

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Maria Vares

**ANTIBIOOTIKUMIDELE RESISTENTSUST KODEERIVAD GEENE KANDVATE
PLASMIIDIDE TUVASTAMINE LÄÄNEMEREST**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Msc Jekaterina Jutkina

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Antibiootikumide mõju keskkonnale.....	6
1.2. Plasmiidide üldiseloomustus	6
1.3. Plasmiidide mitesobivusgrupid	7
1.4. Plasmiidide määramine replikonide järgi	8
1.5. Replikatsioonimehhanismid	10
1.6. Konjugatsioon ja täiendav klassifitseerimine	11
1.7. Olulisemad Inc rühmad	12
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	16
2.1. Töö eesmärgid	16
2.2. Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1. Töös kasutatud geneetiline materjal ja selle säilitamine	16
2.2.2. PBRT (PCR based replicon typing) kit'i testimine	17
2.2.3. Kloneerimine	18
2.2.4. Transformeerimine	18
2.2.5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	18
2.2.6. Sekveneerimine	19
2.2.7. Sekveneeritud järjestuste analüüs.....	19
2.3. Tulemused ja arutelu.....	21
2.3.1. Mikroobikoosluse totaalsest DNAST PBRT kit'iga amplifitseeritud replikonid	21
2.3.2. PBRT kit'iga amplifitseeritud ebaspetsiifilised järjestused.....	25
2.3.3. Plasmiidsete tüvede skriinimine PBRT kit'iga	26
KOKKUVÕTE	30
SUMMARY	31

KIRJANDUSE LOETELU.....	32
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	40
LISAD	41
LISA 1	41
LIHTLITSENTS.....	42

KASUTATUD LÜHENDID

Amp^R – resistentne ampitsilliini suhtes

Benz - bensoaat

bp – aluspaar

ExoI – eksonukleas I

F-plasmiid - fertiilsusplasmiid

Inc rühm – mittesobivusrühm

IS – insertioonijärjestus

LB – Luria-Bertani sööde

MGE – mobiilne geneetiline element

Nah - naftaleen

PBRT kit - *PCR based replicon typing kit*

Phe – fenool

pRNA – praimer RNA

R-plasmiid – resistentsusplasmiid

Sal – salitsülaad

SAP – kreveti aluseline fosfataas

Tol – toluaat

U – ühik

SISSEJUHATUS

Läänemeri on suuruselt teine riimveekogu maailmas. Selle pindala on 415 000 km² ning veemaht on 21 700 km³. Ainult kitsad väinad ühendavad Läänemerd Põhjamerega, mistõttu on veevahetus nende kahe veekogu vahel üsna piiratud. Võrreldes teiste meredega, on Läänemeri saastumise suhtes tundlikum ja ohustatum ökosüsteem. Merevesi koos selles sisalduva orgaanilise ja anorgaanilise ainega vahetub keskmiselt 25-30 aasta tagant (Rheinheimer, 1998). Läänemere reostuse tase on väga kõrge ning sellest on saanud üks suurimaid keskkonnaprobleeme Läänemere kaldal asuvatele riikidele. Saasteaineid on erinevaid, nende hulka kuuluvad ka antibiootikumid.

Antibiootikumid satuvad erinevatesse veekogudesse loomakasvatustest ja haiglatest pärinevate heitvetega, ning põhjustavad antibiootikumide suhtes resistentsete bakterite levikut (Suzuki jt., 2013). Algselt oli antibiootikumiresistentsus seotud vaid suurenenud haiglanakkuste kasvuga patsientide seas. Resistentsed bakterid põhjustasid raskesti ravitavaid ja diagnoositavaid haigusi. Tänapäeval on antibiootikumiresistentsusest saanud aga ülemaailmne probleem, haarates ka looduskeskkonda (Alanis, 2005). Järjest sagedamini on resistentsed bakteritüvesid isoleeritud erinevatest veeökosüsteemidest, ka Läänemerest.

Antibiootikumide suhtes resistentsuse saavutamiseks on bakteritel mitmeid keerulisi molekulaarseid mehhanisme. Kõige sagedasem on konjugatsioon, kus antibiootikumide suhtes resistentsust tagavaid geneetilisi tunnuseid kantakse horisontaalselt plasmiidide abil ühest bakterirakust teise (Alanis, 2005). Plasmide on isoleeritud kõigist keskkondadest, kus on tuvastatud baktereid, näiteks kliinilistest proovidest, muldadest, mereveest (Sørensen jt., 2005). Läänemere plasmidikoosluse kohta on senini vähe teada.

Käesoleva töö eesmärgiks on tuvastada plasmide, mis võivad olla seotud antibiootikumidele resistentsust tagavate geenide levikuga Läänemeres.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antibiootikumide mõju keskkonnale

Tänapäevani on antibiootikumid olnud edukamaid ravimite perekondi. Lisaks inimese tervise parandamisele, on antibiootikume kasutatud loomade ja taimede infektsioonide ennetamiseks ja raviks ning loomakasvatustes kasvuedendajana (Martinez, 2009). Antud hetkeks on väljatöötatud vähemalt 17 erinevat antibiootikumide klassi. Kuid igale nendest on mikroobidel tekkinud vähemalt üks resistentsusmehhanism (Alanis, 2005). Mõnedel juhtudel on bakterid võimelised arendama üheaegselt resistentsust kahele või enamale antibiootikumide klassile, muutes infektsioonide ravi väga keeruliseks ja kalliks ning mõnel juhul ka ebaõnnestunuks (eriti arengumaades), kuna ükski saadaolev ravim infektsioonile ei mõju (Levy ja Marshall, 2004).

Inimese puhul on antibiootikumide tarvitamise tulemuseks selektiivne surve peremehele, kellele antibiootikum on suunatud. Mida laiem on toimespekter, seda suurem on võimalus, et antibiootikumi suhtes tekib resistentsus. Pärast antibiootikumi manustamist elimineeritakse peremehes kõige vastuvõtlikumad bakterid. Nii selekteeritakse resistentseid baktereid, kes on võimelised ellu jääma ka antibiootikumide juuresolekul. Sel viisil muutub inimene resistentsete bakterite reservuaariks, mis võib põhjustada infektsioone samas peremehes või levida teistesse peremeestesse (Alanis, 2005).

Haiglast ja loomakasvatusest pärit jäägid ja heitveed sisaldavad nii antibiootikume kui ka resistentsusgeene (Martinez, 2009). Mitmed antibiootikumid on looduslikud ühendid, mis on miljoneid aastaid olnud kontaktis keskkonna mikrobiotaga ning on seetõttu biodegradeeritavad (Dantas jt., 2008). Degradatsioonile vastupidavamad on sünteetilised antibiootikumid, kuid need võivad olla biodegradatsioonile vastupidavamad. Kuigi antibiootikumid on looduslikes ökosüsteemides lagundatavad, kuuluvad nad siiski oluliste keskkonnasaastajate hulka (Martinez, 2009). Plasmiididel on antibiootikumiresistentsuse saavutamises keskne roll.

1.2. Plasmiidide üldiseloomustus

Plasmiidid on autonoomselt replitseeruvad ekstrakromosomaalsed DNA elemendid, mis avastati esmakordselt *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvatest bakteritest. Praeguseks on neid leitud peaaegu kõikidest uuritud bakteritaksonitest. Plasmiidid on enamasti kaksikahelalised tsirkulaarsed DNA molekulid. Nende suurus võib varieeruda mõnesajast kuni mõnesaja tuhande aluspaarini. Arvestatava osa plasmiidide struktuurist hõlmavad plasmidi ellujäämise, levimise ja replikatsiooni jaoks vajalikud geenid. Neid nimetatakse

plasmiiidi selgrooks. Selgroogeenid on plasmiidide süstematiseerimise aluseks. Kuigi plasmiidid pole bakterite populatsiooni kasvuks ja bakteritele elutähtsateks funktsioonideks vajalikud, siis teatud juhtudel, näiteks ebasoodsate keskkonnatingimuste korral, võib plasmiiidi olemasolu oluliselt soodustada bakteriraku ellujäämist (Miljkovic-Selimovic jt., 2007). Plasmiiide, mis ei kanna ühtegi peremeesrakule olulist fenotüübilist determinanti, kutsutakse krüptilisteks plasmiidideks. Enamik iseloomustatud plasmiididest kodeerivad siiski ühte või mitut peremeesrakule kasulikku tunnust, nagu aromaatsete ühendite lagundamisvõime, resistentsus raskemetallide suhtes ja antibiootikumiresistentsus (Thomas ja Haines, 2004). Plasmiidid võivad antibiootikumiresistentsusgeene koguda ja levitada. Antibiootikumide resistentsusmehhanismid bakterites on erinevad, näiteks sihtmärgi kaitsmine, märklaua asendamine, antibiootikumi mürgitustamine ja antibiootikumi rakusisese kuhjumise blokeerimine (Bennett, 2008).

Soodsates keskkonnatingimustes võib bakterirakk plasmiidist vabaneda, ilma et sellele järgneks peremeesraku jaoks eluotlikke tagajärgi (Miljkovic-Selimovic jt., 2007).

1.3. Plasmiidide mittesobivusgrupid

Plasmiidide identifitseerimiseks ja klassifitseerimiseks on otsitud erinevaid tunnuseid, mis on igas plasmiidis esindatud. Seda kriteeriumit täidavad kõige paremini omadused, mis on seotud plasmiiidi säilumisega. 1971. aastal esitasid Datta ja Hedges klassifitseerimise süsteemi, mis põhines plasmiidide omavahelisel mittesobivusel (Carattoli, 2009). Mittesobivus (*incompatibility*) on kahe plasmiiidi suutmatus samas rakuliinis stabiilselt säiluda. Plasmiidid, mis on üksteise suhtes mittesobivad, paigutatakse samasse mittesobivusgruppi (Inc grupp). Mittesobivust testitakse plasmiiidi sisestamisega tüvesse, mis kannab teist plasmiiidi. Mõlemal plasmiidil peavad olema erinevad geneetilised markerid, et peremeesrakk saaks plasmiiide eristada. Valik langetatakse siseneva plasmiiidi järgi. Seejärel kontrollitakse, kas järgmises põlvkonnas on plasmiiide, mida bakteris esialgselt leidis. Kui antud plasmiiidi järglaskonnas ei ole, loetakse need kaks plasmiiidi mittesobivaks (*incompatible*) ja määratakse samasse mittesobivusgruppi (Couturier jt., 1988). Eristatakse mitmeid mittesobivusgruppe: IncP, IncW, IncN, IncT, IncY, IncF, IncB/O jne. Antud plasmiidide jaotumise viis on tuntud kui *Enterobacteriaceae* klassifikatsioon. Bakteriperekonda *Pseudomonas* kuuluvatest tüvedest isoleeritud plasmiidide klassifitseerimiseks kasutatakse aga teist süsteemi. Pseudomonaadide esindajates tuvastatud plasmiidid kuuluvad 14 erinevasse Inc grupp. Kõige paremini on uuritud IncP-1, IncP-2, IncP-7 ja IncP-9 mittesobivusgruppidesse kuuluvaid plasmiiide (Shintani jt., 2010). IncP-1 rühmale vastab IncP plasmiidide perekond *Enterobacteriaceae* klassifikatsiooni järgi.

Plasmiidide jaotumine mittesobivusgruppidesse eespool kirjeldatud meetodiga on aeganõudev ja töömahukas protsess, mille tõttu kasutatakse tänapäeval selle asemel kiiremat ja täpsemat metoodikat nimega *replicon typing* (põhjalikumalt käsitletud järgmises peatükis). Kuna mõlema metoodika aluseks on enamasti plasmiidide replikatsiooni ja replikatsiooni kontrollimise eest vastutavate selgroopiirkondade võrdlus, kasutatakse esialgse Inc grupeerimise alusel loodud süstemaatikat ka tänapäeval, täiendades seda pidevalt.

