. One of the main mechanisms facilitating the spread of resistance genes in bacterial populations is horizontal gene transfer via conjugation. This bachelor's thesis aimed to investigate whether some commonly used antimicrobials, such as silver, copper, or benzalkonium chloride, affect conjugation between *Escherichia coli* CSH26 (pKJK5) and *Pseudomonas putida* KT2440 tn7 GFP. Experiments were conducted in liquid culture and on solid surfaces using three predetermined concentrations of each antimicrobial alongside control conditions. Selective LB agar was used to isolate transconjugants. The results showed that these antimicrobial compounds did not significantly affect conjugation between the two bacterial strains under the experimental conditions and concentrations tested.

Keywords: conjugation, antimicrobial compounds, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, antibiotic resistance

CERCS code: 230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Konjugatsioon.....	7
1.2. Konjugatsiooni ohtlikkus inimesele.....	9
1.3. Konjugatsiooni mõjutavad tegurid.....	11
1.3.1. Doonori ja retsiendi omadused.....	11
1.3.2. Keskkonnatingimused.....	11
1.3.2.1. Temperatuur.....	11
1.3.2.2. Toitained ja pH.....	12
1.3.2.3. Hapnik.....	12
1.3.2.4. Rakutihedus.....	12
1.3.3. Antimikroobsete ainete mõju konjugatsioonile.....	13
1.3.3.1. Hõbe.....	13
1.3.3.2. Vask.....	14
1.3.3.3. Bensalkooniumkloriid.....	14
1.3.4. Konjugatsioon vedelates tingimustes ja stabiilsel pinnal.....	15
1.3.5. Inkubeerimisaeg.....	15
1.3.6. Transkonjugantide arvutamine.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1. Töö eesmärgid.....	17
2.2. Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1. Kasutatud tüved, söötmed ja lahused.....	18
2.2.2. Konjugatsiooni ajaakna määramine.....	19
2.2.2.1. Konjugatsiooni ajaakna määramine vedelkultuuris.....	20
2.2.2.2. Konjugatsiooni ajaakna määramine pinnal.....	20
2.2.3. Konjugatsiooniks sobilike antimikroobsete ainete kontsentratsioonide määramine.....	21
2.2.4. Antimikroobsete ainete mõju uurimine konjugatsioonisagedusele.....	22
2.2.5. Andmeanalüüs.....	22
2.2.6. Statistika.....	23

2.3.	Tulemused	24
2.3.1.	Konjugatsiooni optimaalse ajaakna määramine	24
2.3.2.	Konjugatsioonisageduse võrdlus vedel- ja pinnakultuuris.....	24
2.3.3.	Hõbeioonide mõju bakterite konjugatsioonisagedusele	25
2.3.3.1.	Ag ⁺ -ioonide subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC	25
2.3.3.2.	Hõbeioonide mõju konjugatsioonisagedusele.....	26
2.3.4.	Vaseioonide mõju bakterite konjugatsioonisagedusele.....	27
2.3.4.1.	Cu ²⁺ -ioonide subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC	27
2.3.4.2.	Vaseioonide mõju konjugatsioonisagedusele.....	28
2.3.5.	Bensalkooniumkloriidi mõju bakterite konjugatsioonile	29
2.3.5.1.	Bensalkooniumkloriidi subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC	29
2.3.5.2.	Bensalkooniumkloriidi mõju konjugatsioonisagedusele.....	30
2.4.	Arutelu.....	32
2.4.1.	Konjugatsioonisageduse erinevus vedel- ja pinnakultuuris	32
2.4.2.	Vedelkultuuri katsetes jätkus konjugatsioon ka peale väljakülve selektiivsöötmele.....	32
2.4.3.	Antimikroobsete ühendite mõju konjugatsioonile	33
KOKKUVÕTE.....		36
RESÜMEE		37
TÄNUSÕNAD		39
KASUTATUD KIRJANDUS		40
KASUTATUD VEEBIALLIKAD.....		49
LISAD		50
Lisa 1		50
Lisa 2		50
Lisa 3		50
Lisa 4		51
Lisa 5		51
LIHTLITSENTS		52

KASUTATUD LÜHENDID

BAC – bensalkooniumkloriid (ingl k *benzalkonium chloride*)

CFU – kolooniaid moodustavad ühikud (ingl k *colony forming units*)

Gm – gentamütsiin (ingl k *gentamicin*)

LB – lüsogeenne sööde (ingl k *lysogeny broth*)

LOD – tuvastuspiir (ingl k *limit of detection*)

MBC – minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (ingl k *minimum bactericidal concentration*)

MIC – minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon (ingl k *minimum inhibitory concentration*)

ns – statistiliselt ebaoluline erinevus (ingl k *non-significant*)

oriT – ülekande alguspunkt (ingl k *origin of transfer*)

PBS – fosfaatpuhver (ingl k *phosphate buffered saline*)

R – retsipient

ROS – reaktiivsed hapnikuradikaalid (ingl k *reactive oxygen species*)

SCDLP – toksilisust neutraliseeriv sööde (ingl k *soy casein digest broth with lecithin and polysorbate*)

Tc – tetratsükliin (ingl k *tetracycline*)

TK – transkonjugant

Tra geenid – ülekande geenid (ingl k *transfer genes*)

T4SS – tüüp IV sekretsioonisüsteem (ingl k *type IV secretion system*)

SISSEJUHATUS

1946. aastal kirjeldasid ameerika teadlased, molekulaarbioloog J. Lederberg ja geneetik E. L. Tatum, geneetilise rekombinatsiooni esinemist *Escherichia coli* rakkudes. Nende eksperimentidest võis järeldada, et toitumismutantide teke segakultuurides on seletatav sugulisele paljunemisele sarnaneva mehhanismiga. Kuigi bakteritel sugulist paljunemist ei esine, on tänaseks teada, et lisaks vertikaalsele geenide ülekandele, esineb neil ka horisontaalne geeniülekanne, mille üheks olulisimaks mehhanismiks on konjugatsioon. Selle käigus toimub üheaheelalise mobiilse geneetilise elemendi – näiteks plasmidi – aktiivne transport ühelt bakterilt teisele rakulise kontakti kaudu. Sageli sisaldavad ülekantavad elemendid genee, mis suurendavad bakterite ellujäämisvõimet, kodeerides näiteks alternatiivsete metabolismiradade, biofilmi moodustamisega seotud või antibiootikumide resistentsust tagavaid genee.

Konjugatsioon on antibiootikumide resistentsusgeenide leviku üks keskseid mehhanisme. Patogeenide üha kasvav resistentsus antibiootikumidele on ülemaailmne probleem, mis tuleneb põhiliselt antibiootikumide ebakorrektselt ja liigsest kasutamisest erinevates valdkondades, sealhulgas meditsiinis ja põllumajanduses. Resistentsuse levikut soodustab veelgi antibiootikumide sattumine keskkonda, näiteks puhastamata heitvete kaudu, mis loob bakteripopulatsioonidele selektiivse surve. Laialdasel antibiootikumiresistentsuse levikul võivad olla tõsised tagajärjed, sealhulgas suuremad haiguskulud ja rohkem surmajuhtumeid.

Mikroobide, sealhulgas patogeenide soovimatu leviku pidurdamiseks kasutatakse lisaks antibiootikumidele ka teisi antimikroobseid aineid, näiteks metalle, nagu hõbedat või vaske, või kvaternaarseid ammooniumühendeid, nagu bensalkooniumkloriidi. Kuigi nende ainete antimikroobne toime on kindel, on vastuolulist informatsiooni selle kohta, kuidas need ühendid mõjutavad konjugatsiooni – inhibeerivalt, stimuleerivalt või ei mõjuta üldse. Sellest tulenevalt on oluline välja selgitada, kas mõne antimikroobse ühendi kasutamine aitab tahtmatult kaasa antibiootikumide resistentsusgeenide levikule.

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli uurida, kas mõni üldkasutatavatest antimikroobsetest ühenditest – nagu hõbe, vask või bensalkooniumkloriid – soodustab *Escherichia coli* CSH26 (pKJK5) ja *Pseudomonas putida* KT2440 tn7 GFP vahelist konjugatsiooni ja seeläbi antibiootikumiresistentsuse levikut.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Konjugatsioon

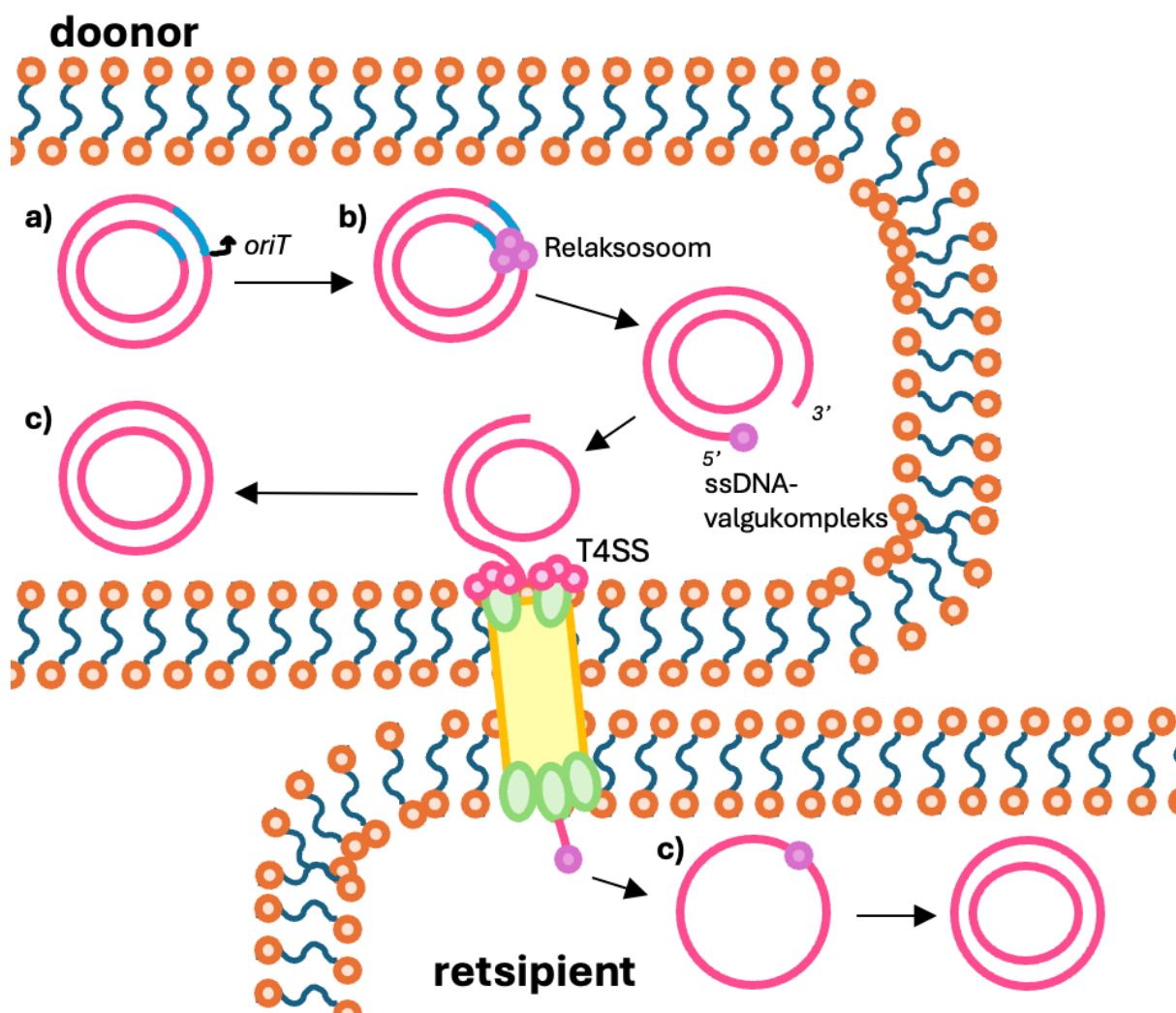
Kõik elusorganismid paljunevad, pärandades oma geenid järglastele. Bakterite puhul toimub paljunemine peamiselt pooldumise teel, mille käigus moodustuvad kaks identset rakku – algne bakter ja tema kloon. Seda protsessi nimetatakse ka vertikaalseks geeniülekaneks. Kuigi bakteritel ei esine sugulist paljunemist, on neil siiski võimekus vahetada geneetilist materjali teiste sama põlvkonna bakterite vahel, mida nimetatakse horisontaalseks geeniülekaneks. Horisontaalse geeniülekande alla kuulub kolm mehhanismi – transduktsioon, transformatsioon ja konjugatsioon. Bakteriaalne konjugatsioon on horisontaalse geeniülekande keskne mehhanism, mille käigus toimub üheaahelalise mobiilse geneetilise elemendi aktiivne transport ühelt bakterilt teisele rakkudevahelise kontakti abil (Arnold jt, 2022; Cabezón jt, 2015; De La Cruz jt, 2010; Firth jt 1987; Helmuth & Achtman, 1978; Novotny jt, 1968; Ou & Anderson, 1970; Pison jt, 2023; Waksman, 2019).

Kõige sagedamini kandub konjugatsiooni käigus üle konjugatiivne plasmiid – isereplitseeruv ekstrakromosomaalne geneetiline element, mis sisaldab konjugatsiooni läbiviimiseks vajalikke ülekande- ehk *tra* gene (ingl k *transfer genes*) (Dimitriu jt, 2024; Hall jt, 2017; Hemmis & Schildbach, 2013; Ochman jt, 2000). Lisaks konjugatiivsetele plasmidiidele võivad kanduda üle ka erinevad integreeritud elemendid, näiteks transposoonid (Arnold jt, 2022; De La Cruz jt, 2010; Ochman jt, 2000; Rice, 1998). Konjugatiivsed transposoonid on bakteriaalsesse DNA-sse integreerunud mobiilsed üksused, mis on võimelised vahendama enda ülekannet bakterite vahel (Cheng jt, 2000; Clewell & Flanagan, 1993; Rice, 1998; Speer jt, 1992). Konjugatsiooni käigus ülekantavad geenid võivad sisaldada bakterite ellujäämist ja kohanemist soodustavaid omadusi, mis võivad olla seotud biofilmi moodustamise, raskemetallide resistentsuse, alternatiivsete metabolismiradade, virulentsuse või antibiootikumide resistentsusega. Sellest tulenevalt on konjugatsioon bakterite evolutsioonis ja keskkonnaga kohanemisel erakordselt oluline, võimaldades bakteripopulatsiooni elujõulisust suurendavate omaduste levikut (Hall jt, 2017; Lawrence, 1999; Ochman jt, 2000; Rankin jt, 2011; von Wintersdorff jt, 2016).

Gramnegatiivsete bakterite konjugatsioon koosneb mitmest etapist. Esmalt on edukaks konjugatsiooniks vajalik rakkude vaheline kontakt. Selleks on doonoraku pinnal piilid, mille abil see saab kinnituda retsiipiendile (De La Cruz jt, 2010; Hemmis & Schildbach, 2013; Virolle jt, 2020; Yu jt, 2021). Piilid on helikaalsed filamentsed struktuurüksused, mille tipus on

adhesiinmolekul (Aly & Baron, 2007; Waksman, 2019). Kõigepealt kinnituvad piilid retsipientrakule ja tõmbuvad seejärel kokku, viies nii doonori ja retsiptendi üksteisele lähemale (Clarke jt, 2008; Koraimann & Wagner, 2014; Piscon jt, 2023; Waksman, 2019). Stabiilse kontakti moodustamiseks on tavaliselt vaja veel lisainteraktsioone. Nende moodustumisel osalevad näiteks doonori ja retsiptendi pinnal olevad valgud ja lipopolüsahhariidid (Chambers jt, 2007; Eisenbrandt jt, 2000; Lawley jt, 2002).

