

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Žana LOVŠIN

**VPLIV ELEKTROPORACIJE NA VNOS  
ANTIBIOTIKOV IN IZTEKANJE DNA PRI  
BAKTERIJAH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2024

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Žana LOVŠIN

**VPLIV ELEKTROPORACIJE NA VNOS ANTIBIOTIKOV IN  
IZTEKANJE DNA PRI BAKTERIJAH**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF BACTERIAL ELECTROPORATION ON  
ANTIBIOTIC UPTAKE AND DNA RELEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2024

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 6. 7. 2021 je bilo potrjeno, da kandidat/ka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje Biologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Tadej Kotnik in za somentorico izr. prof. dr. Anja Klančnik.

Doktorska disertacija je bila opravljena v Laboratoriju za biokibernetiko, na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani

Mentor: prof. dr. Tadej KOTNIK  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Oddelek za biomedicinsko tehniko

Somentorica: izr. prof. dr. Anja KLANČNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja AVGUŠTIN AMBROŽIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Aleš LAPANJE  
Institut Jožef Stefan, Odsek Znanosti o okolju

Član: izr. prof. dr. Jure DERGANC  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biofiziko

Žana Lovšin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 602.621:577.18(043.3)
KG	Elektroporacija, antibiotiki, sinergija, <i>Escherichia coli</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , inaktivacija bakterij, dinamika rasti, iztekanje DNA, fragmentacija DNA
AV	LOVŠIN, Žana, mag. mol. funkc. biol.
SA	KOTNIK, Tadej (mentor), KLANČNIK, Anja (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje biologija
LI	2024
IN	VPLIV ELEKTROPORACIJE NA VNOS ANTIBIOTIKOV IN IZTEKANJE DNA PRI BAKTERIJAH
TD	Doktorska disertacija (Doktorski študij – 3. stopnja)
OP	XII, 87 str., 5 pregl., 30 sl., 9 pril., 118 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kombiniranje elektroporacije s protimikrobnimi snovmi omogoči, da dosežemo višjo stopnjo inaktivacije bakterij, kot če bi uporabili le eno metodo. Naš namen je bil preveriti, kako na potenciacijo inaktivacije bakterij s takšnim kombiniranim pristopom vpliva način delovanja antibiotika, ter kakšen vpliv ima sestava celične stene grampozitivnih in gramnegativnih bakterij. Za boljše temeljno razumevanje te potenciacije smo vzpostavili bolj sistematičen pristop, ki nam je omogočil ločitev vplivov posameznih parametrov. Elektroporacija je najbolj povečala učinkovitost antibiotikov, ki potrebujejo transport preko celičnih ovojnici, da dosežejo svojo tarčo. Pri bakterijah <i>Escherichia coli</i> je bil to ampicilin, ki mora preiti le preko zunanje membrane, pri bakterijah <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> pa tetraciklin, ki mora preiti celotno celično steno. V manjši meri potenciacijo z elektroporacijo dosežemo tudi za antibiotike, ki ne potrebujejo transporta preko celičnih ovojnici, torej so poleg povečanega transporta antibiotika pomembne tudi poškodbe membrane in iztekanje celične vsebine. Preverili smo tudi vpliv električnih pulzov na strukturo plazmidne in genomske DNA. Izpostavitev plazmidne DNA električnim pulzom je povzročila predvsem odvitje iz dodatno zvitega kovalentno zaprtega kroga v obliko odprtega kroga, delež teh sprememb je bil odvisen od dovedene energije. Izpostavitev genomske DNA električnim pulzom pa je vodila v njeno fragmentacijo, vendar delež teh sprememb ni bil odvisen od parametrov elektroporacije ali dovedene energije.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd  
DC UDC 602.621:577.18(043.3)  
CX Electroporation, antibiotics, synergy, *Escherichia coli*, *Lactiplantibacillus plantarum*, bacterial inactivation, growth dynamic, DNA leakage, DNA fragmentation  
AU LOVŠIN, Žana  
AA KOTNIK, Tadej (supervisor), KLANČNIK, Anja (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field Biology  
PY 2024  
TI THE EFFECT OF BACTERIAL ELECTROPORATION ON ANTIBIOTIC UPTAKE AND DNA RELEASE  
DT Doctoral dissertation (Doctoral Study Programmes)  
NO XII, 87 p., 5 tab., 30 fig., 9 ann., 118 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Combining electroporation with antimicrobials allows to achieve higher bacterial inactivation than if only one method is used. Our purpose was to determine the effect of antibiotic's mode of action on its potentiation by electroporation and the effect of gram-positive and gram-negative bacteria cell wall structure. To gain an improved understanding of the mechanisms underlying this potentiation, we established a more systematic approach, which enabled us to separate the influence of individual parameters. Highest potentiation by electroporation was achieved for antibiotics that require transport across the cell wall envelopes to reach their target. For *Escherichia coli* bacteria, this was ampicillin, which only has to pass through the outer membrane, and for *Lactiplantibacillus plantarum* bacteria, this was tetracycline, which has to pass across the entire cell wall. To a lesser extent, potentiation by electroporation was also achieved for antibiotics that do not require transport across the cell envelopes, which means that in addition to increased antibiotic transport, membrane damage and leakage of cell contents are also important. We also determined the influence of electric pulses on the structure of plasmid and genomic DNA. Exposing the plasmid DNA to electric pulses mainly caused unwinding from an additionally coiled covalently closed circle to an open circle shape, the proportion of these changes depended on the delivered energy. Exposing the genomic DNA to electric pulses led to its fragmentation, however, the proportion of these changes did not depend on the electroporation parameters or the delivered energy.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN	3
1.2 HIPOTEZE	4
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>5</b>
2.1 ELEKTROPORACIJA	5
2.2 INAKTIVACIJA BAKTERIJ Z ELEKTROPORACIJO	6
2.3 VPLIV PARAMETROV NA UČINKOVITOST ELEKTROPORACIJE	7
<b>2.3.1 Lastnosti celic</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2 Parametri elektroporacije</b>	<b>9</b>
<b>2.3.3 Značilnosti medija</b>	<b>10</b>
2.4 ELEKTROPORACIJA V KOMBINACIJI S PROTIMIKROBNIMI SNOVMI	11
2.5 ELEKTROPORACIJA V KOMBINACIJI S KLINIČNIMI ANTIBIOTIKI	12
2.6 UPORABA ELEKTROPORACIJE ZA INAKTIVACIJO MIKROORGANIZMOV	17
2.7 ELEKTROPORACIJA IN IZTEKANJE CELIČNE VSEBINE	18
2.8 ELEKTROPORACIJA IN POŠKODBE DNA	20
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIAL	22
<b>3.1.1 Bakterijski izolati</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2 Gojišča</b>	<b>22</b>
3.1.2.1 Priprava trdnih gojišč	22
3.1.2.2 Priprava tekočih gojišč	22
<b>3.1.3 Pufri</b>	<b>23</b>
3.2 METODE	23
<b>3.2.1 Gojenje bakterij</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije</b>	<b>23</b>
3.2.2.1 Določanje minimalnih inhibitornih koncentracij za bakterije <i>E. coli</i>	24
3.2.2.2 Določanje minimalnih inhibitornih koncentracij za bakterije <i>L. plantarum</i>	24

<b>3.2.3 Priprava vzorca</b>	<b>24</b>
3.2.3.1 Priprava vzorcev z različnimi koncentracijami antibiotika	25
<b>3.2.4 Tretiranje s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov</b>	<b>25</b>
3.2.4.1 Uporaba elektroporacije in antibiotikov pri bakterijah <i>E. coli</i>	26
3.2.4.2 Uporaba elektroporacije in antibiotikov pri bakterijah <i>L. plantarum</i>	26
<b>3.2.5 Določanje stopnje inaktivacije bakterij</b>	<b>26</b>
<b>3.2.6 Določanje rastne dinamike bakterij <i>L. plantarum</i> po tretiranju</b>	<b>26</b>
<b>3.2.7 Določanje iztekanja genomske dsDNA</b>	<b>28</b>
3.2.7.1 Elektroporacija	28
3.2.7.2 Izolacija genomske DNA po elektroporaciji	29
3.2.7.3 Kvantifikacija genomske dsDNA	29
3.2.7.4 Določanje prisotnosti DNA v supernatantu in peletu	29
<b>3.2.8 Analiza fragmentacije DNA po izpostavitvi električnim pulzom</b>	<b>29</b>
3.2.8.1 Izpostavitev izolirane genomske DNA električnim pulzom	29
3.2.8.2 Izpostavitev izolirane plazmidne DNA električnim pulzom	29
3.2.8.3 Analiza fragmentacije DNA	30
<b>3.2.9 Statistična analiza</b>	<b>30</b>
3.2.9.1 Statistična analiza stopnje inaktivacije	30
3.2.9.2 Statistična analiza rastnih krivulj bakterij <i>L. plantarum</i>	31
3.2.9.2 Statistična analiza fragmentiranosti DNA	31
<b>4 REZULTATI</b>	<b>32</b>
<b>4.1 INAKTIVACIJA BAKTERIJ</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1 Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotikov</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Inaktivacija z antibiotikom</b>	<b>32</b>
4.1.2.1 Inaktivacija bakterij <i>E. coli</i> z antibiotiki	33
4.1.2.2 Inaktivacija bakterij <i>L. plantarum</i> z antibiotikoma	34
4.1.2.3 Primerjava inaktivacije z antibiotikom med bakterijami <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i>	35
<b>4.1.3 Inaktivacija z elektroporacijo</b>	<b>36</b>
4.1.3.1 Primerjava inaktivacije z elektroporacijo med bakterijami <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i>	37
<b>4.1.4 Inaktivacija s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov</b>	<b>38</b>
4.1.4.1 Inaktivacija bakterij <i>E. coli</i> s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov	38
4.1.4.2 Inaktivacija bakterij <i>L. plantarum</i> s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov	40
4.1.4.3 Primerjava inaktivacije s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov med bakterijami <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i>	41

<b>4.1.5 Kinetika rasti bakterij <i>L. plantarum</i></b>	<b>43</b>
4.1.5.1 Vpliv elektroporacije na kinetiko rasti bakterij <i>L. plantarum</i>	43
4.1.5.2 Vpliv kombinacije elektroporacije in antibiotika na kinetiko rasti pri sobni temperaturi	44
4.1.5.3 Vpliv kombinacije elektroporacije in antibiotika na kinetiko rasti pri 37 °C	47
4.2 IZTEKANJE IN FRAGMENTACIJA DNA	49
<b>4.2.1 Iztekanje DNA po elektroporaciji</b>	<b>49</b>
<b>4.2.2 Vpliv električnih pulzov na fragmentacijo izolirane DNA</b>	<b>51</b>
4.2.2.1 Vpliv električnih pulzov na fragmentacijo izolirane pDNA	52
4.2.2.2 Vpliv električnih pulzov na fragmentacijo izolirane gDNA	55
<b>5 RAZPRAVA</b>	<b>58</b>
5.1 ELEKTROPORACIJA RAZLIČNO POTENCIRA UČINKOVITOST ANTIBIOTIKOV GLEDE NA NJIHOV MEHANIZEM DELOVANJA	58
5.2 POTENCIACIJA UČINKA ANTIBIOTIKA Z ELEKTROPORACIJO SE RAZLIKUJE PRI G- BAKTERIJAH <i>E. coli</i> IN G+ BAKTERIJAH <i>L. plantarum</i>	63
5.3 ELEKTROPORACIJA TER KOMBINACIJA ELEKTROPORACIJE IN ANTIBIOTIKA VPLIVATA NA DINAMIKO RASTI BAKTERIJ <i>L. plantarum</i>	65
5.4 ELEKTROPORACIJA Z 1×1 ms PULZOM NE POVZROČI IZTEKANJA gDNA V SUPERNATANT	66
5.5 ELEKTRIČNI PULZI POVZROČIJO STRUKTURNE SPREMEMBE IN FRAGMENTACIJO DNA	66
<b>6 SKLEPI</b>	<b>68</b>
6.1 HIPOTEZE	69
6.2 PRISPEVKI K ZNANOSTI	69
<b>7 POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>71</b>
7.1 POVZETEK	71
7.2 SUMMARY	73
<b>8 VIRI</b>	<b>76</b>
PRILOGE	
ZAHVALA	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled literature o kombinirani uporabi elektroporacije in antibiotikov za inaktivacijo bakterij.	14
Preglednica 2: Pregled literature o kombinirani uporabi elektroporacije in antibiotikov za spremembo občutljivosti bakterij za antibiotike.	16
Preglednica 3: Minimalne inhibitorne koncentracije ampicilina, tetraciklina in ciprofloxacina, določene za bakterije <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i> .	32
Preglednica 4: Koncentracije antibiotikov, ki smo jih uporabili pri poskusih.	32
Preglednica 5: Testirani parametri elektroporacije in dovedena energija	52

## KAZALO SLIK

Slika 1: Dovedene napetosti in tok	25
Slika 2: Kategorije rastnih krivulj in parametri, ki smo jih uporabili pri analizah.	28
Slika 3: Inaktivacija bakterij <i>E. coli</i> s tremi različnimi antibiotiki v štirih različnih koncentracijah in pri štirih časih inkubacije pri sobni temperaturi.	33
Slika 4: Inaktivacija bakterij <i>L. plantarum</i> z dvema različnima antibiotikoma v štirih različnih koncentracijah in pri dveh časih inkubacije pri sobni temperaturi.	34
Slika 5: Primerjava inaktivacije med bakterijami <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i> z ampicilinom ali tetraciklinom po 1-h ali 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi.	35
Slika 6: Inaktivacija bakterij <i>E. coli</i> (N=9) in <i>L. plantarum</i> (N=6) z elektroporacijo.	36
Slika 7: Primerjava inaktivacije bakterij <i>E. coli</i> (N=9) in <i>L. plantarum</i> (N=6) z elektroporacijo po 1-h in 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi.	37
Slika 8: Inaktivacija bakterij <i>E. coli</i> s kombinacijo elektroporacije in antibiotika pri različnih jakostih električnega polja, koncentracijah antibiotika in časih inkubacije pri sobni temperaturi.	38
Slika 9: Inaktivacija bakterij <i>L. plantarum</i> s kombinacijo elektroporacije in antibiotika pri različnih jakostih električnega polja, koncentracijah antibiotika in časih inkubacije pri sobni temperaturi.	40
Slika 10: Sinergistični učinek kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na inaktivacijo bakterij <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i> pri 1-h inkubaciji pri sobni temperaturi.	41
Slika 11: Sinergistični učinek kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na inaktivacijo bakterij <i>E. coli</i> in <i>L. plantarum</i> pri 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi.	42
Slika 12: Rastna dinamika bakterij <i>L. plantarum</i> po elektroporaciji	44
Slika 13: Rastne krivulje bakterij <i>L. plantarum</i> pri inkubaciji pri sobni temperaturi	46
Slika 14: Rastne krivulje bakterij <i>L. plantarum</i> pri inkubaciji pri 37 °C	48
Slika 15: Koncentracija genomske dsDNA v supernatantu po elektroporaciji bakterij <i>E. coli</i>	49
Slika 16: Detekcija DNA s propidijevim jodidom v supernatantu in peletu po elektroporaciji bakterij <i>E. coli</i> .	49
Slika 17: Koncentracija genomske dsDNA v supernatantu po elektroporaciji bakterij <i>L. plantarum</i> .	50
Slika 18: Detekcija DNA s propidijevim jodidom v supernatantu in peletu po elektroporaciji bakterij <i>L. plantarum</i> .	50
Slika 19: Levo: agarozna gelska elektroforeza izolirane gDNA izpostavljene električnim pulzom.	51
Slika 20: Levo: agarozna gelska elektroforeza izolirane pDNA izpostavljene električnim pulzom.	52
Slika 21: Levo: agarozna gelska elektroforeza pDNA izpostavljene električnim pulzom	53
Slika 22: Regije na elektroforeznem gelu, ki smo jih uporabili za nadaljno analizo fragmentiranosti pDNA	53

Slika 23: : Delež električnim pulzom izpostavljene pDNA v posameznih regijah na gelu in priпадajoča dovedena energija	54
Slika 24: Analiza glavnih komponent deležev pDNA po regijah in dovedene energije.	55
Slika 25: Levo: agarozna gelska elektroforeza gDNA izpostavljene električnim pulzom	55
Slika 26: Regije na elektroforeznem gelu, ki smo jih uporabili za analizo fragmentiranosti gDNA.	56
Slika 27: Delež električnim pulzom izpostavljene gDNA v posameznih regijah na gelu in pripadajoča dovedena energija	56
Slika 28: Analiza glavnih komponent deležev gDNA po regijah in dovedene energije.	57
Slika 29: Shema sestave celične stene G- bakterije <i>E. coli</i> in G+ bakterije <i>L. plantarum</i> , ter lokacije tarč treh izbranih antibiotikov (ampicilin, tetraciklin in ciprofloxacin).	58
Slika 30: Učinki izpostavitve večine bakterijskih celic, v 250 mM saharovi, električnim pulzom različne dolžine in jakosti električnega polja.	61

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Nakloni posameznih delov krivulj sinergističnih učinkov kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika
- Priloga B: Povprečja parametrov rastnih krivulj bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji in pri inkubaciji pri sobni temperaturi ali 37 °C
- Priloga C: Povprečja parametrov rastnih krivulj bakterij *L. plantarum* po tretiranju s kombinacijo elektroporacije in antibiotika ter inkubaciji pri sobni temperaturi
- Priloga D: Povprečja parametrov rastnih krivulj bakterij *L. plantarum* po tretiranju s kombinacijo elektroporacije in antibiotika ter inkubaciji pri 37 °C
- Priloga E: Testirani parametri elektroporacije, dovedena in deleži plazmidne DNA v posameznih regijah na gelu
- Priloga F: Testirani parametri elektroporacije, dovedena energija in deleži genomske DNA v posameznih regijah na gelu
- Priloga G: Znanstvena objava z naslovom: »Electroporation as an Efficacy Potentiator for Antibiotics With Different Target Sites«.
- Priloga H: Znanstvena objava z naslovom: »Antibiotic's target site affects the potentiation of *Lactiplantibacillus plantarum* inhibition and inactivation by electroporation«.
- Priloga I: Dovoljenje revije *Frontiers in Microbiology* za objavo člakov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ANOVA	Analiza variance (iz angl.: »analysis of variance«)
AT	Antibiotik
bp	bazni par
ccc DNA	Kovalentno zaprta krožna DNA (iz angl.: »covalently closed circular DNA«)
CFU/ml	število kolonij (iz angl.: »colony forming units«) na ml
dH <sub>2</sub> O	destilirana H <sub>2</sub> O
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (iz angl.: »deoxyribonucleic acid«)
dsDNA	Dvostranska DNA (iz angl.: »double stranded DNA«)
E	Jakost električnega polja
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EP	Elektroporacija
G– bakterija	Gramnegativna bakterija
G+ bakterija	Grampozitivna bakterija
gDNA	Genomska DNA
HGT	Horizontalni prenos genov (iz angl.: »horizontal gene transfer«)
IN	Inaktivacija
K–	Negativna kontrola
K+	Pozitivna kontrola
kb	kilobazni par
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
Lag faza	Rastna faza prilagajanja
LB	Gojišče Luria-Bertani
Log faza	Logaritemsko oz. eksponentna faza rasti
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MRS	Gojišče de Man, Rogosa in Sharpe
MRSA	Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
oc DNA	DNA v obliki odprtrega kroga (iz angl.: »open circular DNA«)
OD <sub>600</sub>	Optična gostota (iz angl.: »optical density«) pri 600 nm
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCA	Analiza glavnih komponent (iz angl.: »principal component analysis«)
pDNA	Plazmidna DNA
PEF	Pulzirajoče električno polje (iz angl.: »pulsed electric field«)
PI	Propidijev jodid
<i>R. ruber</i>	<i>Rhodococcus ruber</i>
RNA	Ribonukleinska kislina (iz angl.: »ribonucleic acid«)
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (iz angl.: »reactive oxygen species«)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

VI

Viabilnost

$\mu$

Specifična stopnja rasti

## 1 UVOD

Bakterije igrajo pomembno vlogo v življenju na Zemlji in vplivajo na zdravje ljudi. Nekatere so za nas koristne in nujno potrebne, druge pa povzročajo zdravstvene težave, kar spodbuja raziskave za njihovo odstranjevanje. Različne metode, ki so bile v minulih sedmih desetletjih razvite v ta namen, predvsem tiste temelječe na antibiotikih, zaradi hitrega pridobivanja odpornosti (rezistence) bakterij nanje, izgubljajo svojo učinkovitost. Zaradi tega se raziskave ne osredotočajo le na razvoj novih antibiotikov, temveč tudi na iskanje in izboljšanje dopolnilnih, kombiniranih ali alternativnih pristopov, kot je elektroporacija.