1.4. Plasmiidide määramine replikonide järgi

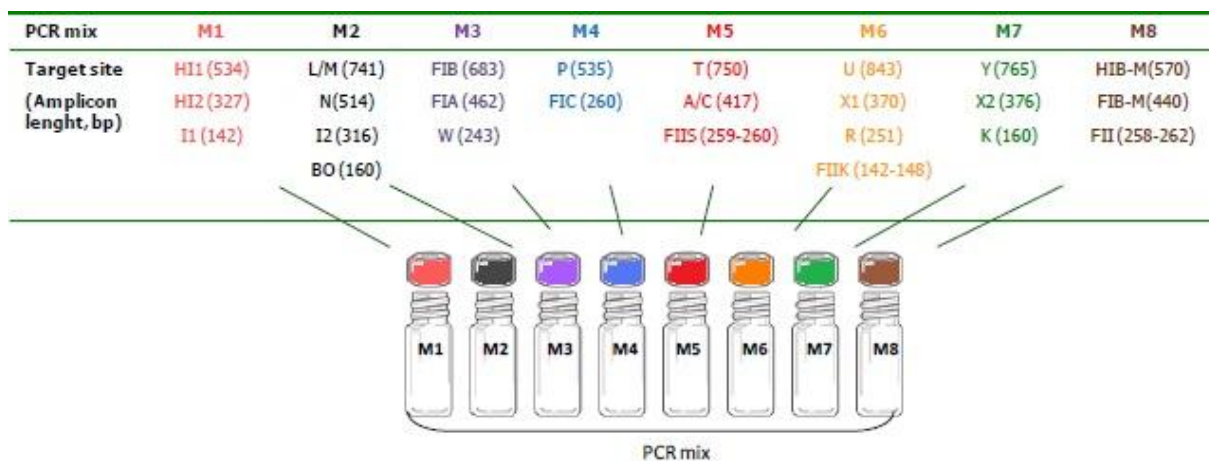
Plasmiidid, mis omavad sarnast replikatsiooni alguspunkti ja kodeerivad sarnaseid replikatsiooni kontrollimise mehhanisme, ei püsi reeglina stabiilselt samas peremeesrakus. Replikatsiooni alguspunkt (*ori*) on plasmiidi piirkond, kus replikatsiooniprotsess algab. See sisaldab tihti iterone, mis on kordusjärjestused, kuhu plasmiidi poolt kodeeritud replikatsiooni initsiaatorvalk (RepA) seondub ning käivitab replikatsiooniprotsessi. Kontroll replikatsiooniprotsessi üle võib toimuda nii iteronide (*cis*-toimivad geneetilised elemendid) kui ka Rep valgu (*trans*-toimiv element) vahendusel (Del Solar jt., 1998). Plasmiidi minimaalset järjestust, mis on vajalik selleks, et plasmiid saaks bakterirakus autonoomselt replitseeruda, säilitades talle omase koopiaarvu, nimetatakse replikoniks. Replikon on iseloomulik kõikidele plasmiididele, teisi tunnuseid kodeerivad geenid on sekundaarse tähtsusega (Summers, 1996).

Replicon typing on plasmiidide tuvastamise ja määramise viis, mis põhineb enamasti replikatsiooni initsiaatorvalku kodeeriva geeni ja *ori* piirkonna järjestuste amplifitseerimisel PCR meetodiga, kasutades igale Inc rühmale spetsiifilisi praimereid. Seejärel amplifitseeritud fragmente sekveneeritakse ja järjestusi analüüsitakse põhjalikult, et leida fülogeneetilisi seoseid. Kuna *replicon typing* on, erinevalt plasmiidi mittesobivusomaduste testimisest, geneetiline test, võimaldab ta määrata ja klassifitseerida plasmiide, mis kodeerivad mitut replikatsiooni initsiaatorvalku. Näiteks plasmiid pME001, mida on identifitseeritud kui IncFII, IncN ja IncA/C plasmiidi. (Sherley jt., 2004). On näidatud, et mitmest olemasolevast *repA* geenist tagab replikatsiooni kindlas peremeesrüves vaid üks. Näiteks *Pseudomonas putida* tüvest DOT-T1E isoleeritud plasmiidil pGRT1 on kaks replikaasi kodeerivat geeni, ORF45 ja ORF49, kuid plasmiidi replikatsiooni eest vastutab ORF49 poolt kodeeritud RepA (Molina jt., 2011). Mitme replikoniga plasmiide isoleeritakse sageli kliinilise tähtsusega bakteritüvedest, mis on resistentsed antibiootikumide suhtes, näiteks mitmed IncF plasmiidid (Villa jt., 2010).

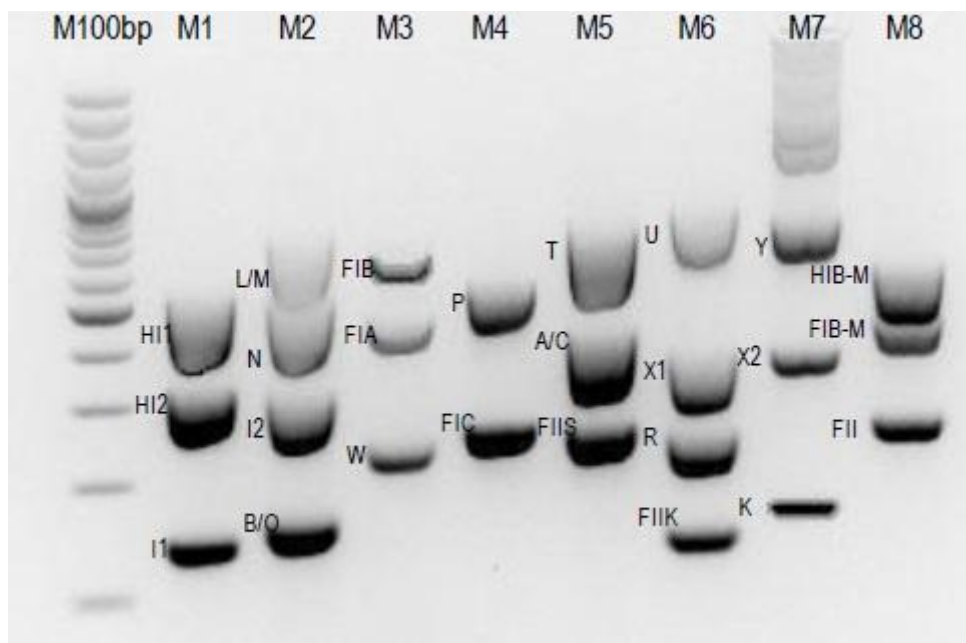
Hiljuti töötati välja esimene kommertsiaalne kit, PBRT kit (*PCR based replicon typing*), resistentsusplasmiidide kiireks tuvastamiseks ja määramiseks *Enterobacteriaceae* sugukonna

esindajatest. PBRT süsteem, mis kujutab endast kaheksat multipleks PCR reaktsioonide segu, on disainitud kahekümne viie replikoni tuvastamiseks: HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK, W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M ja FIB-M. Skeem on näidatud joonistel 1 ja 2.

Antud süsteemi kasutatakse intensiivselt antibiootikumide suhtes resistentsete tüvede skriinimisel resistentsusdeterminantide levimise järel (Carattoli jt, 2009).



Joonis 1. Multipleks PCR reaktsioonide segud vastavate replikonide tuvastamiseks. Joonis pärineb PBRT kit'i tootjate poolt esitatud protokollist.



Joonis 2. Amplifitseeritud positiivsete kontrollide fragmendid agarosegelil. Joonis pärineb PBRT kit'i tootjate poolt esitatud protokollist.

1.5. Replikatsioonimehhanismid

Plasmiidide kaasaegse replikon-põhise identifitseerimise meetodika arendamisele eelnes ulatuslik uurimistöö erinevate plasmiidide replikatsioonimehhanismide ja replikatsiooniprotsessi kontrollimise kohta (Del Solar jt., 1998).

Tsirkulaarsete plasmiidide replikatsioon võib toimuda kolme erineva mehhanismi järgi: teeta mudeli järgi, ahelate teisaldamise kaudu või veereva ratta mehhanismi abil.

1. Teeta mudeli järgi

Teeta replikatsioonimehhanismi on kõige ulatuslikumalt uuritud gram-negatiivsete bakterite tsirkulaarsete plasmiidide põhjal. Antud protsess hõlmab ahelate lahtiharutamist, praimer RNA (pRNA) sünteesi ning DNA sünteesi algatamist pRNA kovalentse pikendamise kaudu. DNA süntees on pidev ühel ahelal ja katkendlik teisel, kuigi mõlema ahela süntees on omavahel seotud. Teeta-tüüpi DNA süntees võib alata ühest või mitmest lähtekohast ja replikatsioon võib kulgeda ühes või mõlemas suunas. Kui vaadata replikatsiooni vaheühendeid elektronmikroskoobis, siis meenutavad need Θ -kujulisi molekule, mis annavad pärast seda, kui ensüümid on neid lagundanud, Y-kujulisi molekule.

Plasmiidid, mis kasutavad replikatsiooniks teeta mehhanismi, vajavad enamasti Rep initsiaatorvalku, mille kodeerib plasmiid. Mõned replikonid vajavad juhtiva ahela sünteesi varajastel etappidel DNA I polümeraasi, mille kodeerib peremeesrakk (Del Solar jt., 1998).

2. Ahela teisaldamine

Tuntuimad plasmiidid, mis selle mehhanismi järgi replitseeruvad, on IncQ rühma kuuluvad plasmiidid. Selle grupi liikmed vajavad DNA replikatsiooni alustamiseks kolme valku, mis on plasmiidi poolt kodeeritud. Nendeks valkudeks on RepA, RepB ja RepC. Nimetatud valgud soodustavad sünteesi alustamist replikatsiooni lähtekoha piirkonnast. Replikatsioon algab kahest alguspunktist *ssiA* ja *ssiB*. Need alguspunktid tunneb ära plasmiidi poolt kodeeritud RepB primaas. Replikatsioon kulgeb mõlemas suunas ning mõlemat ahelat sünteesitakse pidevalt komplementaarse ahela väljatõrjumisega (Del Solar jt., 1998).

3. Veereva ratta mehhanism

Replikatsioon veereva ratta mehhanismi järgi on ühesuunaline. See on asümmeetriline protsess, kuna juhtiva ahela süntees ja mahajääva ahela süntees pole omavahel seotud. Värskest sünteesitud

juhtiv positiivne ahel jääb kovalentselt seotuks vana positiivse ahelaga. Kuigi enamik selle mehhanismi järgi replitseeruvatest plasmiididest on väiksemad kui 10 kiloaluspaari, ei replitseeru kõik väikesed plasmiidid veereva ratta mudeli järgi.

Replikatsioon algab plasmidi Rep valgu seondumisega plasmidi DNAGA. Seejärel lõikab Rep vana ühte DNA ahelat, mistõttu vabaneb 3'OH ots, mida omakorda kasutatakse juhtiva ahela sünteesil praimerina. 3'OH otsast toimub ahela pikendamine, millega kaasneb plasmidi vana positiivse ahela eemaletõrjumine. Selle asemele sünteesitakse uus ahel. Replikatsiooni tulemusena saadakse kaksikahelaline DNA molekul ja üksikahelaline DNA molekul, millele sünteesitakse komplementaarne ahel peremehe valkude abil (Del Solar jt., 1998).

1.6. Konjugatsioon ja täiendav klassifitseerimine

Meditsiinilisest aspektist lähtudes on plasmiidide kõige olulisemaks tunnuseks resistentsusdeterminantide levitamine keskkonnas. Konjugatsioon on plasmiidide poolt esile kutsutud protsess, kus rakkudevahelise kontakti teel doonorliku DNA kantakse horisontaalselt üle retsipientrakku. Resistentsusplasmiidid võivad sageli kanduda üle konjugatsiooni teel nii sama liigi eri tüvede kui ka erinevatesse taksonitesse kuuluvate bakterite vahel (Miljkovic-Selimovic jt., 2007).