Pärast stabiilse konjugatsioonipaari moodustumist võib alata plasmidi ülekanne, mida vahendavad valgukompleks relaksosoom ja tüüp IV sekretsioonisüsteem (T4SS) (Joonis 1). T4SS on makromolekulaarne kompleks, mis koosneb kolmest põhilisest komponendist: piilivalkudest, ATPaasidest ja konjugatsioonikanali valkudest (Cabezón jt, 2015, 2017; Ilangovan jt, 2015; Waksman, 2019). Ülekande käivitamiseks on vajalik ekspressioon *tra* geenidelt, mis kodeerivad ühe operonina kõiki ülekandeks vajalikke valke: T4SS-i osasid, relaksosoomi komponente ja regulaatoreid (Frost jt, 1994). Edasi saadetakse signaal relaksosoomile, mille komponentidest olulisim roll on relaksaasil (Ilangovan jt, 2015; Virolle jt, 2020; Waksman, 2019). Relaksaas tekitab üheaahelalise DNA katke konjugatiivse plasmidi ülekande alguspunktis (*oriT*, ingl k *origin of transfer*) ning seondub seejärel kovalentselt katke 5' otsaga (De La Cruz jt, 2010; Garcillán-Barcia jt, 2009; Ilangovan jt, 2015; Piscon jt, 2023). Selle tulemusena moodustub ssDNA-valgukompleks, mille tunneb ära relaksaasi esitlev valk. Viimane transpordib kompleksi T4S-süsteemile, mille kaudu DNA-valgukompleks retsiptenti üle pumbatakse (Cabezón jt, 1997; De La Cruz jt, 2010; Gomis-Ruth jt, 2004; Ilangovan jt, 2015; Llosa jt, 2002; Virolle jt, 2020; Waksman, 2019). Kui terve kompleks on viidud üle retsipientrakku, kleebib relaksaas transpordiks lineariseeritud ssDNA taas rõngasmolekuliks kokku (Chandler jt, 2013; Dostál jt, 2011; Draper jt, 2005; Waksman, 2019). Nii doonor- kui retsipientrakus toimub konjugatiivse plasmidi replikatsioon, misjärel on mõlemas bakteris kaheaahelaline koopia algsest plasmidist (Shen jt, 2022; Zechner jt, 2012; Virolle jt, 2020; Waksman, 2019). Lõpuks ühendus bakterite vahel katkeb. Teatud juhtudel ei jää replikatiivne plasmid eraldiseisvana püsima, vaid integreerub hoopis retsiptendi kromosoomi (Arnold jt, 2022; Botelho, 2023; Virolle jt, 2020).



Joonis 1. Bakteriaalse konjugatsiooni mehhanism. (a) Ülekande algatamiseks on vajalik *tra* geenide ekspressioon (joonisel märgitud siniselt). (b) Relaksosoom tunneb ära *oriT* (ingl *k origin of transfer*), tekitab üheaahelalise katke DNA ahelasse ja seondub seejärel kovalentselt katke 5' otsaga. Moodustunud ssDNA-valgukompleksi esitletakse T4S-süsteemile, misjärel toimub transport retsipienttrakku. (c) Jõudnud rakku, kleebib relaksaas ssDNA uuesti rõngasmolekuliks ning nii doonoris kui ka retsiendis toimub DNA komplementaarse ahela süntees, mille tulemusena on mõlemas rakus dsDNA konjugatiivne plasmiid. Joonise autor: Laura Maria Pella

1.2. Konjugatsiooni ohtlikkus inimesele

Antibiootikumiresistentsuse tekkeks on kaks põhilist viisi: juhuslikud mutatsioonid ja resistentsusgeeni horisontaalne ülekande (Graf jt, 2019; Pang jt, 2019; Reygaert, 2018). Kui mutatsioonid võivad muuta üksiku bakteri antibiootikumi vastu resistentseks, siis just horisontaalne geeniülekanne põhjustab resistentsuse ulatuslikku levikut (Dang jt, 2017; Graf jt, 2019; Mazel & Davies, 1999; Tang jt, 2022; von Wintersdorff jt, 2016; Waters, 1999). Horisontaalse geeniülekanne mehhanismidest peetakse resistentsusgeenide ülekandel kõige olulisemaks konjugatsiooni, sealhulgas kliiniliselt oluliste patogeenide seas (von Wintersdorff

jt, 2016). Näiteks ESKAPE patogeenide hulka kuuluvad *Klebsiella pneumoniae* ja *Enterobacter* spp. omandavad antibiootikumiresistentsuse just konjugatsiooni vahendusel (Partridge jt, 2018; X. Yang jt, 2021). Suureks murekohaks on seejuures asjaolu, et konjugatiivsed plasmiidid võivad kodeerida kliinilises praktikas eriti ohtlikke resistentsusgeene, sealhulgas kolistiiniresistentsusgeeni *mcr-1* või karbapeneemide resistentsusgeene *bla_{KPC}* ja *bla_{NDM}*, mis piirab oluliselt ravivõimalusi (Wang jt, 2018; Wu jt, 2019; X. Yang jt, 2021).

Patogeenide järjest kasvav resistentsus erinevate antibiootikumide suhtes on ülemaailmne probleem, mille ajendiks on antibiootikumide hooletu kasutus nii meditsiinis, veterinaarias kui ka põllumajanduses (Ashbolt jt, 2013; Cabello, 2006; Chang jt, 2015; Khachatourians, 1998; Pal jt, 2017; Smith jt, 2002; Ventola, 2015). Meditsiinisektoris on probleemiks antibiootikumide kergekäeline määramine ja pikendatud ravikuurid, mis mõlemad soodustavad resistentsuse teket ja selektiivset survet resistentsuse sagenemiseks (Gjini jt, 2020; Llor & Bjerrum, 2014; Reygaert, 2018; Ventola, 2015; Vitiello jt, 2024). Loomakasvatuses kasutatakse antibiootikume mitte ainult nakkuste ennetamiseks ja raviks, aga ka kariloomade kasvu stimuleerimiseks (Isaacson & Torrence, 2002; Khachatourians, 1998; Pal jt, 2017). Taimakasvatuses võidakse antibiootikume, näiteks tetratsükliini või streptomütsiini, kasutada muuhulgas pestitsiididena (Levy, 2002). Antibiootikumide sattumine keskkonda, sealhulgas põllumajandusest pärit sõnniku, vihmavete või puhastamata heitvete kaudu, loob selektiivse surve ka looduslikes keskkondades resistentsete bakterite paljunemiseks ja levikuks (Amarasiri jt, 2020; Berendonk jt, 2015; Filutowicz jt, 2008; Graf jt, 2019; Headd & Bradford, 2018). Probleemi süvendab veelgi asjaolu, et uute antibiootikumide väljatöötamine ei suuda pidada sammu resistentsuse kiire arenguga (Cabezón jt, 2015; Filutowicz jt, 2008; Gould & and Bal, 2013; Hede, 2014; Ventola, 2015).

Ulatuslikul antibiootikumiresistentsuse levikul võivad olla tõsised tagajärjed mitmes valdkonnas. Tervishoiusektoris võivad suurened a tervishoiukulud, kannatada haiglaressurss ning kasvada ka surmade arv (Llor & Bjerrum, 2014). Loomakasvatuses võib resistentsete patogeenide levik viia nakkushaiguste sagenemiseni kariloomade hulgas, samas kui taimepatogeenide resistentsus võib oluliselt vähendada põllukultuuride saagikust. Seega ei ohusta antibiootikumiresistentsuse levik ainult inimeste tervist, vaid seab ohtu ka ülemaailmse toiduturvalisuse (*World Health Organization*, 2023).

1.3. Konjugatsiooni mõjutavad tegurid

1.3.1. Doonori ja retsiendi omadused

Konjugatsioonipaari moodustavaid baktereid kutsutakse doonoriks, mis sisaldab konjugatsiooni algatamiseks vajalikku plasmidi, ja retsiendiks, millele kantakse üle geneetilist materjali. Võimalike retsipientide eristamiseks doonorite hulgast, on bakteritel erinevaid mehhanisme, sealhulgas signaalmolekulide eritamine. Doonorrakud võivad eritada inhibiitormolekule, mis signaliseerivad teistele doonoritele vastava plasmidi olemasolust, takistades seeläbi tarbetut konjugatsiooni algatamist (Auchtung jt, 2005; Singh jt, 2013). Teisalt võivad retsiendid eritada plasmiid-spetsiifilisi feromone, mis võimaldavad konjugatsiooniprotsessi käivitamist juhul, kui doonor ja retsipient on üksteisele piisavalt lähedal (Dunny jt, 1979; Hirt jt, 2002; Mori jt, 1988). Samas ei taga ainult konjugatiivse plasmidi puudumine edukat konjugatsiooni – eelduseks on ka stabiilse konjugatsioonipaari moodustamine, milles osalevad bakterite pinnastruktuurid, nagu valgud ja lipopolüsahhariidid (Alderliesten jt, 2020; Thomas & Nielsen, 2005). Nende omavahelise seondumiseefektiivsuse määrab aga suuresti doonori ja retsiendi taksonoomiline sugulusaste: mida lähedamas suguluses bakterid on, seda suurem on tõenäosus stabiilse konjugatsioonipaari tekkeks (Alderliesten jt, 2020).

1.3.2. Keskkonnatingimused

Konjugatiivsete geenide regulatsioon on tugevalt seotud keskkonnasignaalidega, tagamaks nende õigeaegset ja koordineeritud ekspressiooni (Pallares-Vega jt, 2021; Piscon jt, 2023; Virolle jt, 2020). Olulisimad konjugatsiooni mõjutavad keskkonnategurid on temperatuur, pH, toitainete ja hapniku kättesaadavus, biofilmi moodustamine ja rakutihedus (Dadeh Amirfard jt, 2024; Johnsen & Kroer, 2007; Liu jt, 2023; Pallares-Vega jt, 2021; Piscon jt, 2023; Virolle jt, 2020).

1.3.2.1. Temperatuur

Üldiselt toimub konjugatsioon efektiivsemalt mõõdukatel temperatuuridel, samas kui äärmuslikel temperatuuridel, nagu 4°C või 42°C, on konjugatsioon pärsitud (Pallares-Vega jt, 2021; Piscon jt, 2023; Yang jt, 2022). Siiski on kirjanduses vastuolulisi andmeid konjugatsiooni optimaalse temperatuuri kohta. Näiteks Piscon jt (2023) leidsid, et *E. coli* tüvede vaheline konjugatsioon on tõhusam 25°C juures, ehkki *tra* geenide ekspressioon on suurim liigi

optimaalsel kasvutemperatuuril, milleks on 37°C (Piscon jt, 2023). Samas on teised eksperimendid näidanud, et maksimaalne konjugatsioon saavutatakse *E. coli* tüvede puhul just 37°C juures (Headd & Bradford, 2018; Yang jt, 2022).

1.3.2.2. Toitained ja pH

Konjugatsiooniks vajaliku energia tagamiseks on oluline piisav toitainete kättesaadavus (Bale jt, 1987; Fernandez-Astorga jt, 1992; Pallares-Vega jt, 2021). Näiteks on lämmastik kui aminohapete koostisosa oluline komponent piilide moodustamiseks (Pallares-Vega jt, 2021). Toitainete lahustuvus ja seeläbi nende kättesaadavus rakkudele sõltuvad aga keskkonna pH-st (Richaume jt, 1989). Lisaks on täheldatud, et väga aluselistes tingimustes, alates pH väärtusest 8-9, on konjugatsioon inhibeeritud piilide vähese kleepuvuse tõttu (Alvarez-Molina jt, 2022; Toomey jt, 2009).

1.3.2.3. Hapnik

On teada, et aeroobsed tingimused on konjugatsiooni soodustava mõjuga samas kui mikroaeroofiilsed või anaeroobsed olud võivad vähendada selle efektiivsust (Piscon jt, 2023). Hapnikupuuduse pärssiv mõju seisneb arvatavasti selles, et konjugatsiooniks peab olema tagatud sünkroniseeritud *tra* geenide ekspressioon, mis on aga hapnikuvaestes tingimustes häiritud (Piscon jt, 2023).

1.3.2.4. Rakutihedus

Kuna konjugatsioon eeldab rakkudevahelist kontakti, on selle sagedus tugevalt seotud rakutihedusega (Dadeh Amirfard jt, 2024; Fernandez-Astorga jt, 1992; Kessler jt, 2023; Liu jt, 2023). Seega mida rohkem on rakke ühe pindala- või ruumalaühiku kohta, seda suurema tõenäosusega saab tekkida rakkudevaheline kontakt. Suuremat rakutihedust soodustavad optimaalsed kasvutingimused ja näiteks biofilmi moodustamine (Dadeh Amirfard jt, 2024; Liu jt, 2023; Virolle jt, 2020). Biofilmi pakub lisaks ka kaitset ebasoodsate keskkonnatingimuste, näiteks antibiootikumide eest (Madsen jt, 2012; Virolle jt, 2020; H. Yu jt, 2020). Samuti on biofilmides sageli palju erinevaid mikroobipopulatsioone, mis suurendab geneetilist mitmekesisust ja võimaldab biofilmis levida erinevatel eeliseid andvatel geenidel (Madsen jt, 2012; Virolle jt, 2020).

Konjugatsiooni edukust mõjutab lisaks üldisele rakutihedusele ka see, kui palju on kultuuris doonor- ja kui palju retsipientrakke. Seega võidakse näiteks laboratoorsetes katsetes segada doonorit ja retsiipienti kokku erinevates suhetes, muuhulgas 1:1, 1:10 või 1:100. Pallares-Vega jt (2021) leidsid, et transkonjugantide teke retsiipienti kohta konjugatsioonil kahe *E. coli* tüve vahel on efektiivseim, kui doonor ja retsiipient on segatud kokku suhtes 1:1. Seevastu on märgata langust konjugatsioonisageduses, kui doonori ja retsiipienti suhe kultuuris on vastavalt 1:10 või 1:100 (Pallares-Vega 2021). Sellega kattuvad Bogusławska jt (2008) tulemused, leides, et suurim konjugatsioonisagedus retsiipienti kohta saavutati doonori ja retsiipienti suhtel 1:1 – $8,17 \cdot 10^{-3}$ –, samas kui 1:10 segus oli konjugatsioonisagedus umbkaudu $1,00 \cdot 10^{-3}$ (Bogusławska 2008).

1.3.3. Antimikroobsete ainete mõju konjugatsioonile

Konjugatsiooni uurimise raames on üritatud välja selgitada erinevate bakteritele toksiliste ühendite mõju selle efektiivsusele. On leitud, et teatud stressorid, sealhulgas antibiootikumid, kvaternaarsed ammooniumühendid ja raskemetallid, võivad konjugatsioonisagedust suurendada ja seda eelkõige vedelates tingimustes (Dadeh Amirfard jt, 2024; Han jt, 2019; Jutkina jt, 2016; S. Zhang jt, 2019; Y. Zhang jt, 2018). Oluline on mainida, et toksiliste ainete mõju konjugatsioonile on sõltuvuses nende kontsentratsioonist ning doonori ja retsiipienti liigist ning tüvest (Hu jt, 2024; Palm jt, 2022). Sageli tõstab konjugatsioonisagedust toksilise ühendi teatud kontsentratsioon, samas kui suuremad ja väiksemad kontsentratsioonid kas ei avalda mõju või mõjutavad vastupidiselt.

1.3.3.1. Hõbe

Hõbe on rakkudele mittevajalik metall, mille ioonidel on tugev antimikroobne toime. Ag^+ -ioonide kuhjumine rakus põhjustab membraanide ja nukleiinhapete kahjustusi ja funktsionaalsete valkude inaktiveerumist, pärssides muuhulgas rakujagunemist (Izatt jt, 1971; Jung jt, 2008; Sondi & Salopek-Sondi, 2004; Spadaro jt, 1974). Tõenäoliselt tuleneb Ag^+ -ioonide mõju konjugatsioonile geeniekspressiooni muutustest, reaktiivsete hapnikuradikaalide (ROS, ingl k *reactive oxygen species*) ületootmisest johtuvast oksüdatiivsest stressist ja DNA kahjustustega kaasnevast SOS-vastusest (Y. Zhang jt, 2018). On arvatud ka, et membraanikahjustused muudavad rakumembraani läbilaskvamaks, mis võib hõlbustada geneetilise elemendi ülekannet (Lu jt, 2020; Y. Zhang jt, 2018).

Mitmed uuringud on näidanud, et mitte-inhibeerivad hõbeioonide kontsentratsioonid võivad soodustada horisontaalset geeniülekannt (Lu jt, 2020; Y. Zhang jt, 2018). Näiteks leidsid Y. Zhang jt (2018), et hõbeioonide kontsentratsioonidel 0,01 ja 0,02 mg/l on stimuleeriv mõju *E. coli* tüvede vahelisele konjugatsioonile (Y. Zhang jt, 2018). Y. Zhang'i jt katseteks määratud Ag⁺-ioonide minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (MIC, ingl k *minimum inhibitory concentration*) oli 0,39±3,54 mg/l (Y. Zhang jt, 2018). Ka Lu jt (2020) artiklist järeldub, et hõbeioonid soodustavad *E. coli* K-12 LE392 ja *P. putida* KT2440 vahelise konjugatsiooni toimumist ja seda kontsentratsioonidel 1 ja 10 µg/l (MIC doonoril 25 µg/l ja retsiptendil 12,5 µg/l) (Lu jt, 2020).

1.3.3.2. Vask

Vask on mikroorganismidele väikestes kogustes hädavajalik mikroelement, kuid selle suuremad kontsentratsioonid on antimikroobse toimega. Vaseioonide toksilisus tuleneb muuhulgas interaktsioonidest raku valkude ja nukleiinhapetega (Trevors & Cotter, 1990). Nagu ka hõbeioonide puhul, suurenevad akumulierenud vaseioonide mõjul rakus oksüdatiivne stress ja membraani läbilaskvus ning toimuvad muudatused geeniekspresioonis (Song jt, 2021; S. Zhang jt, 2019; Y. Zhang jt, 2018).