Elektroporacija je proces, pri katerem biološke celice izpostavimo električnemu polju ustrezone jakosti, kar zviša transmembransko napetost, ki nad določeno pragovno vrednostjo privede do začasnega povečanja prepustnosti membrane (Kotnik in sod., 2019). Za elektroporacijo mikroorganizmov so potrebne jakosti električnega polja, ki znašajo več tisoč V/cm (Kotnik in sod., 2015), učinkovitost pa je odvisna od več parametrov, kot so izpostavitev električnemu polju (amplituda, trajanje, oblika in število električnih pulzov, frekvenca dovajanja pulzov), oblike komore oziroma elektrod (Narsetti in sod., 2006), lastnosti mikroorganizmov (El-Hag in sod., 2011) ter lastnosti medija (Wang in sod., 2018). Razlikujemo med reverzibilno elektroporacijo, ki omogoča popravilo poškodovane celice in njeno preživetje, ter irreverzibilno elektroporacijo, ki povzroči nepopravljive poškodbe in smrt celice (Kotnik in sod., 2019).

Reverzibilna elektroporacija vodi v povečanje prepustnosti celične membrane, kar je uporabno za vnos ali ekstrakcijo različnih molekul v celice (npr. elektroekstrakcija in elektrotransformacija). Irreverzibilna elektroporacija pa se uporablja za inaktivacijo mikroorganizmov in evkariotskih celic (Kotnik in sod., 2015). V živilski industriji je elektroporacija priznana tehnologija za konzerviranje hrane, prav tako je uporabna za čiščenje odpadnih voda (Gusbeth in sod., 2009; Nowosad in sod., 2020; Zhou in sod., 2021). Zaradi težav z odpornimi bakterijami v odpadnih vodah in bakterijami, ki povzročajo kvar hrane, se raziskave usmerjajo v razvoj novih pristopov, ki združujejo različne pristope z raznolikimi mehanizmi delovanja in ciljnimi celičnimi tarčami (Alexopoulos in sod., 2019; Berdejo in sod., 2019; Juma in sod., 2020).

Za namen inaktivacije mikroorganizmov lahko elektroporacijo uporabimo v kombinaciji z drugimi fizikalnimi metodami ali s protimikrobnimi snovmi (Martín-Belloso in Sobrino-López, 2011; Berdejo in sod., 2019; Garner, 2019), kar v splošnem izboljša stopnjo inaktivacije. Z elektroporacijo odpadnih vod, ki že vsebujejo antibiotike, bi lahko izboljšali stopnjo inaktivacije bakterij, v živilski industriji pa bi lahko v kombinaciji z elektroporacijo uporabili odobrene protimikrobne snovi, kot so eterična olja, ter ocetno, mlečno in citronsko kislino (Mosqueda-Melgar in sod., 2008; Garner, 2019; Montanari in sod., 2019; Novickij in sod., 2019). Študije, ki kombinirajo elektroporacijo in klinične antibiotike, kažejo, da ta pristop omogoča povišanje inaktivacije mikroorganizmov in poveča občutljivost bakterij za antibiotike (Korem in sod., 2018; Novickij in sod., 2018b; Vadlamani in sod., 2018, 2020; Rubin in sod., 2019; Kuyukina in sod., 2020; Martens in sod., 2020). Elektroporacija lahko zmanjša potrebne koncentracije antibiotikov in obide nekatere mehanizme odpornosti. Večina študij se

osredotoča na doseganje maksimalnega učinka inaktivacije in ne na mehanizme, ki privedejo do potenciranega učinka. Ena od teh vprašanj je tudi odvisnost stopnje potenciacije inaktivacije od načina delovanja antibiotika. Skoraj vse študije, ki so opravile primerjavo med različnimi antibiotiki, so uporabile enak nabor masnih koncentracij za vse testirane antibiotike (Novickij in sod., 2018b, 2018a; Vadlamani in sod., 2018, 2020), kar ne omogoča natančnih primerjav med antibiotiki, za katere je potrebno pri vsakem izhajati iz njegove minimalne inhibitorne koncentracije za bakterijo, na kateri izvajamo poskuse.

Pri uporabi elektroporacije za povečanje učinkovitosti antibiotikov je pomembno tudi vprašanje, kakšen vpliv pri tem ima sestava celične stene bakterij. Grampozitivne ( $G^+$ ) bakterije imajo debelo peptidoglikansko steno in notranjo membrano, medtem ko gramnegativne ( $G^-$ ) bakterije poleg notranje membrane vsebujejo tanko peptidoglikansko steno in zunanjo membrano, ki deluje kot dodatna selektivna ovira (Silhavy in sod., 2010). Te razlike v sestavi celične stene vplivajo na učinkovitost elektroporacije, pri čemer so rezultati študij nasprotujoči. Nekateri ugotavljajo večjo občutljivost  $G^+$  bakterij (Piggot in sod., 2011; Martens in sod., 2020), drugi pa večjo občutljivost  $G^-$  bakterij (Vadlamani in sod., 2018). Večina teh primerjav ni najbolj ustreznih, saj primerjajo bakterije različnih velikosti in oblik, kar pomembno vpliva na transmembransko napetost in prek te na elektroporacijo. Tako so večje in okrogle celice (García in sod., 2005; Huang in sod., 2014) bolj občutljive za elektroporacijo, saj je vsiljena transmembranska napetost, ki jo ustvari izpostavitev električnemu polju, premo sorazmerna velikosti celice in odvisna tudi od njene oblike.

Mikroorganizmi, kot so bakterije, kvasovke in mikroalge, so pomemben vir različnih molekul za industrijo, farmacijo in medicino. Povečanje prepustnosti membrane pri elektroporaciji omogoči prehajanje različnih molekul v in iz celice, kar je ključno za procese kot so elektroekstrakcija, elektrotransformacija, inaktivacija in sušenje biomase (Kotnik in sod., 2015). Z optimizacijo parametrov elektroporacije lahko vplivamo na permeabilizacijo in specifični transport molekul preko membrane (Demiryurek in sod., 2015). Elektroekstrakcija omogoča hitro ekstrakcijo z nizko porabo energije in brez kemikalij, lahko pa se tudi izognemo kontaminaciji z ostanki celic, ki so problematični pri ekstrakciji z lizo celic (Kotnik in sod., 2015). V primerjavi z nekaterimi drugimi metodami ekstrakcije, kot je homogenizacija pod visokim pritiskom, elektroporacija zagotavlja proteinski ekstrakt, ki je manj kontaminiran s fragmenti DNA, drugimi makromolekulami ter ostanki celične stene (Haberl-Meglič in sod., 2020; Schottroff in sod., 2021). Uporabna je za  $G^+$  in  $G^-$  bakterije ter jo lahko kombiniramo z nekaterimi nadaljnji postopki detekcije in hibridizacije, pri izolaciji večjih molekul pa z elektroporacijo dosežemo tako lizo kot izolacijo. Čeprav je učinkovitost večinoma nižja kot pri drugih že uveljavljenih metodah (Haberl-Meglič in sod., 2016; Haberl Meglič in sod., 2020), je z optimizacijo možno doseči primerljive rezultate (Kotnik in sod., 2015). Za prenos velikih, električno nabitih molekul, kot je plazmidna DNA, so potrebni dolgi pulzi, ki ustvarijo zadostno elektroforezno silo za prehod DNA skozi membrano (Kotnik in sod., 2019). Pri uporabi visokih jakosti električnega polja ali velikega števila pulzov lahko prihaja tudi do segrevanja in elektrokemijskih reakcij, kar lahko vodi v poškodbe DNA (Vitzthum in sod., 2000).

## 1.1 NAMEN

V doktorski disertaciji smo primerjali potenciacijo učinka antibiotika z elektroporacijo glede na njegov način delovanja oziroma lokacijo njegove tarče (zunajcelična tarča: zaviranje sinteze celične stene; ali znotrajcelična tarča: zaviranje sinteze proteinov ali DNA). V naši študiji smo za določanje koncentracij antibiotikov uporabili pristop, ki temelji na določitvi minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK), kar je v primerjavi z drugimi študiji, omogočilo bolj relevantno primerjavo učinkovitosti različnih antibiotikov glede na njihov mehanizem delovanja. To se razlikuje od večine študij, ki standardizirano uporabljo enake masne koncentracije za vse antibiotike, npr. za vsak antibiotik 1, 10, 100 in 1000 µg/ml (Novickij in sod., 2018b), kar zmanjša natančnost in relevantnost primerjav. Poleg tega smo preučili vpliv časa inkubacije v mediju z antibiotikom po elektroporaciji, saj je v literaturi pogosto različen ali celo ni naveden. Kuyukina in sod. (2020) so opravili podobne primerjave z različnimi antibiotiki in časovnimi obdobji inkubacije, a so se osredotočili na spremembo odpornosti bakterij proti antibiotikom po elektroporaciji. V disertaciji pa smo se osredotočili na ovrednotenje stopnje inaktivacije bakterij, kar je ključno za praktično uporabo kombinacije elektroporacije in antibiotikov pri inaktivaciji bakterij.

Naš pristop je omogočil ustreznejšo primerjavo potenciacije učinka antibiotika med G+ in G– bakterijami. Dosedanje študije namreč uporabljajo enak nabor koncentracij za vse antibiotike (Novickij in sod., 2018b; Vadlamani in sod., 2018, 2020), nekatere pa za dosego čim višje inaktivacije uporabljajo mešanice več različnih antibiotikov (Rubin in sod., 2019), kar otežuje razločevanje in s tem razumevanje mehanizmov. Ker na učinkovitost elektroporacije vplivata tudi oblika in velikost celic smo, v nasprotju z omenjenimi študijami, za naše poskuse izbrali predstavnika G+ in G– bakterije, ki imata podobno obliko in velikost, čemur so med doslej izvedenimi študijami namenili izrecno pozornost le Martens in sod. (2020). Sistematično vrednotenje sinergističnih učinkov bo prispevalo k boljšemu razumevanju kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov za inaktivacijo bakterij, ob upoštevanju načina delovanja antibiotika, časa inkubacije in sestave celične stene. To bo pomembno za nadaljnji razvoj takšnega kombiniranega pristopa.

V drugem delu doktorske naloge smo raziskali iztekanje DNA iz bakterij po elektroporaciji in učinek parametrov elektroporacijskih pulzov na fragmentacijo DNA. Medtem, ko so se prejšnje študije večinoma osredotočale na elektroekstrakcijo plazmidne DNA za njeni izolacijo ali transformacijo bakterij, smo v okviru te disertacije preučevali količino in hitrost sproščanja genomske DNA po elektroporaciji.

Vprašanje fragmentacije DNA je ključnega pomena ne le za elektroekstrakcijo in transformacijo, temveč tudi zaradi potencialnih okoljskih vplivov. Pri elektroporaciji odpadnih voda bi lahko prišlo do iztekanja celične vsebine in DNA, kar bi povečalo tveganje za horizontalni prenos genov med prisotnimi bakterijami, vključno z razširjanjem odpornosti bakterij proti antibiotikom. Zato smo raziskali, kako različni parametri elektroporacije vplivajo na fragmentacijo genomske in plazmidne DNA. Pridobljeni rezultati bodo pomembni pri

nadalnjem razvoju elektroporacije za izolacijo DNA in transformacijo bakterij ter pri potencialni uporabi elektroporacije pri čiščenju odpadnih voda.

## 1.2 HIPOTEZE

- 1) Elektroporacija različno potencira učinek antibiotika v odvisnosti od njegovega načina delovanja oziroma njegove tarče v bakteriji. Največjo potenciacijo inaktivacije pričakujemo pri antibiotikih, ki jim elektroporacija najizraziteje poveča dostop do njihove tarče.
- 2) Potenciacija učinka delovanja antibiotika, ki jo dosežemo z elektroporacijo, je pri gramnegativnih bakterijah značilno drugačna kot pri grampozitivnih bakterijah, zaradi različne zgradbe celične stene.
- 3) Iztekanje DNA, ki ga dosežemo z elektroporacijo, je izrazitejše pri daljših pulzih in je pri gramnegativnih bakterijah značilno drugačno kot pri grampozitivnih bakterijah.

## 2 PREGLED OBJAV

Inaktivacija bakterij je eden od pristopov k zagotavljanju zdravja, kar ustvarja je motivacijo za izboljšanje obstoječih metod in razvoj novih tehnologij za učinkovito inaktivacijo bakterij. Bakterije, odporne proti antibiotikom v medicini in odpadnih vodah, ter bakterije, ki povzročajo kvar hrane (kvarljivci) in potencialni patogeni v živilski industriji predstavljajo resen zdravstveni ter ekonomski problem, kot opozarja Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, 2023a in 2023b). Elektroporacija je ena izmed obetavnih metod za inaktivacijo mikroorganizmov, saj je učinkovita, ponovljiva, ne vključuje uporabe kemikalij in ima nizek potencial za nastajanje potencialno škodljivih stranskih produktov. Temelji na fizikalnem mehanizmu ustvarjanja por v lipidnem dvosloju membrane celic, kar onemogoča razvoj odpornosti mikroorganizmov proti tej metodi.

### 2.1 ELEKTROPORACIJA

Večina celic ohranja razliko v električnem potencialu na obeh straneh membrane s pomočjo ionskih kanalčkov in črpalk, kar imenujemo mirovalna transmembranska napetost (tudi mirovalni ali mirovni transmembranski potencial). Ob izpostavitvi celice zunanjemu električnemu polju, začne nanjo delovati še vsiljena transmembranska napetost, ki pri dovolj visoki jakosti povzroči preureditev membranskih molekul in strukturne spremembe, tako v lipidnem dvosloju kot pri membranskih proteinih (Kotnik in sod., 2019). Proces izpostavitve bioloških celic zadosti močnemu električnemu polju, ki vodi v začasno povečanje prepustnosti membrane, imenujemo elektroporacija in je vse pomembnejša metoda v medicini, biotehnologiji in živilski industriji. V literaturi se pogosto kot sopomenka za elektroporacijo uporablja izraz elektropemeabilizacija, a se ta pojma po strožji definiciji razlikuje. Elektroporacija natančneje zajema le del povečane propustnosti membrane, ki je posledica nastanka por v lipidnem dvosloju, medtem ko elektropemeabilizacija zajema celotno povečano propustnost, h kateri poleg por prispevajo tudi kemične spremembe membranskih lipidov in proteinov (Kotnik in sod., 2019). V nadaljevanju bomo uporabljali le izraz elektroporacija, razen na mestih, kjer bomo želeli poudariti, da gre za celoten vpliv na permeabilnost. Glede na učinek ločimo reverzibilno elektroporacijo, po kateri pride do popravila poškodb in celica preživi, ter ireverzibilno elektroporacijo, pri kateri pride do nepovratnih poškodb, zaradi katerih celica odmre (Kotnik in sod., 2019).

Proces elektropemeabilizacije obsega pet stopenj. Začne se z iniciacijo, ki traja od nekaj nanosekund do mikrosekund, med katero pride do zvišanja prevodnosti in prepustnosti membrane. Sledi ekspanzija, ki traja do konca dovedenega električnega pulza, med katero se vzdržujeta ali še povečujeta zvišani prevodnost in prepustnost. Po koncu pulza pride do delnega okrevanja, ko prevodnost in prepustnost padeta, kar traja od nekaj mikrosekund do milisekund. Nadaljnje okrevanje membrane in ponovna vzpostavitev fiziološke izvorne neprepustnosti membrane lahko traja od nekaj sekund do nekaj ur, odvisno od obsega poškodb in temperature. Kljub temu ostane še tako imenovani »spomin«, saj so še vedno prisotne določene poškodbe in spremembe molekul ali presnovnih reakcij. Za popolno vrnitev v prvotno stanje, v kakršnem je bila pred izpostavitvijo električnemu polju, lahko celica potrebuje več ur (Kotnik in sod., 2019).