Sõltuvalt konjugatiivsusest saab plasmiidid jagada kahte klassi. Plasmide, mis kannavad tervet konjugatsiooniks vajalike geenide komplekti, nimetatakse konjugatiivseteks plasmiidideks. Teised plasmiidid sisaldavad vaid minimaalset geenide hulka, mis võimaldavad neil konjugatsiooni teel liikuda vaid konjugatiivsete plasmiidide abiga. Neid nimetatakse mittekonjugatiivseteks või mobiliseeritavateks plasmiidideks, näiteks IncQ rühma esindajad. Konjugatiivsed plasmiidid on tavaliselt väikese koopiaarvuga, samas kui mittekonjugatiivsed elemendid on kõrge koopiaarvuga (Garcillán-Barcia jt., 2011). Plasmiidid, mis kuuluvad samasse mitesobivusgruppi, kodeerivad tavaliselt sarnaseid konjugatsioonisüsteeme. Konjugatsiooniprotsessis toimuvad sündmused järgnevalt:

1. DNA ülekande algus ülekande lähtekohast (*oriT*), kuhu ensüüm relaksaas teeb üheaahelalise katke,
2. plasmidi DNA ahelate lahtiharutamine,
3. ühe ahela ülekande sugukiu vahendusel retsipientrakku,
4. üksikahelalisele DNAle komplementaarse ahela sünteesi nii doonor- kui retsipientrakus,
5. plasmidse DNA rõngasmolekuli moodustumine (Miljkovic-Selimovic jt., 2007)

Hiljuti pakuti *repA* ja *ori* järjestustele põhinevale plasmiidide süstematiseerimisele välja alternatiiv: plasmiidide konjugatiivsete süsteemide klassifitseerimine MOB perekondadesse. Plasmiidide klassifitseerimise aluseks võetakse relaksaasi kodeeriva geeni järjestus. Plasmiidid jagatakse kuude MOB perekonda: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_C, MOB_P, MOB_V (Garcillán-Barcia jt., 2009). MOB klassifikatsiooni kasutatakse sageli uute tuvastatud plasmiidide iseloomustamisel lisaks Inc-põhisele klassifikatsioonile.

1.7. Olulisemad Inc rühmad

Mõningaid Inc rühmi on rohkem uuritud kui teisi. Kui palju mingi Inc rühm tähelepanu saab, sõltub nii sinna kuuluvate plasmiidide esindatusest looduses kui nende funktsioonist ja omadustest. Põhjalikult on uuritud näiteks IncN mittesobivusgruppi kuuluvaid plasmide. Need plasmiidid on ohuks inimese tervisele, kuna nende peremeesteks on eelistatult enterobakterid, kuhu kuuluvad inimeste ja loomade patogeenid *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ja *Klebsiella pneumoniae* (Eikmeyer jt., 2012). IncA/C rühma kuuluvad väikese koopiaarvuga suured plasmiidid, mis on seotud multiresistentsuse levikuga inimese ja loomade soolestiku patogeenide seas (Johnson ja Lang, 2012). IncW plasmiidid on teadaolevatest looduslikest konjugatiivsetest plasmiididest kõige väiksema genoomiga. Nad on laia peremeestingiga ning omavad antibiootikumide suhtes resistentsust kodeerivaid geene (Fernandez-Lopez jt., 2006). Kõige enam on uuritud siiski järgmiseid plasmide:

IncX

IncX plasmide isoleeriti *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvatest bakteritest juba enne antibiootikumide ajastut, mis algas penitsilliini kasutuselevõttuga 1940. aastatel. (Johnson jt., 2012). Algul arvati, et IncX plasmiidid on kitsa peremeestingiga, kuid nende võime kanduda konjugatsiooni teel *Escherichia coli* bakterirakkudest üle *Pseudomonas aeruginosa* bakteriliigist retsipientidesse viitab sellele, et nende peremeesting on arvatust laiem (Tardif ja Grant, 1983). Kõige enam on IncX plasmide tuvastatud *Escherichia coli* ja *Salmonella enterica* tüvedes. IncX plasmiidid on võimelised moodustama kointegraate *Salmonella* esindajatest pärinevate F-tüüpi virulentsusplasmiididega. IncX esindajate replikatsioon toimub teeta replikatsioonimehhanismi järgi (Norman jt., 2008).

IncX plasmiidid jagatakse kaheks rühmaks: IncX1 ja IncX2. IncX grupi arhetüüpiliseks plasmiidiks on plasmiid R6K, mis kuulub alagruppi IncX2. Esimene sekveneeritud IncX1 plasmiid oli sea sõnnikust isoleeritud multiresistentne plasmiid pOLA52. Plasmiid kannab kahte

geenikassetti: esimene geenikassett *oqxAB* kodeerib antibiootikumidele multiresistentsust tagavat pumpa (*efflux pump oqxAB*) (Johnson jt, 2012) ning teine geenikassett *mrkABCDF* suurendab biofilmi moodustamist ja konjugatsiooni toimumist mitmetes erinevates *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvates bakterites (Norman jt, 2008). Bakterist *Escherichia coli*, keda on leitud sinikael-partidest, heeringast, kajakast ja hobusest, isoleeriti kinoloonile resistentsust kodeerivat geeni *qnrS* kodeerivad IncX plasmiidid (Johnson jt, 2012).

IncHI

IncHI plasmiidid liiguvad erinevate bakterite vahel konjugatsiooni teel tüüp IV sekretsioonisüsteemi abil. Antud süsteem koosneb kaheteistkümnest või kolmeteistkümnest plasmiidide poolt kodeeritud valgust, mis võimaldavad rakk-rakk kontakti loomist. IncHI plasmiidide unikaalseks iseärasuseks on nende temperatuuritundlik konjugatsioon. Optimaalne temperatuur konjugatsiooniks on 30°C, vähendatud konjugatsioon toimub 37°C juures. Temperatuurikontroll on reguleeritud transkriptsiooni tasemel (Gunton jt., 2008). Telluriidi ja faagi resistentsuse ning F-plasmiidiga mittesobivuse alusel jagatakse IncHI plasmiidid kolme alamgruppi: IncHI1, IncHI2 ja IncHI3. IncHI1 alamgruppi kuuluvad haigusevastast ravi raskendavad konjugatiivsed multiresistentsed plasmiidid, mis pärinevad kõhutüüfust põhjustavast bakterist *Salmonella enterica* serovar Typhi (Gunton jt., 2008). Tetratsükliini suhtes resistentsust kodeeriv plasmiid R27 on IncHI1 prototüüpiline plasmiid (Phan ja Wain, 2008). Kuigi IncHI1 plasmiiide leidub peamiselt bakteris *Salmonella enterica* serovar Typhi, viitab nende termosensitiivne ülekandumine ja suhteliselt lai peremeestering sellele, et nad on pärit mullabakteritest.

IncHI2 alamgrupi esindajad vastutavad samuti peremeesrakkude resistentsuse eest antibiootikumide suhtes. Need plasmiidid on isoleeritud loomadest kui ka inimestest pärit kõhutüüfust mittepõhjustavatest *Salmonella* tüvedest (Gunton jt., 2008).

IncF

Plasmiididel, mis kuuluvad IncF mittesobivusgruppi, on oluline roll antibiootikumiresistentsuse ja virulentsusdeterminantide levitamises *Enterobacteriaceae* sugukonna liikmete seas. (Wibberg jt., 2013). IncF plasmiidid on madala koopiaarvuga ning kannavad sageli rohkem kui ühte replikoni (Carattoli, 2009). IncF plasmiidide konjugatiivne ülekanne on efektiivne ja nad püsivad oma peremeestes stabiilsetena, kuna kodeerivad selleks vajalikke mehhanisme: toksiin-antitoksiin

süsteeme ja plasmidikoopiate aktiivset jaotumist tütarrakkude vahel jagunevas rakus. Antibiootikumiresistentsust ja virulentsusfunktsioone kodeerivad IncF plasmiidid isoleeriti esmalt inimeste patogeenidest, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* ja *Salmonella enterica* bakteritüvedest. *Salmonella typhimurium* tüüp DT104 isolaatides on aset leidnud resistentsus- ja virulentsusgeenide koondumine IncFIC mitesobivusgruppi kuuluvatesse plasmiididesse. Antud bakteritüvede virulentsus on tagatud *spvCD* geenide poolt ning nendele iseloomulik ACSSuT fenotüüp väljendub plasmiidide poolt kodeeritud resistentsuses ampitsilliinile, klooramfenikoolile, streptomütsiinile, sulfoonamiididele ja tetratsükliinile (Rychlik jt., 2006).

IncP

Enamik senini isoleeritud IncP plasmide on kataboolsed plasmiidid ja resistentsusplasmiidid. Kataboolsed plasmiidid kodeerivad nii looduses esinevate kui ka inimese poolt loodud keemiliste ühendite lagundamiseks vajalikke ensüüme. Nad on tüüpiliselt suured madala koopiaarvuga (50-500 kiloaluspaari) DNA molekulid. Kataboolsed plasmiidid sisaldavad arvukalt mobiilseid geneetilisi elemente (MGE), nagu insertioonijärjestusi ja transposoone. (Dennis, 2005).

IncP-1 plasmiididel on lai peremeesting ja mitmekesiseid lisatunnuseid kodeerivad geenid. Antud plasmiidid on võimelised kanduma gram-negatiivsetelt bakteritelt gram-positiivsetele bakteritele, tsüanobakteritele ja isegi pärmidele (Oliveira jt., 2012). Kõikidel teadaolevatel IncP-1 plasmiididel on modulaarne ülesehitus: nende plasmiidide selgrood sisaldavad replikatsiooni, stabiilse säilimise, rakk-rakk kontakti loomise ja DNA ülekandega seotud geenide mooduleid, kusjuures viimased kaks mainitud geenide blokki võivad osal plasmiididel puududa. Lisaks on peaaegu kõigil IncP-1 plasmiididel üks või enam mobiilne geneetiline lisaelement, mis kodeerib kas antibiootikumi/raskemetalli suhtes resistentsust või ensüüme, mis on seotud ksenobiootiliste (inimese poolt loodud) ühendite lagundamisega, kuigi esineb ka plasmide, millel puuduvad kirjeldatud funktsionaalsed elemendid (Bahl jt., 2009).

IncP-9 plasmiidid on kõige paremini tuntud kui pseudomonaadide seas kataboolsete geenide levitajad. Nad levitavad näiteks tolueeni/ksüleeni ja naftaleeni lagundamiseks vajalikke gene (Shintani jt., 2010). IncP-9 plasmiidid võivad kanda ka resistentsuse geneetilisi determinante, näiteks laia peremeestingiga plasmiid pM3 kannab resistentsust streptomütsiini ja tetratsükliini suhtes (Greated jt., 2000). IncP-9 plasmiidide DNA järjestuste analüüs ja hübriidisatsiooni eksperimendid paljastasid suure sarnasuse nende replikatsioonialades (Krasowiak jt., 2002) ja ka terve selgroo ülesehituses (Sota jt., 2006).

Perekonna *Pseudomonas* bakteritest isoleeritud IncP-7 plasmiidid on kataboolsed plasmiidid, millel on kitsas peremeestering (Shintani jt., 2011).

IncP-2 mittesobivusgruppi kuuluvad plasmiidid on sattunud huviorbiiti tänu järgmistele omadustele: levimus bakteriperekonna *Pseudomonas* liikides, piiratud peremeestering, rekombinantsete molekulide moodustumine ja molekulide suur suurus. Lisaks resistentsusele antibiootikumide suhtes, kannavad IncP-2 plasmiidid resistentsust ka toksilistele ühenditele, nagu boor, kroom, elavhõbe ja telluur (Jacoby jt., 1983).