Varasemalt on S. Zhang'i jt (2019) näidanud, et vaseioonid soodustavad doonori *E. coli* K-12 LE392 ja retsiptendi *P. putida* KT2440 vahelist konjugatsiooni kontsentratsioonidel 0,5, 1 ja 5 µmol/l, samas kui kontsentratsioonid 10 ja 100 µmol/l mõjuvad inhibeerivalt (MIC doonoril 200 µmol/l ja retsiptendil 300 µmol/l) (S. Zhang jt, 2019). Sarnaseid tulemusi on saanud ka Song jt (2021) – doonori *Proteus mirabilis* ChSC1905 ja retsiptendi *E. coli* EC600 vaheline konjugatsioon on soodustatud vaseioonide kontsentratsioonidel 1, 5 ja 10 µmol/l ning inhibeeritud kontsentratsioonil 100 µmol/l (MIC 10 mmol/l) (Song jt, 2021). Samuti kinnitasid Y. Zhang'i jt (2018) tulemused vaseioonide stimuleerivat mõju *E. coli* tüvede vahelisele konjugatsioonile kontsentratsioonidel 0,005, 0,01 ja 0,05 mg/l (MIC 410,63±6,65 mg/l) (Y. Zhang jt, 2018).

1.3.3.3. Bensalkooniumkloriid

Bensalkooniumkloriid (BAC, ingl k *benzalkonium chloride*) on kvaternaarseste ammooniumühendite hulka kuuluv antimikroobne pindaktiivne aine. Nende ühendite antimikroobne mõju seisneb membraanikahjustuste tekitamises, mis tuleneb interaktsioonidest

rakumembraani komponentidega, nagu näiteks fosfolipiididega, suurendades seeläbi rakumembraani läbilaskvust (Buffet-Bataillon jt, 2012; Gilbert & Moore, 2005). BAC-i mõjust konjugatsioonile on vähe teada, kuid Alvarez-Molina jt (2022) eksperimentidest selgub, et BAC-i maksimaalsel mitte-inhibeerival kontsentratsioonil 8 µg/ml, on *E. coli* tüvede vaheline konjugatsioon märkimisväärselt pärsitud (Alvarez-Molina jt, 2022).

1.3.4. Konjugatsioon vedelates tingimustes ja stabiilsel pinnal

Lisaks eelpool käsitletud teguritele mõjutab konjugatsioonisagedust ja efektiivsust ka suuresti see, kas protsess leiab aset stabiilsel pinnal, näiteks filtril või tardsöötmetel, või vedelates tingimustes (Dadeh Amirfard jt, 2024; Piscon jt, 2023; Robledo jt, 2022; Toomey jt, 2009). Üldjuhul on konjugatsioonisagedus vedelkultuuris madalam, mida on seostatud madalama rakutihedusega ning raskustega stabiilse konjugatsioonipaari moodustamisel (Alderliesten jt, 2020; Bradley jt, 1980; Simonsen jt, 1990; Toomey jt, 2009). Kui pinnakultuuris on stabiilsed rakukontaktid soodustatud, siis vedelkultuuris on võtmetähtsusega konjugatsioonipaari stabiliseerimine, mida mõjutab muuhulgas doonori ja retsiipiendi taksonoomiline sugulusaste (Alderliesten jt, 2020; Manoil & Rosenbusch, 1982). Keskkonnaspetsiifilist erinevust konjugatsioonisageduses on täheldanud Bogusławska jt (2008), kes uurisid konjugatsiooni *Lactococcus*'e tüvede vahel filtril ning tard- ja vedelsöötmetel. Tulemustest järeldus, et transkonjugantide arvukus doonori arvukuse kohta oli suurim filtril ($6,0 \cdot 10^{-3}$), samas suurusjärgus tardsöötmetel ($1,35 \cdot 10^{-3}$) ja oluliselt väiksem vedelsöötmes ($2,3 \cdot 10^{-7}$) (Bogusławska jt, 2008).

Seega erineb konjugatsioonisageduse tõlgendus sõltuvalt kasutatud katseformaadist. Filterkonjugatsiooni sagedus näitab otseselt bakterite konjugatsiooni kiirust ehk plasmidi ülekande kiirust, kuna rakukontakti ja stabiilse konjugatsioonipaari moodustamine ei ole piirav tegur (Zhong jt, 2010). Samas on vedelkultuuris rakukontakti teke juhuslik ja konjugatsioonipaari stabiliseerimine olulisem, mistõttu mõjutab konjugatsioonisagedust lisaks plasmidi ülekande kiirusele ka stabiilse konjugatsioonipaari tekkesagedus (Zhong jt, 2010).

1.3.5. Inkubeerimisaeg

Konjugatsiooni inkubeerimisaja osas pole välja kujunenud ühtset standardit. Lühikesi inkubatsiooniaegu nagu kuus või kaheksa tundi, on kasutanud näiteks Lu jt (2018; 2020), kes uurisid triklosaani ja hõbeda mõju konjugatsiooni efektiivsusele. Samas on levinud ka pikemad

ajad, näiteks 18-20 tundi, mida rakendasid *Lactococcus*'e tüvede konjugatsiooniks Bogusławska jt (2008). Inkubatsiooniaja valikul tuleb lähtuda konjugeeruvatest tüvedest ja keskkonnatingimustest (Saliu jt, 2020; Berg & Trevors, 1990). Tüvede roll ilmneb näiteks Saliu jt (2020) tulemustest, kus transkonjugantide teket täheldati enamike konjugatsioonipaaride puhul alates kaheksandast, kuid mõningal juhul ka juba neljandast inkubatsioonitunnist (Saliu jt, 2020). Keskkonnatingimuste olulisust rõhutavad muuhulgas Berg'i ja Trevors'i (1990) katsed, kus nad täheldasid *Pseudomonas*'e liikide vahelisel konjugatsioonil transkonjugantide teket mittesteriilses liivasavimullas juba alates teisest inkubatsioonitunnist, kuid steriilses mullas alles alates 12. tunnist (Berg & Trevors, 1990).

1.3.6. Transkonjugantide arvutamine

Konjugatsioonikatse tulemuste võrdlemist raskendab asjaolu, et erinevate katsete raames arvutatakse transkonjugantide (retsipientide, kellele on edukalt konjugatsiooni käigus plasmiid üle viidud) osakaalu erinevalt. Näiteks võidakse saadud keskmine transkonjugantide arvukus jagada kõikide bakterite arvukusega (Headd & Bradford, 2018), doonorite arvukusega (Pallares-Vega jt, 2021) või retsipiendi arvukusega (Chen jt, 2019; Jiao jt, 2017; Jutkina jt, 2016).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli uurida, kas mõni üldkasutatavatest antimikroobsetest ühenditest – nagu hõbe, vask või bensalkooniumkloriid – soodustab *Escherichia coli* CSH26 (pKJK5) ja *Pseudomonas putida* KT2440 tn7 GFP vahelist konjugatsiooni ja seeläbi antibiootikumiresistentsuse levikut. Selleks tuli:

1. määrata edasisteks katseteks konjugatsiooni optimaalne ajaaken;
2. määrata hõbeda, vase ning bensalkooniumkloriidi subinhivitoorsed ja minimaalsed bakteritsiitsed kontsentratsioonid (MBC, ingl k *minimum bactericidal concentration*)
3. valida sobilikud kontsentratsioonid antimikroobsete ainete mõju uurimiseks konjugatsioonile;
4. tuvastada, kas konjugatsiooni efektiivsuses esineb erinevusi sõltuvalt sellest, kas konjugatsioon toimub vedelates tingimustes või pinna peal;
5. tuvastada, kas hõbe, vask ja/või bensalkooniumkloriid mõjutavad konjugatsiooni efektiivsust;

Töö eesmärkide täitmiseks:

- viidi läbi katse määramaks konjugatsiooni ajaaken;
- leiti hõbe- ja vaseioonide ning bensalkooniumkloriidi subinhivitoorsed kontsentratsioonid ning MBC;
- valiti katsetes kasutatavad hõbe- ja vaseioonide ning bensalkooniumkloriidi kontsentratsioonid;
- optimeeriti konjugatsioonikatse protokoll;
- viidi läbi konjugatsioon paralleelselt vedelates tingimustes ja pinnal eelnevalt määratud hõbeda, vase ja bensalkooniumkloriidi kontsentratsioonidel;
- võrreldi transkonjugantide arvukust retsiipiendi kohta vedelkultuuris ja pinnakultuuris toimunud konjugatsiooni puhul;
- hinnati hõbeda, vase ja bensalkooniumkloriidi mõju konjugatsioonisagedusele vedelkultuuris ja pinnal;

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud tüved, söötmed ja lahused

Tabel 1 annab ülevaate kasutatud bakteritüvedest ja konjugatiivsest plasmiidist. Retsipienttüvena kasutatud *Pseudomonas putida* KT2440 tn7 GFP konstrueeriti Levi Tomitsiki bakalaureuse töö raames (Tomitsik, 2023), kasutades Maia Kivisaare grupilt (Tartu Ülikool) pärit *P. putida* KT2440 tüve ning Merike Jõesaare (Tartu Ülikool) plasmide pUC18T-miniTn7T-Gm-gfpmut3 ja pUX-BF13. Doonortüvena kasutatud *Escherichia coli* CSH26 ja konjugatiivne plasmiid IncP-1ε pKJK5 pärinevad Marko Virtalt (Helsingi Ülikool). *E. coli* t kasvatati 24 tundi 40 µg/ml tetratsükliini (Tc40) sisaldaval LB (lüsogeenne sööde, ingl k *lysogeny broth*) tardsöötmele (Miller, 1992; Tabel 2) 37°C juures ning *P. putida* t 40 µg/ml gentamütsiini (Gm40) sisaldaval LB tardsöötmele 30°C juures.

Kõik katses kasutatud söötmed valmistati deioniseeritud veega ning steriliseeriti autoklaavimise teel (Tabel 2).

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiid.

Liik ja tüvi	Kirjeldus	Päritolu
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 tn7 GFP	Retsipient, GFP ja gentamütsiini resistentsusgeeni sisaldava transposooniga tüvi	Konstrueeritud Levi Tomitsiki bakalaureusetöö käigus
<i>Escherichia coli</i> CSH26 (pKJK5)	Doonor, pKJK5 plasmiidiga tüvi	Marko Virta (Helsingi Ülikool)
Plasmiid	Kirjeldus	Päritolu
pKJK5	Konjugatiivne 54 383 aluspaari suurune eksogeenne plasmiid tetratsükliini ja trimetopriimi resistentsusgeenidega	Marko Virta (Helsingi Ülikool)

Tabel 2. Kasutatud söötmed ja lahused.

Sööde/lahus	Komponendid
LB tardsööde	Trüptoon 10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l + 40 µg/ml gentamüütsiini (Gm40) ja/või tetratsükliini (Tc40)
Toksilisust neutraliseeriv sööde (SCDLP, ingl k <i>soy casein digest broth with lecithin and polysorbate</i>)	Letsitiin 1 g/l, kaseiinpepton 17 g/l, sojapepton 3 g/l, NaCl 5 g/l, Na ₂ HPO ₄ 2,5 g/l, glükoos 2,5 g/l, TWEEN® 80 7 g/l
Orgaaniline saastelahus (ingl k <i>soil load</i>) (EPA 2022)	Veise seerumalbumiin 2,5 g/l, pärmiekstrakt 3,5 g/l, mutsiin 0,8 g/l, NaCl 6,4 g/l, KCl 0,16 g/l, Na ₂ HPO ₄ 1,152 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,16 g/l
Fosfaatpuhver (PBS, ingl k <i>phosphate buffered saline</i>)	NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na ₂ HPO ₄ 1,44 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,2 g/L; pH 7,1

2.2.2. Konjugatsiooni ajaakna määramine

Konjugatsiooni optimaalse ajaakna määramiseks tehti katsed viie erineva ajapunktiga: 0, 5, 10, 15 ja 24 tundi. Katseteks kasvatati *P. putida* KT2440 tn7 GFP ja *E. coli* CSH26 (pKJK5) üleoökultuurid selektiivsel LB tardsöötmele, koguti agaril kasvanud rakud kokku ning resuspendeeriti ühekordses orgaanilises saastelahuses (Tabel 2). Retsipiendi suspensioon lahjendati ühekordses saastelahuses OD₆₀₀ väärtuseni 20 (ligikaudu 1,6·10¹⁰ rakku/ml) ja doonori oma väärtuseni 16 (ligikaudu 1,28·10¹⁰ rakku/ml). Konjugatsioonisegu saamiseks segati kokku üks osa doonorit ja kümme osa retsiipienti (1:10), jälgendamaks keskkonnatingimusi, kus doonori ja retsiipienti arvukused ei ole tasakaalus ning suure tõenäosusega on konjugatiivset plasmiidid sisaldavat doonortüve tunduvalt vähem, kui retsiipienti. Konjugatsiooni ajaakna määramine viidi läbi üheksas bioloogilises ja ühes tehnilises korduses. Eduka konjugatsiooni korral kandus doonortüvelt *E. coli* CSH26 retsiipientile *P. putida* KT2440 üle tetratsükliiniresistentsust kodeeriv plasmiid pKJK5, mis võimaldas selekteerida transkonjugante gentamütsiini ja tetratsükliini sisaldaval tardsöötmele.

2.2.2.1. Konjugatsiooni ajaakna määramine vedelkultuuris

Konjugatsiooni ajaakna määramiseks vedelkultuuris pipeteeriti 100 µl konjugatsioonisegu mikrotiiterplaadile iga ajapunkti kohta kolmes korduses. Bakteritel lasti konjugeeruda toatemperatuuril vastavalt kas 0, 5, 10, 15 või 24 tundi.

Transkonjugantide, retsiendi ja doonori arvukuste määramiseks valmistati iga ajapunktil proovidest kümnekordsed lahjendused. 10^{-1} lahjendus tehti toksilisust neutraliseerivas söötmes (SCDLP, ingl k *soy casein digest broth with lecithin and polysorbate*) ja ülejäänud (10^{-2} ... 10^{-8}) ühekordses fosfaatpuhvris (PBS, ingl k *phosphate buffered saline*). Transkonjugantide arvukuse määramiseks külvati 100 µl 10^{-1} lahjendust Gm40Tc40 LB tardsöötmetele ning lahjendused 10^{-3} ... 10^{-8} külvati 20 µl tilkkülvina retsiendi ja doonori arvukuste leidmiseks Gm40 või Tc40 LB tardsöötmetele. Gm40 tardsöötmetelt loeti retsiendi *P. putida* kolooniaid ja Tc40 tardsöötmetelt doonortüve *E. coli* kolooniaid.

2.2.2.2. Konjugatsiooni ajaakna määramine pinnal

Konjugatsiooni ajaakna määramiseks pinnakultuuris pipeteeriti 15 µl konjugatsioonisegu steriilsetele polüpropüleenist plastpindadele iga ajapunkti kohta kolmes korduses ja asetati peale steriilne klaaskate, nii et konjugatsioonisegu ühtlaselt klaasi all laiali valgus. Selline meetodika imiteerib mittepoorsete pindade testimiseks olemasolevaid rahvusvahelisi standardmeetodeid ning võimaldab maksimaalset kontakti testitavate organismide ja pinna vahel. Bakteritel lasti konjugeeruda toatemperatuuril vastavalt kas 0, 5, 10, 15 või 24 tundi.

Pinnakultuuride arvukuste leidmiseks asetati iga plastpind koos klaaskattega 10 ml toksilisust neutraliseerivasse söötmesse (mahapesu). Tuube segati vorteksil täisvõimsusel 30 sekundi jooksul. Seejärel külvati igast tuubist 500 µl Gm40Tc40 LB tardsöötmele. Lisaks valmistati retsiendi ja doonori arvukuste leidmiseks kümnekordsed lahjendused 10^{-1} ... 10^{-5} ühekordses PBS-s, mis külvati 20 µl tilkkülvidena Gm40 või Tc40 LB tardsöötmetele.

Nii vedel- kui pinnakultuuri puhul inkubeeriti transkonjugantide ja retsiendi väljakülve 30°C juures ning doonori väljakülve 37°C juures 24 tundi. Seejärel loendati moodustunud kolooniad ja arvutati kolooniaid moodustavate ühikute arv (CFU, ingl k *colony forming units*) milliliitri kohta.

2.2.3. Konjugatsiooniks sobilike antimikroobsete ainete kontsentratsioonide määramine

Uurimaks hõbeioonide (AgNO_3), vaseioonide (CuSO_4) ja bensalkooniumkloriidi mõju konjugatsioonile, määrati edaspidisteks katseteks nende ühendite subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC-d. Selleks testiti 9-13 erinevat kontsentratsiooni (Tabel 3) iga antimikroobse aine kohta. Katse läbiviimiseks kanti 100 μl konjugatsioonisegu kolmes korduses iga kontsentratsiooni kohta mikrotiiterplaadile. Kohe peale seda lisati bakteritele 10 μl ühte eelnevalt valmistatud antimikroobse aine kontsentratsiooni. Kontrollina kasutati samas mahus deioniseeritud vett. Baktereid inkubeeriti toatemperatuuril 18 tundi. Katse viidi läbi kolmes bioloogilises ja ühes tehnilises korduses.