Tudi oblikovanje membranskih por je večstopenjski proces, hitrost oblikovanja pore pa je odvisna od jakosti električnega polja. Začne se z reorganizacijo vodnih molekul, ki svoje dipole poravnajo v smeri električnega polja. Sledi združevanje vodnih molekul na obeh straneh membrane v skupke, ki prodrejo v notranjost lipidnega dvosloja, s čimer oblikujejo vodni stolpec oziroma hidrofobno poro. Temu sledi reorganizacija lipidnih molekul, ki svoje polarne glave usmerijo proti vodnemu stolpcu, kar vodi v nastanek energijsko ugodnejše hidrofilne pore, ki je precej stabilnejša od hidrofobne. Hitrost zapiranja hidrofilne pore ni odvisna od jakosti električnega polja in tipično traja nekaj 10 do 100 nanosekund (Kotnik in sod., 2019).

Povečana prepustnost membrane po prenehanju dovajanja električnih pulzov, ki se empirično opazi še po običajnem času zapiranja hidrofilnih por v lipidnem dvosloju membrane, še ni povsem pojasnjena. Znano je, da k temu pomembno prispevata peroksidacija membranskih lipidov ter denaturacija ali vsaj začasna funkcionalna sprememba membranskih proteinov, verjetno pa k temu prispevajo še drugi, zaenkrat nepojasnjeni, mehanizmi. Do oksidacije lipidov v membrani pride zaradi reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS, iz angl.: »reactive oxygen species«), ki nastanejo zaradi izpostavitve celic električnim pulzom ter lahko tudi vplivajo na hitrost zapiranja por in nivo celičnih poškodb. Ta učinek se povečuje z višanjem jakosti električnega polja, dolžine pulza in njihovim številom. Oksidacija lipidov v membrani zmanjša njihovo strukturno urejenost, zniža temperaturo, pri kateri pride do faznega prehoda, tanjša in razširja lipidni dvosloj ter povečuje mobilnost lipidov in njihovo premeščanje. To spremeni fizikalne lastnosti membrane in tako poveča njeno nagnjenost k nastanku por med elektroporacijo (Kotnik in sod., 2019). Na oksidacijo lipidov pomembno vpliva smer električnega polja; do oksidacije pride najizraziteje na delu membrane, ki je obrnjena proti anodi, vendar so potrebne jakosti električnega polja, ki so višje od meje za elektroporacijo (Gabriel in Teissie, 1995; Michel in sod., 2020). Oksidacija lipidov je komaj zaznavna pri uporabi pufra z nizko prevodnostjo, kar nakazuje na pomembno vlogo električnega toka (Michel in sod., 2020). Numerični modeli in poskusi na lipidnih dvoslojih kažejo na vlogo lipidne peroksidacije pri podaljšani membranski permeabilizaciji, saj imajo membrane, ki vsebujejo oksidirane lipide, povečano permeabilnost in prevodnost (Rems in sod., 2019; Balantič in sod., 2023). Vendar pa primerjava numeričnih rezultatov z eksperimentalnimi kaže, da lipidna peroksidacija vseeno ne pojasni celotne izmerjene podaljšane permeabilnosti. Del povečane permeabilnosti prispevajo tudi denaturirani transmembranski proteini, ki so posledica lokalnega segrevanja ob izpostavitvi celic električnim pulzom (Rems in sod., 2019). Na elektroporacijo so še posebej občutljivi napetostno odvisni ionski kanalčki, pri katerih električno polje povzroči nastanek pore v domeni napetostnega senzorja. Z naknadno reorganizacijo lipidnih molekul nastanejo tako imenovane kompleksne pore, ki so precej bolj stabilne, kot običajne lipidne pore (Rems in sod., 2020).

## 2.2 INAKTIVACIJA BAKTERIJ Z ELEKTROPORACIJO

Začetki uporabe električnega toka za inaktivacijo mikroorganizmov segajo v leto 1919, ko sta Anderson in Finkelstein uporabila izmenični tok za sterilizacijo mleka. Elektroporacija predstavlja obetavno inovativno tehnologijo za inaktivacijo mikroorganizmov brez uporabe kemikalij, z minimalnim tveganjem za nastanek potencialnih škodljivih produktov. V živilski

industriji se je uveljavila kot metoda za konzerviranje hrane, saj lahko z optimizacijo parametrov dosežemo inaktivacijo mikroorganizmov tudi brez velikega zvišanja temperature. Različne nepatogene in patogene mikroorganizme inaktivira pri nižjih temperaturah od tistih, ki se uporabljajo pri termični obdelavi hrane (Saldaña in sod., 2014). To prispeva k ohranjanju hranil, kot so vitamini, minerali in antioksidanti, ter okusa hrane, ki ga termična obdelava lahko spremeni (Delso in sod., 2023). Uporabna je tudi za čiščenje odpadnih voda (Gusbeth in sod., 2009), ki so rezervoar patogenih bakterij, vključno s sevi odpornimi proti antibiotikom (Hocquet in sod., 2016), zlasti iz bolnišnic in živinorejskih obratov, ki vsebujejo različna zdravila, vključno z antibiotiki (Diwan in sod., 2013; Kim in sod., 2020).

Ker odpornost mikroorganizmov proti antibiotikom predstavlja vse večjo grožnjo, se raziskave osredotočajo na nove pristope, ki združujejo različne metode z raznolikimi mehanizmi delovanja in tarčami (Alexopoulos in sod., 2019; Berdejo in sod., 2019; Juma in sod., 2020). Kombiniranje metod omogoča ohranjanje visoke stopnje inaktivacije mikroorganizmov kljub zmanjšani intenzivnosti posameznih tretmajev, kar znižuje porabo energije. Elektroporacijo lahko uporabimo v kombinaciji z drugimi fizikalnimi metodami ali protimikrobnimi snovmi (Martín-Belloso in Sobrino-López, 2011; Berdejo in sod., 2019; Garner, 2019), ki so pogosto učinkovitejše, če je patogen predhodno poškodovan z drugo metodo (Berdejo in sod., 2019). Uporaba elektroporacije v odpadnih vodah, ki že vsebujejo antibiotike, bi lahko povečala stopnjo inaktivacije bakterij. Raziskave kažejo, da sama elektroporacija ne poveča genotoksičnosti medija in da bakterije ne razvijejo odpornosti na ponavljajočo se elektroporacijo (Rieder in sod., 2008; Gusbeth in sod., 2009). V primerjavi z elektroporacijo so druge fizikalne in kemične metode inaktivacije mikroorganizmov, kot so ultravijolično obsevanje ali kloriranje, manj učinkovite (npr. ultravijolično obsevanje je neučinkovito pri obdelovanju kalne vode) ali pa ustvarjajo toksične stranske produkte, npr. halogenirane organske snovi v vodi, obdelani s kloriranjem, in kovinski oksidi pri ozoniranju (Paraskeva in Graham, 2002; Schwartz in sod., 2003).

V nasprotju z vegetativnimi bakterijskimi celicami so bakterijske spore bolj odporne proti elektroporaciji. Ta sicer povzroči poškodbe proteinske ovojnice spor (Pillet in sod., 2016a), vendar je za njihovo uspešno inaktivacijo dokaj neučinkovita, zato se večinoma uporablja v kombinaciji z drugimi metodami (višja temperatura, nižji pH, višja koncentracija sladkorjev, ultrazvok, ...) (Martín-Belloso in Sobrino-López, 2011; Garner, 2019). Uporaba obločnih razelektritev (»električnih strek«) na sporah je sicer bolj učinkovita, vendar pri tem ne gre le za elektroporacijo, temveč so prisotni še drugi učinki, kot so mehanski tlačni val, segrevanje, nastanek plazme,... (Pillet in sod., 2016b).

## 2.3 VPLIV PARAMETROV NA UČINKOVITOST ELEKTROPORACIJE

Učinkovitost elektroporacije je odvisna od številnih dejavnikov, kot so lastnosti celic, parametri elektroporacije (jakost električnega polja, trajanje in oblika pulza, čas izpostavitve in jakost dovedene energije), oblika elektroporacijske komore in elektrod (Narsetti in sod., 2006), temperatura in značilnosti medija, v katerem bakterije elektroporiramo (Wang in sod., 2018).

### 2.3.1 Lastnosti celic

Lastnosti celic, ki vplivajo na elektroporacijo, so velikost, oblika, faza rasti in sestava celične stene. Večje in okrogle celice (García in sod., 2005; Huang in sod., 2014) so bolj občutljive za elektroporacijo, saj je vsiljena transmembranska napetost, ki jo ustvari izpostavitev električnemu polju, premo sorazmerna velikosti celice in odvisna tudi od njene oblike (pri enaki jakosti električnega polja bo vsiljena napetost večja za večje celice in večja za okrogle celice, kot za tiste podolgovatih ali ploščatih oblik). Za elektroporacijo evkariotskih celic ponavadi uporabljamo jakosti električnega polja, ki znašajo nekaj sto V/cm, medtem ko so za elektroporacijo mikroorganizmov, ker so manjši, potrebne jakosti več tisoč V/cm (Kotnik in sod., 2015). Bolj občutljive za elektroporacijo so bakterije v eksponentni fazi rasti, saj so takrat večje ter imajo tanjšo in bolj permeabilno membrano, kot v stacionarni fazi (Somolinus in sod., 2008; Novickij in sod., 2018a).

Na učinkovitost elektroporacije vpliva tudi sestava bakterijske stene, v smislu splošne organiziranosti in lipidne sestave. Glede splošne strukture stene bakterije delimo v dve skupini, po Gramu negativne ( $G-$ ) in po Gramu pozitivne ( $G+$ ) bakterije.  $G-$  bakterije imajo steno sestavljeno iz notranje membrane, tanke peptidoglikanske stene in zunanje membrane, ki deluje kot učinkovita selektivna bariera.  $G+$  bakterije pa nimajo zunanje membrane, a imajo precej debelejšo peptidoglikansko steno. Nekatere raziskave navajajo, da so  $G+$  bakterije bolj odporne na elektroporacijo kot  $G-$  bakterije, spet druge pa trdijo ravno obratno. Ena od raziskav, ki navaja večjo učinkovitost elektroporacije pri  $G-$  bakterijah, je raziskava, ki so jo opravili Vadlamani in sod. (2018). Z uporabo nanosekundnih pulzov so pri  $G-$  *Escherichia coli* dobili višjo stopnjo inaktivacije kot pri  $G+$  *Staphylococcus aureus*. Avtorji so kot možen razlog navedli razliko v velikosti celic (*S. aureus* je manjši) in razliko v hiperosmotskem gradientu za vzdrževanje oblike ( $G-$  bakterije imajo bolj rigidno steno, zato potrebujejo manjši gradient). Tudi Muñoz in sod. (2012) so s pomočjo PEF (pulzirajoče električno polje: iz angl. »pulsed electric field«) pri  $G-$  *Escherichia coli* dobili višjo stopnjo inaktivacije kot pri  $G+$  *Listeria innocua*. Po drugi strani pa so Piggot in sod. (2011) s simulacijo molekularne dinamike celične stene pokazali, da je  $G-$  *E. coli* bolj odporna na elektroporacijo kot  $G+$  *S. aureus*, zaradi zmanjšane mobilnosti lipopolisaharidnih molekul v zunanjji membrani. Martens in sod. (2020) so primerjali  $G-$  *E. coli* in  $G+$  *Lactobacillus acidophilus*, ki sta po obliku obe paličaste oblike in podobne velikosti. Njihovi rezultati kažejo, da je nivo inaktivacije bolj odvisen od celotne dovedene energije (amplituda, število in trajanje pulzov), kot pa od vrste bakterije. *L. acidophilus* je bil tako pri srednji in višji amplitudi bolj občutljiv za elektroporacijo kot *E. coli*, pri nižji amplitudi pa bolj odporen. Zaključili so, da je pri *L. acidophilus* verjetno potrebno močnejše električno polje za preseg praga elektroporacije. Večjo odpornost  $G-$  bakterij na elektroporacijo so pokazali tudi Wang in Xie (2023). Učinkovitost elektroporacije je bila nižja pri  $G-$  *E. coli*, kot pri  $G+$  *Staphylococcus epidermidis*. Kot možen razlog za to razliko so navedli sestavo celične stene, ki vpliva na mejno vrednost za elektroporacijo. Večja odpornost  $G+$  bakterij na mehanske in oksidacijske motnje se običajno pripisuje debelejšemu sloju peptidoglikana. V primeru elektroporacije pa je situacija obratna, kar so pojasnili s prisotnostjo dodatnega lipidnega dvosloja, ki poveča odpornost  $G-$  bakterij na elektroporacijo.

Drug vidik vpliva sestave celične stene na občutljivost membrane za elektroporacijo in na elektroporacijski prag pa je lipidna sestava. Membrane, ki vsebujejo razvezjane lipide, imajo večjo prečno mehansko napetost, kar ovira difuzijo vodnih molekul med oblikovanjem hidrofobne pore, to pa zmanjša verjetnost za oblikovanje por in zviša prag, ki je potreben za permeabilizacijo membrane. Nasprotno pa oksidacija lipidov poveča občutljivost membrane za elektroporacijo, zaradi lažje difuzije vodnih molekul (Vernier in sod., 2009). Višji prag elektroporacije imajo tudi membrane, ki vsebujejo lipide, med katerimi se vzpostavijo močne vodikove vezi, saj te stabilizirajo interakcije med lipidnimi glavami. Takšni so na primer lipidni arheji in fosfatidiletanolamin (Gurtovenko in Lyulina, 2014; Polak in sod., 2014).

### 2.3.2 Parametri elektroporacije

Parametri elektroporacije, ki vplivajo na elektroporacijo, so jakost električnega polja, trajanje in oblika pulza, frekvenca dovajanja pulzov, čas izpostavitve ter dovedena energija. Pri irreverzibilni elektroporaciji, kjer želimo povisiti nivo inaktivacije, običajno zvišamo amplitudo, dolžino in/ali število pulzov, s čimer dovedemo več energije.

Pulzi so lahko dolgi od nekaj ns do več sto ms. Večinoma se uporabljajo  $\mu$ s-pulzi, dolgi ms-pulzi pa se največkrat uporablja pri ekstrakcijah in vnašanju molekul v celice, saj vsebujejo tudi učinek elektroforeze. Zelo kratki, ns-pulzi, imajo nekoliko drugačne učinke od običajnih  $\mu$ s-pulzov (drugačna velikost, stabilnost in porazdelitev por), njihova prednost pa je bolj enakomerna permeabilizacija heterogenega tkiva (Novickij in sod., 2022).

Frekvenca dovajanj pulzov vpliva na učinkovitost elektroporacije predvsem pri uporabi kratkih pulzov. Povišanje frekvence načeloma vodi do večje gostote por na membrani in s tem do večje permeabilizacije. Pri dovajanju pulzov, krajsih od 1  $\mu$ s, se običajno uporablja nižje frekvence v rangu 1-10 Hz, pri višjih frekvencah se namreč učinkovitost zmanjša. Pri daljših pulzih, kot so na primer 100  $\mu$ s-pulzi, je vpliv frekvence manjši, med 1 Hz in 1 kHz protokoli skorajda ni razlik v učinkovitosti. Pri zelo visokih frekvencah (500 kHz do 1 MHz) pa se učinkovitost elektroporacije zviša, saj pride do akumulacije transmembranskega potenciala, kar zniža mejo za elektroporacijo (Novickij in sod., 2022).

Med najpogostejsimi oblikami pulzov so eksponentno padajoči in pravokotni pulzi, med slednjimi pa monopolarni in bipolarni pulzi. Pri eksponentno padajočih pulzih je željena, dovedena napetost na membrani prisotna le povsem na začetku pulza, nato pa eksponentno pada. Prvi generatorji električnih pulzov so lahko dovajali le eksponentno padajoče pulze, saj so temeljili na preprosti razelektritvi kondenzatorja, vendar se ti čedalje manj uporabljajo, saj pri njih težko nadzorujemo dolžino pulza in izgubo energije. Sedaj se večinoma uporablja pravokotni pulzi, pri katerih se, teoretično, skozi celotno trajanje pulza vzdržuje električno polje nad mejno vrednostjo za elektroporacijo. Pri monopolarnih oz. monofaznih pulzih dovedemo pulz samo v eni smeri, pri bipolarnih oz. bifaznih pulzih pa dovedemo dva pulza, ki imata nasprotno polarnost. Večinoma se uporablja monopolarni pulzi, kratki bipolarni pulzi v kombinaciji z visokimi frekvencami pa se uporabljajo predvsem v klinične namene, saj izboljšajo elektroporacijo heterogenih tkiv in zmanjšajo mišično kontrakcijo (Novickij in sod.,

2022). Pri elektroporaciji bakterij se večinoma uporablajo klasični pravokotni monopolarni pulzi.

### 2.3.3 Značilnosti medija

Učinkovitost elektroporacije je prav tako odvisna od značilnosti medija, v katerem celice elektroporiramo, vključno s prevodnostjo, temperaturo in vrednostjo pH.

Mehanizmi odvisnosti elektroporacije od temperature še niso v celoti raziskani, najverjetneje pa so povezani s fazno tranzicijo lipidov v membrani (Müller in sod., 2022). Učinkovitost elektroporacije se poveča pri višjih temperaturah, saj ta zniža potreben elektroporacijski prag (Song in sod., 2011), zviša prevodnost in gostoto por v membrani ter pospeši transport molekul, kar ojača porušitev homeostaze (Yan in sod., 2021). Pri nižjih temperaturah pa sta formacija por in okrevanje počasnejša. Daljša odprtost por pri nizkih temperaturah lahko poveča transport ionov in molekul preko membrane, kar pojasni eksperimentalne rezultate izboljšane ekstrakcije molekul pri nižjih temperaturah (Müller in sod., 2022). Temperatura medija se lahko zviša tudi med samim dovajanjem električnih pulzov, zato lahko z nadaljnjiimi pulzi še povečamo nivo elektropermeabilizacije (Yan in sod., 2021).