IncY

IncY mittesobivusgruppi kuuluv plasmiid pIP231 kodeerib resistentsust tetratsükliini suhtes ja võimaldab vesiniksulfiidi moodustumist. Plasmiid pIP231 kodeerib restriksiooni ja modifikatsiooni süsteemi, mis võimaldab kaitsta bakterirakku võõra, rakku tunginud DNA eest (Briaux jt., 1979).

Plasmiidid P15B, P1 ja P7 kuuluvad samuti IncY mittesobivusgruppi. Nimetatud kolm IncY plasmiidide replikoni näitavad märkimisväärset sarnasust nii geneetilisel kui ka funktsionaalsel tasemel (Briaux jt., 1979). P1 on *Escherichia coli* ja teiste soolestikubakterite bakteriofaag. Profaagina olev P1 eksisteerib peremeesrakus tsirkulaarse madala koopiaarvuga plasmidi kujul (Lobockal jt., 2004).

Mõlema profaagi nii P1 kui ka P7 replikatsiooniks on vajalikud RepA initsiaatorvalk ja replikatsiooni alguspunkt, millega RepA seondub. Nende kahe plasmidi RepA valgu järjestused erinevad vaid ühe aminohappe poolest (Froehlich ja Scott, 1988). On näidatud et *Escherichia coli* peremeesraku lüüsimine P7 poolt on replikatsiooni alguspunkti kontrolli all (Ludtke ja Austin, 1987).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on identifitseerida Läänemere pinnavees esinevaid plasmide, kasutades PBRT (*PCR based replicon typing*) kit'i (Diatheva):

- kontrollida antud kit'i sobivust merevee proovidest eraldatud mikroobikoosluse DNA analüüsimiseks;
- tuvastada plasmidirühmi, mis võivad olla seotud antibiootikumide suhtes resistentsust kodeerivate geenide kandmise ja levimisega Läänemere mikroobikoosluses;
- testida antud kit'iga amplifitseeritavate replikonide olemasolu Läänemerest isoleeritud neljas plasmiidises kataboolses bakteritüves

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Töös kasutatud geneetiline materjal ja selle säilitamine

Uurimistöös kasutatud neli bakteritüve on kirjeldatud tabelis 1 (Jutkina jt., 2011).

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved

Bakteritüvi	Plasmiidide arv*	Iseloomustus**
<i>Pseudomonas putida</i> C14	2S + 3V	Phe Benz Sal Amp ^R
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> C70a	1S	Phe Sal Nah Amp ^R
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> C70b	1S	Phe Sal Nah Amp ^R
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 2D47	2V	Phe Benz Tol Sal

*suur plasmiid (S), väike plasmiid (V)

** resistentne ampitsilliini (Amp^R) suhtes; kasvab fenoolil (Phe), bensoaadil (Benz), toluaadil (Tol), salitsülaadil (Sal) ja naftaleenil (Nah)

Töös on kasutatud ka Läänemere pinnavee mikroobikooslusest eraldatud totaalset DNAd. Veeproovid olid eelnevalt kogutud neljast proovivõtu kohast A (Tallinna lähedal), B (avamerest), C (Narva lähedal), D (Pärnu lähedal) (LISA 1), filtreeritud paberfiltritele ning säilitatud temperatuuril -80 °C (Jutkina jt., 2011).

Filtrid lõigati ribadeks ja DNA eraldati *PowerSoil DNA Isolation Kit*'i (MO BIO Laboratories Inc.) abil, järgides tootja poolt esitatud protokoll. DNA oli eraldatud poolest liitrist filtreeritud pinnaveest.

Bakteritüvesid hoiti temperatuuril 4°C R2A agarsöetmel. Manipulatsioonide käigus eraldatud või amplifitseeritud DNA säilitati -20°C juures.

2.2.2. PBRT (PCR based replicon typing) kit'i testimine

Bakteritüvedest ja filtritelt eraldatud DNAs esinevate plasmiidide skriinimine teostati PBRT – *PCR based replicon typing kit*'iga (Diatheva), järgides tootja poolt koostatud protokoll.

Esmalt eraldati bakteritüvedest DNA. Selleks suspendeeriti bakterirakke 50 µl destilleeritud vees ning inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 95°C. Seejärel tsentrifugeeriti segu kümne minuti jooksul režiimil 12000 x g rakukomponentide sadestamiseks ja DNA vabastamiseks supernatanti.

Järgnevalt viidi läbi PCR reaktsioon. PCR-i reaktsioonisegu segati kokku tootja poolt varustatud komponentidest ning määratud proportsioonides. Reaktsioonimahuks oli 25 µl, millest 23,8 µl moodustas vastav *mix*, 0,2 µl polümeraas ja 1 µl bakterirakkude lüsaat või filterpaberitelt eraldatud DNA. Kontrollproovi jaoks lisati samas koguses *mix*-i ja polümeraasi ning 1 µl kit'is sisalduvat positiivset DNA kontrolli. *Mix*-ides sisalduvad praimerid ning kontrollideks kasutatavad plasmiidid on loetletud tabelis 2. Tabel 2 on koostatud teaduslike artiklite põhjal, mis on mainitud PBRT kit'iga kaasnevas protokollis.

Eppendorf Mastercycler PCR masinas viidi läbi PCR programm järgmistel tingimustel:

1. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon kümne minuti jooksul.

Järgnevad kolm etappi kordusid nelikümmend tsükli:

2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon ühe minuti jooksul 95°C juures.
3. Praimerite seondumine 30 sekundi jooksul temperatuuril 60°C.
4. Uue DNA ahela süntees ühe minuti jooksul temperatuuril 72°C.

Lõppinkubeerimine teostati 72°C juures 5 minuti jooksul.

PCR produkte kontrolliti elektroforeesi meetodil TAE [50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2] puhvril, mis sisaldas etiidumbromiidi (0,5 µg/ml). Produktide võrdlemiseks kasutati suurusmarkerina *GeneRuler*™ 100bp DNA markerit (Fermentas). Elektroforees viidi läbi 100 V juures, fragmendid visualiseeriti UV valguses.

Kontrollidele vastava suurusega amplifitseeritud DNA produktid lõigati agarosgeelist välja ning agarosist puhastamiseks kasutati *QIAquick Gel Extraction Kit*'i (Qiagen), järgides tootja poolt

esitatud protokoll.

2.2.3. Kloneerimine

Geelist väljapuhastatud amplifitseeritud fragmendid kloneeriti, kasutades *Clone JET PCR Cloning Kit*'i ning tootjapoolset protokoll (Fermentas). Ligeerimisel liideti geelist väljapuhastatud fragmendid ning pTZ57R/T vektori molekulid. Ligeerimine teostati kolme tunni jooksul toatemperatuuril ning säilitati üleöö 4°C juures.

2.2.4. Transformeerimine

Ligeerimissegu (10 µl) transformeeriti *Escherichia coli* DH5α kompetentseks muudetud rakkudesse (200 µl) (Inoue jt. 1990). Transformeerimine viidi läbi kuumašoki meetodil, kus rakke hoiti 30-40 minutit jääl, millele järgnes kuumašokk 42°C juures 1 minut ja 30 sekundit. Seejärel viidi rakud taas 10 minutiks jääle. Transformeeritud rakud külvati LB tardsöötmele, mis sisaldas ampitsilliini (0,15 mg/ml), 0,48 mg/ml IPTG-d (isopropüül-1-tio-β-D-galaktosiid) ja 0,08 mg/ml X-gal-i (5-bromo-4-kloro-3-indolüül-D-galaktopüranosiid). Baktiereid inkubeeriti 37°C juures üleöö.

Selekteeritud kolooniad külvati ümber nummerdatud ampitsilliini sisaldavatele LB tardsöötmetele edasiseks analüüsimiseks ja säilitamiseks.

2.2.5. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl sisaldas PCR puhvrit [75mM Tris-HCl, pH 8,8; 20mM (NH₄)₂SO₄-MgCl₂; 0,01% Tween 20], 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, 20 pmol kumbagi praimerit (Forward 5`CATTGCTTGCCGGTCA-3` ja Reverse 5`-AACAGCTATGACCATG-3`), nukleotiide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM, termoresistentset *Thermus aquaticus*'e *Taq* DNA polümeraasi (Fermentas) kontsentratsiooniga 0,02 U/µl ning 5 µl rakkude lüsaati. Lüsaadi saamiseks lüüsi bakterirakke 15 minutit 25 µl destilleeritud vees 96°C juures, seejärel jahutati jääl ja tsentrifuugiti viie minuti jooksul režiimil 12000 x g. PCR teostati eespool kirjeldatud tingimustel, välja arvatud praimerite seondumine, mis toimus temperatuuril 50°C.

2.2.6. Sekvenerimine

Enne sekvenerimist viidi läbi PCR produktide töötlus, mille eesmärgiks oli inaktiveerida ja eemaldada seondumata nukleotiidid ja praimerid. Selleks kasutati ensüüme ExoI (Fermentas) lõppkontsentratsiooniga 0,36 U/ μ l, ja SAP (Fermentas), kontsentratsiooniga 0,15 U/ μ l. ExoI on üheaheelalise DNA-spetsiifiline ensüüm, mis lõhub praimerid. SAP eemaldab 5'-positsioonist kaks fosfaatjääki. Töötlus teostati 15 minuti jooksul temperatuuril 37°C. Ensüümide inaktiveerimiseks viidi läbi järeltöötlus 80°C juures 15 minutit.

Sekvenerimisreaktsiooni teostati kasutades *Terminator 3.1. Cycle Sequencing Kit*'i ja sellele vastavat protokollit (Applied Biosystems). Reaktsioonid viidi läbi *Eppendorf Mastercycler* masinas järgmistel tingimustel:

- 1) Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 15 sekundit,
- 2) Praimeri (Forward) seondumine temperatuuril 50°C 10 sekundi jooksul,
- 3) DNA ahela ekstensioon 60°C juures 45 sekundi jooksul

Viidi läbi 30 kordustsükli. Automaatsekvenenaatoriks oli *Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer*.

2.2.7. Sekveneritud järjestuste analüüs

Sekveneritud järjestusi analüüsiti programmiga BioEdit (versioon 7.1.11.0). Järjestusi võrreldi geenipangas (GenBank) olevate andmetega, kasutades programme BLASTN ja BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabel 2. Inc rühmade spetsiifilised praimerid ja vastavad positiivsed kontrollid.