Tabel 3. Hõbe- ja vaseioonide ning bensalkooniumkloriidi (BAC) MBC määramiseks kasutatud kontsentratsioonid. Esimeses tulbas on toodud kontsentratsioonid ning ülejäänud kolmes tulbas on iga aine puhul testitud kontsentratsioonid märgitud tähisega „x“.

Kontsentratsioon	Ag^+ (AgNO_3), mM	Cu^{2+} (CuSO_4), mM	BAC, g/l
25,6	x	x	
12,8	x	x	
6,4	x	x	
3,2	x	x	x
1,6	x	x	x
0,8	x	x	x
0,4	x	x	x
0,2	x	x	x
0,1	x	x	x
0,05	x	x	x
0,025	x	x	x
0,0125	x	x	
0	x	x	x

Bakterite arvukuste leidmiseks 0 tunni ja 18 tunni ajapunktidel kasutati eelmises alampeatükis kirjeldatud meetodikat ning selektiivsöötmetele külvati eraldi doonorid ja retsiপিঁndid. Kuna antimikroobse aine mõju uurimisel konjugatsioonile ei olnud eesmärk baktereid tappa, siis valiti edasisteks katseteks sellised kontsentratsioonid, mis jäid MBC väärtustest madalamale.

2.2.4. Antimikroobsete ainete mõju uurimine konjugatsioonisagedusele

Hõbeioonide, vaseioonide ja bensalkooniumkloriidi mõju uurimiseks lisati konjugatsioonisegule, mida oli pipeteeritud mikrotiiterplaadile 100 µl, 10 µl nende ainete valitud kontsentratsioone või deioniseeritud vett ja suspendeeriti hoolikalt. Iga aine igat kontsentratsiooni ning deioniseeritud vett lisati konjugatsioonisegule kolmes korduses. Saadud segu inkubeeriti 18 tundi toatemperatuuril (konjugatsioon vedelas). Lisaks tõstet igast segust mikrotiiterplaadi kaevus 15 µl steriilsele polüpropüleenist plastpinnale ja kaeti steriilse klaaskattega (konjugatsioon pinnal). Bakteritel lasti konjugeeruda 18 tundi toatemperatuuril. Katsed viidi läbi kolmes bioloogilises ja viies tehnilises korduses.

Arvukuste määramiseks 0 tunni ja 18 tunni ajapunktide saabudes kasutati alampeatükkides „Konjugatsiooni ajaakna määramine vedelkultuuris“ ja „Konjugatsiooni ajaakna määramine pinnal“ kirjeldatud meetodikat.

2.2.5. Andmeanalüüs

Konjugatsioonisageduse leidmiseks arvutati esmalt nii transkonjugantide kui retsiপিঁndide CFU arv milliliitri kohta vedelkultuuris ja pinnakultuuris. Retsiপিঁndide ja transkonjugantide arvuse leidmiseks vedelkultuurist kasutati valemit

$$CFU/ml = \text{kolooniate arv} \cdot \text{külvilahjendus} \cdot \frac{\text{reaktsioonisegu maht } (\mu\text{l})}{\text{külvimaht } (\mu\text{l})} \cdot \frac{1000 \mu\text{l}}{\text{inokulatsiooni maht } (\mu\text{l})} \quad (1.1)$$

ja pinnakultuuri puhul valemit

$$CFU/ml = \text{kolooniate arv} \cdot \text{külvilahjendus} \cdot \frac{\text{mahapesu maht } (\mu\text{l})}{\text{külvimaht } (\mu\text{l})} \cdot \frac{1000 \mu\text{l}}{\text{inokulatsiooni maht } (\mu\text{l})} \quad (1.2).$$

Konjugatsioonisageduse arvutamiseks jagati iga saadud transkonjugantide CFU/ml vastava retsiপিঁndi omaga nii vedel- kui pinnakultuuri puhul. Edasiste analüüside jaoks transformeeriti saadud tulemused \log_{10} formaati.

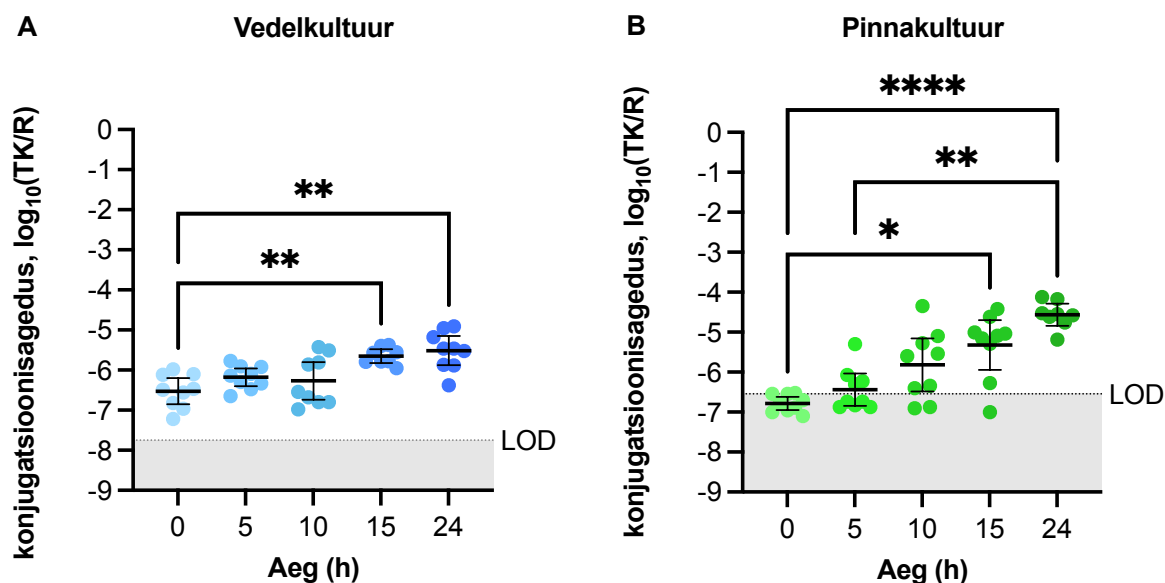
2.2.6. Statistika

Kvantitatiivsete tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism 10.4.2 (GraphPad Software Inc., USA) tarkvarapaketti. Tulenevalt konjugatsiooni juhuslikkusest põhjustatud konjugatsioonisageduse kõikumisest, rakendati üksikute anomaalsete väärtuste eemaldamiseks edasisest analüüsist Grubbs'i testi. Andmete analüüsimiseks kasutati ühefaktorilist dispersioonianalüüsi (ANOVA). Selgelt mitte-normaaljaotusega andmete analüüsiks rakendati mitteparameetilist Kruskal-Wallis'e testi koos sobiva *post-hoc* testiga. Normaaljaotuse korral kasutati Welch'i testi. Vedelkultuuri ja pinnakultuuri konjugatsioonisageduste võrdlemiseks 0. ja 24. või ainult 0. tunnil rakendati Student'i t-testi. Statistiliselt oluliste erinevuste tuvastamiseks kasutati olulisusnivood $\alpha=0,05$. Iga graafiku all on märgitud, millist testi vastavate andmete puhul kasutati.

2.3. Tulemused

2.3.1. Konjugatsiooni optimaalse ajaakna määramine

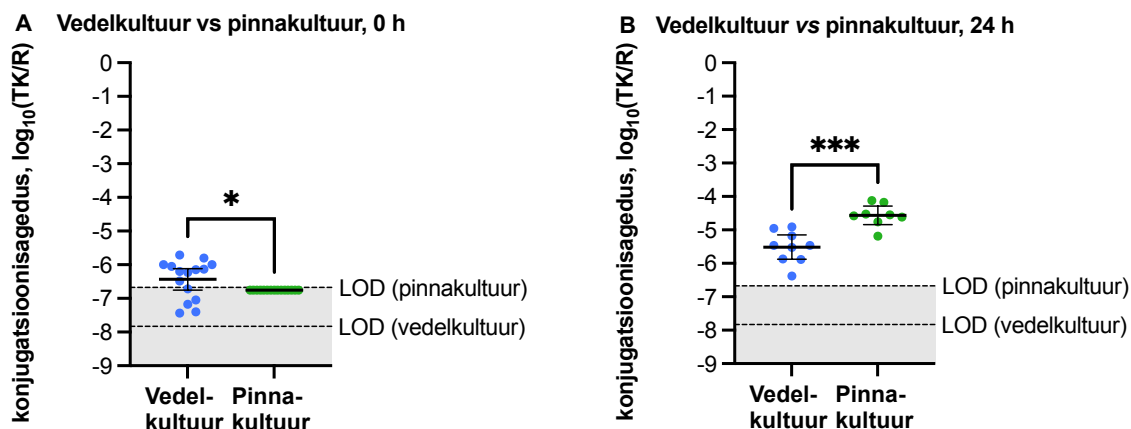
Uurimaks valitud antimikroobsete ühendite mõju konjugatsioonisagedusele, tuli esmalt panna paika konjugatsiooniks optimaalne ajaaken. Selleks tehti katsed nii vedel- kui pinnakultuuris ajapunktidel 0, 5, 10, 15 ja 24 tundi. Mõlemas keskkonnas täheldati märkimisväärset tõusu konjugatsioonisageduses alates 15. tunnist (Joonis 2).



Joonis 2. Konjugatsiooni katseks sobiva ajaakna määramine vedelates tingimustes ja pinnal. (A) Konjugatsioonisagedus vedelkultuuris. (B) Konjugatsioonisagedus pinnakultuuris. Joonisel on toodud transkonjugantide (TK) arv retsiipiendi (R) kohta \log_{10} transformeerituna ja sageduste keskväärtused koos 95% usalduslävenga. Halli ja punktiirjoonega on märgitud empiiriline tuvastuspiir LOD (ingl k *limit of detection*, kates 3 kolooniat). Statistilisel analüüsil võrreldi konjugatsioonisagedust kõigi ajapunktide vahel, kasutades Kruskal-Wallis'e analüüsi ja Dunn'i *post-hoc* testi usaldusnivool $\alpha=0,05$. Joonisel on esitatud statistiliselt olulised erinevused (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; **** $P<0,0001$).

2.3.2. Konjugatsioonisageduse võrdlus vedel- ja pinnakultuuris

Tuvastamaks võimalikke erinevusi konjugatsioonisageduses vedel- ja pinnakultuuri vahel, võrreldi transkonjugantide sagedusi 24. inkubatsioonitunnil. Täheldati, et konjugatsioonisagedus vedelkultuuris oli sellel ajapunktisel üheksa korda madalam kui pinnakultuuris, vastavalt $3,1 \cdot 10^{-6}$ ja $2,7 \cdot 10^{-5}$ ($P<0,001$; Joonis 3B). Lisaks kasvasid vedelkultuuri 0 tunni ajapunktist välja transkonjugandid, mida pinnakultuuri puhul ei täheldatud (Joonis 3A).

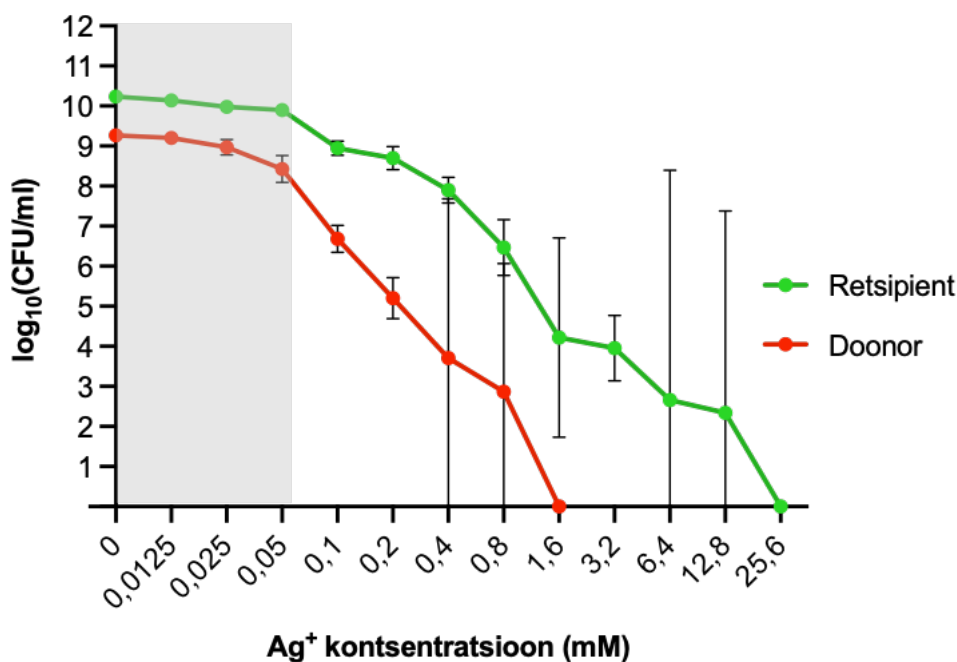


Joonis 3. Konjugatsioonisageduse erinevus vedel- ja pinnakultuuris. (A) Konjugatsioonisagedus 0 h ajapunktil vedel- ja pinnakultuuris. (B) Konjugatsioonisagedus 24 h ajapunktil vedel- ja pinnakultuuris. Joonisel on toodud transkonjugantide (TK) arv retsiendi (R) kohta \log_{10} transformeerituna ja sageduste keskvaartused koos 95% usaldusl\u00e4vega. Halli ja punktiirjoonega on m\u00e4rgitud empiiriline tuvastuspiir LOD (ingl k *limit of detection*, k\u00e4ses 3 kolooniat). Statistilisel anal\u00fc\u00fcsil v\u00f6rreldi nii vedel- kui pinnakultuuris konjugatsioonisagedust vastaval ajapunktil Student'i t-testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Joonisel on esitatud statistiliselt olulised erinevused (* $P<0,05$, *** $P<0,001$).

2.3.3. H\u00f5beioonide m\u00f5ju bakterite konjugatsioonisagedusele

2.3.3.1. Ag^+ -ioonide subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC

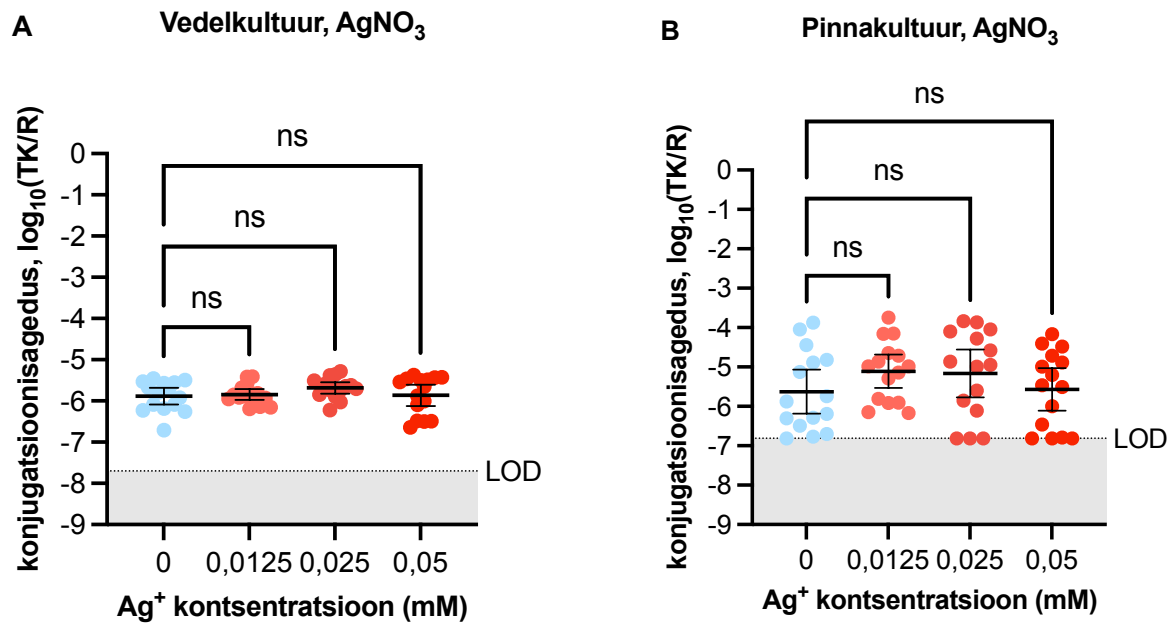
Enne antimikroobsete ainete m\u00f5ju uurimist konjugatsioonile oli oluline teha kindlaks uuritavate ainete kontsentratsioonid, millest alates avaldus nende inhibitoorne m\u00f5ju ehk doonori ja retsiendi rakuarvukuse kahanemine. Vastavate Ag^+ -ioonide kontsentratsioonide leidmiseks, m\u00e4arati nii doonori kui retsiendi rakuarvukused erinevatel kontsentratsioonidel (Tabel 3) peale 18-tunnist inkubatsiooni. Seej\u00e4rel leiti minimaalne bakteritsiidne kontsentratsioon (MBC, ingl k *minimal bactericidal concentration*) ehk kontsentratsioon, mille puhul koloonaid enam ei tuvastatud. K\u00e4esolevas t\u00f5\u00f5s oli doonort\u00fcve (*E. coli* CSH26) MBC h\u00f5beioonide suhtes 1,6 mM ja retsiendit\u00fcvel (*P. putida* KT2440) 25,6 mM (Joonis 4). Seega oli kasutatud doonort\u00fcvi Ag^+ -ioonide suhtes 16 korda tundlikum kui retsiendit. Vaatamata erinevale MBC-le tuvastati, et nii doonori kui retsiendi arvukus kahanes juba kontsentratsioonil 0,1 mM. Sellest tulenevalt valiti edasisteks konjugatsioonikatseteks h\u00f5beioonide subinhibitoorsed kontsentratsioonid 0,0125, 0,025 ja 0,05 mM (hallil taustal piirkond joonisel 4). Seega oli k\u00f6rgeim konjugatsioonikatsetes kasutatud kontsentratsioon 512 korda v\u00e4iksem retsiendi ja 32 korda madalam doonori MBC-st.