Prevodnost medija je močno odvisna od koncentracije ionov ter vpliva na stopnjo permeabilizacije in viabilnost celic. Manj prevodni mediji običajno vodijo v večjo stopnjo permeabilizacije in nižjo viabilnost celic (Djuzenova in sod., 1996), vendar je slednja odvisna tudi od same ionske sestave medija (Sherba in sod., 2020). Nima pa ionska sestava vpliva na samo stopnjo permeabilizacije in privzem propidijevega jodida (PI) pri določeni prevodnosti (Djuzenova in sod., 1996). Manjšo permeabilizacijo in transport molekul pri elektroporaciji v mediju z višjo prevodnostjo so opazili tudi Ruzgys in sod. (2019), kar so pripisali spremembri v obliki celic. V visoko prevodnem mediju so bile celice bolj okrogle, kar je spremenilo prerazporeditev napetosti na membrani in znižalo transmembranski potencial.

Vpliv pH na elektroporacijo bakterij je odvisen od tega, katere bakterije elektroporiramo, G+ bakterije so bolj občutljive za elektroporacijo pri kislem pH 4, medtem ko so G- bakterije bolj občutljive pri nevtralnem pH 7 (García in sod., 2005). Pri tem gre predvsem za vpliv pH na okrevanje celic po elektroporaciji. Kislo pH vrednosti (pH 4), ki sicer same po sebi ne povzročijo inaktivacije, imajo sinergistični učinek na nivo inaktivacije bakterij, saj preprečijo okrevanje reverzibilno elektroporiranih celic (Somolinos in sod., 2008).

Osmolarnost medija, v katerem celice elektroporiramo, vpliva predvsem na njihovo preživetje. Pri bakterijah, ki rastejo tudi v hiperosmolarnem mediju, uporaba takšnega medija vodi v izboljšano elektrotransformacijo. To velja predvsem za G+ bakterije, katerih viabilnost po elektroporaciji se zviša, če uporabimo medij z višjo koncentracijo sorbitola ali manitola. V hiperosmolarnem mediju se celice namreč skrčijo, kar naj bi izboljšalo zapiranje por in okrevanje po elektroporaciji (Xue in sod., 1999). Hipoosmolarni pogoji pa vodijo v povečano lateralno tenzijo membrane, kar povzroči znižanje kritične vrednosti transmembranskega potenciala za permeabilizacijo membrane (Barrau in sod., 2004).

Pri proučevanju vpliva posameznega parametra pa je potrebno paziti, da se vzorci med seboj ne razlikujejo tudi v drugih parametrih. García in sod., 2005 so pri primerjavi vpliva velikosti in oblike bakterijskih celic na občutljivost za elektroporacijo, ugotovili, da se osnovne predpostavke (manjše celice bolj odporne, in okrogle celice bolj občutljive kot paličaste) niso skladale z rezultati pri posameznem pH. So se pa predpostavke glede velikosti in oblike celic skladale z rezultati pri primerjavi bakterij znotraj G<sup>+</sup> ali G<sup>-</sup> bakterij pri pH 7. Kot bolj pomemben parameter se je izkazala oblika celic. Med G<sup>+</sup> bakterijami sta se obe bakteriji okroglo oblike izkazali kot bolj občutljivi za elektroporacijo, kljub najmanjši velikosti. So pa bile večje celice bolj občutljive za elektroporacijo kot manjše pri primerjavi paličastih bakterij, ki so skupno bolj odporne kot okrogle.

## 2.4 ELEKTROPORACIJA V KOMBINACIJI S PROTIMIKROBNIMI SNOVMI

Poškodbe celic, ki nastanejo zaradi obdelave z različnimi fizikalnimi metodami, povečajo občutljivost bakterij za protimikrobne snovi (Berdejo in sod., 2019). Pretekle raziskave na področju kombinirane uporabe protimikrobnih snovi z elektroporacijo so se večinoma osredotočale na snovi, ki so primerne za uporabo v živilski industriji ali so že naravno prisotne v hrani, kot so eterična olja, organske kisline, protimikrobní encimi, bakteriocini, in nizin (Martín-Belloso in Sobrino-López, 2011; Garner, 2019). Te snovi preprečujejo rast in regeneracijo bakterij, tudi v primeru reverzibilne elektroporacije (Ulmer in sod., 2002).

Ena najpogostejših protimikrobnih snovi, ki se uporablja v kombinaciji z elektroporacijo, je bakteriocin nizin. Gre za protimikrobní peptid z dvema mehanizmoma delovanja: ustvarjanje membranskih por, ki povečujejo propustnost membrane, porušijo homeostazo in povzročijo celično smrt (Ruhr in Sahl, 1985), ter zaviranje sinteze peptidoglikana v celični steni (Wiedemann in sod., 2001), kar dodatno prispeva k protimikrobnu učinku. Nizin ima ozek spekter delovanja, predvsem je učinkovit proti G<sup>+</sup> bakterijam, medtem ko proti G<sup>-</sup> bakterijam ni naravno učinkovit. Vendar pa njegova učinkovitost proti G<sup>-</sup> bakterijam naraste, ko se uporabi v kombinacijami z metodami, ki omogočajo njegov prehod skozi zunano membrano, kar poveča stopnjo inaktivacije bakterij (Ulmer in sod., 2002; Martín-Belloso in Sobrino-López, 2011; Novickij in sod., 2018d).

Elektroporacija, uporabljena samostojno ali v kombinaciji s protimikrobnimi snovmi, je pokazala obetavne rezultate pri inaktivaciji bakterij v biofilmih, ki predstavljajo kompleksne strukture z močno zaščito pred imunskim odzivom in protimikrobnimi snovmi (Del Pozo in sod., 2009a, 2009b; Khan in sod., 2016; Novickij in sod., 2018c; Fernandes in sod., 2019). Biofilmi igrajo ključno vlogo pri večini bakterijskih okužb pri ljudeh, zlasti pri tistih, ki so povezane z medicinskimi pripomočki, kot so vsadki in proteze (Freebairn in sod., 2013). Vendar pa so rezultati kombinirane uporabe elektroporacije in protimikrobnih snovi raznoliki, kar kaže na to, da izboljšana učinkovitost proti biofilmskim bakterijam ni vedno zagotovljena (Del Pozo in sod., 2009a). Med možnimi mehanizmi, ki bi lahko pojasnili izboljšano delovanje nekaterih protimikrobnih spojin v kombinaciji z elektroporacijo so: zmanjšana vezava protimikrobnih spojin na biofilm, povečana prepustnost celičnih membran, elektroforezni

transport protimikrobnih spojin, spodbujanje rasti zaradi tvorbe kisika med elektrolizo, nastanek ROS, elektroosmoza, ekspanzije biofilma, mehanske poškodba biofilma zaradi mehurčkov med elektrolizo in povišanje temperature (del Pozo in sod., 2008).

## 2.5 ELEKTROPORACIJA V KOMBINACIJI S KLINIČNIMI ANTIBIOTIKI

Vse več je tudi študij, ki v kombinaciji z elektroporacijo uporablja klinične antibiotike za izboljšanje inaktivacije bakterij (preglednica 1) ali za povečanje njihove občutljivosti za antibiotike (preglednica 2). Študije so pokazale, da ta kombiniran pristop lahko privede do boljše inaktivacije mikroorganizmov in poveča občutljivost bakterij za antibiotike (Korem in sod., 2018; Novickij in sod., 2018b; Vadlamani in sod., 2018, 2020; Rubin in sod., 2019; Kuyukina in sod., 2020; Martens in sod., 2020).

Korem in sod. (2018) so raziskovali učinek kombinirane uporabe elektroporacije in oksacilina na inaktivacijo bakterij *S. aureus*. Čeprav je uporaba samega antibiotika do neke mere zmanjšala število bakterij s povečevanjem njegove koncentracije, je elektroporacija samostojno pokazala večji učinek na inaktivacijo. Ko so pred elektroporacijo dodali oksacilin v koncentracijah od  $0,5\times$  do  $2\times$  minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) so opazili popolno inaktivacijo bakterij, kar dokazuje sinergistično delovanje obeh metod.

Novickij in sod. (2018b) so preizkusili učinkovitost kombinacije elektroporacije s petimi različnimi antibiotiki za inaktivacijo bakterij *S. aureus*, ki je odporen proti meticilinu. Ta kombiniran pristop je omogočil uporabo tudi do  $1000\times$  nižjih koncentracij antibiotikov za doseganje primerljive ravni inaktivacije kot z uporabo samo elektroporacije. Najbolj učinkovita sta bila doksiciklin (iz skupine tetraciclinov) in gentamicin (aminoglikozid), ki zavirata sintezo proteinov. Sledita ciprofloksacin in sulfametoksazol, ki zavirata sintezo DNA. Najmanj učinkovit je bil vankomicin, ki zavira sintezo peptidoglikana in je primarno usmerjen proti G+ bakterijam.

Vadlamani in sod. (2018) so raziskovali, kako kombinirana uporaba elektroporacije in antibiotikov izboljša inaktivacijo pri G+ bakterijah *S. aureus* in G- bakterijah *E. coli*. Za elektroporacijo so uporabili kraje 300-ns pulze v kombinaciji s tobramicinom (zavira sintezo proteinov) ali rifampicinom (zavira sintezo RNA). S kombiniranim pristopom so dosegli višjo stopnjo inaktivacije, kot če so uporabili samo elektroporacijo ali samo antibiotika pri obeh vrstah bakterij. Prav tako je elektroporacija omogočila hitrejše delovanje nizkih koncentracij tobramicina, v primerjavi s kliničnim odmerkom, ki je za primerljivo inaktivacijo potreboval več časa. Čeprav je bila elektroporacija sama po sebi učinkovitejša pri *E. coli*, so tudi sami opozorili na razliko v velikosti bakterijskih celic; bakterije *E. coli* so večje od bakterij *S. aureus* in zato bolj občutljive za elektroporacijo.

Rubin in sod. (2019) so analizirali učinkovitost inaktivacije G- bakterij *Pseudomonas aeruginosa* in G+ bakterij *S. epidermidis* z uporabo PEF v kombinaciji z mešanicami antibiotikov, ki je vključevala penicilin, streptomycin in nistatin. Bakterije *P. aeruginosa* so pokazale večjo občutljivost na samo elektroporacijo, za inaktivacijo so potrebovale nižjo jakost električnega

polja v primerjavi s bakterijami *S. epidermidis*. Dodatek mešanice antibiotikov pred elektroporacijo je pri obeh vrstah bakterij zmanjšal minimalno potrebno jakost električnega polja za dosego inaktivacije.

Vadlamani in sod. (2020) so pokazali, da elektroporacija omogoča inaktivacijo G– bakterij tudi z uporabo antibiotikov, ki običajno pri njih niso učinkoviti. Preizkusili so kombinacijo elektroporacije in antibiotikov na G– bakterijah *E. coli* (odpornih proti karbapenemom) in bakterijah *P. aeruginosa* (odpornih proti gentamicinu, streptomycinu in sulfonamidu) ter G+ bakterijah *S. aureus* (odpornih proti meticilinu, eritromicinu in tetraciklinu). Uporabili so šest različnih antibiotikov: vankomicin (zavira sintezo peptidoglikana), linezolid (zavira sintezo proteinov), rifampicin (zavira sintezo RNA), mupirocin (zavira sintezo proteinov), eritromicin (zavira sintezo proteinov) in fusidno kislino (zavira sintezo proteinov). Vsi delujejo predvsem proti G+ bakterijam, z izjemo rifampicina, ki ima širši spekter delovanja proti tako G+ kot G– bakterijam. Elektroporacija je omogočila inaktivacijo bakterij z antibiotiki pri koncentracijah, ki sicer niso bile učinkovite, največji učinek na inaktivacijo pa je sicer imelo povečanje jakosti električnega polja. Pri vseh preizkušenih bakterijah so najboljše rezultate dosegli v kombinaciji z antibiotiki, ki zavrejo sintezo proteinov ali RNA. Za bakterije *S. aureus* so bili najbolj učinkoviti linezolid, mupirocin in rifampicin. Elektroporacija je pri bakterijah *E. coli* izboljšala učinkovitost vseh testiranih antibiotikov, razen fusidne kisline, najboljše rezultate pa so dosegli z rifampicinom. Pri bakterijah *P. aeruginosa* sta bila v kombinaciji z elektroporacijo učinkovita le rifampicin in linezolid, kar pomeni, da so antibiotiki, primarno usmerjeni proti G+ bakterijam, ostali večinoma neučinkoviti. Slabšo inaktivacijo bakterij *P. aeruginosa* so pojasnili z manjo občutljivostjo na elektroporacijo in z nižjo občutljivostjo za antibiotike, saj gre za odporen sev z obsežnim slojem kapsule.

Preglednica 1: Pregled literature o kombinirani uporabi elektroporacije in antibiotikov za inaktivacijo bakterij. Povzeto po Lovšin in sod. (2021).

Raziskava	Bakterija	Antibiotik		Parametri elektroporacije				Maksimalni učinek (IN = inaktivacija; VI = viabilnost)
		Vrsta	Koncentracija	Dolžina pulza	Število pulzov	Amplituda pulza	Frekvence	
Korem in sod., 2018	<i>Staphylococcus aureus</i> (občutljiva za oksacilin)	Oksacilin	0,5×, 1× ali 2×MIK (MIK = 0,38 µg/ml)	100 µs	~50 pulzov 2,0 kV + ~50 pulzov 1,5 kV		1 Hz	Brez zaznane viabilnosti @ ≥ 0,5×MIK
Novickij in sod., 2018b	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Ciprofloksacin	1, 10, 100 ali 1000 µg/ml	100 µs	8	5, 10, 15 ali 20 kV/cm	1 kHz	< 25% VI @ 20 kV/cm, 1000 µg/ml
		Doksiciklin	1, 10, 100 ali 1000 µg/ml					< 3% VI @ 20 kV/cm, 1000 µg/ml
		Gentamicin	1, 10, 100 ali 1000 µg/ml					< 1% VI @ 15 kV/cm, 10 µg/ml
		Sulfametoksazol	1, 10, 100 ali 1000 µg/ml					< 5% VI @ 20 kV/cm, ≥ 1 µg/ml
		Vankomicin	1, 10, 100 ali 1000 µg/ml					< 16% VI @ 20 kV/cm, 1000 µg/ml
Vadlamani in sod., 2018	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tobramicin	0,2, 2 ali 20 µg/ml	300 ns	1000 pulzov 20 kV/cm, 445 pulzov 30 kV/cm ali 250 pulzov 40 kV/cm		1 Hz	> 5,5 log <sub>10</sub> IN @ 40 kV/cm, 20 µg/ml
	<i>Escherichia coli</i>							> 4,2 log <sub>10</sub> IN @ 30 kV/cm, 20 µg/ml
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Rifampicin	0,2, 2 ali 20 µg/ml					> 5,2 log <sub>10</sub> IN @ 30 kV/cm, 20 µg/ml
	<i>Escherichia coli</i>							> 8,5 log <sub>10</sub> IN @ 30 kV/cm, 20 µg/ml
Rubin in sod., 2019	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mešanica penicilina G (500-5000 enot/ml), streptomicina (0,5-5 mg/ml) in nistatinina (antimikotik, 62,5-625 enot/ml)		60 µs	200	≤ ~3,1 kV/cm	2.8 Hz	enaka IN pri ~30-45% nižji amplitudi
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					≤ ~3,8 kV/cm		enaka IN pri ~8-13% nižji amplitudi
Vadlamani in sod., 2020	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Mupirocin	2 ali 20 µg/mL	300 ns	500 pulzov 20 kV/cm ali 222 pulzov 30 kV/cm		1 Hz	do 6,5 log <sub>10</sub> IN
	<i>Escherichia coli</i>							do 4,5 log <sub>10</sub> IN
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							do 1,3 log <sub>10</sub> IN
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Rifampicin	2 ali 20 µg/mL					do 6,3 log <sub>10</sub> IN
	<i>Escherichia coli</i>							do 6,4 log <sub>10</sub> IN
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							do 2,1 log <sub>10</sub> IN
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Eritromicin	2 ali 20 µg/mL					do 4,8 log <sub>10</sub> IN
	<i>Escherichia coli</i>							do 4,4 log <sub>10</sub> IN
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							do 1,0 log <sub>10</sub> IN
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)		Vankomicin	2 ali 20 µg/mL					do 5,3 log <sub>10</sub> IN
	<i>Escherichia coli</i>							do 4,5 log <sub>10</sub> IN
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							do 1,4 log <sub>10</sub> IN

Martens in sod. (2020) so raziskovali kako PEF vpliva na občutljivost bakterij *E. coli* in *L. acidophilus* za antibiotike. Uporabili so 600-ns dolge pulze in tri različne jakosti električnega polja ter analizirali spremembe v občutljivosti bakterij, razvrščene glede na velikost inhibicisce cone po 24-urni inkubaciji, v kategorije odpornih, zmerno občutljivih ali občutljivih. Rezultati so pokazali povečano občutljivost za antibiotike pri obeh vrstah bakterij, največji vpliv pa je imela jakost električnega polja. Pred tretiranjem je bila bakterija *E. coli* zmerno občutljiva za kanamicin (zavira sintezo proteinov) in odporna proti tobramicinu (zavira sintezo proteinov), po elektroporaciji pa se je občutljivost za oba antibiotika povečevala z naraščanjem števila pulzov in/ali jakostjo električnega polja. Bakterija *L. acidophilus* je bila pred tretiranjem odporna proti vankomicinu (zavira sintezo peptidoglikana), po PEF tretiranju pa je postala zmerno občutljiva. Pri ampicilin-sulbaktamu (zavira sintezo celične stene) se je občutljivost po tretiraju spremenila iz zmerno občutljive v občutljivo. Zaključili so, da PEF povzroči poškodbe bakterijske celične stene, kar olajša prehod antibiotikov v celico in tako poveča občutljivost bakterij za antibiotike.

Kuyukina in sod. (2020) so preučevali kako elektroporacija vpliva na občutljivost G+ bakterije *Rhodococcus ruber* na antibiotike. Ugotovili so, da se sprememba občutljivosti razlikuje med testiranimi antibiotiki in, da ima pomemben vpliv čas okrevanja celic po elektroporaciji, preden so izpostavljene antibiotiku. Niso pa zaznali neposredne povezave med občutljivostjo bakterije *R. ruber* za antibiotik in molekulsko maso ali hidrofobnostjo antibiotika. Največjo povprečno spremembo občutljivosti so opazili pri cefazolinu (zavira sintezo celične stene), ki je imel primerljive rezultate pri vseh dolžinah okrevanja po elektroporaciji in pred izpostavitvijo antibiotiku (0, 2, 4 ali 24 h). Drugi je bil neomicin (zavira sintezo proteinov), pri katerem je občutljivost naraščala z daljšanjem časa okrevanja. Občutljivost se je izrazito povečala po 24-h okrevanju, kjer je  $\sim 2\times$  večja kot pri cefazolinu, kateri ima sicer večjo povprečno spremembo občutljivosti. Sledili so benzilpenicilin oz. penicilin G (zavira sintezo celične stene), z največjo učinkovitostjo po 4-h okrevanju, gentamicin (zavira sintezo proteinov), z največjo učinkovitostjo po 24-h okrevanju, klotrimazol (zavira sintezo celične stene pri glivah), z največjo učinkovitostjo po 24-h okrevanju, kanamicin (zavira sintezo proteinov), pa je imel skoraj neopazno povprečno spremembo občutljivosti.