Inc rühm	Praimeri nimetus	5'→3' järjestus	Tüvi ja selles esinev plasmiid	Geenipanga number	Amplif. fragment (bp)
IncHI1	HI1 FW	ggagc gatggattacttcagtac	<i>Salmonella typhi</i> R27	AF250878	471
	HI1 RV	tgccgttcacctcgtgagta			
IncHI2	HI2 FW	tttcctcctgagtcacctgtaaacac	<i>Serratia marcescens</i> R478	BX664015	644
	HI2 RV	ggctcactaccgtgtcatcct			
IncI1-alpha	I1 FW	cgaaagccggacggcagaa	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium R64	AP005147	139
	I1 RV	tcgtcgttccccaagttcgt			
IncI2-gamma	I2 FW	-	<i>Escherichia coli</i> R721	AP002527	-
	I2 RV	-			
IncX1	X1 FW	-	<i>Escherichia coli</i> pOLA52	EU370913	-
	X1 RV	-			
IncX2	X2 FW	-	<i>Escherichia coli</i> R6K	M65025	-
	X2 RV	-			
IncL/M	L/M FW	ggatgaaaactatcagcatctgaag	<i>Citrobacter freundii</i> pCTX-M3	AF550415	785
	L/M RV	ctgcaggggcgattctttagg			
IncN	N FW	gtctaacgagcttaccgaag	<i>Escherichia coli</i> R46	NC_003292	559
	N RV	gtttcaactctgccaagttc			
IncFIA	FIA FW	ccatgctggttctagagaaggtg	Plasmid F	AP001918	462
	FIA RV	gtatctcttactggtctccgcag			
IncFIB	FIB FW	ggagtctgacacacgattttctg	Plasmid F	AP001918	702
	FIB RV	ctcccgtcgttcagggcatt			
IncW	W FW	cctaagaacaacaagcccccg	<i>Escherichia coli</i> R721	AP002527	242
	W RV	ggcgcgccgcatagaaccgt			
IncY	Y FW	aattcaacaacactgtgcagcctg	<i>Enterobacteria</i> phage P7	AF503408	765
	Y RV	gcgagaatggacgattacaaaacttt			
IncP	P FW	ctatggccctgcaaacgcgccagaaa	IncP-alfa plasmiid	L27758	534
	P RV	tcacgcgccagggcgcagcc			
IncFIC	FIC FW	gtgaactggcagatgaggaagg	Plasmid F	AP001918	262
	FIC RV	ttctctctcgtcgcacaactagat			
IncA/C	A/C FW	gagaaccaaagacaagacctgga	<i>Aeromonas hydrophila</i> pRA1	FJ705807	465
	A/C RV	acgacaaactggaattgctctctt			
IncT	T FW	ttggcctgtttgtgcctaaacat	<i>Proteus vulgaris</i> Rts1	AP004237	750
	T RV	cgttgattacacttagctttggac			
IncFIIS	FIIS FW	ctgtcgttaagctgatggc	<i>S. enterica</i> Typhimurium pSLT	AE006471	270
	FIIS RV	ctctgccacaacttcagc			
IncFII	FII FW	ctgatcgtttaaggaatttt	<i>Escherichia coli</i> NR1	DQ364638 AP000342	258–262
	FII RV	cacaccatcctgcactta			
IncF	FIik FW	tcttctcaatcttgccgga	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKPN3	CP000648	142–148
	FIik RV	gcttatgttgacrgaagga			
IncK/B	K/B FW	gcggtccggaagccagaaaaac	-	-	160
IncK	K RV	tctttcacgagcccgcacaa	<i>Escherichia coli</i> R387	M93063	160
IncB/O	B/O RV	tctcgttccgccaagttcga	<i>Escherichia coli</i> p3521	GU256641	159
Pole määratud	HIB-M	-	pNDM-MAR	JN420336	-
Pole määratud	FIB-M	-	pNDM-MAR	JN420336	-
IncU	U FW	tcacgacacaagcgaaggg	<i>Aeromonas hydrophila</i> pRA3	DQ401103	843
	U RV	tcattgtatcctggcg			
Pole määratud	R FW	tcgcttctcctgcttcagc	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pK245	DQ449578	251
	R RV	gtgtgctgtgttatgcctca			

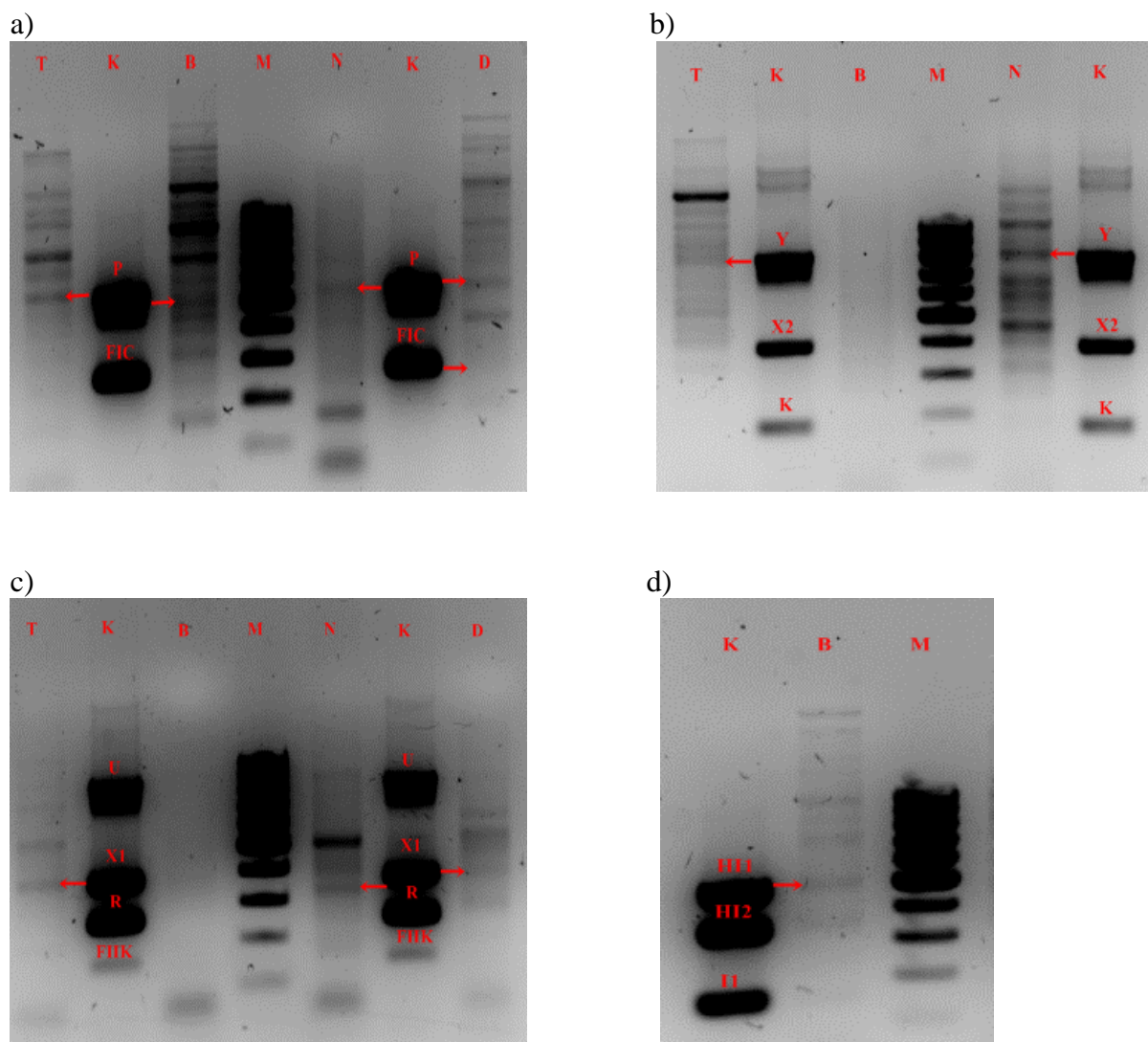
Tabel on koostatud põhinedes PBRT kit'iga kaasnevas protokollis mainitud artiklitele: Carattoli jt., 2005; Carattoli, 2009; Garcia-Fernandez jt., 2009; Villa jt., 2010.

-, ei ole avalikustatud ega leidu kit'i protokollis

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Mikroobikoosluse totaalsest DNAs PBRT kit'iga amplifitseeritud replikonid

Käesolevas töös testiti PBRT meetodika sobilikkust looduskeskkonnas, Läänemere pinnavees, esinevate plasmiidide tuvastamiseks ja klassifitseerimiseks. Antud meetodika järgi erinevate Inc esindajate amplifitseerimine mikroobikooslusest eraldatud totaalsest DNAs osutus ebaefektiivseks, sest tulemuseks saadi palju praimerite mittespetsiifilisest seondumisest tingitud DNA fragmente (Joonis 3). Joonisel 3 on näidatud agarosgeelipildid, kus kontrollile vastav Inc rühm on totaalses DNAs tuvastatav.



Joonis 3 a), b), c) ja d). Inc rühma esindajate tuvastamine mikroobikooslusest eraldatud totaalsest DNAs. T, B, N ja D tähistavad proovivõtukohti. K, erinevatele Inc gruppidele vastavad spetsiifilised kontrolljärjestused; M, 100bp DNA marker

Tugev ebaspetsiifika segas tulemuste interpreteerimist, kuna sageli ei olnud võimalik agarosgeelil täpselt eristada kontrolliga ühel kõrgusel olevaid fragmente. Seega tekkis kahtlus, kas kontrollile vastav identifitseeritud produkt kuulub tõepoolest vastava Inc rühma esindajatele või mitte. Inc rühma plasmiidide olemasolu kindlaksmääramiseks lõigati vastav fragment geelist välja, teostati mitmeid manipulatsioone DNAGA (kirjeldatud eksperimentaalosas) ja sekveneeriti vähemalt 3 kloni. Identifitseeritud Inc rühmad iga proovi kohta koos sekveneeritud kloonide arvuga on esitatud tabelis 3.

Tabel 3. Plasmiidsete kloonide arv analüüsitud proovides

Proov	Inc rühm	Analüüsitud kloonide arv	Plasmiidsete kloonide arv	Inc rühmadesse kuuluvate plasmiidsete kloonide arv
T	Y	32	14	6/ 1 X2
	X1	20	4	0
	P	3	0	0
N	Y	8	5	2/ 2 X2
	X1	6	2	0
	P	13	8	4/ 1 FIC
D	FIC	15	7	0/ 1 P
	X1	10	3	0
	P	26	17	10/ 3 FIC
B	HI1	5	1	1
	P	10	6	2

PBRT kit'iga tuvastati IncP esindajaid kõigist neljast proovivõtukohest, kuna antud plasmiidirühmale vastav DNA fragment oli geelil eristatav. Sekveneeritud kloonide analüüs kinnitas IncP spetsiifiliste järjestuste esinemist kolmes proovis: N, D ja B. Kloonide raamatukogust, mis konstrueeriti proovivõtukohest T eraldatud DNAST, ei saanud IncP plasmiidide esindajaid. Võimalikuks põhjuseks on väike analüüsitud kloonide arv - ainult 3 kloni on sekveneeritud. Seega vajab T proovipunkti kloonide raamatukogu lisaanalüüsi. IncP rühma esindajaid leidis kõige enam tõenäoliselt seetõttu, et Läänemere reostuse tase on väga kõrge: seal leidub aromaatseid ühendeid, nagu naftaleen, fenool ja salitsüalaat. IncP plasmiidid kannavad geene, mis on võimelised neid ühendeid degradeerima. Samas kannavad IncP plasmiidid ka antibiootikumiresistentsust kodeerivaid geene. IncP plasmiidide suurele levikule ja arvukusele annab panuse ka nende lai peremeestering (Dennis, 2005; Leitet jt., 2006).

Proovivõtukohtadest B ja N pärinevatele järjestustele leidis andmebaasis homolooge IncP-1 mitesobivusgruppi kuuluvatest plasmiididest: 100% identsusega järjestused sea sõnnikust

isoleeritud plasmiidist pKS77 ning sõnnikuga väetatud mullast isoleeritud plasmiidist pHH128, mõlemad tagavad resistentsuse sulfoonamiidi suhtes (Heuer jt., 2012). Kõige lähedasemate homoloogide seas on ka teisi IncP-1 resistentsusplasmide, mille peremeestüved on inimese patogeenid, näiteks *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (plasmiid pYT2) (Hernandez jt., 2012), *Escherichia coli* O83:H1 (plasmiid pO83_CORR) (Allen jt., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* metsik tüvi (plasmiid R1033) (Bailey jt., 2011) ja *Escherichia coli* H10407 (plasmiid pEntH10407) (Ochi jt., 2009).

Proovipunktide D ja B isoleeritud järjestustele vastavad andmebaasis 96%-100% identsusega järjestused IncP-1 mittesobivusgruppi kuuluvatest erinevatele antibiootikumidele resistentsust tagavatest plasmiididest. Näiteks plasmiidist pWEC911, mis kannab resistentsust tetratsükliini, β -laktaam-antibiootikumide, kanamütsiini ja anorgaanilise elavhõbeda suhtes, ja plasmiidist pG527, mis kannab resistentsust kodeerivaid gene aminoglükosiidide, kanamütsiini, streptomütsiini, β -laktaam-antibiootikumide ja tetratsükliini suhtes. Samuti IncP-1 α alamgruppi kuuluvad multiresistentsed plasmiidid pSP21 ja pB11, mis tagavad resistentsuse juba eespool mainitud antibiootikumidele (Popowska ja Krawczyk-Balska, 2013).