Joonis 4. Doonori ja retsiptiendi hõbeioonide MBC määramine. Joonisel on toodud muutused retsiptiendi ehk *P. putida* KT2440 ja doonori ehk *E. coli* CSH26 arvukuses (\log_{10} -skaalas) sõltuvalt Ag^+ -ioonide kontsentratsioonist koos 95% usalduslãvega. Halli taustaga on märgitud doonori ja retsiptiendi arvukused nendel kontsentratsioonidel, mida kasutati hõbeioonide mõju uurimiseks konjugatsioonile. Retsiptiendi MBC-ks määrati 25,6 mM ja doonoril 1,6 mM.

2.3.3.2. Hõbeioonide mõju konjugatsioonisagedusele

Leidmaks, kas hõbeioonid mõjutavad konjugatsioonisagedust vedelkultuuris või pinnainkubatsioonil, uuriti transkonjugantide arvu retsiptiendi kohta Ag^+ -ioonide kontsentratsioonidel 0,0125, 0,025 ja 0,05 mM. Selgus, et nendel kontsentratsioonidel puudus statistiliselt oluline mõju konjugatsiooni toimumisele nii vedelkultuuris ($P=0,4208$; Joonis 5A) kui ka pinnakultuuris ($P=0,3551$; Joonis 5B). Samas oli võimalik näha kõnealuste kontsentratsioonide puhul bioloogilist efekti. Nimelt oli nii vedel- kui pinnakultuuris tuvastatav väike tõus konjugatsioonisageduses vastavalt kontsentratsioonidel 0,025 mM või 0,0125 ja 0,025 mM.

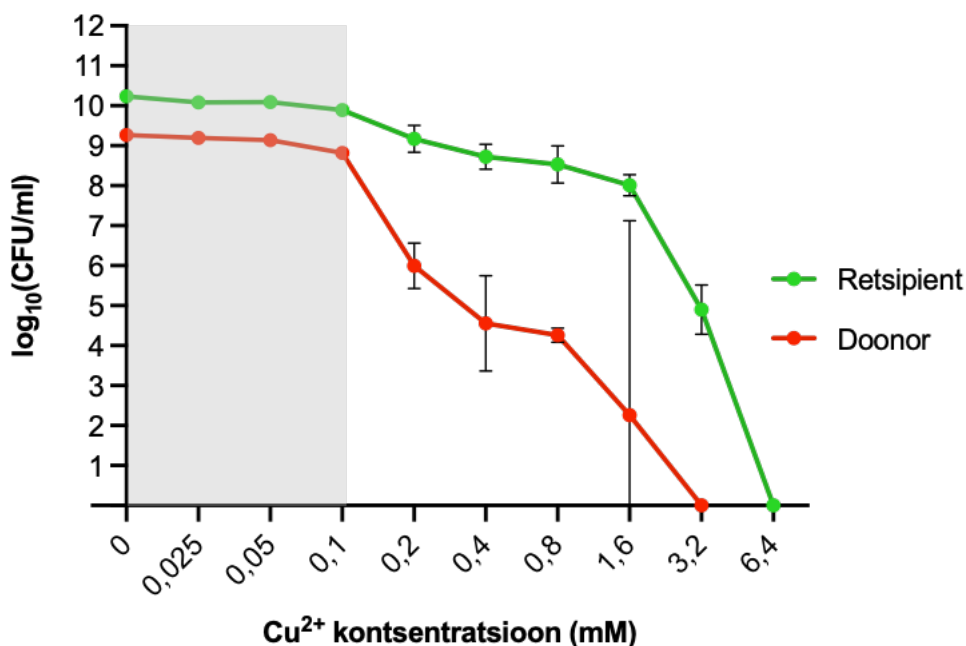


Joonis 5. Hõbeda mõju konjugatsioonisagedusele vedelates tingimustes ja pinnal. (A) Konjugatsioonisagedus hõbeioonide juuresolul vedelkultuuris. (B) Konjugatsioonisagedus hõbeioonide juuresolul pinnakultuuris. Joonisel on toodud transkonjugantide (TK) arv retsiipiendi (R) kohta log₁₀ transformeerituna ja sageduste keskvaartused koos 95% usalduslänguga. Halli ja punktiirjoonega on märgitud empiiriline tuvastuspiir LOD (ingl k *limit of detection*, kates 3 kolooniat). Statistilisel analüüsil võrreldi konjugatsioonisagedusi ilma hõbedata kontrolliga. Vedelkultuuri andmeid analüüsiti normaaljaotuse puudumise tõttu Kruskal-Wallis'e testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Pinnakultuuri analüüsiks kasutati normaaljaotusest tulenevalt ühesuunalist dispersioonianalüüsi usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulisi erinevusi ei tuvastatud (ns, ingl k *non-significant*).

2.3.4. Vaseioonide mõju bakterite konjugatsioonisagedusele

2.3.4.1. Cu²⁺-ioonide subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC

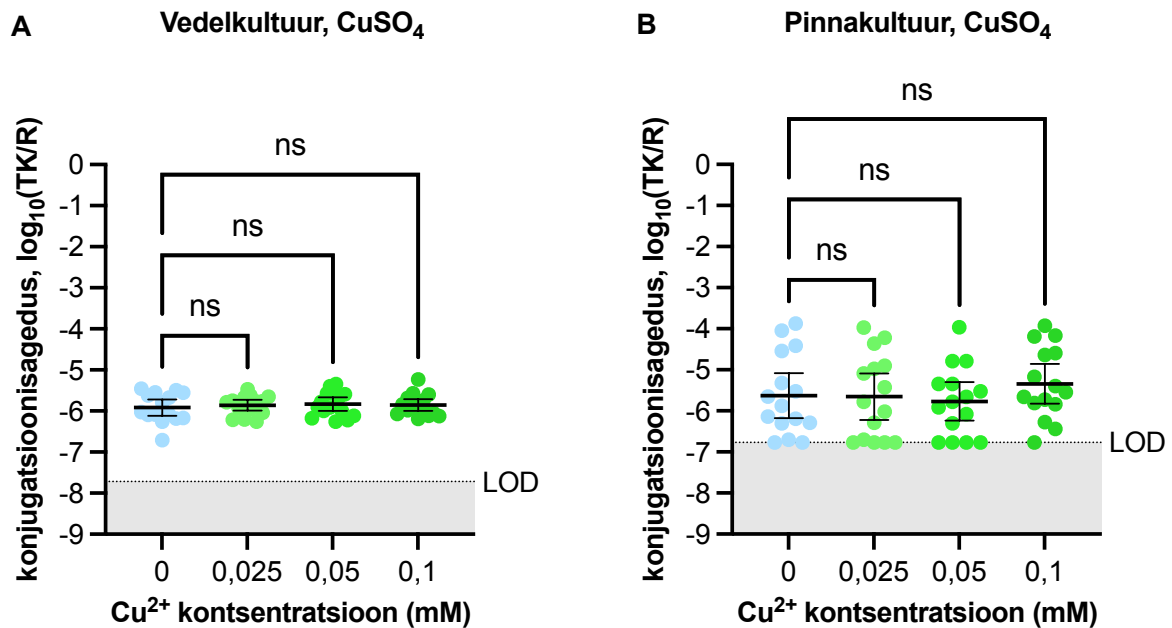
Ka vaseioonide puhul määrati esmalt subinhibitoorsed kontsentratsioonid ning MBC nii doonorile kui retsiipiendile. *E. coli* MBC väärtuseks oli 3,2 mM ning *P. putida* MBC oli 6,4 mM (Joonis 6). Nagu ka hõbeda puhul, oli doonortüvi vasele natuke tundlikum. Alates Cu²⁺-ioonide kontsentratsioonist 0,2 mM võis retsiipiendi puhul märgata kontrolliga võrreldes kümnekordset ja doonori puhul pea tuhandekordset langust arvukuses. Sellest tulenevalt valiti edaspidisteks katseteks vaseioonide subinhibitoorsed kontsentratsioonid 0,025, 0,05 ja 0,1 mM (hallil taustal piirkond joonisel 6). Seega oli Cu²⁺-ioonide kõrgeim edasistes katsetes rakendatud kontsentratsioon 32 korda väiksem doonortüve MBC-st ja 64 korda madalam retsiipiendi omast.



Joonis 6. Doonori ja retsiptiendi vaseioonide MBC määramine. Joonisel on toodud muutused retsiptiendi ehk *P. putida* KT2440 ja doonori ehk *E. coli* CSH26 arvukuses (log₁₀-skaalas) sõltuvalt Cu²⁺-ioonide kontsentratsioonist koos 95% usalduslängega. Halli taustaga on märgitud doonori ja retsiptiendi arvukused nendel kontsentratsioonidel, mida kasutati vaseioonide mõju uurimiseks konjugatsioonile. Retsiptiendi MBC-ks määrati 6,4 mM ja doonoril 3,2 mM.

2.3.4.2. Vaseioonide mõju konjugatsioonisagedusele

Katsest selgus, et valitud vaseioonide kontsentratsioonid – 0,025, 0,05 ja 0,1 mM – ei soodusta konjugatsiooni toimumist ei vedelkultuuris (P=0,8818; Joonis 7A) ega pinnakultuuris (P=0,6396; Joonis 7B). Erinevalt hõbeioonidest, ei olnud vaseioonide puhul võimalik tuvastada ka bioloogilist efekti konjugatsioonisagedusele.

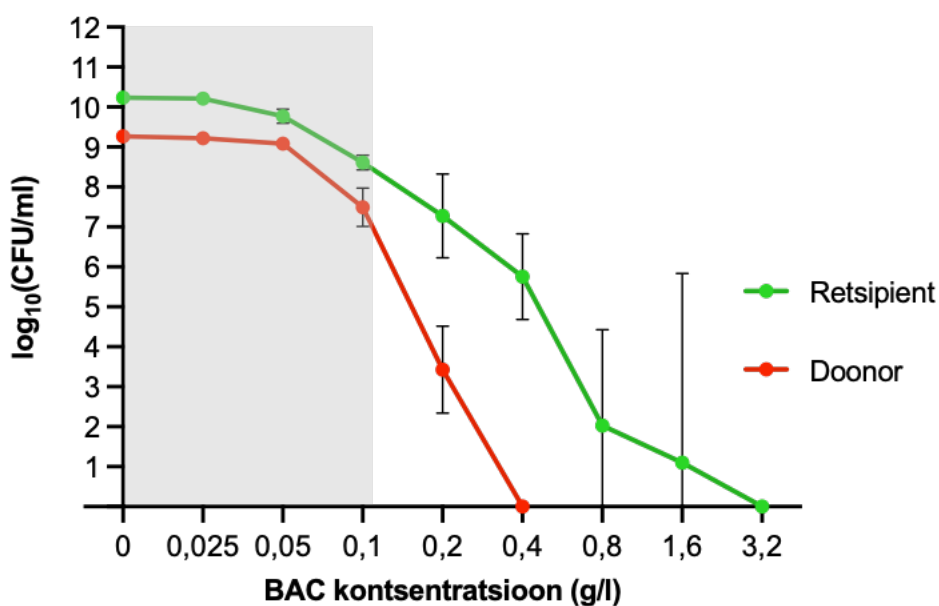


Joonis 7. Vase mõju konjugatsioonisagedusele vedelates tingimustes ja pinnal. (A) Konjugatsioonisagedus vaseioonide juuresolul vedelkultuuris. (B) Konjugatsioonisagedus vaseioonide juuresolul pinnakultuuris. Joonisel on toodud transkonjugantide (TK) arv retsiipiendi (R) kohta log₁₀ transformeerituna ja sageduste keskväärtused koos 95% usalduslãvega. Halli ja punktiirjoonega on märgitud empiiriline tuvastuspiir LOD (ingl k *limit of detection*, katses 3 kolooniat). Statistilisel analüüsil võrreldi konjugatsioonisagedusi ilma vaseta kontrolliga, kasutades selleks ühesuunalist dispersioonianalüüsi usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulisi erinevusi ei tuvastatud (ns, ingl k *non-significant*).

2.3.5. Bensalkooniumkloriidi mõju bakterite konjugatsioonile

2.3.5.1. Bensalkooniumkloriidi subinhibitoorsed kontsentratsioonid ja MBC

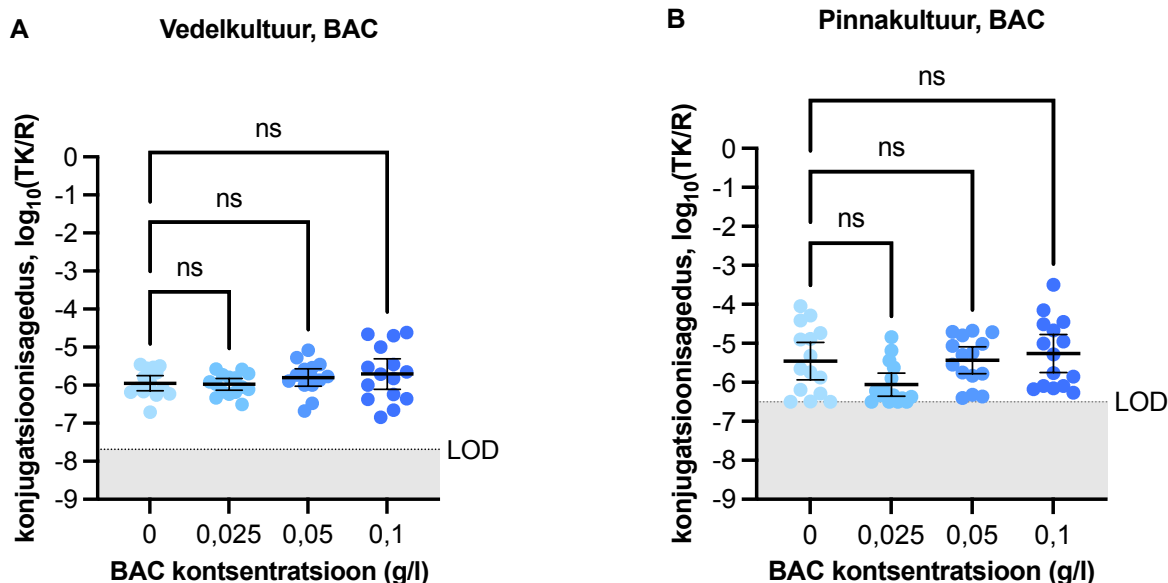
Samuti määrati *E. coli* ja *P. putida* bensalkooniumkloriidi MBC. Doonortüve MBC oli 0,4 g/l ja retsiipienttüvel 3,2 g/l (Joonis 8). Seega näitasid tulemused järjekordselt, et doonortüvi oli uuritud ühendite suhtes retsiipientist tundlikum, mis oli kooskõlas nii hõbe- kui vaseioonide puhul täheldatud tundlikkuse erinevusega. Nimelt suutis retsiipient kasvada kaheksa korda kangemal BAC-i kontsentratsioonil kui doonor, vastavalt 1,6 ja 0,2 g/l. Edasisteks katseteks valiti kontsentratsioonid 0,025, 0,05 ja 0,1 g/l (hallil taustal piirkond joonisel 8). 0,025 ja 0,05 g/l olid subinhibitoorsed kontsentratsioonid ning 0,1 g/l langetas *P. putida* arvukust kümme korda ja *E. coli* oma 32 korda võrreldes kontrolliga. Seega oli kõrgeim konjugatsioonikatses kasutatud kontsentratsioon neli korda madalam doonortüve MBC-st ja 32 korda väiksem retsiipiendi omast.