Djukić-Vuković in sod. (2021) so preverjali vpliv PEF na dve probiotični bakteriji, *Lacticaseibacillus rhamnosus* in *Lacticaseibacillus paracasei*. Ugotovili so, da lahko z uporabo parametrov elektroporacije, ki sami po sebi ne povzročijo inaktivacije, izboljšamo lastnosti probiotičnih bakterij in spodbudimo sintezo probiotikov. Preučevali so tudi kako PEF vpliva na spremembo občutljivosti za antibiotike, saj se je pri tretiraju probiotikov potrebno preprečiti razvoj odpornosti, ki bi se preko probiotičnih živil lahko prenesle na gostiteljski mikrobiom. V nasprotju s prej omenjenima raziskavama, so zaznali zmanjšanje občutljivosti za antibiotik po tretiraju z PEF. Pri bakteriji *L. rhamnosus* se je občutljivost zmanjšala le za kloramfenikol, medtem ko so pri bakteriji *L. paracasei* opazili zmanjšano občutljivost za štiri antibiotike: kloramfenikol, penicilin G, eritromicin in tetraciklin. Sprememba občutljivosti je bila enaka takoj 12,5 min kot 30 min po elektroporaciji, kar nakazuje, da je za spremembo občutljivosti morda bolj kot povečana prepustnost membrane, pomemben nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki vodijo v spremembe transkripcije genov in presnovnih poti.

Preglednica 2: Pregled literature o kombinirani uporabi elektroporacije in antibiotikov za spremembo občutljivosti bakterij za antibiotike.

Raziskava	Bakterija	Antibiotik	Dolžina pulza	Parametri elektroporacije			Sprememba občutljivosti
				Število pulzov	Amplituda pulza	Frekvenca	
Martens in sod., 2020	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicin	600 ns	1, 5, 10, 100 ali ali kV/cm	13,5 ali 18,5 ali 23,5 kV/cm	1 Hz	Zmerno občutljiva → občutljiva @ 1000×600 ns 13,5 kV/cm, 5×600 ns 18,5 kV/cm in 10×600 ns 23,5 kV/cm
		Tobramicin		1000			Odporna → zmerno občutljiva @ 1000×600 ns 18,5 kV/cm
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Vankomicin					Odporna → občutljiva @ 100×600 ns 23,5 kV/cm
		Ampicilin/sulbaktam					Odporna → zmerno občutljiva @ 1000×600 ns 13,5 ali 18,5 kV/cm, ter 5×600 ns 23,5 kV/cm
Kuyukina in sod., 2020	<i>Rhodococcus ruber</i>	Benzilpenicilin	/	/	9 ali 12,5 kV/cm	/	Povprečno zvišanje občutljivosti za 13,16 %
		Cefazolin					Povprečno zvišanje občutljivosti za 26,49 %
		Klotrimazol					Povprečno zvišanje občutljivosti za 7,76 %
		Neomicin					Povprečno zvišanje občutljivosti za 20,42 %
		Gentamicin					Povprečno zvišanje občutljivosti za 10,71 %
		Kanamicin					Nezaznavno
Djukić-Vuković in so., 2021	<i>L. rhamnosus</i>	Eritromicin	100 µs	8 ali 20	5 kV/cm	1 Hz	Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Znižana občutljivost @ 20 pulzov
	<i>L. rhamnosus</i>	Tetraciklin					Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Znižana občutljivost @ 20 pulzov
	<i>L. rhamnosus</i>	Kloramfenikol					Znižana občutljivost @ 20 pulzov
	<i>L. paracasei</i>						Znižana občutljivost @ 20 pulzov
	<i>L. rhamnosus</i>	Penicilin G					Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Znižana občutljivost @ 20 pulzov
	<i>L. rhamnosus</i>	Cefaleksin					Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Ni sprememb
	<i>L. rhamnosus</i>	Gentamicin					Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Ni sprememb
	<i>L. rhamnosus</i>	Kanamicin					Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Ni sprememb
	<i>L. rhamnosus</i>	Streptomicin					Ni sprememb
	<i>L. paracasei</i>						Ni sprememb

Dosedanje študije kombinira ne uporabe elektroporacije in antibiotikov so se večinoma osredotočale na doseganje maksimalne učinkovitosti (povečanje občutljivosti ali inaktivacije), ne da bi podrobnejše raziskale, zakaj so določene kombinacije bolj učinkovite kot druge. Manjka globlji, sistematičen pristop k razumevanju, kako način delovanja antibiotika vpliva na stopnjo potenciacije učinka, pri čemer je ključno izhodišče minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika. Do sedaj so tak pristop uporabili le Korem in sod. (2018), ki pa so testirali le en antibiotik. Večina drugih študij enotno uporablja enake masne koncentracije za vse testirane antibiotike (Novickij in sod., 2018b, 2018a; Vadlamani in sod., 2018, 2020), ne da bi upoštevali njihovo specifično učinkovitost, kar otežuje primerjavo med antibiotiki, saj se uporabljeni koncentraciji antibiotikov lahko razlikujejo od tistih, ki se uporablajo v klinični ali veterinarski praksi. Poleg tega študije pogosto uporablajo parametre elektroporacije, ki so že samostojno zelo učinkoviti in/ali povzročajo dodatne učinke (npr. segrevanje in močne elektrokemijske reakcije), kar zamegljuje razumevanje vpliva same permeabilizacije. Nadalje ostaja vprašanje kako sestava celične stene bakterij vpliva na potenciacijo učinka antibiotikov z elektroporacijo. Čeprav so nekatere študije primerjale učinke na različne bakterije (Vadlamani in sod., 2018, 2020; Rubin in sod., 2019; Martens in sod., 2020), je primerjava mehanizmov potenciacije med G+ in G– bakterijami otežena zaradi razlik v obliki in velikosti celic, ki pomembno vplivajo na učinkovitost same elektroporacije. Problem so naslovili le Martens in sod. (2020), ki so analizirali spremembo občutljivosti za antibiotike pri G– bakterijah *E. coli* ter G+ bakterijah *L. acidophilus*, ki so podobne oblike in velikosti.

## 2.6 UPORABA ELEKTROPORACIJE ZA INAKTIVACIJO MIKROORGANIZMOV

Elektroporacija je izredno vsestranska metoda, ki se uporablja pri različnih bioloških sistemih: evkariotskih celicah, mikroorganizmih, arhejah in tudi pri drugih lipidnih sistemih, kot so vezikli. Ta univerzalnost omogoča njeni široko uporabo v medicini, industriji in okoljskih tehnologijah. Elektroporacija mikroorganizmov se lahko uporablja za njihovo inaktivacijo, ekstrakcijo ali vnos različnih molekul ter izboljšanje proizvodnje presnovkov.

V živilski tehnologiji se elektroporacija uporablja za inaktivacijo mikroorganizmov v tekočinah, kot so sokovi, fermentirane pijače, mleko, mlečni izdelki in pivo. Raziskave se pogosto usmerjajo v uporabo kombinacije z drugimi metodami, kot so ultravijolična svetloba, plazma, visok pritisk, ultrazvok, pulzirajoča svetloba, protimikrobne snovi ali temperatura. Še posebej obetavna je pri obdelavi beljakovinske hrane, kjer dosega primerljive ravni inaktivacije bakterij kot topotna pasterizacija, a z manjšim vplivom na hranile in senzorične lastnosti hrane (Martín-Belloso in Sobrino-López, 2011; Garner, 2019).

Čiščenje odpadnih voda temelji predvsem na fizikalnih metod, kot so ultrasonikacija, elektroporacija, ultravijolična svetloba in ozonacija, saj vsako dodajanje kemikalij pomeni dodatno onesnaženje. Prednost uporabe elektroporacije za čiščenje voda je predvsem njeni univerzalni učinkovitosti proti različnim mikroorganizmom (Rieder in sod., 2008; Gusbeth in sod., 2009; Kotnik in sod., 2015; Eleršek in sod., 2020). Za razliko od kloriranja, ki lahko ustvari genotoksične kloride (Emmanuel in sod., 2004), elektroporacija tudi pri visokih amplitudah in daljših protokolih ne povečuje genotoksičnosti (Gusbeth in sod., 2009). Odpadne

vode vsebujejo tudi zdravila, vključno z antibiotiki. Elektroporacija bi lahko ob neposrednem učinku na inaktivacijo bakterij omogočila tudi sinergistični učinek pri reverzibilno elektroporiranih bakterijah, s čimer bi lahko povečali učinkovitost že prisotnih antibiotikov. To bi omogočilo boljše izkoriščanje obstoječega onesnaženja vode z antibiotiki za učinkovitejšo inaktivacijo bakterij.

Uporaba elektroporacije za inaktivacijo mikroorganizmov v medicini je zaenkrat še vprašljiva, zlasti zaradi možnosti poškodb gostiteljskega tkiva. Kot je že bilo omenjeno, so evkariotske celice precej večje od bakterijskih, zato bi ob uporabi visokega električnega polja, potrebnega za inaktivacijo bakterij, poškodovali tudi okoliško tkivo. Kot potencialno uporabo elektroporacije v medicini se omenja predvsem lokalno zdravljenje površinskih okužb (Golberg in sod., 2015; Novickij in sod., 2018c), kjer bi kombinacija elektroporacije in antibiotikov izboljšala njihovo delovanje. Elektroporacija bi v tem primeru prispevala k delnemu uničenju biofilma, kar bi omogočilo večjo difuzijo antibiotikov do bakterij, in olajšala prenos antibiotikov v bakterije.

## 2.7 ELEKTROPORACIJA IN IZTEKANJE CELIČNE VSEBINE

Mikroorganizmi, vključno z bakterijami, kvasovkami in mikroalgami, predstavljajo pomemben vir različnih molekul, ki so ključne za industrijo, farmacijo in medicinske namene. Tradicionalni pristopi k izolaciji teh molekul temeljijo na celični lizi, ki pogosto povzroči kontaminacijo z neželenimi molekulami, večjimi celičnimi ostanki in znotrajceličnimi strukturami, zaradi česar so potrebni dodatni postopki čiščenja. Uporaba kemikalij, visokih temperatur in vrednosti pH lahko poškoduje tudi občutljive molekule, kot so DNA, RNA in proteini, ki jih želimo izolirati (Matos in sod., 2013). Povečanje prepustnosti membrane pri elektroporaciji omogoči prehajanje različnih molekul preko membrane v celico in iz nje, kar je ključno za procese kot so elektroekstrakcija, elektrotransformacija, inaktivacija mikroorganizmov in sušenje biomase (Kotnik in sod., 2015).

Elektroekstrakcija omogoča hitro ekstrakcijo molekul pri nizki porabi energije, brez uporabe kemikalij in z minimalno kontaminacijo s celičnimi ostanki, kar omogoča čistejše vzorce (Kotnik in sod., 2015). Z optimizacijo parametrov elektroporacije in uporabo ustreznih napetosti lahko do neke mere tudi uravnavamo nivo permeabilizacije in specifični transport molekul preko membrane (Matos in sod., 2013; Demiryurek in sod., 2015). Uporabna je tudi za tretiranje majhnih volumnov vzorcev v povezavi z mikročipi, kjer majhen razmik med elektrodama omogoča hitro obdelavo pri nizkih napetostih brez potrebe po dodatnih reagentih. To izboljša zanesljivost in možnost detekcije molekul, zlasti proteinov, ki jih za razliko od DNA pred analizo ne moremo pomnožiti (Rockenbach in sod., 2019). Za učinkovit vnos različnih molekul v celice se pogosto uporablja protokol z dvema pulzoma, pri čemer prvi (kratek pulz z visoko napetostjo) zagotavlja elektropermeabilizacijo, drugi (daljši pulz z nizko napetostjo) pa podaljša prepustnost membrane in omogoča elektroforezno delovanje na večje električno nabite molekule (Demiryurek in sod., 2015). Ta pristop izboljša učinkovitost vnosa molekul v celico in ohranja živost celic.

Velik vpliv na transport molekul pod vplivom elektroporacije imata velikost in električni naboje molekul. Majhne molekule lahko prosto prehajajo preko membrane med in po dovedenih pulzih, ter skozi membranske regije, ki imajo dovolj visoko negativno ali pozitivno transmembransko napetost. Pri nabitih molekulah je transport v času trajanja pulza predvsem posledica elektroforezne sile in poteka predvsem na strani celice z nasprotno polarnostjo transmembranske napetosti, po pulzu pa je predvsem posledica difuzije in poteka iz obeh smeri. Večje ali večkratno nabite molekule lahko membrano prehajajo le v času trajanja pulza, pri še večjih molekulah, predvsem DNA, pa so za transport preko membrane potrebni dolgi pulzi, ki zagotovijo zadostno elektroforezno silo za poteg skozi membrano (Kotnik in sod., 2019). Pomemben parameter pri elektroekstrakciji je temperatura, saj lahko z njo podaljšamo permeabilizirano stanje celic in s tem povečamo ekstrakcijo. Največji izkoristek dobimo, če po elektroporaciji celice inkubiramo pri nizkih temperaturah, ki upočasnijo zapiranje por in popravilo poškodb (Haberl-Meglič in sod., 2016). Blago segrevanje (40 do 45 °C) sicer poveča fluidnost membrane, kar vodi v večji privzem DNA in njeno izražanje, vendar lahko hkrati zmanjša viabilnost celic (Donate in sod., 2015), ali poveča tveganje za denaturacijo temperaturno občutljivih proteinov.

Elektroporacija ima dober potencial za izolacijo DNA, saj zanjo ne potrebujemo kemikalij, uporabna je pri G+ in G- bakterijah, mogoče jo je kombinirati z nekaterimi nadaljnji postopki detekcije in hibridizacije, pri dovolj močnih pulzih pa omogoči tudi lizo celic in sprostitev celotne celične vsebine (Vitzthum in sod., 2000). Kljub široki uporabnosti se je pokazalo, da je učinkovitost v večini primerov nižja pri G+ bakterijah, zaradi njihove debele in goste celične stene, ki otežuje prehod večjih molekul (Xue in sod., 1999). Uporaba elektroporacije za transport plazmidne DNA (pDNA) preko bakterijske stene se še vedno uporablja predvsem za elektrotransformacijo, saj je pri izolaciji pDNA dolgo veljalo, da je elektroekstrakcija manj učinkovita, kot na primer izolacija z alkalno lizo. Kasneje se je izkazalo, da lahko z ustrezno optimizacijo elektroporacijskih parametrov dosežemo primerljive ali celo boljše rezultate (Haberl in sod., 2013a). Za izolacijo genomske DNA (gDNA) je potrebna popolna liza celic, pri čemer se običajno uporablja visoke jakosti električnega polja, za kar potrebujemo vzorec z nizko ionsko jakostjo in visoko upornostjo. Pri uporabi nizkih jakosti električnega polja pa je za uspešno izolacijo DNA potrebna uporaba večjega števila pulzov, s čimer se podaljša čas iztekanja DNA (Vitzthum in sod., 2000).

V primerjavi z nekaterimi drugimi metodami izolacije proteinov se lahko z optimizacijo parametrov elektroporacije izognemo popolni lizi celic, kar zmanjša prisotnost nečistoč, kot so ostali proteini in DNA (Eleršek in sod., 2020; Haberl-Meglič in sod., 2020; Schottroff in sod., 2021). Je pa učinkovitost elektroekstrakcije večinoma nižja v primerjavi z drugimi uveljavljenimi metodami (Haberl-Meglič in sod., 2016; Haberl-Meglič in sod., 2020), ki tudi imajo svoje pomanjkljivosti, kot so visoki stroški, toksičnost kemikalij, potreba po njihovi hitri nevtralizaciji ali razredčenju, različna občutljivost bakterij in dolgotrajen proces ekstrakcije. Pri fizikalnih metodah pa so glavne pomanjkljivosti fragmentacija ali denaturacija proteinov, neselektivna izolacija, segrevanje in težavna obdelava velikih volumnov. Elektroekstrakcija nudi prednosti, kot so hitra obdelava (nekaj sekund), ponovljivost, možnost uporabe v pretočnem sistemu in enostavna implementacija v že obstoječih proizvodnih linijah. Ključna je

optimizaciji parametrov elektroporacije za izolacijo tarčnih molekul brez prekomerne razgradnje celic (Haberl-Meglič in sod., 2016) (Schottroff in sod., 2021). Poleg tega lahko elektroporacija spodbudi sintezo tarčnega produkta (npr. povečana sinteza mlečne kisline pri probiotičnih bakterijah), kar dodatno izboljša učinkovitost elektroekstrakcije (Djukić-Vuković in sod., 2021).

Do iztekanja celične vsebine prihaja tudi pri uporabi elektroporacije za namen inaktivacije bakterij. V primeru čiščenja odpadnih voda z elektroporacijo bi tako prišlo tudi do iztekanja DNA, ki bi lahko bila vir za vnos v druge bakterije in s tem vir horizontalnega genskega prenosa (HGT). Poleg tega v naravi obstajajo tudi abiotiki mehanizmi HGT, elektroporacijo bi npr. v naravi lahko povzročali udari strele v vodna okolja (Kotnik in Weaver, 2016). S tem bi prišlo tako do ireverzibilne kot reverzibilne poracije bakterij, pri čemer bi se iz ireverzibilno poriranih sprostila njihova celična vsebina, med drugim tudi DNA. Stabilnost izločene DNA v okolju je odvisna od številnih dejavnikov, kot so: prisotnost nukleaz (v zemlji in vodnih okoljih), temperatura (nižje temperature upočasnijo razpadanje DNA), vsebnost soli (visoke koncentracije upočasnijo razpadanje DNA), vrednost pH in druge (Nagler in sod., 2018; Zulkefli in sod., 2019). V primeru večjih količin izločene bakterijske DNA in njene daljše obstojnosti, bi lahko prišlo do povečanja HGT, kar bi posledično lahko povečalo razširjenost odpornosti proti antibiotikom med bakterijami, še posebej v okoljih, kot so odpadne vode.