Läänemeres leidub IncHI1 rühma esindajaid, mida tuvastati B proovipunktist. Nende olemasolu kinnitas ka sekveneerimistulemuste analüüs. Andmebaasis leidub 99% identsusega järjestus plasmiidist pO111_1, mis pärineb patogeenselt enterohemorraagilisest *Escherichia coli* tüvest 11128 (Ogura jt., 2009), ning järjestus plasmiidist pHCM1, mille peremeheks on mitmete ravimite suhtes resistentne *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CT18 (Parkhill jt., 2001). Arvatakse, et plasmiidid, mis kuuluvad IncHI1 mittesobivusgruppi, on olulised antibiootikumide resistentsusgeenide kandjad ja levitajad nii inimese mikroflooras kui ka vee- ja mullakeskkonnas (Phan ja Wain, 2008).

Kit'iga tuvastati ka IncX1 (proovipunktide T, N ja D) rühma esindajaid. Antud kontrollidele vastavad DNA fragmendid olid geelil eristatavad. Sekveneerimistulemuste analüüsil ei tuvastatud IncX1 plasmiidide olemasolu aga ühestki proovipunktist. Vaatamata fragmentide vastavusele antud kontrollile, osutusid kõik analüüsitud kloonid ebaspetsiifikaks. Saadud tulemuse võimalikuks põhjuseks võib olla vastavate kloonide raamatukogude ebapiisav analüüs, kuid ei saa ka välistada, et antud praimerid ei olnud sobivad IncX1 replikoni amplifitseerimiseks vastavatest proovidest.

IncFIC plasmide tuvastati D proovipunktist, kuna antud kontrollile vastas geelil õrn bänd. Sekveneerimistulemusi analüüsides, ei leitud IncFIC plasmiidide järjestusi kloonidest, mis

pärinevad geelil FIC kontrollile vastavast fragmendist, kuid tuvastati P replikonidele vastava kloonide raamatukogu analüüsid. Antud järjestustele leidis andmebaasis 91% identsusega homolooge plasmiididest pAA, F ja P307, mis pärinevad bakterist *Escherichia coli* (Chaudhuri jt., 2010; Saadi jt., 1987). Võimalikuks põhjuseks on amplifitseeritud fragmentide ebapiisav lahutumine üksteisest geelelektroforeesil, kuna antud PBRT kit'is olid FIC ja P replikonide amplifitseerimiseks vajalikud primerid koos ühes *mix*-is (Joonis 1; Joonis 2). Võimalik, et samal põhjusel osutus sekveneerimistulemusi analüüsid proovipunktist D saadud kloon IncP järjestuseks, kuigi ta pärineb FIC replikonidele vastavast kloonide raamatukogust. Andmebaasis leidis sellele järjestusele 100% identsusega homolooge IncP-1 plasmiididest pWEC911 ja pG527 (Popowska ja Krawczyk-Balska, 2013). Ka N proovipunktist isoleeriti järjestus, mis geelipiltide alusel vastas P kontrollile, kuid pärast sekveneerimistulemuste analüüsi selgus, et järjestus kuulub IncFIC plasmiidide hulka. Selle järjestuse viimased 35 nukleotiidi näitavad kõige suuremat sarnasust (91% identsusega) vastava homoloogiga plasmiidist pAA (Chaudhuri jt., 2010).

Läänemeres leidub ka IncY plasmide, mida tuvastati kahest proovipunktist (N ja T) ning ka sekveneerimistulemusi analüüsid leiti IncY rühma esindajatele vastavaid järjestusi. Andmebaasis leidis 100% identsusega *repA* geeni järjestus bakteriofaag P7 genoomist. Bakteriofaag P7 profaag esineb peremeesrakus plasmiidina, mis on määratud IncY perekonda (Briaux jt., 1979; Loboekal jt., 2004). Proovipunktist N isoleeritud järjestusele vastab andmebaasis 100% identsusega ka transformatsiooni hõlbustava vektori TAC-LTR homoloogiline piirkond. Vektor TAC-LTR sisaldab suurt replikatsiooni origini, mis pärineb plasmiidist pRiA4 ning on võimeline replitseeruma stabiilselt *Agrobacterium* tüvedes (Chen jt., 2010).

Tuvastati ka järjestusi, mis geelipildi alusel vastasid Y kontrollile, kuid sekveneerimistulemusi analüüsid selgus, et järjestused kuuluvad IncX2 rühma esindajatele. Sarnaselt eespool kirjeldatule, olid ka sel juhul vastavad replikonid PBRT kit'is amplifitseeritavad ühes PCR segus, mistõttu antud kloonide raamatukogudesse, võisid sattuda mõlemad replikonid. N proovivõtukohest isoleeriti 85%-95% identsusega järjestusi CRIM (Conditional-replication, integration, and modular) plasmiididest. CRIM plasmiidid on vektorid, mis on konstrueeritud IncX2 rühma kuuluva plasmidi R6K baasil ning sisaldavad R6K replikatsiooni ja rakus püsimise eest vastutavat DNA piirkonda (<http://www.scs.illinois.edu/rao/protocol-ecoli-crim.php>). T proovipunktist pärinevatele järjestustele vastab andmebaasis 100% identsusega järjestus IncX2 plasmiidide hulka kuuluvast resistentsusplasmiidist pNGX2-QnrS1, mis pärineb kanadest isoleeritud bakteritüvest *Escherichia coli* Z1 (Johnson jt., 2012).

Saadud tulemused näitavad, et antud PBRT kit on mereveest isoleeritud DNAST replikonide detekteerimiseks ebaefektiivne. Siiski tuvastati mitmeid erinevatesse Inc rühmadesse kuuluvaid plasmide, mis kannavad antibiootikumide suhtes resistentsust kodeerivaid geene. Nende kandjate olemasolu Läänemeres viitab asjaolule, et antibiootikumiresistentsus on muutumas tõsiseks probleemiks antud ökosüsteemis.

2.3.2. PBRT kit'iga amplifitseeritud ebaspetsiifilised järjestused

Kuigi PBRT kit'iga tuvastati mitmeid replikonide rühmi, amplifitseeriti ka palju ebaspetsiifikat, järjestusi, mis kodeerivad hüpoteetilisi või määratud funktsiooniga valke (mitte Rep valke). Selle põhjuseks on praimerite mittespetsiifiline seondumine DNAle. Amplifitseeritud DNA fragmentidele vastasid andmebaasis nii kromosomaalse kui ka plasmiidse päritoluga järjestused. Plasmiididest pärinevad homoloogid on välja toodud põhjalikult allpool.

N proovivõtukohest eraldatud järjestustele vastas andmebaasis veest ning risosfäärist pärinevad plasmiidid homoloogid. Kõige lähedasemad on 93% identsusega järjestus plasmiidist pSfHH103e, mille peremeestüveks on *Sinorhizobium fredii* HH103, mis osaleb liblikõieliste taimede noodulite moodustamises (Weidner jt., 2012) ning 77% identsusega järjestus plasmiidist pPNAP02, mille peremeheks on naftaleeni lagundav bakter *Polaromonas naphthalenivorans* tüvi CJ2 (Yagi jt., 2009).

B proovipunktist isoleeritud järjestustele leidub andmebaasis lähemaid homolooge (sarnasusega 80%-88%) plasmiididest, mis on isoleeritud erinevatest lämmastikku siduvatest α -proteobakteritest. Näiteks risosfääribakter *Azospirillum brasilense* tüvi Sp245 (Wisniewski-Dyé jt., 2011) ning kiire kasvuga sümbiont *Sinorhizobium fredii* tüvi HH103 (Weidner jt., 2012). Proovidele vastavad 66%-83% identsusega järjestused plasmiididest, mis pärinevad bakteritüvedest, millel on degradeerivad omadused: plasmiid pA82, mis on isoleeritud bakteritüvest *Achromobacter xylosoxidans* A8 ning võimaldab peremehel lagundada 2-klorobensoaati ja 2,5-diklorobensoaati (Jencova jt., 2004), ning plasmiid pI2, mille peremeheks on aniliini ja 3-kloroaniliini degradeeriv bakteritüvi *Comamonas testosteroni* I2 (Boon jt., 2000).

D proovipunktist pärit proovidele leidub 68%-86% identsusega homolooge plasmiididest, mille peremeesteks on risosfääri- ja mullabakterid. Näiteks plasmiidist byi_1p, mis pärineb mullabakterist *Burkholderia* sp YI23 (Lim jt., 2012), plasmiidist AZOBR_p1, mis pärineb lämmastikku siduvast risosfääribakteri *Azospirillum brasilense* tüvest Sp245 (Wisniewski-Dyé jt., 2011) ning plasmiidist pSfHH103e, mille peremeestüveks on *Sinorhizobium fredii* HH103

(Weidner jt., 2012).

T proovivõtukoost pärit järjestustele leidub andmebaasis vasteid taimepatogeenidest, mulla- ja risosfäärilbakteritest ja veest isoleeritud bakteritest. Järjestustele vastavad 83%-89% identsusega megaplasmiidid, mis isoleeriti laia peremeesteringiga tavaliselt juuri nakatava taimepatogeeni *Ralstonia solanacearum* tüvedest GMI1000, FQY_4 ja PSI07. *Ralstonia solanacearum* kuulub β -proteobakterite hulka (Salanoubat jt., 2002). Andmebaasis leidub veel 68%-86% identsusega plasmiid pSymB, mis pärineb lämmastikku siduva bakteri *Sinorhizobium meliloti* tüvest 2011 (Wais jt., 2002), bakteritüvest *Sinorhizobium fredii* HH103 (Weidner jt., 2012). 73%-74% identsusega leidub homolooge ka plasmiidist pTM3, mis pärineb mere α -proteobakterist *Tistrella mobilis* KA081020-065 (Xu jt., 2012).

Tulemustest ilmneb, et erinevatest proovivõtukohtadest isoleeriti palju järjestusi, mis olid sarnase iseloomuga. Kõikides proovipunktides leidis risosfääri- ja mügarbakteritest pärinevaid plasmiidseid järjestusi. On tähelepanuväärne, et kahest proovipunktist - N ja B - isoleeritud proovidele, leidis vasteid plasmiidsetest järjestustest, mis pärinevad aromaatsaid ühendeid degradeerivatest bakteritüvedest. Degradateerivate bakterite olemasolu võib viidata Läänemere reostuse kõrgele tasemele.

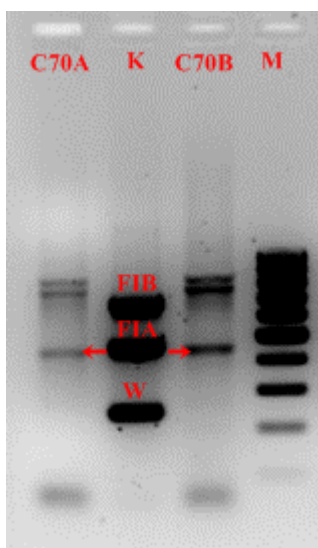
Kuigi ebaspetsiifika analüüs ei anna olulist informatsiooni Läänemeres esinevate Inc rühmade kohta, lisab ta huvitavat informatsiooni Läänemere plasmiidide kohta ning võib osutada kasulikuks selles ökosüsteemis esinevate plasmiidide edaspidises uurimises.

2.3.3. Plasmiidsete tüvede skriinimine PBRT kit'iga

PBRT kit on välja töötatud eelkõige kliinilistest proovidest isoleeritud *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvate bakteritüvede skriinimiseks eesmärgiga identifitseerida plasmiidide, mis kannavad ja levitavad antibiootikumide suhtes resistentsust kodeerivaid geene. Resistentsusplasmiidid on sageli laia peremeesteringiga konjugatiivsed või mobiliseeritavad geneetilised elemendid. Resistentsusplasmiidide selgroog võib olla kandjaks ka geenidele, mis kodeerivad teistele bakteritele kasulikke tunnuseid (Miljkovic-Selimovic jt., 2007). Arvestades neid aspekte, valiti välja 4 kataboolsete omadustega bakteritüve (C70a, C70b, 2D47 ja C14), mis kannavad plasmiidide. Plasmiidide olemasolu kinnitamiseks lõigati huvipakkuv fragment geelist välja, DNAGA viidi läbi manipulatsioonid ning sekveneeriti vähemalt 5 kloonid.