Joonis 8. Doonori ja retsiptendi bensalkooniumkloriidi (BAC) MBC määramine. Joonisel on toodud muutused retsiptendi ehk *P. putida* KT2440 ja doonori ehk *E. coli* CSH26 arvukuses (logaritmilises skaalas) sõltuvalt BAC-i kontsentratsioonist koos 95% usalduslängega. Halli taustaga on märgitud doonori ja retsiptendi arvukused nendel kontsentratsioonidel, mida kasutati BAC-i mõju uurimiseks konjugatsioonile. Retsiptendi MBC-ks määrati 3,2 mM ja doonoril 0,4 mM.

2.3.5.2. Bensalkooniumkloriidi mõju konjugatsioonisagedusele

Konjugatsioon bensalkooniumkloriidi erinevate kontsentratsioonide juures näitas, et valitud kontsentratsioonid – 0,025, 0,05 ja 0,1 g/l – ei soodusta konjugatsiooni toimumist vedelkultuuris ($P=0,3623$; Joonis 9A) ega pinnakultuuris ($P=0,0413$; Joonis 9B). Kuigi ühesuunaline dispersioonianalüüs näitas võimalikke statistiliselt olulisi erinevusi pinnakultuuri rühmade vahel ($P<0,05$), ei ilmnunud sellised erinevusi ühegi katserühma ja kontrollrühma vahel Dunn'i *post-hoc* testi alusel ($P>0,05$). Selgus, et statistiliselt oluline erinevus oli hoopis BAC-i kontsentratsioonide 0,025 ja 0,1 g/l vahel ($P<0,05$), kus keskmine konjugatsioonisagedus kontsentratsioonil 0,025 g/l oli umbkaudu kuus korda madalam kui kontsentratsioonil 0,1 g/l, vastavalt $8,7 \cdot 10^{-7}$ ja $5,5 \cdot 10^{-6}$.



Joonis 9. Bensalkooniumkloriidi mõju konjugatsioonisagedusele vedelates tingimustes ja pinnal. (A) Konjugatsioonisagedus bensalkooniumkloriidi (BAC) juuresolul vedelkultuuris. (B) Konjugatsioonisagedus bensalkooniumkloriidi (BAC) juuresolul pinnakultuuris. Joonisel on toodud transkonjugantide (TK) arv retsiendi (R) kohta \log_{10} transformeerituna ja sageduste keskvaartused koos 95% usalduslãvega. Halli ja punktiirjoonega on märgitud empiiriline tuvastuspiir LOD (ingl k *limit of detection*, katses 3 kolooniat). Statistilisel analüüsil võrreldi konjugatsioonisagedusi ilma BAC-ta kontrolliga. Vedelkultuuri andmeid analüüsiti standardhãlvete olulise erinevuse tõttu Welch'i testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Pinnakultuuri andmeid analüüsiti normaaljaotuse puudumise tõttu Kruskal-Wallis'e testiga usaldusnivool $\alpha=0,05$. Statistiliselt olulisi erinevusi ei tuvastatud (ns, ingl k *non-significant*).

2.4. Arutelu

2.4.1. Konjugatsioonisageduse erinevus vedel- ja pinnakultuuris

Käesoleva töö katsed näitasid, et konjugatsioonisagedus vedelkultuuris on madalam kui pinnal (Joonis 3B). Sarnast nähtust on täheldanud ka näiteks Bogusławska jt (2008), kes uurisid konjugatsioonisageduse sõltuvust sellest, kas protsess toimus filtril, tardsöötmel või vedelsöötmes (Bogusławska jt, 2008). Ilmnes, et transkonjugantide tekkesagedus doonori kohta oli filtril ja tardsöötmel vastavalt ligikaudu 26000 ja 6000 korda suurem kui vedelkultuuris (Bogusławska jt, 2008). Vedelates tingimustes limiteerivad konjugatsiooni arvatavasti oluliselt madalam rakutihedus ning stabiilse konjugatsioonipaari moodustamine (Alderliesten jt, 2020; Bradley jt, 1980; Simonsen jt, 1990; Toomey jt, 2009). Tõenäoliselt on stabiilsetel pindadel, nagu näiteks filtril või tardsöötmel, stabiilsed rakukontaktid rohkem soodustatud, mistõttu pole konjugatsioonipaari stabiliseerimine sama oluline kui vedelkultuuri puhul (Alderliesten jt, 2020; Thomas & Nielsen, 2005; Manoil & Rosenbusch, 1982). Stabiliseerimisel on aga omakorda oluline roll konjugatsioonipaari moodustanud bakterite taksonoomilisel sugulusastmel: lähedamalt suguluses olevate bakterite konjugatsioon on soodustatum (Alderliesten jt, 2020). Käesolevas töös doonortüvena kasutatud *E. coli* CSH26 ja retsipient *P. putida* KT2440 ei ole mitte ainult erinevast liigist ja perekonnast, vaid lausa erinevast seltsist.

2.4.2. Vedelkultuuri katsetes jätkus konjugatsioon ka peale väljakülve selektiivsöötmele

Vedelkultuuri 0 tunni ajapunkti väljakülvidest tuvastati märkimisväärne konjugatsioonisagedus – $3,7 \cdot 10^{-7}$ –, mis viitab konjugatsiooni jätkumisele ka peale väljakülvi Gm40 ja Tc40 tardsöötmele (Joonis 3A). Samas pinnakultuuri 0 tunni ajapunkti väljakülvides ei olnud transkonjugantide kolooniad, mille arv oleks ületanud seatud tuvastuspiiri (pinnakultuuris 4006 ja vedelkultuuris 300 kolooniat moodustavat transkonjuganti ühes milliliitris konjugatsioonisegus). Põhjus, miks 0 tunnil oli transkonjugantide teke tuvastatav just vedelkultuuris ja mitte pinnakultuuris, tuleneb erinevusest konjugatsiooni efektiivsuses nendes keskkondades ja sellega kaasnevast katseprotokollist. Kuna vedelkultuurides oli konjugatsioonisagedus madalam, tuli sealsete transkonjugantide tuvastamiseks välja külvata oluliselt suurem kogus rakke kui pinnakultuuris. See viis omakorda olukorrani, kus vedelkultuuri väljakülviga tardsöötmele oli väga kõrge rakutihedusega bakterimass, mistõttu ei suutnud transkonjugantide selekteerimiseks valitud antibiootikumid rakkude pindmise kihini koheselt difundeeruda ja esines viivitus selle inhibeerivas toimes (Lisa 1) (He jt, 2024; Norcia

jt, 1999). Seega on võimalik, et tardsöötme, kus stabiilsed rakukontaktid on rohkem soodustatud kui vedelkultuuris ja taksonoomilisel sugulusastmel väiksem roll (Alderliesten jt, 2020; Manoil & Rosenbusch, 1982), bakterite vaheline konjugatsioon mitte ainult ei jätkunud, vaid oli isegi et rohkem soodustatud peale väljakülvi, hoolimata söötme selektiivsetest omadustest. Järelikult on käesolevates eksperimentides tekkinud vedelkultuuri transkonjugantide arvukus moonutatud, sest pole võimalik eristada neid, kes tekkisid enne või pärast väljakülvi. Seda fenomeni oleks võimalik vältida, kui sooritada vedelkultuuri väljaküvid tardsöötme asemel selektiivsesse vedelsöötmesse, kuna see takistab konjugatsiooni jätkumist, võimaldades nii hinnata konjugatsioonisagedust objektiivsemalt (He jt, 2024).

2.4.3. Antimikroobsete ühendite mõju konjugatsioonile

Valitud hõbeda, vase ega bensalkooniumkloriid kontsentratsioonid käesolevas töös *E. coli* ja *P. putida* vahelist konjugatsiooni statistiliselt oluliselt ei mõjutanud. Ometi oli võimalik täheldada hõbeioonide ja bensalkooniumkloriidi puhul trende, millel küll statistiliselt oluline erinevus puudus, kuid mille puhul oli konjugatsioonisagedus veidi muutunud. Paaril hõbeda kontsentratsioonil – pinnal 0,0125 ja 0,025 mM ning vedelkultuuris 0,025 mM – tundus olevat konjugatsioonisagedust suurendav mõju (Joonis 5). Ka varasemalt on täheldatud konjugatsioonisageduse tõusu madalatel hõbeioonide kontsentratsioonidel, enamjaolt märkimisväärselt alla minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni (MIC, ingl k *minimum inhibitory concentration*). Näiteks Lu jt (2020) kirjeldasid Ag⁺-ioonide stimuleerivat mõju *E. coli* K-12 LE392 ja *P. putida* KT2440 vahelisele konjugatsioonile kontsentratsioonidel, mis olid 12500 ja 1250 korda väiksemad *P. putida* MIC-st. Võrdluseks oli käesolevas töös kasutatud madalaim kontsentratsioon (0,0125 mM) 2048 korda väiksem retsiptendi MBC-st ning 128 korda väiksem doonori omast. Seega tasuks tulevikus uurida veel madalamate hõbeioonide kontsentratsioonide mõju konjugatsioonisagedusele. Kuigi kirjanduses on määratud enamasti MIC ja siinses töös MBC, on tulemused siiski võrreldavad: bakteritsiidsete ainete, nagu hõbe- ja vaseioonide ning bensalkooniumkloriidi, puhul kehtib üldiselt põhimõte, et MIC on MBC-st maksimaalselt neli korda väiksem (Ishak jt, 2025).

Bensalkooniumkloriid näis inhibeerivat konjugatsiooni pinnakultuuris konsentratsioonil 0,025 g/l, kuigi erinevus ei olnud statistiliselt oluline (Joonis 9). Varasemalt on Alvarez-Molina jt (2022) näidanud BAC-i inhibeerivat mõju *E. coli* HV40 ja *E. coli* CECT-516 vahelisele konjugatsioonile maksimaalsel mitte-inhibeerival kontsentratsioonil 8 µg/l, mil

konjugatsioonisagedus langes umbkaudu 10^{-4} -lt transkonjugandilt retsiipiendi kohta 10^{-6} -ni ehk sajakordselt (Alvarez-Molina jt, 2022). Siinkohal tuleb tõdeda, et käesolevas töös konjugatsioonisagedusele nõrka inhibeerivat mõju avaldanud BAC-i kontsentratsioon oli subinhibitoorne, olles seejuures 128 korda väiksem retsiipiendi MBC-st ja 16 väiksem doonori omast. Sellest tulenevalt on tulemus mõnevõrra üllatav, kuid rõhutab samas kuivõrd oluline on uurida konjugatsiooni puhul erinevaid kontsentratsioone.

Ainus antimikroobne aine, mille puhul ei täheldatud mingit mõju konjugatsioonisagedusele, oli vask (Joonis 7). Seejuures ei ilmnenud ei statistiliselt olulist erinevust ega bioloogilist trendi nii madalamatel kui kõrgematel kontsentratsioonidel ei vedel- ega pinnakultuuris. Ometi on varasemates töödes korduvalt täheldatud nii vaseioonide stimuleerivat kui inhibeerivat mõju konjugatsioonile. Näiteks S. Zhang (2019) leidsid, et Cu^{2+} -ioonide kontsentratsioonidel 0,5, 1 ja 5 $\mu\text{mol/l}$ esines konjugatsioonisageduses tõus *E. coli* K-12 LE392 ja *P. putida* KT2440 vahel (S. Zhang jt, 2019). Nimetatud kontsentratsioonid jäid vastavalt 600-, 300- ja 60- kordselt alla *P. putida* MIC-i (300 $\mu\text{mol/l}$). Samuti täheldasid nad konjugatsiooni pärssimist kontsentratsioonidel 10 ja 100 $\mu\text{mol/l}$, millest viimase puhul oli konjugatsioon täielikult inhibeeritud (S. Zhang jt, 2019). Võrdluseks oli käesolevas töös kõige madalam Cu^{2+} -ioonide kontsentratsioon (0,025 mM) 256 korda madalam retsiipiendi MBC-st ning 128 korda väiksem doonori omast. Vastavalt oli suurim kasutatud vaseioonide kontsentratsioon (0,1 mM) retsiipiendi MBC-st 64 korda ja doonori omast 32 korda madalam. See asetab kasutatud kontsentratsioonid vahemikku, kus varasemates töödes on tuvastatud kasvõi väikest statistilist olulist vaseioonide mõju konjugatsioonisagedusele. Lisaks tüvede ja meetoodika iseärasustele võib erinevus tulemustes olla tingitud ka ülekantava plasmidi eripäradest. Tulevikus oleks otstarbekas testida kas MIC-st märkimisväärselt madalamaid või vahetult MBC-le lähenevaid kontsentratsioone vaseioonide võimaliku mõju tuvastamiseks.

Ehkki käesolevas töös ei ilmnenud ühegi uuritud antimikroobse ühendi – hõbeda, vase ja bensalkooniumkloriidi – puhul olulist mõju konjugatsioonisagedusele, tuleb rõhutada, et saadud tulemused on tugevalt sõltuvad kasutatud bakteritüvedest ja spetsiifilistest katsetingimustest. Teisisõnu võivad teistsugused tüved, antimikroobsete ainete kontsentratsioonid ja katsetingimused viia hoopis vastupidiste tulemusteni. Seetõttu on edasine erinevate antimikroobsete ühendite mõju uurimine hädavajalik, kaardistamiseks nende võimalikku mõju erinevatel tingimustel ja erinevates keskkondades. Vaid süsteemne ja laiaulatuslik uurimine võimaldab teha järeldusi selle kohta, kas laialdaselt kasutatavad

antimikroobsed ühendid, sealhulgas hõbe, vask ja bensalkooniumkloriid, soodustavad antibiootikumiresistentsuse levikut looduskeskkonnas ja kliinilistes tingimustes või on nende kasutamine antud kontekstis ohutu.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks oli uurida, kas üldkasutuses olevad antimikroobsed ained – nagu hõbe, vask ja bensalkooniumkloriid – soodustavad konjugatsiooni toimumist *E. coli* CSH26 (pKJK5) ja *P. putida* KT2440 tn7 GFP vahel. Eduka konjugeerumise korral kandus tetratsükliini-resistentselt doonorbakterilt *E. coli* CSH26 gentamütsiini-resistentsele retsiipiendile *P. putida* KT2440 üle tetratsükliini resistentsust kodeeriv plasmiid pKJK5. Tänu sellele oli võimalik selekteerida transkonjugante gentamütsiini ja tetratsükliini sisaldaval LB tardsöötmel. Katsed viidi läbi nii vedel- kui pinnakultuuris, tuvastamaks võimalikke keskkonnaspetsiifilisi erinevusi konjugatsioonisageduses. Transkonjugantide tekkesageduse määramiseks jagati saadud transkonjugantide CFU/ml retsiipiendi omaga ning transformeeriti edasiseks analüüsiks log₁₀-skaalasse.

Esmalt selgitati välja konjugatsiooni optimaalne ajaaken, milleks uuriti konjugatsioonisagedust viiel ajapunktil: 0, 5, 10, 15 ja 24 tundi. Tulemused näitasid, et nii vedel- kui pinnakultuuris toimus konjugatsioonisageduses oluline tõus alates 15. inkubatsioonitunnist. Samuti selgus, et transkonjugantide sagedus vedelkultuuris oli 24. tunnil ligikaudu üheksa korda madalam kui pinnakultuuris. Edasistel katsetel kasutati inkubeerimisega 18 tundi. Järgmisena valiti hõbe- ja vaseioonide ning bensalkooniumkloriidi mõju hindamiseks välja iga aine kohta kolm kontsentratsiooni ja viidi läbi konjugatsioonikatsed. Statistilise analüüsi põhjal võis järeldada, et valitud antimikroobsete ainete kontsentratsioonid ei avaldanud märkimisväärset mõju konjugatsiooni efektiivsusele ei vedel- ega pinnakultuuris.

Seega vähemalt käesolevas töös kasutatud bakteritüvede, kontsentratsioonide ja katsetingimuste juures hõbe- ja vaseioonid ning bensalkooniumkloriid konjugatsiooni oluliselt ei mõjuta. Siiski tuleb rõhutada, et teistsugused kontsentratsioonid ja katsetingimused võivad viia vastupidiste tulemusteni. Sellest tulenevalt on oluline jätkata erinevate antimikroobsete ainete mõju uurimist konjugatsioonile, kindlustamaks, et nende kasutamine ei soodusta antibiootikumiresistentsuse levikut.

RESÜMEE

Effect of antimicrobials on conjugation efficiency between *E. coli* CSH26 and *P. putida* KT2440

Laura Maria Pella

Summary

In light of the increasing spread of antimicrobial resistance among pathogens, the risk of global threat to public health and food safety continues to rise. The misuse and overuse of antibiotics, as well as their release into the environment, for example, via untreated wastewater, greatly accelerates the spread of resistance genes. Resistance may arise through spontaneous mutations in individual cells or via horizontal gene transfer, particularly conjugation – a process by which bacteria transfer mobile genetic elements, such as plasmids, through direct cell-to-cell contact. Frequently, these plasmids carry genes that enhance bacterial adaptation to different environmental stressors, including those involved in virulence, biofilm formation, and antibiotic resistance. In addition to antibiotics, a wide range of antimicrobial agents are used to inhibit the spread of microbes, including pathogens, for example, silver, copper, and benzalkonium chloride. While their antimicrobial properties are beyond doubt, evidence of their effect on conjugation remains contradictory. Given the widespread use of these antimicrobials in various environments, it is crucial to determine whether any of them inadvertently promote conjugation and, thus, the spread of antibiotic-resistance genes within bacterial populations.