## 2.8 ELEKTROPORACIJA IN POŠKODBE DNA

Raziskave vpliva elektroporacije na strukturo in poškodbe DNA se večinoma osredotočajo na poškodbe DNA v evkariotskih celicah pri elektrokemoterapiji. Vendar pa vprašanje, ali električni pulzi vplivajo na DNA neposredno ali posredno, še ni popolnoma razjasnjeno (Batista Napotnik in sod., 2021). Elektroporacija izolirane genomske DNA je pokazala, da pri uporabi parametrov ireverzibilne elektroporacije, kakršni se pogosto uporabljajo v medicini, pride do poškodb DNA. Pri tretiranih vzorcih je bila jakost signala na agaroznem gelu zmanjšana, prav tako je prišlo do razpotegnenosti signala. Ta učinek se je večal z višanjem jakosti električnega polja (0,25-25 kV/cm), daljšanjem trajanja pulzov (1-100 ms) in večanjem števila pulzov (5-150). Obratno pa so se poškodbe DNA manjšale z višanjem frekvence dovajanja pulzov (0,5-10 Hz), kar bi lahko bilo povezano z relaksacijskim časom DNA molekul. Pri uporabi pulzov, ki so krajsi od 1 ms, pa do poškodb DNA ni prišlo (Golberg in Rubinsky, 2010).

Pri elektroporaciji bakterij do poškodb DNA ne prihaja, če uporabimo nizke jakosti električnega polja (pod 60 V/cm). Taki pogoj omogoča, da ostane izolirana DNA nespremenjena in z visoko molekulsko maso, kar je ugodno za nadaljnje genomske študije (Vitzthum in sod., 2000). Vprašanje pa je, kako na strukturo DNA vplivajo višje jakosti električnega polja, ki se uporabljajo pri metodah inaktivacije bakterij in bakterijskih spor, ter pri transformaciji nekaterih bakterij, ki za elektropermeabilizacijo potrebujejo višje jakosti. Pri teh pride tudi do segrevanja in elektrokemijskih reakcij, ki preko nastanka prostih radikalov prav tako povzročijo razpad DNA. Pri uporabi električne razelektritve, prihaja tudi do nastanka plazme in mehanskega tlachenega vala (Pillet in sod., 2016b), kar prav tako vodi v poškodbe genomske DNA (Lamarche in sod., 2018). Pomemben vpliv ima tudi material elektrod, saj pri

elektroporaciji prihaja do sproščanja kovinskih ionov iz elektrod, ti pa se lahko vežejo na molekule DNA ter sprožijo konformacijske spremembe in prelome (Golberg in Rubinsky, 2010).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Bakterijski izolati

V doktorskem delu smo uporabili gramnegativno bakterijo *Escherichia coli* K12 ER1821 (New England BioLabs, Ipswich, MA, ZDA) in grampozitivno bakterijo *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (Orla-Jensen, Bergey in sod.: ATCC 14917), zdaj preimenovan v *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* (Zheng in sod., 2020).

Pri izboru nepatogenih predstavnikov G- in G+ bakterij, ki niso odporne proti antibiotikom, smo posebno pozornost namenili izboru bakterij z najbolj podobno obliko in velikostjo celic. Ta pristop je ključen za bolj natančno in primerljivo ocenjevanje učinkovitosti elektroporacije, saj oblika in velikost celic bistveno vplivata na njihovo občutljivost za to metodo. Za potrebe raziskave smo iz naše bakterijske zbirke izbrali sev *E. coli*, za modelno G+ bakterijo, pa smo izbrali *L. plantarum*. Obe bakteriji sta paličaste oblike, so pa celice *E. coli* vseeno nekoliko manjše ( $2 \times 0,5 \mu\text{m}$ ) (Britannica, b. l.) v primerjavi z *L. plantarum* ( $0,9-1,2 \times 3-8 \mu\text{m}$ ) (Landete in sod., 2010).

##### 3.1.2 Gojišča

###### 3.1.2.1 Priprava trdnih gojišč

Za pripravo trdnih gojišč LB (Luria-Bertani) smo v deionizirani vodi raztopili 35 g/l gojišča, avtoklavirali 15 minut pri 121 °C, gojišče ohladili in razlili v plastične petrijevke.

Za pripravo trdnih gojišč MRS (de Man, Rogosa in Sharpe) smo v deionizirani vodi raztopili 61,15 g/l gojišča, avtoklavirali 15 minut pri 121 °C, gojišče ohladili in razlili v plastične petrijevke.

Za pripravo trdnih gojišč LB z antibiotiki smo najprej pripravili osnovno gojišče LB kot je opisano zgoraj. Ko se je gojišče nekoliko ohladilo pa smo dodali ustrezne količine antibiotikov (za določanje minimalne inhibitorne koncentracije), premešali in razlili v plastične petrijevke.

###### 3.1.2.2 Priprava tekočih gojišč

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 20 g/l gojišča LB in ga sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

Za pripravo tekočih gojišč MRS smo v deionizirani vodi raztopili 51 g/l gojišča MRS in ga sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C.

Za pripravo tekočih gojišč MRS z antibiotiki smo najprej pripravili osnovno gojišče MRS, kot je opisano zgoraj. Ko se je gojišče nekoliko ohladilo pa smo dodali ustrezne količine antibiotikov (za določanje minimalne inhibitorne koncentracije).

### 3.1.3 Pufri

Pri elektroporaciji smo uporabili dva različna pufra:

- 250 mM saharoza:
  - 42,7875 g saharoze;
  - dH<sub>2</sub>O do 500 ml.
- 250 mM saharoza z NaCl:
  - 42,7875 g saharoze;
  - dH<sub>2</sub>O do 500 ml;
  - ~ 10 ml 0,9 % NaCl (končna prevodnost ~300 µS/cm).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje bakterij

Za pripravo prekonočne kulture smo eno kolonijo iz trdnega gojišča nacepili v 50 ml tekočega gojišča ali dodali kulturo, ki je bila shranjena pri -80 °C (bakterijske celice z gojiščem in glicerolom). Inkubirali smo preko noči pri 37 °C ob stalnem stresanju.

Vsi poskusi so bili izvedeni na kulti v srednji logaritemski fazi, zato smo najprej določili rastni krivulji za obe bakterijski vrsti. Prekonočno kulturo smo precepili v sveže gojišče in inkubirali pri 37 °C s stresanjem. Vsako uro smo izmerili OD<sub>600</sub> (optična gostota pri 600 nm), ter del kulture uporabili za določitev števila kolonij na ml (CFU/ml; iz angl.: »colony forming units per ml«). Iz dobljenih podatkov smo izrisali rastne krivulje ter določili srednjo logaritemsko fazo.

Za poskuse smo prekonočni kulti izmerili OD<sub>600</sub> in ustrezeno količino precepili v sveže gojišče. Začetni OD<sub>600</sub> pri *E. coli* je bil 0,01, pri *L. plantarum* pa 0,3. Bakterije smo nato inkubirali pri 37 °C ob stalnem stresanju do srednje logaritemsko faze (~3,5 h za *E. coli* in ~3 h za *L. plantarum*).

### 3.2.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije

Za določitev minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK) smo uporabili protokol, ki ga je opisala Andrews (2001), z nekaj spremembami.

V naših raziskavah smo uporabili ampicilin, tetraciklin in ciprofloxacin. Ampicilin je β-laktamski antibiotik s širšim spektrom delovanja, ki zavira delovanje peptidoglikanskih transpeptidaz in s tem ustavi sintezo celične stene. Pri nadaljnji rasti bakterije zato pride do

vdora vode, kar vodi v citolizo (Wright, 1999). Tetraciklin zavira sintezo proteinov preko vezave na 16S rRNA v 30S ribosomski podenoti, kar ovira vezavo aminoacil tRNA med elongacijo. Gre za antibiotik s širšim spektrom delovanja, ki ima bakteriostatični učinek, pri nekaterih vrstah pa lahko tudi baktericidni (Chopra in Roberts, 2001). Ciprofloksacin je fluorokinolon, ki zavira sintezo DNA preko zaviranja giraze in topoizomeraze IV (Campoli-Richards in sod., 1988).

### 3.2.2.1 Določanje minimalnih inhibitornih koncentracij za bakterije *E. coli*

Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotikov za bakterije *E. coli* smo določali na trdnih gojiščih LB z različnimi koncentracijami antibiotika od 1 µg/ml do 100 µg/ml, vključno z vmesnimi koncentracijami 2, 2.5, 5, 10, 20, 30 µg/ml itd. Na pripravljena gojišča smo nato nanesli bakterijske kulture. Pri ciprofloksacinu smo, glede na priporočen razpon (tabela 2 v Andrews, 2001) in ob predpostavki, da sev ni odporen, testirali koncentracije od 0,0025 µg/ml do 1 µg/ml. Minimalno inhibitorno koncentracijo smo določili kot najnižjo koncentracijo antibiotika, pri kateri nismo opazili vidne rasti po inokulaciji z ne-redčeno kulturo.

### 3.2.2.2 Določanje minimalnih inhibitornih koncentracij za bakterije *L. plantarum*

Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotikov za bakterije *L. plantarum* smo določali v tekočih gojiščih MRS<sup>1</sup> z različnimi koncentracijami antibiotika in bakterijsko kulturo z gostoto 10<sup>5</sup> CFU/ml. Vsi vzorci so bili narejeni v duplikatih. Za ampicilin smo testirali koncentracije 1, 2, 3,... in 40 µg/ml ter za tetraciklin 1, 2, 3,... in 10 µg/ml. Pri ciprofloksacinu so bile začetno izbrane koncentracije prenizke (0,3 do 1 µg/ml), zato smo testirali še koncentracije do 100 µg/ml. S čitalcem mikrotitrnih plošč (Tecan Infinite M200, Tecan, Avstrija) smo en dan vsako uro merili OD<sub>600</sub> pri 37 °C z občasnim stresanjem in iz dobljenih podatkov pridobili rastne krivulje za vsako koncentracijo antibiotika. Kot minimalno inhibitorno koncentracijo smo določili najnižjo koncentracijo antibiotika pri kateri nismo opazili vidne rasti (ni prišlo do dviga OD<sub>600</sub>).

## 3.2.3 Priprava vzorca

Pri poskusih smo uporabili bakterije v srednji logaritemski fazi. Po inkubaciji smo bakterijsko kulturo centrifugirali 15 min pri 4 248 g in 4 °C, odstranili ves supernatant in celice resuspendirali v 250 mM saharozu. V primeru da smo celice centrifugirali v velikih centrifugirkah (200 ml) smo celice vmes še 1× sprali s 250 mM saharozo, saj je drugače ostalo nekaj gojišča, kar je zvišalo prevodnost vzorca. 250 mM sahariza se pogosto uporablja kot elektroporacijski medij (Haberl in sod., 2013b; Miklavcic in sod., 2020; Sachdev in sod., 2020), saj ima nizko ionsko jakost (nizka prevodnost vzorca) in osmolarnost 250 mOsmol/L (za

---

<sup>1</sup> V času, ko smo začeli s poskusi na naši drugi bakteriji *L. plantarum*, smo imeli za določitev MIK možnost uporabe čitalca mikrotitrnih plošč, kar je precej hitrejša metoda. Smo pa s to metodo še enkrat določili MIK ciprofloksacina pri *E. coli*, kjer smo dobili primerljive rezultate, kot pri metodi z uporabo trdnih gojišč.

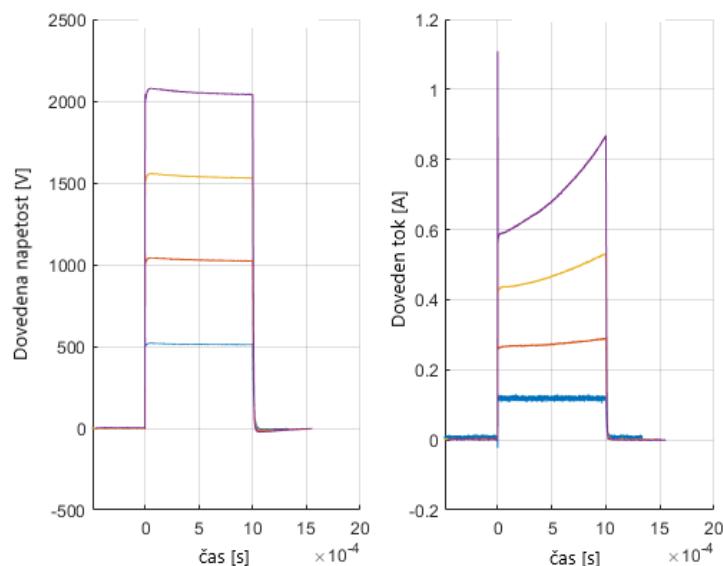
primerjavo, osmolarnost fiziološke raztopine je 308 mOsmol/L (sodium chloride injection, solution, B. Braun Medical Inc.), osmolarnost krvne plazme pa med 275 in 295 mOsmol/L (Shah in Mandiga, 2020). Končna koncentracija bakterij je bila  $\sim 10^8$  CFU/ml.

### 3.2.3.1 Priprava vzorcev z različnimi koncentracijami antibiotika

Najprej smo pripravili 3 ml 250 mM saharoze z 2× željene končne koncentracije antibiotika. Za kontrolo smo uporabili 250 mM saharozo brez dodanega antibiotika. Tem raztopinam smo nato dodali 3 ml pripravljene bakterijske kulture s saharozo.

### 3.2.4 Tretiranje s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov

Elektroporacijo smo izvedli z uporabo HVP-VG generatorja pravokotnih pulzov (IGEA, Carpi, Italija). Vsi poskusi so bili izvedeni pri sobni temperaturi ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ).  $140\text{ }\mu\text{l}$  vzorca smo vnesli med dve ploščati elektrodi iz nerjavečega jekla z razmikom 1 mm (Peter Vahtar s.p., Slovenija) in dovedli 1 pravokoten električni pulz dolžine 1 ms. Dovedene napetosti so bile 500, 1000, 1500 in 2000 V, s čimer smo dobili amplitudo električnega polja v velikosti 5, 10, 15 in 20 kV/cm. Dejanska dovedena napetost je prikazana na sliki 1 in je bila izmerjena z osciloskopom LeCroy HDO4104A in napetostno sondjo HVD3206A (Teledyne Technologies, Thousand Oaks, CA, ZDA). Za nadaljnjo analizo smo uporabili  $100\text{ }\mu\text{l}$  vzorca. Med vzorci z različno koncentracijo antibiotika smo elektrode sprali s sterilno  $\text{dH}_2\text{O}$ .



Slika 1: Dovedene napetosti in tok pri jakostih električnega polja 5 (modra), 10 (oranžna), 15 (rumena) in 20 kV/cm (vijolična). Vzrok za naraščanje toka pri stalni jakosti električnega polja je povečevanje električne prevodnosti suspenzije z bakterijami, ki je posledica postopnega zviševanja temperature, dodatno pa lahko tudi iztekanja znotrajcelične vsebine, ki ima višjo električno prevodnost od medija.

Poskuse na bakterijah *L. plantarum* je izvedla Polona Komel v okviru svoje magistrske naloge (mentorica: izr. prof. dr. Anja Klančnik). Po navodilih je izvedla pripravo vzorcev, elektroporacijo, določanje inaktivacije bakterij ter inhibicijo rasti pri 37 °C. Za svojo magistrsko naložo je izvedla lastno statistično analizo rezultatov.

### 3.2.4.1 Uporaba elektroporacije in antibiotikov pri bakterijah *E. coli*

100 µl vzorca po elektroporaciji smo takoj dodali enak volumen gojišča LB (za kontrolo brez tretmaja in kontrole kjer smo uporabili le elektroporacijo) ali gojišča LB z ustrezeno koncentracijo antibiotika (za kontrole kjer smo uporabili le antibiotik in vse kombinirane tretmaje). Vzorci so bili nato inkubirani pri sobni temperaturi < 1 min (brez inkubacije), 60 min, 160 min ali 24 h.

### 3.2.4.2 Uporaba elektroporacije in antibiotikov pri bakterijah *L. plantarum*

100-µl vzorca po elektroporaciji smo takoj dodali enak volumen gojišča MRS (za kontrolo brez tretmaja in kontrole kjer smo uporabili le elektroporacijo) ali gojišča MRS z ustrezeno koncentracijo antibiotika (za kontrole kjer smo uporabili le antibiotik in vse kombinirane tretmaje). Vzorci so bili nato inkubirani pri sobni temperaturi 1 h ali 24 h (glede na rezultate, ki smo jih dobili pri bakterijah *E. coli*, smo izbrali le dva časa inkubacije).

## 3.2.5 Določanje stopnje inaktivacije bakterij

Po inkubaciji pri sobni temperaturi smo vzorce serijsko redčili v 0,9 % NaCl in za vsako redčitev odpipetirali po tri 10 µl kapljice na ustrezeno trdno gojišče (LB ali MRS) brez antibiotika. Ko so se kapljice posušile smo plošče inkubirali pri 37 °C čez noč (*E. coli*) ali dva dneva (*L. plantarum*). Pri redčitvah kjer smo dobili števne kolonije (stevilo kolonij na eno kapljico je bilo med 3 in 30) smo izračunali povprečno število kolonij in izračunali CFU/ml. Stopnja inaktivacije je bila izračunana kot  $\log_{10}(N/N_0)$ , kjer  $N$  predstavlja CFU/ml vzorca in  $N_0$  CFU/ml kontrole brez tretmaja. V nadaljevanju bo  $\log_{10}$  obravnavan kot log.

Sinergistični učinek kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika smo izračunali po enačbi 1. Od inaktivacije, dobljene s kombiniranim tretiranjem, smo odšteli inaktivacijo dobljeno samo z elektroporacijo (EP) pri enakem električnem polju in inaktivacijo dobljeno samo z antibiotikom (AT) v enaki koncentraciji.

$$\text{Sinergistični učinek} = \text{inaktivacija}_{\text{KOMBINACIJA}} - \text{inaktivacija}_{\text{EP}} - \text{inaktivacija}_{\text{AT}} \quad \dots (1)$$

Naklon krivulj smo izračunali kot spremembo v sinergističnem učinku glede na spremembo električnega polja. Naklone smo izračunali za vsak del krivulje posebej: pri posamezni bakteriji in pri posameznem antibiotiku, smo za vsako koncentracijo antibiotika izračunali naklone med 5 in 10 kV/cm, 10 in 15 kV/cm ter 15 in 20 kV/cm.