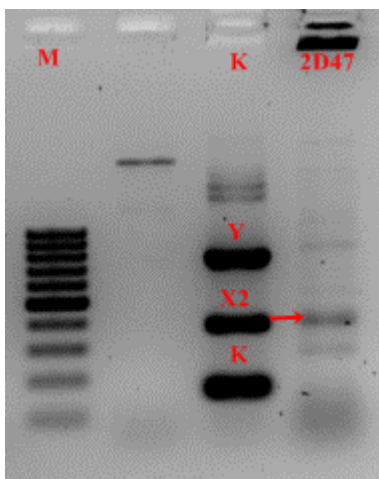
Tüvedest C70a ja C70b isoleeritud DNAd amplifitseeriti praimerite seguga, mis koosnes FIB, FIA ja W spetsiifilistest järjestustest. Saadi produkt, mis oli geelelektroforeesil eristatav selgelt

nähtava bändina ning suuruse poolest vastas FIA kontrollile (Joonis 4). Sekvencerimise tulemusi analüüsid selgus, et antud järjestused ei kuulu FIA plasmiidide genoomsete järjestuste hulka. 23 aluspaari suurusele fragmendile amplifitseeritud järjestuse lõpust vastavad andmebaasis 100% identsusega fragmendid *repA* geenist, mis on iseloomulik FIB replikonidele. Ülejäänud järjestusele ei leitud andmebaasis nii DNA kui ka valgu tasemel ühtegi homoloogi. Carattoli ja kolleegide poolt konstrueeritud IncFIA spetsiifilised praimerid amplifitseerivad vastavate plasmiidide *oriV* piirkonna, IncFIB praimerid aga RepA valku kodeeriva geeni (Carattoli jt., 2005). Võib oletada, et *Pseudomonas putida* tüvedest C70A ja C70B amplifitseeritud järjestus võib kuuluda ühele plasmiididest, mis omab FIB replikoni.



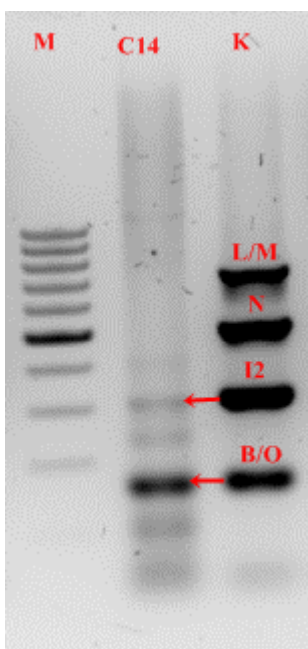
Joonis 4. Inc rühma esindajate tuvastamine bakteritüvedest C70a ja C70b isoleeritud DNAST. K, erinevatele Inc rühmadele vastavad spetsiifilised kontrolljärjestused; M, 100bp DNA marker

IncY, IncX2 ja IncK spetsiifiliste praimeritega amplifitseeriti bakteritüvest 2D47 eraldatud DNAd. Produkt vastas suuruse poolest IncX2 plasmiididele (Joonis 5). Sekvencerimistulemuste analüüs aga näitas, et antud järjestus ei pärine IncX2 perekonna plasmiididest. Suuremale osale amplifitseeritud fragmendi järjestustest vastab andmebaasis 97%-99% identsusega hüpoteetilist valku kodeeriva geeni homoloog *Pseudomonas stutzeri* erinevate tüvede genoomidest. 25 nukleotiidist koosnevale fragmendile järjestuse lõpus vastab andmebaasis 100% identsusega järjestus RepA valku kodeerivast geenist, mis on omane hoopis IncY plasmiididele. Kuigi me ei saa kindlalt väita, kas amplifitseeritud järjestus kuulub bakteritüve *Pseudomonas stutzeri* 2D47 plasmidi või kromosoomi ning antud plasmidi Inc grupp jääb ebaselgeks, on tehtud analüüsist siiski võimalik järeldada, et tõenäoliselt *Pseudomonas stutzeri* tüvi 2D47 puutus kokku IncY plasmiidide esindajaga.



Joonis 5. Inc rühma esindajate tuvastamine bakteritüvest 2D47 isoleeritud DNAST. K, erinevatele Inc rühmadele vastavad spetsiifilised kontrolljärjestused; M, 100bp DNA marker

Bakteritüvest C14 isoleeritud DNAd amplifitseeriti praimerite seguga, kuhu kuulusid L/M, N, I2 ja B/O spetsiifilised järjestused. Saadi produkt, mis vastas suuruse poolest I2 plasmiididele (Joonis 6). Pärast sekveneerimist läbi viidud analüüs näitas, et antud järjestus ei kuulu I2 plasmiidide hulka. Suuremale osale analüüsitud järjestustele vastab andmebaasis 100% identsusega *Pseudomonas* sp tüvede GM50 ja GM102 kromosomaalne järjestus atsetüül-CoA dehüdrogenaasi kodeerivast geenist.



Joonis 6. Inc rühma esindajate tuvastamine bakteritüvedest C14 isoleeritud DNAST. K, erinevatele Inc rühmadele vastavad spetsiifilised kontrolljärjestused; M, 100bp DNA marker

Erinevate Inc esindajate amplifitseerimine tüvedest eraldatud DNAs oli efektiivsem kui totaalsest DNAs: agarosgeelil oli näha vähem ebaspetsiifikat. Siiski näitasid sekveneerimise tulemused ebaspetsiifika esinemist ning sekveneeritud kloonide analüüsimistulemuste ja PBRT kit'i tulemuste vahelist mittevastavust. Seega ei ole antud kit sobilik Läänemerest isoleeritud plasmiidsete tüvede kiireks skriinimiseks plasmiidide klassifitseerimise eesmärgil.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks on tuvastada Läänemere pinnavees esinevaid plasmide, kasutades PBRT (*PCR based replicon typing*) kit'i (Diatheva). PBRT süsteem koosneb multipleks PCR reaktsioonisegudest, mis võimaldavad amplifitseerida kahtekümmet viite erinevat replikoni. Need replikonid esindavad peamisi Inc rühmi, mis on identifitseeritud *Enterobacteriaceae* isolaatide resistentsusplasmidide alusel.

Läänemerest kogutud pinnaveeproovidest eraldatud totaalse DNA analüüs näitas, et identifitseeritud replikonide hulgas leidub kõige enam IncP plasmide. IncP plasmidide rohkus on tõenäoliselt tingitud Läänemere reostuse kõrge tasemest. Paljudes uurimistöodes, mis on keskendunud keskkonna orgaanilistele reostajatele või erinevate antibiootikumiresistentsusgeeni levikule, on näidatud IncP rühma kuuluvate plasmidide olemasolu. Lisaks IncP plasmididele, on Läänemeres esindatud ka IncY, IncHI1, IncX2 ja IncFIC rühmad. Nimetatud replikonide tuvastamine veeproovidest viitab vastavate Inc rühmade võimalikule tähtsusele antibiootikumiresistentsuse levikus Läänemeres.

Ka nelja Läänemerest isoleeritud plasmide kandva bakteritüve skriinimine andis tagasihoidlikke tulemusi: tuvastati ainult FIB replikonile spetsiifilise järjestuse olemasolu tüvedest *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70a ja *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70b, mis viitab veel tundmatu või vähekirjeldatud plasmidigruppide olemasolule Läänemeres.

SUMMARY

Identification of plasmids carrying antibiotic resistance genes from the Baltic Sea

The purpose of this study was to assess the plasmid community of the Baltic Sea surface water using PBRT (*PCR based replicon typing*) kit (Diatheva). The multiplex PCR assays enable to amplify 25 different replicons, which represent main plasmid Inc families identified on resistance plasmids of *Enterobacteriaceae* isolates.

Analysis of total community DNA extracted from the Baltic Sea water samples revealed the dominance of IncP plasmids among identified replicons. High abundance of these plasmids in the Baltic Sea can be attributed to the high level of pollution of this ecosystem. Presence of IncP family members have been shown in many studies focused on biodegradation of organic environmental pollutants as well as spread of different antibiotic resistance genes. Along with IncP plasmids, representatives of IncY, IncHI1, IncX2, IncFIC groups have been detected. Detection of particular replicons in water samples refers to probable importance of these incompatibility groups for the spread of antibiotic resistance in the Baltic Sea.

Screening of four plasmid(s)-bearing bacterial strains isolated from Baltic Sea water yielded modest results: only the presence of FIB replicon specific sequence has been detected in strains *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70a and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70b, referring to existence of yet unknown or poorly characterised plasmid groups in the Baltic Sea.

KIRJANDUSE LOETELU

- Alanis, A. J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch. Med. Res.* 36(6): 697-705.
- Allen, C. A., Niesel, D. W., Torres, A. G. (2008). The effects of low-shear stress on Adherent-invasive *Escherichia coli*. *Environ. Microbiol.* 10(6): 1512-1525.
- Bahl, M. I., Burmølle, M., Meisner, A., Hestbjerg Hansen, L., Sørensen, S. J. (2009). All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel e subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid.* 62: 134–139.
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham S., Hall, R. M. (2011). Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(4): 745-751.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer on antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153: 347-357.
- Boon, N., Goris, J., De Vos, P., Verstraete, W., Top, E. M. (2000). Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteroni* Strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7): 2906-2913.
- Briaux, S., Gerbaud, G., Jaffé-Brachet, A. (1979) Studies of a Plasmid Coding for Tetracycline Resistance and Hydrogen Sulfide Production Incompatible with the Prophage P1. *Molec. Gen. Genet.* 170: 319-325.
- Carattoli, A. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods.* 63: 219-228.
- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(6): 2227-2238.

Chaudhuri, R. R., Sebaihia, M., Hobman, J. L., Webber, M. A., Leyton, D. L., Goldberg, M. D., Cunningham, A. F., Scott-Tucker, A., Ferguson, P. R., Thomas, C. M., Frankel, G., Tang, C. M., Dudley, E. G., Roberts, I. S., Rasko, D. A., Pallen, M. J., Parkhill, J., Nataro, J. P., Thomson, N. R., Henderson, I. R. (2010). Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PloS one*. 5(1):e8801

Chen, Q. J., Xie, M., Ma, X. X., Dong, L., Chen, J., Wang, X. C. (2010). MISSA is a highly efficient in vivo DNA assembly method for plant multiple-gene transformation. *Plant Physiol*. 153(1): 41-51.

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 52(3): 375-395.

Dantas, G., Sommer, M. O., Oluwasegun, R. D., Church, G. M. (2008). Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 320(5872): 100–103.

Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2):434-464.

Dennis, J. J. (2005). The evolution of IncP catabolic plasmids. *Curr Opin Biotechnol.* 16(3): 291-298.

Eikmeyer F., Hadiati, A., Szczepanowski, R., Wibberg, D., Schneiker-Bekel, S., Rogers, L. M., Brown, C. J., Top, E. M., Pühler, A., Schlüter, A. (2012). The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid.* 68(1): 13-24.

Fernandez-Lopez, R., Garcillan-Barcia, M. P., Revilla C., Lazaro, M., Vielva, L., de la Cruz, F. (2006). Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 942–966.

Froehlich, B. J., Scott, J. R. (1988). A single amino acid difference between Rep proteins of P1 and P7 affects plasmid copy number. *Plasmid*. 19: 121-133

García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D., Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(2): 274-81

Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., De La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 657-687.

Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A., de la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 936-956.

Greated, A., Titok, M., Krasowiak, R., Fairclough, R. B., Thomas, C. M. (2000). The replication and stable-inheritance functions of IncP-9 plasmid pM3. *Microbiology*. 146(9): 2249-2258.