The primary aim of this thesis was to investigate whether certain concentrations of silver, copper, or benzalkonium chloride promote conjugation between tetracycline-resistant donor strain *E. coli* CSH26 (pKJK5) and gentamicin-resistant recipient strain *P. putida* KT2440 tn7 GFP. In case of successful conjugation, the tetracycline resistance encoding plasmid pKJK5 was transported from the donor to the recipient, allowing for the selection of transconjugants on gentamicin-tetracycline (Gm40Tc40) selective LB agar. Conjugation experiments were conducted in both liquid and solid conditions at room temperature.

Initially, the optimal time frame for conjugation was assessed at 0, 5, 10, 15, and 24 hours. The results indicated a notable increase in conjugation frequency beginning at 15 hours under both liquid and solid conditions. Moreover, conjugation was found to be approximately nine times less efficient in liquid conditions compared to conjugation on plastic surfaces at the 24-hour time point. For the subsequent experiments, an 18-hour timepoint was chosen.

Regarding the antimicrobials, three concentrations of each compound were chosen and their effect on conjugation was tested, with deionised water serving as the control. To determine conjugation efficiency, the CFU/ml of transconjugants was divided by the CFU/ml of the recipient and transformed into a \log_{10} -scale for further analysis. Under the conditions applied in this thesis, none of the tested antimicrobials had a measurable effect on conjugation frequency.

In this context, negative results are reassuring – these substances, at the tested concentrations and conditions, do not appear to unintentionally promote the spread of antibiotic-resistance genes. However, it is important to acknowledge that variations in concentration, bacterial strain, and environmental conditions may yield different outcomes. Therefore, continued investigation into the effects of antimicrobials on conjugation efficiency remains critical.

TÄNUSÕNAD

Suurima tänu võlgnen Hanna Ainelole, kes on olnud mulle erakordne juhendaja ja inspireeriv eeskuju. Samuti soovin tänada professor Angela Ivaskit, kes kaasas mind uurimisgruppi ning nõustas töö valmimise käigus. Olen väga tänulik ka uurimisgrupi liikmetele, eriti Merilin Rosenbergile, Harleen Kaurile ja Sandra Parkile, kelle sõbralik toetus ja valmisolek aidata on olnud mulle suureks abiks ja toeks kogu protsessi vältel.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alderliesten, J. B., Duxbury, S. J. N., Zwart, M. P., de Visser, J. A. G. M., Stegeman, A., & Fischer, E. A. J. (2020). Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: A meta-analysis. *BMC Microbiology*, *20*(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01825-4>
- Alvarez-Molina, A., Trigo, E., Prieto, M., López, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2022). Assessment of a plasmid conjugation procedure to monitor horizontal transfer of an extended-spectrum β -lactamase resistance gene under food chain scenarios. *Current Research in Food Science*, *6*, 100405. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.11.024>
- Aly, K. A., & Baron, C. (2007). The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, *153*(11), 3766–3775. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010462-0>
- Amarasiri, M., Sano, Daisuke, & Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *50*(19), 2016–2059. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>
- Arnold, B. J., Huang, I.-T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(4), 206–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00650-4>
- Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W. H., Heberer, T., Lawrence, J. R., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Ryan, J. J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape, J. R., Van den Eede, C., & Topp, E. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives*, *121*(9), 993–1001. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206316>
- Auchtung, J. M., Lee, C. A., Monson, R. E., Lehman, A. P., & Grossman, A. D. (2005). Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(35), 12554–12559. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505835102>
- Bahl, M., Hansen, L., Goesmann, A., & Sørensen, S. (2007). The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established alpha, beta and delta sub-groups. *Plasmid*, *58*, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2006.11.007>
- Bale, M. J., Fry, J. C., & Day, M. J. (1987). Plasmid Transfer between Strains of *Pseudomonas aeruginosa* on Membrane Filters Attached to River Stones. *Microbiology*, *133*(11), 3099–3107. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-11-3099>
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Berg, G., & Trevors, J. T. (1990). Bacterial conjugation between *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp. Donor and recipient cells in soil. *Journal of Industrial Microbiology*, *5*(2–3), 79–84. <https://doi.org/10.1007/BF01573856>
- Bogusławska, J., Feld, L., Monaghan, A., Toomey, N., Schjørring, S., Jacobsen, B., van der Voet, H., Andersen, S., Bolton, D., Aarts, H., Krogfelt, K., Wilcks, A., & Bardowski, J. (2008). A standardized conjugation protocol to assess antibiotic resistance transfer

- between lactococcal species. *International journal of food microbiology*, *127*, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.017>
- Bore, E., Hébraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Skjæret, C., Moen, B., Møretro, T., Langsrud, Ø., Rudi, K., & Langsrud, S. (2007). Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology*, *153*(4), 935–946. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29288-0>
- Botelho, J. (2023). Defense systems are pervasive across chromosomally integrated mobile genetic elements and are inversely correlated to virulence and antimicrobial resistance. *Nucleic Acids Research*, *51*(9), 4385–4397. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad282>
- Bradley, D. E., Taylor, D. E., & Cohen, D. R. (1980). Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *143*(3), 1466–1470. <https://doi.org/10.1128/jb.143.3.1466-1470.1980>
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: The role of quaternary ammonium compounds—a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *39*(5), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, *8*(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Cabezón, E., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2017). Conjugation Inhibitors and Their Potential Use to Prevent Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02329>
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(1), 81–95. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>
- Cabezón, E., Sastre, J. I., & de la Cruz, F. (1997). Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Molecular and General Genetics MGG*, *254*(4), 400–406. <https://doi.org/10.1007/s004380050432>
- Cen, T., Zhang, X., Xie, S., & Li, D. (2020). Preservatives accelerate the horizontal transfer of plasmid-mediated antimicrobial resistance genes via differential mechanisms. *Environment International*, *138*, 105544. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105544>
- Chambers, C., Chang, B., Fehrmann, K., & Quan, G. (2007). *Investigating the Sex Life of Escherichia coli: The Effect of OmpA Expression on Hfr Conjugation Efficiency*. 11.
- Chandler, M., de la Cruz, F., Dyda, F., Hickman, A. B., Moncalian, G., & Ton-Hoang, B. (2013). Breaking and joining single-stranded DNA: The HUH endonuclease superfamily. *Nature reviews. Microbiology*, *11*(8), 525–538. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3067>
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., & Hanage, W. P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? *Evolutionary Applications*, *8*(3), 240–247. <https://doi.org/10.1111/eva.12185>
- Chen, X., Yin, H., Li, G., Wang, W., Wong, P. K., Zhao, H., & An, T. (2019). Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation: Implications from oxidative stress and gene expression. *Water Research*, *149*, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.019>
- Cheng, Q., Paszkiet, B. J., Shoemaker, N. B., Gardner, J. F., & Salyers, A. A. (2000). Integration and Excision of a *Bacteroides* Conjugative Transposon, CTnDOT. *Journal of Bacteriology*, *182*(14), 4035–4043.
- Clarke, M., Maddera, L., Harris, R. L., & Silverman, P. M. (2008). F-pili dynamics by live-cell imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(46), 17978–17981. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806786105>

- Clewell, D. B., & Flannagan, S. E. (1993). The Conjugative Transposons of Gram-Positive Bacteria. D. B. Clewell (Toim), *Bacterial Conjugation* (1k 369–393). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9357-4_15
- Dadeh Amirfard, K., Moriyama, M., Suzuki, S., & Sano, D. (2024). Effect of environmental factors on conjugative transfer of antibiotic resistance genes in aquatic settings. *Journal of Applied Microbiology*, *135*(6), lxae129. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae129>
- Dang, B., Mao, D., Xu, Y., & Luo, Y. (2017). Conjugative multi-resistant plasmids in Haihe River and their impacts on the abundance and spatial distribution of antibiotic resistance genes. *Water Research*, *111*, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.12.046>
- De La Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J., & Zechner, E. L. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(1), 18–40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00195.x>
- Dimitriu, T., Szczelkun, M. D., & Westra, E. R. (2024). Various plasmid strategies limit the effect of bacterial restriction–modification systems against conjugation. *Nucleic Acids Research*, *52*(21), 12976–12986. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae896>
- Dos Santos, V. A. P. M., Heim, S., Moore, E. R. B., Strätz, M., & Timmis, K. N. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, *6*(12), 1264–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00734.x>
- Dostál, L., Shao, S., & Schildbach, J. F. (2011). Tracking F plasmid TraI relaxase processing reactions provides insight into F plasmid transfer. *Nucleic Acids Research*, *39*(7), 2658–2670. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1137>
- Draper, O., César, C. E., Machón, C., de la Cruz, F., & Llosa, M. (2005). Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(45), 16385–16390. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506081102>
- Dunny, G. M., Craig, R. A., Carron, R. L., & Clewell, D. B. (1979). Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: Production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid*, *2*(3), 454–465. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(79\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0147-619X(79)90029-5)
- Eisenbrandt, R., Kalkum, M., Lurz, R., & Lanka, E. (2000). Maturation of IncP Pilin Precursors Resembles the Catalytic Dyad-Like Mechanism of Leader Peptidases. *Journal of Bacteriology*, *182*(23), 6751–6761.
- EPA. (2022). *Test Method for Evaluating the Efficacy of Antimicrobial Surface Coatings MB-40-00*. US Environmental Protection Agency. <https://www.epa.gov/system/files/documents/2022-09/MB-40-00.pdf>
- Fernandez-Astorga, A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J., & Barcina, I. (1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(1), 392–398. <https://doi.org/10.1128/aem.58.1.392-398.1992>
- Filutowicz, M., Burgess, R., Gamelli, R. L., Heinemann, J. A., Kurenbach, B., Rakowski, S. A., & Shankar, R. (2008). Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid*, *60*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.03.004>
- Firth, N., Ippen-Ihler, K., & Skurray, R. A. (1987). *Structure and Function of the F Factor and Mechanism of Conjugation*.
- Franklin R. Cockerill, III, MD, Matthew A. Wikler, MD, MBA, FIDSA, Jeff Alder, PhD, Michael N. Dudley, PharmD, FIDSA, George M. Eliopoulos, MD, Mary Jane Ferraro, PhD, MPH, Dwight J. Hardy, PhD, David W. Hecht, MD, Janet A. Hindler, MCLS, MT(ASCP), Jean B. Patel, PhD, D(ABMM), Mair Powell, MD, FRCP, FRCPath, Jana M. Swenson, MMSc, Richard B. Thomson, Jr., PhD, Maria M. Traczewski, BS,

- MT(ASCP), John D. Turnidge, MD, Melvin P. Weinstein, MD, Barbara L. Zimmer, PhD, & Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *M07 | Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (9. tr, Kd 2).
- Frost, L. S., Ippen-Ihler, K., & Skurray, R. A. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiological Reviews*, 58(2), 162–210. <https://doi.org/10.1128/mr.58.2.162-210.1994>
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & de La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 657–687. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Gjini, E., Paupério, F. F. S., & Ganusov, V. V. (2020). Treatment timing shifts the benefits of short and long antibiotic treatment over infection. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2020(1), 249–263. <https://doi.org/10.1093/emph/eoaa033>
- Gomis-Ruth, F. X., Sola, M., Cruz, F. d. l., & Coll, M. (2004). Coupling Factors in Macromolecular Type-IV Secretion Machineries. *Current Pharmaceutical Design*, 10(13), 1551–1565. <https://doi.org/10.2174/1381612043384817>
- Gould, I. M., & Bal, A. M. (2013). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*, 4(2), 185–191. <https://doi.org/10.4161/viru.22507>
- Graf, F. E., Palm, M., Warringer, J., & Farewell, A. (2019). Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Development Research*, 80(1), 19–23. <https://doi.org/10.1002/ddr.21457>
- Hall, J. P. J., Brockhurst, M. A., & Harrison, E. (2017). Sampling the mobile gene pool: Innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 372(1735), 20160424. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>
- Han, Y., Zhou, Z.-C., Zhu, L., Wei, Y.-Y., Feng, W.-Q., Xu, L., Liu, Y., Lin, Z.-J., Shuai, X.-Y., Zhang, Z.-J., & Chen, H. (2019). The impact and mechanism of quaternary ammonium compounds on the transmission of antibiotic resistance genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(27), 28352–28360. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05673-2>
- He, Z., Smets, B. F., & Dechesne, A. (2024). Mating Assay: Plating Below a Cell Density Threshold is Required for Unbiased Estimation of Plasmid Conjugation Frequency of RP4 Transfer Between *E. coli* Strains. *Microbial Ecology*, 87(1), 109. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02427-7>
- Headd, B., & Bradford, S. A. (2018). Physicochemical Factors That Favor Conjugation of an Antibiotic Resistant Plasmid in Non-growing Bacterial Cultures in the Absence and Presence of Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02122>
- Hede, K. (2014). Antibiotic resistance: An infectious arms race. *Nature*, 509(7498), S2–S3. <https://doi.org/10.1038/509S2a>
- Helmuth, R., & Achtman, M. (1978). Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: Purification of F pili with biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(3), 1237–1241. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.3.1237>
- Hemmis, C. W., & Schildbach, J. F. (2013). Thioredoxin-like proteins in F and other plasmid systems. *Plasmid*, 70(2), 168–189. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.05.004>

- Hirt, H., Schlievert, P. M., & Dunny, G. M. (2002). In Vivo Induction of Virulence and Antibiotic Resistance Transfer in *Enterococcus faecalis* Mediated by the Sex Pheromone-Sensing System of pCF10. *Infection and Immunity*, 70(2), 716–723. <https://doi.org/10.1128/iai.70.2.716-723.2002>
- Hu, Q., Zhang, L., Yang, R., Tang, J., & Dong, G. (2024). Quaternary ammonium biocides promote conjugative transfer of antibiotic resistance gene in structure- and species-dependent manner. *Environment International*, 189, 108812. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108812>
- Ilangovan, A., Connery, S., & Waksman, G. (2015). Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends in Microbiology*, 23(5), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.012>
- Ishak, A., Mazonakis, N., Spernovasilis, N., Akinosoglou, K., & Tsioutis, C. (2025). Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: Clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 80(1), 1–17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae380>
- Isaacson, R. E., & Torrence, M. E. (2002). *The Role of Antibiotics in Agriculture: This report is based on a colloquium sponsored by the American Academy of Microbiology held November 2–4, 2001, in Santa Fe, New Mexico*. American Society for Microbiology. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559438/>
- Izatt, R. M., Christensen, J. J., & Rytting, J. H. (1971). Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and nucleotides. *Chemical Reviews*, 71(5), 439–481. <https://doi.org/10.1021/cr60273a002>
- Jiao, Y.-N., Chen, H., Gao, R.-X., Zhu, Y.-G., & Rensing, C. (2017). Organic compounds stimulate horizontal transfer of antibiotic resistance genes in mixed wastewater treatment systems. *Chemosphere*, 184, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.149>
- Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L., & Díaz, E. (2002). Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 824–841. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00370.x>
- Johnsen, A. R., & Kroer, N. (2007). Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 718–728. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00230.x>
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2008). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Jutkina, J., Rutgersson, C., Flach, C.-F., & Joakim Larsson, D. G. (2016). An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. *The Science of the Total Environment*, 548–549, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.044>
- Kessler, C., Hou, J., Neo, O., & Buckner, M. M. C. (2023). In situ, in vivo, and in vitro approaches for studying AMR plasmid conjugation in the gut microbiome. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(1), fuac044. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac044>
- Khachatourians, G. G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 159(9), 1129–1136.