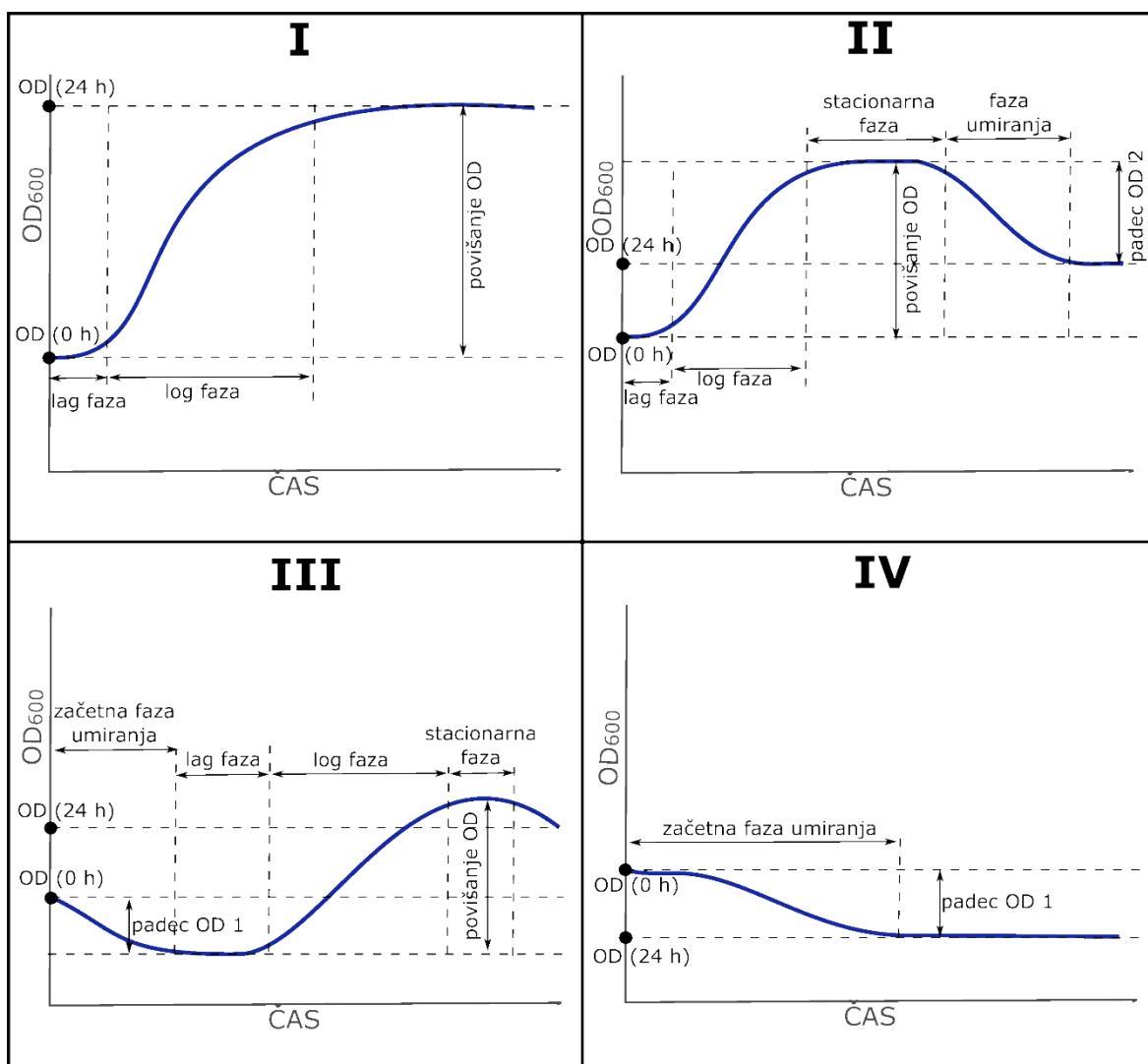
## 3.2.6 Določanje rastne dinamike bakterij *L. plantarum* po tretiranju

Po tretiranju in inkubaciji vzorcev pri sobni temperaturi smo 110 µl odpipetirali na mikrotitrno ploščo in s čitalcem en dan vsako uro merili OD<sub>600</sub>, pri sobni temperaturi ali 37 °C, z občasnim mešanjem. Iz izmerjenih podatkov smo dobili rastne krivulje, iz katerih smo nato pridobili

naslednje podatke (prikazani tudi na sliki 2): različne faze rasti (začetna faza umiranja, lag faza, logaritemska faza, stacionarna faza, faza umiranja), OD (0 h) (OD<sub>600</sub> na začetku meritev), OD (24 h) (OD<sub>600</sub> na koncu meritev), padec OD 1 (razlika med OD<sub>600</sub> na začetku meritev in najnižjim OD<sub>600</sub> pred začetkom rasti), povečanje OD (razlika med maksimalnim OD<sub>600</sub> in OD<sub>600</sub> na začetku logaritemske faze), padec OD 2 (razlika med OD<sub>600</sub> na koncu meritev in najvišnjim OD<sub>600</sub> pred začetkom faze umiranja). Zamik log faze je bil določen kot dolžina lag faze ali vsota lag faze in začetne faze umiranja. Specifična stopnja rasti  $\mu$  je bila izračunana kot stopnja naraščanja biomase populacije celic na enoto koncentracije biomase na linearinem delu krivulje :

$$\mu = \frac{\text{končni } OD_{600} - \text{začetni } OD_{600}}{t \times \text{začetni } OD_{600}} \quad \dots (2)$$

Začetni OD<sub>600</sub> je OD<sub>600</sub> na začetku linearnega dela krivulje, končni OD<sub>600</sub> je OD<sub>600</sub> na koncu linearnega dela krivulje in t je čas med temo dvema meritvama. Glede na obliko smo rastne krivulje v grobem razdelili v štiri kategorije (prikazane na sliki 2). Krivulje tipa I so imele običajno obliko rastne krivulje, pri krivuljah tipa II je v času meritev stacionarni fazi sledila tudi faza umiranja s padcem OD<sub>600</sub>, pri krivuljah tipa III je prisotna začetna faza umiranja, ki ji sledi faza rasti, pri krivuljah tipa IV pa ne zaznamo rasti (ali popolna inhibicija rasti ali celo faza umiranja).



Slika 2: Kategorije rastnih krivulj in parametri, ki smo jih uporabili pri analizah.

### 3.2.7 Določanje iztekanja genomske dsDNA

Uporabili smo bakterije v srednji logaritemski fazи. Po inkubaciji smo bakterijsko kulturo centrifugirali 15 min pri 4 248 g in 4 °C, odstranili ves supernatant in celice resuspendirali v raztopini 250 mM saharoze z dodanim 0,9 % NaCl do končne prevodnosti medija ~ 300 µS/cm (višja ionska jakost pufra je bila potrebna, da je čez vzorec tekel tok  $\geq 1$  A).

#### 3.2.7.1 Elektroporacija

Elektroporacijo smo izvedli z uporabo HVP-VG generatorja pravokotnih pulzov (IGEA, Carpi, Italija). 400 µl vzorca smo dali v elektroporacijsko kiveto z 2 mm razmikom med elektrodama iz nerjavečega jekla (VWR International, Avstrija). Pri teh poskusih smo namesto navadnih elektrod uporabljali elektroporacijske kivete, da smo preprečili DNA kontaminacijo s predhodno elektroporiranimi vzorci.

### 3.2.7.2 Izolacija genomske DNA po elektroporaciji

Po elektroporaciji smo vzorec inkubirali pri sobni temperaturi 0, 10, 30 ali 60 min, nato smo prenesli 380 µl v mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min pri 8 000 g. 370 µl supernatanta smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in uporabili za izolacijo genomske DNA iz supernatanta po navodilih iz kita NucleoSpin Microbial DNA Mini kit (Macherey-Nagel, Nemčija). Kot negativno kontrolo smo uporabili supernatant vzorca brez elektroporacije. Pri supernatantih smo izpustili začetno lizo, smo pa vseeno dodali proteazo A in inkubirali 15 min pri 56 °C. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 380 µl začetnega vzorca in DNA izolirali po navodilih iz kita. V zadnjem koraku izolacije smo elucijo DNA opravili v dveh korakih: 2 × 50 µl elucijskega pufra in 4 min inkubacijo pred centrifugiranjem.

### 3.2.7.3 Kvantifikacija genomske dsDNA

Za kvantifikacijo iztekle genomske dsDNA (dvoverižna DNA: iz angl.: »double stranded«) smo uporabili fluorescentno barvilo QuantiFluor dsDNA Dye (Promega, ZDA). Vzorce in standardno krivuljo (Lambda DNA standard) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Fluorescenco smo izmerili s čitalcem mikrotitrnih plošč, izrisali standardno krivuljo in preračunali koncentracije DNA v naših vzorcih.

### 3.2.7.4 Določanje prisotnosti DNA v supernatantu in peletu

Prisotnost DNA v peletu in supernatantu po elektroporaciji smo določali s fluorescentnim barvilm propidijev jodid (PI). Vzorce smo elektroporirali, inkubirali pri sobni temperaturi in centrifugirali, kot je opisano v poglavjih 3.2.7.1 in 3.2.7.2. Ko smo supernatant odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, smo peletu dodali enak volumen 250 mM saharoze z NaCl in resuspendirali. 100 µl vsakega vzorca smo prenesli na mikrotitrno ploščo in dodali PI v končni koncentraciji 0,1 mg/ml. Po 20-min inkubaciji pri sobni temperaturi v temi, smo s čitalcem mikrotitrnih plošč pomerili fluorescenco (vzbujanje pri 535 nm in emisija pri 617 nm).

## 3.2.8 Analiza fragmentacije DNA po izpostavitvi električnim pulzom

### 3.2.8.1 Izpostavitev izolirane genomske DNA električnim pulzom

Iz pripravljenega vzorca smo izolirali genomsko DNA po navodilih proizvajalca NucleoSpin Microbial DNA Mini Kit. 90 µl izolirane DNA smo v kivetih z 1 mm razmikom med elektrodama iz nerjavečega jekla (VWR International, Avstrija) izpostavili električnim pulzom s HVP-VG generatorjem pravokotnih pulzov (IGEA, Carpi, Italija).

### 3.2.8.2 Izpostavitev izolirane plazmidne DNA električnim pulzom

Predhodno izolirano plazmidno DNA pEGFP-N1 (4,7 kb) s koncentracijo 0,99 mg/ml smo redčili do koncentracije 50 µg/ml v pufru 250 mM saharoze z NaCl, s prevodnostjo

~300 µS/cm. 90 µl redčene pDNA smo izpostavili električnim pulzom v kiveti z 1 mm razmikom med elektrodama iz nerjavečega jekla s pomočjo HVP-VG generatorja pravokotnih pulzov (IGEA, Carpi, Italija).

### 3.2.8.3 Analiza fragmentacije DNA

Za vizualizacijo izolirane genomske ali plazmidne DNA, izpostavljeni električnim pulzom, smo pripravili 1 % agarozni gel, s SYBR SAFE barvilom za DNA, v 1xTAE pufru (Tris-acetat-EDTA pufer). Elektroforeza je potekala 1 h pri 80 V. Gel smo nato slikali v transiluminatorju pod UV svetlobo in s programom analizirali fragmente (Q9 Alliance UviTec, Cambridge, Velika Britanija).

## 3.2.9 Statična analiza

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli v programu R Commander 2.6 (razvil ga je John Fox iz McMaster University, in je na voljo pod licenco GNU General Public License).

### 3.2.9.1 Statična analiza stopnje inaktivacije

Poskuse smo ponovili trikrat za vsak antibiotik (vključno z vsemi kontrolami: brez tretiranja, samo z elektroporacijo in samo z antibiotikom). Rezultate inaktivacije smo normalizirali glede na kontrolo brez tretmaja (vzorec brez dodanega antibiotika in elektroporacije) in jih predstavili kot povprečje ± standardni odklon. Povprečja in standardni odkloni za vzorce kjer smo uporabili samo elektroporacijo, so na grafih prikazani kot povprečje vseh 9-ih ponovitev za bakterije *E. coli* (za vsak antibiotik so bile izvedene tri elektroporacijske kontrole) in vseh 6-ih ponovitev pri bakterijah *L. plantarum*.

Pri bakterijah *E. coli* smo za primerjavo učinkovitosti treh različnih antibiotikov uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA) in sicer za vsako posamezno kombinacijo amplitude električnega pulza, koncentracije antibiotika in časa inkubacije. V primerih, ko je bila s pomočjo ANOVA ugotovljena statistična značilnost ( $p < 0,05$ ), smo za podrobnejšo primerjavo povprečji različnih tretmajev uporabili Tukeyev HSD test mnogoterih primerjav ( $p < 0,05$ ).

Za bakterije *L. plantarum* pri katerih smo proučevali učinke le dveh antibiotikov, smo za analizo variance uporabili F-test, in sicer za vsako kombinacijo amplitude električnega pulza, koncentracije antibiotika in časa inkubacije ( $p < 0,05$ ). V primeru, da sta bili varianci med skupinama homogeni, smo za primerjavo povprečij uporabili Studentov t-test ( $p < 0,05$ ), če varianci nista bili homogeni pa smo uporabili Welchov t-test ( $p < 0,05$ ).

Za primerjavo sinergističnega učinka kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika, ter za primerjavo naklonov krivulj med bakterijami *E. coli* in *L. plantarum* znotraj posameznih skupin (koncentracija antibiotika, jakost električnega polja in čas inkubacije), smo izvedli analizo variance z F-testom ( $p < 0,05$ ). V primeru da sta bili varianci med skupinama homogeni, smo

za nadaljnjo primerjavo med povprečjema uporabili Studentov t-test ( $p < 0,05$ ), v primeru da varianci znotraj skupin nista bili homogeni, pa smo uporabili Welchev t-test ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.9.2 Statistična analiza rastnih krivulj bakterij *L. plantarum*

Pri analizi rastnih krivulj smo pri vzorcih najprej odsteli OD<sub>600</sub> gojišča. Pri razvrščanju krivulj v štiri kategorije smo najprej uporabili Dunnettov testa ( $p < 0,05$ ), ter s tem preverili ali je naraščanje oz. padanje OD<sub>600</sub> statistično signifikantno različno od 0. Parametre, pridobljene iz rastnih krivulj, smo analizirali z Dunnettovim testom ( $p < 0,05$ ), primerjali pa smo jih s parametri kontrolnega vzorca, ki ni bil izpostavljen elektroporaciji ali antibiotikom.

### 3.2.9.2 Statistična analiza fragmentiranosti DNA

Za primerjavo razporeditve DNA po različnih regijah na elektroforeznem gelu med vzorci smo uporabili analizo glavnih komponent oz. PCA analizo (iz angl.: «principal component analysis»), ki omogoča učinkovito vizualizacijo razlik. Za analizo smo uporabili novejšo različico programa R 4.3.2 (2023) in paket »Factoshiny«.

## 4 REZULTATI

### 4.1 INAKTIVACIJA BAKTERIJ

#### 4.1.1 Minimalne inhibitorne koncentracije antibiotikov

V preglednici 3 so predstavljene minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin, ki smo jih določili za bakterije *E. coli* in *L. plantarum*. Vse uporabljeni koncentracije so zabeležene v preglednici 4. Izpostavimo lahko, da je bila vrednost MIK za ciprofloksacin pri bakterijah *L. plantarum* visoka (70 µg/ml), kljub temu, da naj sev ne bi bil odporen proti antibiotikom. To je povzročilo povečano električno prevodnost vzorca, kar je pri elektroporaciji povzročilo preboje. Zaradi tega smo ciprofloksacin izključili iz poskusov z omenjenim sevom.