Gunton, J. E., Ussher, J. E. R., Rooker, M. M., Wetsch, N. M., Alonso, G., Taylor, D. E. (2008). Entry exclusion in the IncHI1 plasmid R27 is mediated by EexA and EexB. *Plasmid*. 59: 86-101.

Hernandez, S. M., Keel, K., Sanchez, S., Trees, E., Gerner-Smidt, P., Adams, J. K., Cheng, Y., Ray, A. 3rd, Martin, G., Presotto, A., Ruder, M. G., Brown, J., Blehert, D. S., Cottrell, W., Maurer, J. J. (2012). Epidemiology of a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain associated with a songbird outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(20): 7290-7298.

Heuer, H., Binh, C. T., Jechalke, S., Kopmann, C., Zimmerling, U., Krögerrecklenfort, E., Ledger, T., González, B., Top, E., Smalla, K. (2012). IncP-1 ϵ Plasmids are Important Vectors of Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Systems: Diversification Driven by Class 1 Integron Gene Cassettes. *Front. Microbiol.* 3: 2.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-28.

Jacoby, G. A., Sutton, L., Knobel, L., Mammen, P. (1983). Properties of IncP-2 Plasmids of *Pseudomonas* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 168-175. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24(2): 168-175.

Jencova, V., Strnad, H., Chodora, Z., Ulbrich, P., Hickey, W. J., Paces, V. (2004). Chlorocatechol catabolic enzymes from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 54(2-3): 175-181.

Johnson, T. J., Bielak, E. M., Fortini, D., Hestbjerg Hansen, L., Hasman, H., Debroy, C., Nolan, L. K., Carattoli, A. (2012). Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid.* 68: 43-50.

Johnson, T. J., Lang, K. S. (2012). IncA/C plasmids An emerging threat to human and animal health? *Mobile Genetic Elements* 2:1, 55–58; G 2012 Landes Bioscience. *Mob. Genet. Elements.* 2(1): 55-58.

Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J., Heinaru, A. (2011). Occurrence of Plasmids in the Aromatic Degrading Bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes.* 2(4): 853-868.

Krasowiak, R., Smalla, K., Sokolov, S., Kosheleva, I., Sevastyanovich, Y., Titok, M., Thomas, C. M. PCR primers for detection and characterisation of IncP-9 plasmids. (2002). *FEMS Microbiology Ecology* 42 (2002) 217-225. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42(2): 217-225.

Leitet C., Riemann L., Hagström Å. (2006). Plasmids and prophages in Baltic Sea bacterioplankton isolates. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 86: 567-575.

Levy, S. B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: S122 - S129.

Lim, J. S., Choi, B. S., Choi, A. Y., Kim, K. D., Kim, D. I., Choi, I. Y., Ka, J. O. (2012). Complete Genome Sequence of the Fenitrothion-Degrading *Burkholderia* sp. Strain YI23. *J. Bacteriol.* 194(4): 896.

- Lobockal, M. B., Rose, D. J., Plunkett, G., Rusin, M., Samojedny, A., Lehnerr, H., Yarmolinsky, M. B., Blattner, F. R. (2004). Genome of Bacteriophage P1. *J. Bacteriol.* 186(21): 7032-7068.
- Ludtke, D. N., Austin, S. J. The plasmid-maintenance functions of the P7 prophage. (1987). *Plasmid.* 18(1): 93-98.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157: 2893–2902.
- Miljkovic-Selimovic, B., Babic, T., Kocic, B., Stojanovic, P., Ristic, L. and Dinic, M. (2007). Bacterial plasmids. *Acta Medica Medianae* 46(4): 61-65.
- Molina, L., Duque, E., Gómez, M. J., Krell T., Lacal, J., García-Puente, A., García V., Matilla, M. A., Ramos, J.-L., Segura, A. (2011). The pGRT1 plasmid of *Pseudomonas putida* DOT-T1E encodes functions relevant for survival under harsh conditions in the environment. *Environ. Microbiol.* 13(8): 2315–2327.
- Norman, A., Hestbjerg Hansen, L., She, Q., Sørensen, S. J. (2008). Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid.* 60: 59-74.
- Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M., Tsuji, T. (2009). Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Res.* 16(5): 299–309.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M., Hayashi, T. (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106(42): 17939-17944.
- Oliveira, C. S., Lázaro, B., Azevedo, J. S. N, Henriques, I., Almeida, A., Correia, A. (2012). New molecular variants of epsilon and beta IncP-1 plasmids are present in estuarine waters. *Plasmid.* 67: 252–258.

Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connor, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T. T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T. S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413: 848–852.

Phan, M. D., Wain, J. (2008). IncHI plasmids, a dynamic link between resistance and pathogenicity. *J. Infect. Dev. Ctries*. 2(4): 272-278.

Popowska, M., Krawczyk-Balska, A. (2013). Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Front. Microbiol*. 4: 44.

Rheinheimer, G. (1998). Pollution in the Baltic Sea. *Naturwissenschaften*. 85(7): 318-329.

Rychlik, I., Gregorova, D., Hradecka, H. (2006). Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol*. 112(1): 1–10.

Saadi, S., Maas, W. K., Hill, D. F., Bergquist, P. L. (1987). Nucleotide sequence analysis of RepFIC, a basic replicon present in IncFI plasmids P307 and F, and its relation to the RepA replicon of IncFII plasmids. *J. Bacteriol*. 169(5): 1836-1846.

Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thébault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., Boucher, C. A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. 415: 497-502.

Sherley, M., Gordon, D. M., Collignon, P. J. (2004) Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology*. 150(5): 1539-1546.

Shintani, M., Takahasi, Y., Yamane, H., Nojiri, H. (2010). The Behavior and Significance of Degradative Plasmids Belonging to Inc. Groups in *Pseudomonas* within Natural Environments and Microcosms. *Microbes. Environ.* 25(4): 253-265.

Shintani, M., Tokumaru, H., Takahashi, Y., Miyakoshi, M., Yamane, H., Nishida, H., Nojiri, H. (2011). Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria. *Plasmid.* 66: 85–92.

Søren J. Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N. and Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9): 700-710.

Sota, M., Yano, H., Ono, A., Miyazaki, R., Ishii, H., Genka, H., Tpo, E.M., Tsuda, M. (2006) Genomic and functional Analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid Nah7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *J. Microbiol.* 188(11): 4057-4067.

Summers, D. K. 1996. *The Biology of Plasmids*, p. 33- 34. Blackwell Science Ltd.

Suzuki, S., Ogo, M., Miller, T. W., Shimizu, A., Takada, H., Maria Auxilia T. Siringan, M. A. T. (2013). Who possesses drug resistance genes in the aquatic environment?: sulfamethoxazole (SMX) resistance genes among the bacterial community in water environment of Metro-Manila, Philippines. *Front. Microbiol.* 4: 102.

Tardif, G., Grant, R. B. (1983). Transfer of plasmids from *Escherichia coli* to *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mutant with enhanced recipient ability for enterobacterial plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24(2): 201–208.

Thomas, C. M. and Haines, A. S. (2004). *Plasmids of the Genus Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 197-231.

Villa, L., Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(12): 2518-2529.

Wais, R. J., Wells, D. H., Long, S. R. (2002). Analysis of differences between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 strains using the host calcium spiking response. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15(12): 1245-1252.

Weidner, S., Becker, A., Bonilla, I., Jaenicke, S., Lloret, J., Margaret, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., Schneiker-Bekel, S., Szczepanowski, R., Vinardell, J. M., Zehner, S., Göttfert, M. (2012). Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. *J. Bacteriol.* 194(6): 1617-1618.

Wibberg, D., Szczepanowski, R., Eikmeyer, F., Pühler, A., Schlüter, A. (2013). The IncF plasmid pRSB225 isolated from a municipal wastewater treatment plant's on-site preflooder combining antibiotic resistance and putative virulence functions is highly related to virulence plasmids identified in pathogenic *E. coli* isolates. *Plasmid.* 69: 127–137.

Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnikov, L. O., Wuichet, K., Hurst, G. B., McDonald, W. H., Robertson, J. S., Barbe, V., Calteau, A., Rouy, Z., Mangenot, S., Prigent-Combaret, C., Normand, P., Boyer, M., Siguier, P., Dessaux, Y., Elmerich, C., Condemine, G., Krishnen, G., Kennedy, I., Paterson, A. H., González, V., Mavingui, P., Zhulin, I. B. (2011). *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. *PLoS Genet.* 7(12): e1002430.

Xu, Y., Kersten, R. D., Nam, S. J., Lu, L., Al-Suwailem, A. M., Zheng, H., Fenical, W., Dorrestein, P. C., Moore, B. S., Qian, P. Y. (2012). Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents. *J. Am. Chem. Soc.* 134(20): 8625-8632.

Yagi, J. M., Sims, D., Brettin, T., Bruce, D., Madsen, E. L. (2009). The genome of *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2, isolated from coal tar-contaminated sediment, reveals physiological and metabolic versatility and evolution through extensive horizontal gene transfer. *Environ. Microbiol.* 11(9): 2253-2270.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

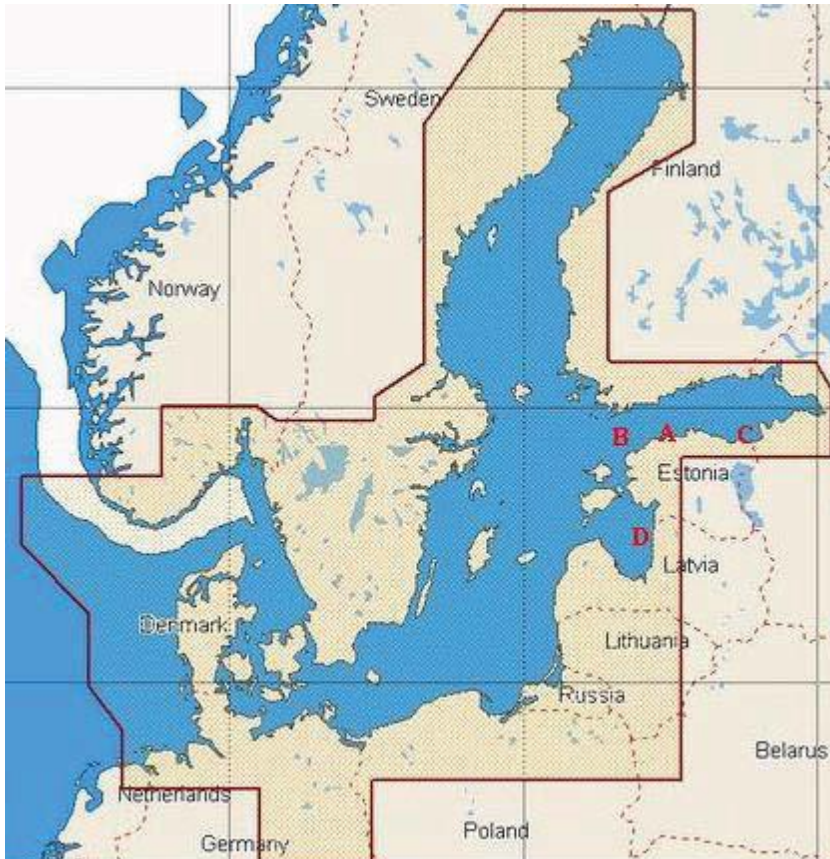
<http://www.scs.illinois.edu/rao/protocol-ecoli-crim.php>

<http://seamaps.ee/blog/kaardid>

LISAD

LISA 1

Kaardil on toodud proovivõtukohtade (A, B, C, D) geograafilised asukohad.



Kaart pärineb internetileheküljelt <http://seamaps.ee/blog/kaardid>. Kaarti on modifitseeritud.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Maria Vares
(sünnikuupäev: 23.05.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Antibiootikumidele resistentsust kodeerivaid geene kandvate plasmiidide tuvastamine Läänemerest“, mille juhendaja on Msc Jekaterina Jutkina,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013