- Khelissa, S., Gharsallaoui, A., Fadel, A., Barras, A., Jama, C., Jbilou, F., & Chihib, N.-E. (2021). Microencapsulation of benzalkonium chloride enhanced its antibacterial and antibiofilm activities against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(3), 1136–1146. <https://doi.org/10.1111/jam.15010>
- Koraimann, G., & Wagner, M. A. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00054>
- Lawley, T. D., Gordon, G. S., Wright, A., & Taylor, D. E. (2002). Bacterial conjugative transfer: Visualization of successful mating pairs and plasmid establishment in live *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *44*(4), 947–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02938.x>
- Lawrence, J. G. (1999). Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(5), 519–523. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00010-7)
- Levy, S. B. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1093/jac/49.1.25>
- Liu, W., Huang, Y., Zhang, H., Liu, Z., Huan, Q., Xiao, X., & Wang, Z. (2023). Factors and Mechanisms Influencing Conjugation In Vivo in the Gastrointestinal Tract Environment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms24065919>
- Llor, C., & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, *5*(6), 229–241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., & Cruz, F. de la. (2002). Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, *45*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x>
- Lu, J., Wang, Y., Jin, M., Yuan, Z., Bond, P., & Guo, J. (2020). Both silver ions and silver nanoparticles facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes. *Water Research*, *169*, 115229. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115229>
- Lu, J., Wang, Y., Li, J., Mao, L., Nguyen, S. H., Duarte, T., Coin, L., Bond, P., Yuan, Z., & Guo, J. (2018). Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera. *Environment International*, *121*, 1217–1226. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.040>
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *65*(2), 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
- Manoil, C., & Rosenbusch, J. P. (1982). Conjugation-deficient mutants of *Escherichia coli* distinguish classes of functions of the outer membrane OmpA protein. *Molecular & General Genetics: MGG*, *187*(1), 148–156. <https://doi.org/10.1007/BF00384398>
- Mazel, D., & Davies, J. (1999). Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *56*(9), 742–754. <https://doi.org/10.1007/s000180050021>
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mori, M., Sakagami, Y., Ishii, Y., Isogai, A., Kitada, C., Fujino, M., Adsit, J. C., Dunny, G. M., & Suzuki, A. (1988). Structure of cCF10, a peptide sex pheromone which induces conjugative transfer of the *Streptococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid, pCF10. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(28), 14574–14578. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68258-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68258-4)

- Nagai, K., Ohta, S., Zenda, H., Matsumoto, H., & Makino, M. (1996). Biochemical Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* Strain Isolated from a Benzalkonium Chloride Solution. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(6), 873–875. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.873>
- Norcia, L. J. L., Silvia, A. M., & Hayashi, S. F. (1999). *Actinobacillus and Escherichia coli*.
- Novotny, C., Knight, W. S., & Brinton, C. C. (1968). Inhibition of Bacterial Conjugation by Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid Male-Specific Bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 95(2), 314–326.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Ou, J. T., & Anderson, T. F. (1970). Role of Pili in Bacterial Conjugation¹. *Journal of Bacteriology*, 102(3), 648–654.
- 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>
- Pallares-Vega, R., Macedo, G., Brouwer, M. S. M., Hernandez Leal, L., van der Maas, P., van Loosdrecht, M. C. M., Weissbrodt, D. G., Heederik, D., Mevius, D., & Schmitt, H. (2021). Temperature and Nutrient Limitations Decrease Transfer of Conjugative IncP-1 Plasmid pKJK5 to Wild *Escherichia coli* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656250>
- Palm, M., Fransson, A., Hultén, J., Búcaro Stenman, K., Allouche, A., Chiang, O. E., Constandse, M. L., van Dijk, K. J., Icli, S., Klimesova, B., Korhonen, E., Martínez-Crespo, G., Meggers, D., Naydenova, M., Polychronopoulou, M. A., Schuntermann, D. B., Unal, H., Wasylkowska, A., & Farewell, A. (2022). The Effect of Heavy Metals on Conjugation Efficiency of an F-Plasmid in *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081123>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Piscon, B., Pia Esposito, E., Fichtman, B., Samburski, G., Efremushkin, L., Amselem, S., Harel, A., Rahav, G., Zarrilli, R., & Gal-Mor, O. (2023). The Effect of Outer Space and Other Environmental Cues on Bacterial Conjugation. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e03688-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03688-22>
- Rankin, D. J., Rocha, E. P. C., & Brown, S. P. (2011). What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity*, 106(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.24>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rice, L. B. (1998). Tn916 Family Conjugative Transposons and Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 1871–1877. <https://doi.org/10.1128/aac.42.8.1871>
- Richaume, A., Angle, J. S., & Sadowsky, M. J. (1989). Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7), 1730–1734. <https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1730-1734.1989>

- Robledo, M., Álvarez, B., Cuevas, A., González, S., Ruano-Gallego, D., Fernández, L. Á., & de la Cruz, F. (2022). Targeted bacterial conjugation mediated by synthetic cell-to-cell adhesions. *Nucleic Acids Research*, *50*(22), 12938–12950. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1164>
- Saliu, E.-M., Zentek, J., & Vahjen, W. (2020). In vitro conjugation kinetics of AmpC, broad spectrum and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* donors and various Enterobacteriaceae recipients. *BMC Microbiology*, *20*(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01787-7>
- Shen, Z., Tang, C. M., & Liu, G.-Y. (2022). Towards a better understanding of antimicrobial resistance dissemination: What can be learnt from studying model conjugative plasmids? *Military Medical Research*, *9*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00362-z>
- Simonsen, L., Gordon, D. M., Stewart, F. M., & Levin, B. R. (1990). Estimating the rate of plasmid transfer: An end-point method. *Microbiology*, *136*(11), 2319–2325. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-11-2319>
- Singh, P. K., Ramachandran, G., Ramos-Ruiz, R., Peiró-Pastor, R., Abia, D., Wu, L. J., & Meijer, W. J. J. (2013). Mobility of the Native *Bacillus subtilis* Conjugative Plasmid pLS20 Is Regulated by Intercellular Signaling. *PLoS Genetics*, *9*(10), e1003892. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003892>
- Smith, D. L., Harris, A. D., Johnson, J. A., Silbergeld, E. K., & Morris, J. G. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(9), 6434–6439. <https://doi.org/10.1073/pnas.082188899>
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, *275*(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>
- Song, Z., Zuo, L., Li, C., Tian, Y., & Wang, H. (2021). Copper Ions Facilitate the Conjugative Transfer of SXT/R391 Integrative and Conjugative Element Across Bacterial Genera. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616792>
- Spadaro, J. A., Berger, T. J., Barranco, S. D., Chapin, S. E., & Becker, R. O. (1974). Antibacterial effects of silver electrodes with weak direct current. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *6*(5), 637–642. Scopus. <https://doi.org/10.1128/AAC.6.5.637>
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, *5*(4), 387–399. <https://doi.org/10.1128/cmr.5.4.387>
- Zechner, E. L., Lang, S., & Schildbach, J. F. (2012). Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1592), 1073–1087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0207>
- Zhang, S., Wang, Y., Song, H., Lu, J., Yuan, Z., & Guo, J. (2019). Copper nanoparticles and copper ions promote horizontal transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes across bacterial genera. *Environment International*, *129*, 478–487. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.054>
- 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>
- Zhang, Y., Gu, A. Z., He, M., Li, D., & Chen, J. (2017). Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within

- and across Genera. *Environmental Science & Technology*, 51(1), 570–580. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03132>
- Zhong, X., Kro'ł, Jarosław E., Top, E. M., & Krone, S. M. (2010). Accounting for mating pair formation in plasmid population dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 262(4), 711–719. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.10.013>
- Tang, H., Liu, Z., Hu, B., & Zhu, L. (2022). Effects of iron mineral adhesion on bacterial conjugation: Interfering the transmission of antibiotic resistance genes through an interfacial process. *Journal of Hazardous Materials*, 435, 128889. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128889>
- Thomas, C. M. (2021). Plasmid Incompatibility. E. Bell (Toim), *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference* (1k 1–3). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6436-5_565-2
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Timmis, K. N. (2002). *Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology*, 4(12), 779–781. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x>
- Tomitšik, L. (2023). *Conjugation-driven horizontal gene transfer in bacteria on antimicrobial surfaces* [Tartu Ülikool]. <https://hdl.handle.net/10062/90728>
- Toomey, N., Monaghan, Á., Fanning, S., & Bolton, D. J. (2009). Assessment of horizontal gene transfer in Lactic acid bacteria – A comparison of mating techniques with a view to optimising conjugation conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.12.002>
- Trevors, J. T., & Cotter, C. M. (1990). Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology*, 6(2), 77–84. <https://doi.org/10.1007/BF01576426>
- Ventola, C. L. (2015a). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes*, 11(11), 1239. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
- Vitiello, A., Sabbatucci, M., Salzano, A., & Zovi, A. (2024). The importance of antibiotic treatment duration in antimicrobial resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 43(8), 1673–1675. <https://doi.org/10.1007/s10096-024-04867-y>
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Waksman, G. (2019). From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: A mechanistic biology perspective. *EMBO reports*, 20(2), e47012. <https://doi.org/10.15252/embr.201847012>
- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 11(5), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., & Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin

- resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications*, 9(1), 1179. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>
- Waters, V. L. (1999). Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience*, 4, D433-56. <https://doi.org/10.2741/waters>
- Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 10.1128/cmr.00115-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00115-18>
- Yang, B., Wang, Z., Jia, Y., Fang, D., Li, R., & Liu, Y. (2022). Paclitaxel and its derivative facilitate the transmission of plasmid-mediated antibiotic resistance genes through conjugative transfer. *Science of The Total Environment*, 810, 152245. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152245>
- Yang, X., Dong, N., Chan, E. W.-C., Zhang, R., & Chen, S. (2021). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*, 29(1), 65–83. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.012>
- Yilmaz, A. G. (2017). Development of a New *Pseudomonas* Agar Medium Containing Benzalkonium Chloride in Cetrimide Agar. *Food and Nutrition Sciences*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.4236/fns.2017.84025>
- Yu, H., Liu, Y., Li, L., Guo, Y., Xie, Y., Cheng, Y., & Yao, W. (2020). Ultrasound-involved emerging strategies for controlling foodborne microbial biofilms. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.010>
- Yu, Z., Wang, Y., Lu, J., Bond, P. L., & Guo, J. (2021). Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through conjugative gene transfer. *The ISME Journal*, 15(7), 2117–2130. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00909-x>

KASUTATUD VEEBIALLIKAD

Antimicrobial resistance. (2023). *World Health Organization*. Kasutatud 28. aprill 2025, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

LISAD

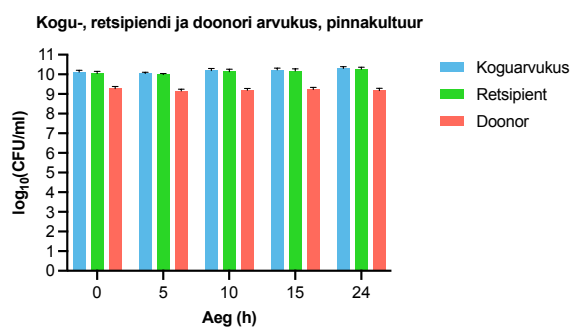
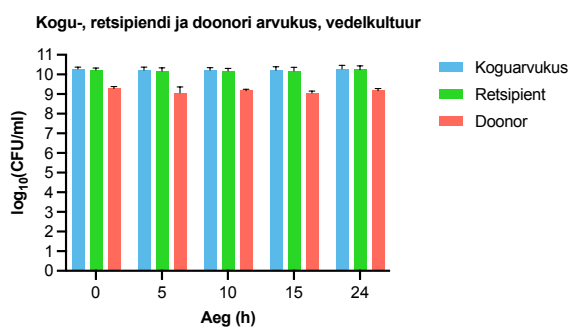
Lisa 1

20 μ l tilkkülvi kümnekordses lahjenduses moodustusid kahel juhul üksikud kolooniad bakterimassi pinnale selektiivsel LB tardsöötmele. Kuna külvid on tehtud tetratsükliini sisaldavale söötmele, on bakterimass eeldatavasti *E. coli* CSH26 ja üksikud kolooniad *P. putida* KT2440. Pildi jäädvustas professor Angela Ivask, PhD.



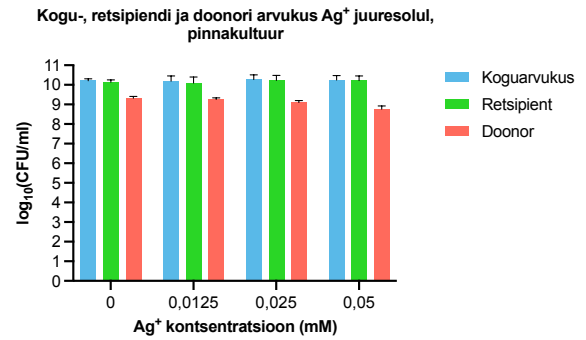
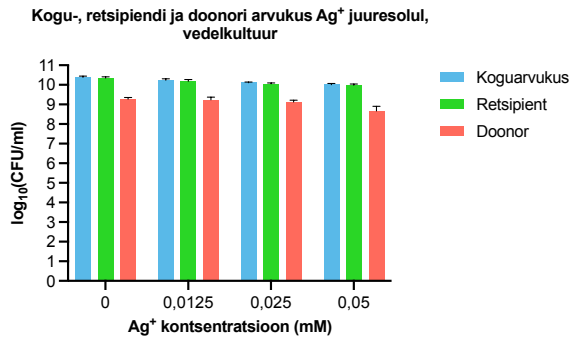
Lisa 2

Rakkude koguarvukus ning retsiptendi ja doonori arvukus konjugatsiooni ajaakna määramisel ajapunktidel 0, 5, 10, 15 ja 24 tundi vedel- ja pinnakultuuris. Arvukused on esitatud \log_{10} transformeerituna.



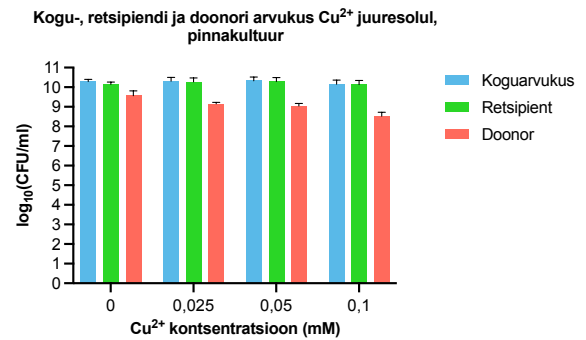
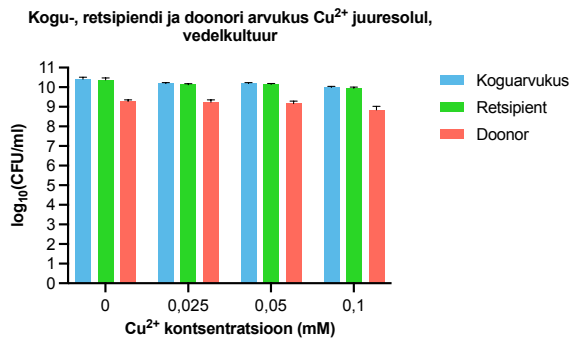
Lisa 3

Rakkude koguarvukus ning retsiptendi ja doonori arvukus hõbeda ioonide juuresolul (0, 0,0125, 0,025 ja 0,05 mM) peale 18 tunnist konjugatsiooni vedel- ja pinnakultuuris. Arvukused on esitatud \log_{10} transformeerituna.



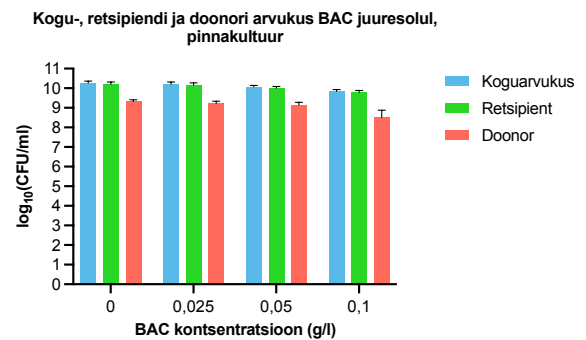
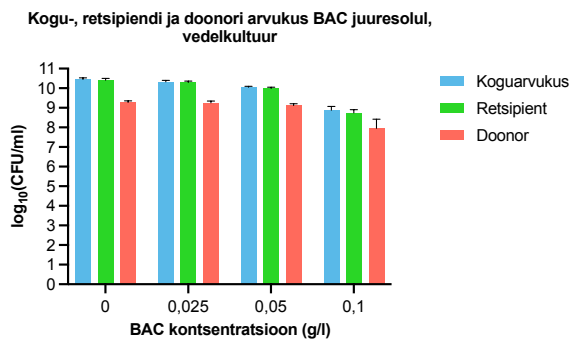
Lisa 4

Rakkude koguarvukus ning retsiptendi ja doonori arvukus vaseioonide juuresolul (0, 0,025, 0,05 ja 0,1 mM) peale 18 tunnist konjugatsiooni vedel- ja pinnakultuuris. Arvukused on esitatud \log_{10} transformeerituna.



Lisa 5

Rakkude koguarvukus ning retsiptendi ja doonori arvukus bensalkooniumkloriidi (BAC) juuresolul (0, 0,025, 0,05 ja 0,1 g/l) peale 18 tunnist konjugatsiooni vedel- ja pinnakultuuris. Arvukused on esitatud \log_{10} transformeerituna.



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Maria Pella ,
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Antimikroobsete ainete mõju *E. coli* CSH26 ja *P. putida* KT2440 vahelise
konjugatsiooni efektiivsusele ,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Hanna Ainelo, PhD, ja professor Angela Ivask, PhD ,
(*juhendajate nimed*)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Laura Maria Pella
23.05.2025