Preglednica 3: Minimalne inhibitorne koncentracije ampicilina, tetraciklina in ciprofloksacina, določene za bakterije *E. coli* in *L. plantarum*.

antibiotik \ bakterija	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Ampicilin	30 µg/ml	3 µg/ml
Tetraciklin	2 µg/ml	8 µg/ml
Ciprofloksacin	0,025 µg/ml	70 µg/ml

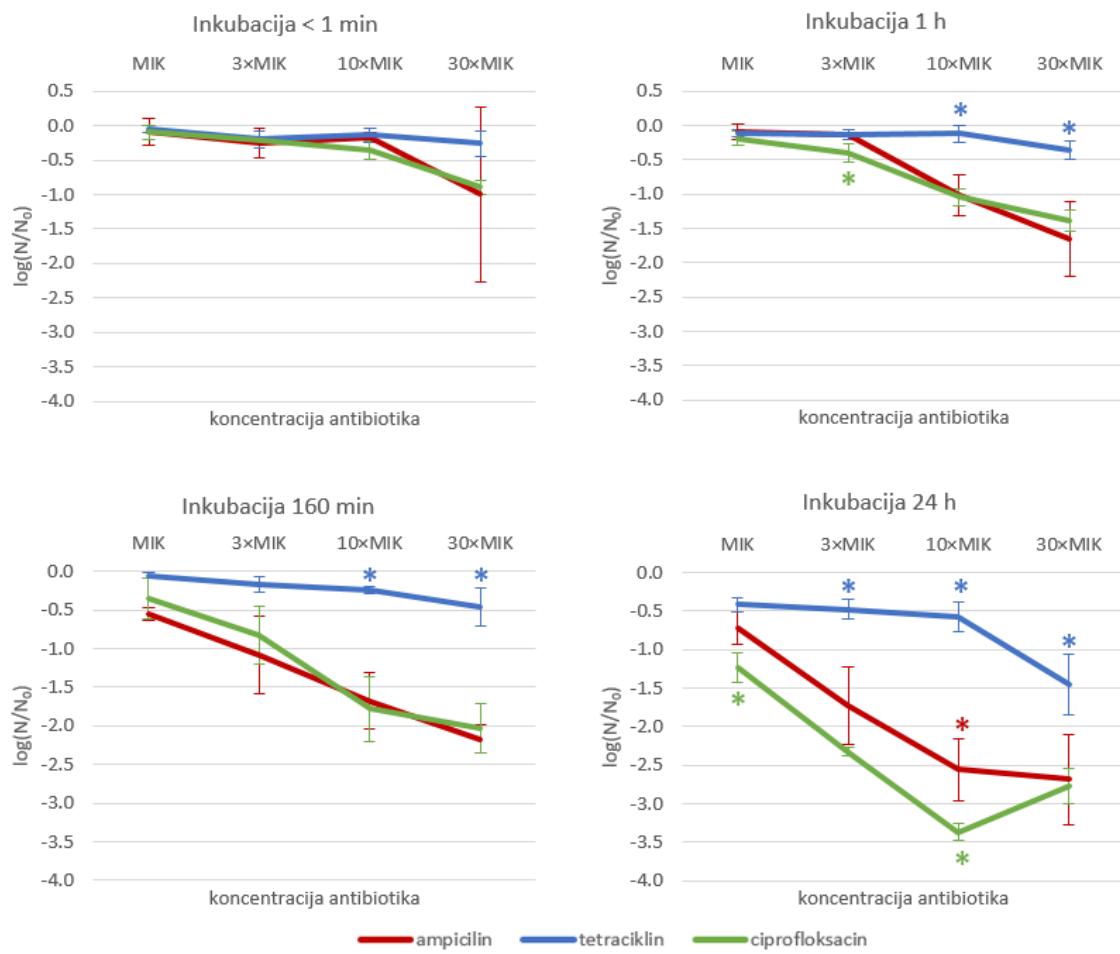
Preglednica 4: Koncentracije antibiotikov, ki smo jih uporabili pri poskusih. MIK= minimalna inhibitoma koncentracija.

antibiotik	koncentracija	<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Ampicilin	MIK	30 µg/ml	3 µg/ml
	3×MIK	90 µg/ml	9 µg/ml
	10×MIK	300 µg/ml	30 µg/ml
	30×MIK	900 µg/ml	90 µg/ml
Tetraciklin	MIK	2 µg/ml	8 µg/ml
	3×MIK	6 µg/ml	24 µg/ml
	10×MIK	20 µg/ml	80 µg/ml
	30×MIK	60 µg/ml	240 µg/ml
Ciprofloksacin	MIK	0,025 µg/ml	/
	3×MIK	0,075 µg/ml	/
	10×MIK	0,25 µg/ml	/
	30×MIK	0,75 µg/ml	/

#### 4.1.2 Inaktivacija z antibiotikom

Preden smo pogledali vpliv kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na inaktivacijo obih bakterijskih sevov, smo preverili kako nanjo vpliva izpostavitev le antibiotiku.

#### 4.1.2.1 Inaktivacija bakterij *E. coli* z antibiotiki

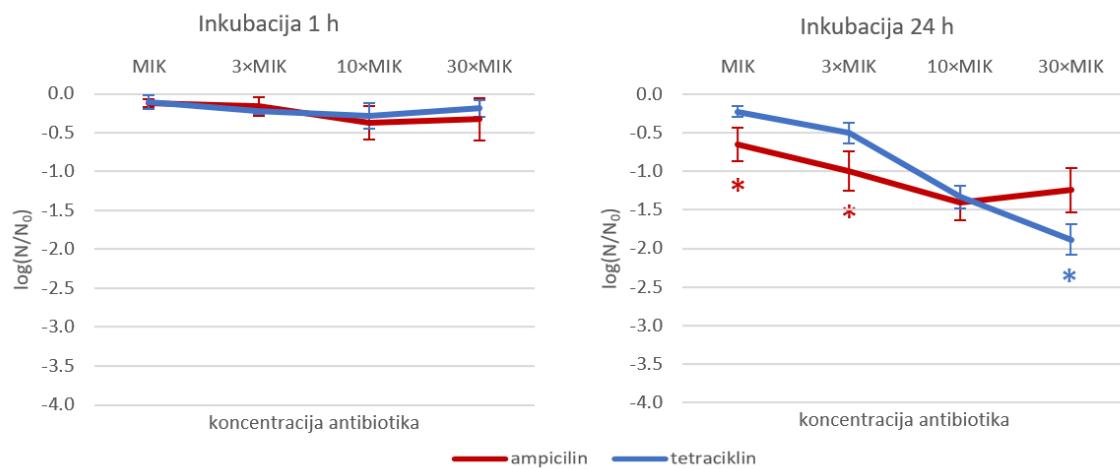


Slika 3: Inaktivacija bakterij *E. coli* s tremi različnimi antibiotiki v štirih različnih koncentracijah in pri štirih časih inkubacije pri sobni temperaturi. N=3. MIK=minimalna inhibitorna koncentracija. \* označujejo parametre, kjer je inaktivacija s posameznim antibiotikom statistično značilno različna od inaktivacije z drugima dvema antibiotikoma pri istih parametrih (primer: modra \* označuje koncentracijo in čas inkubacije kjer je inaktivacija s tetraciklinom statistično različna od inaktivacij z ampicilinom in ciprofloksacinom).

Na sliki 3 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *E. coli* s tremi različnimi antibiotiki (ampicilin, tetraciklin ali ciprofloksacin) pri štirih različnih koncentracijah in štirih različnih časih inkubacije pri sobni temperaturi. Stopnja inaktivacije je naraščala ob naraščanju koncentracije in/ali časa inkubacije. Najmanj učinkovit je bil tetraciklin, rezultati za ampicilin in ciprofloksacin pa so bili večinoma primerljivi. Pri najkrajšem času inkubacije (< 1 min) je bila inaktivacija zelo nizka, prav tako ni bilo razlik med testiranimi antibiotiki. Ko smo čas inkubacije podaljšali na 1 h, se je stopnja inaktivacije nekoliko povišala za ampicilin in ciprofloksacin pri vrednostih 10×MIK in 30×MIK. Pri 160-min inkubaciji se je stopnja inaktivacije povišala pri ampicilinu in ciprofloksacinu, med katerima ni bilo razlik. Učinkovitost tetraciklina je ostala skoraj enaka kot pri krajsi inkubaciji, prav tako je bil tudi tu pri najvišjih dveh koncentracijah manj učinkovit od drugih dveh antibiotikov. Pri najdaljšem času inkubacije (24 h) se je stopnja inaktivacije povišala pri vseh treh antibiotikih, vendar precej izraziteje pri ciprofloksacinu in ampicilinu. Tetraciklin je bil manj učinkovit od ostalih dveh

antibiotikov, inaktivacija pa se je najbolj povišala pri vrednosti  $30\times\text{MIK}$ . Ciprofloxacin je bil učinkovitejši od obeh ostalih antibiotikov pri vrednostih MIK in  $10\times\text{MIK}$ , pri najvišji koncentraciji pa je bila inaktivacija skoraj enaka kot pri ampicilinu.

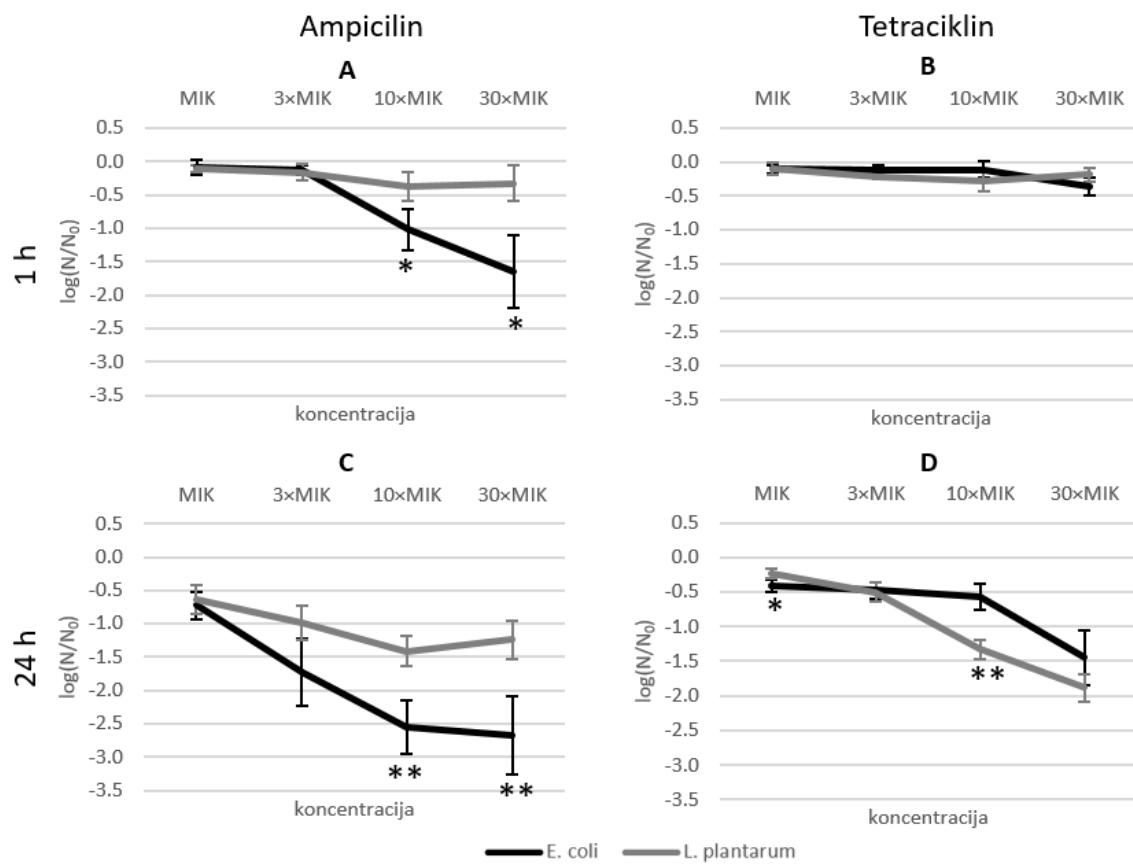
#### 4.1.2.2 Inaktivacija bakterij *L. plantarum* z antibiotikoma



Slika 4: Inaktivacija bakterij *L. plantarum* z dvema različnima antibiotikoma v štirih različnih koncentracijah in pri dveh časih inkubacije pri sobni temperaturi.  $N=3$ . MIK=minimalna inhibitorna koncentracija. \* označujejo parametre, kjer sta inaktivaciji z antibiotikoma statistično značilno različni (primer: modra \* označuje koncentracijo in čas inkubacije kjer je inaktivacija s tetraciklinom statistično značilno višja od inaktivacije z ampicilinom).

Pri bakterijah *L. plantarum* smo testirali le dva antibiotika, saj je bila MIK ciprofloxacina precej visoka.

Na sliki 4 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *L. plantarum* pri štirih različnih koncentracijah antibiotika (ampicilin ali tetraciklin) in dveh različnih časih inkubacije pri sobni temperaturi. Pri 1-h inkubaciji z antibiotikom je bila inaktivacija primerljiva med antibiotikoma in vsemi koncentracijami. Pri 24-h inkubaciji z antibiotikom se je stopnja inaktivacije bistveno povišala, razen pri najnižji koncentraciji tetraciklina. Pri vrednostih MIK in  $3\times\text{MIK}$  je bil ampicilin učinkovitejši, pri vrednosti  $10\times\text{MIK}$  je bila inaktivacija primerljiva med antibiotikoma, pri najvišji vrednosti  $30\times\text{MIK}$  pa je bil tetraciklin učinkovitejši od ampicilina.

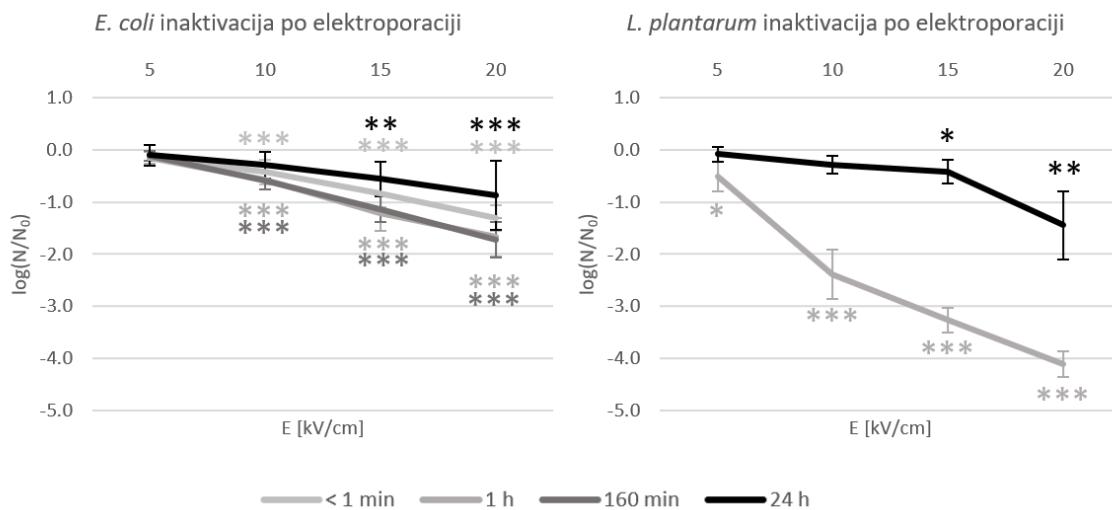
4.1.2.3 Primerjava inaktivacije z antibiotikom med bakterijami *E. coli* in *L. plantarum*

Slika 5: Primerjava inaktivacije med bakterijami *E. coli* in *L. plantarum* z ampicilinom ali tetraciklinom po 1-h ali 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi. N=3. MIK=minimalna inhibitorna koncentracija. \* označuje parametre kjer je statistično značilna razlika v inaktivaciji med bakterijama (\* za  $p<0,05$  in \*\* za  $p<0,01$ ).

Na sliki 5 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *E. coli* in *L. plantarum* z ampicilinom ali tetraciklinom pri različnih koncentracijah in dvema različnima časoma inkubacije pri sobni temperaturi. Pri ampicilinu so bile razlike v inaktivaciji med bakterijama vidne pri višjih koncentracijah antibiotika. Pri 1-h inkubaciji z ampicilinom (slika 5:A) je bila stopnja inaktivacije bakterij *L. plantarum* zelo nizka pri vseh koncentracijah. Pri bakterijah *E. coli* pa se je inaktivacija precej povišala pri vrednostih 10×MIK in 30×MIK. Pri 24-h inkubaciji z ampicilinom (slika 5:C) se je stopnja inaktivacije povišala pri obeh bakterijah, a je bila za bakterije *L. plantarum* še vedno nižja kot pri bakterijah *E. coli* (statistično značilno le pri vrednostih 10×MIK in 30×MIK). Pri 1-h inkubaciji s tetraciklinom (slika 5:B) je bila inaktivacija zelo nizka pri obeh bakterijah in vseh koncentracijah. Pri 24-h inkubaciji s tetraciklinom (slika 5:D) se je inaktivacija povišala predvsem pri vrednostih 10×MIK in 30×MIK za bakterije *L. plantarum*, ter 30×MIK za bakterije *E. coli*. Pri najnižji koncentraciji je bil tetraciklin učinkovitejši pri inaktivaciji bakterij *E. coli*. Pri vrednostih 10×MIK in 30×MIK pa je bil tetraciklin učinkovitejši pri inaktivaciji bakterij *L. plantarum* (statistično značilno le pri vrednosti 10×MIK).

#### 4.1.3 Inaktivacija z elektroporacijo

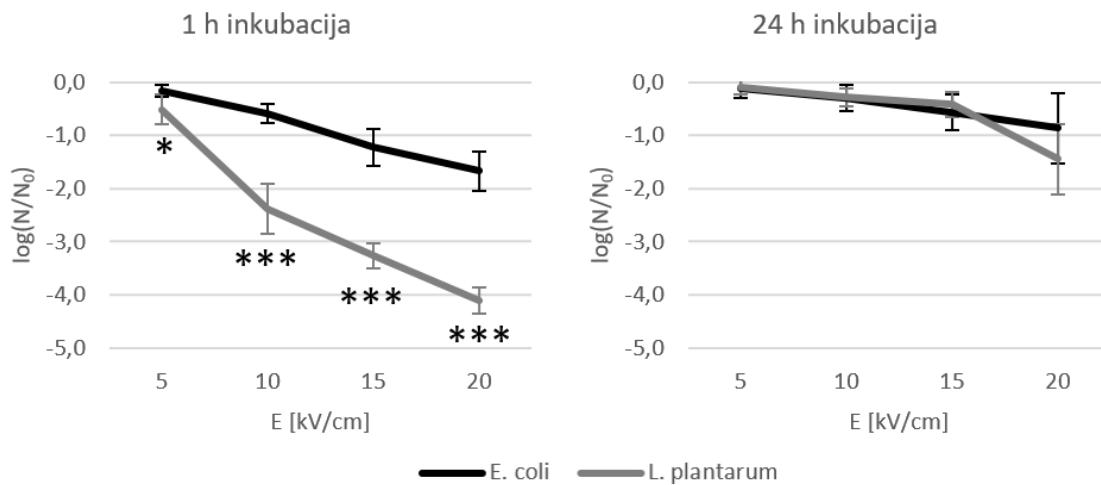
Preden smo pogledali vpliv kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na inaktivacijo obih bakterijskih sevov, smo preverili kako nanjo vpliva le izpostavitev elektroporaciji.



Slika 6: Inaktivacija bakterij *E. coli* ( $N=9$ ) in *L. plantarum* ( $N=6$ ) z elektroporacijo.  $E$ =jakost električnega polja. \* označuje parametre ki so statistično značilno različni od kontrole (\* za  $p<0,05$ , \*\* za  $p<0,01$  in \*\*\* za  $p<0,001$ ).

Na sliki 6 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *E. coli* in *L. plantarum* z uporabo elektroporacije pri štirih različnih jakostih električnega polja in štirih časovnih inkubacijah pri sobni temperaturi. Inaktivacija bakterij *E. coli* je naraščala pri vseh časih inkubacije ob povečevanju jakosti električnega polja, vendar je ta morala biti večja od 5 kV/cm. Pri podaljšanju časa inkubacije na 1 h, se je inaktivacija povisala in ostala skoraj nespremenjena tudi po 160 min. Po 24-h inkubaciji pa je bila inaktivacija nižja, predvidoma zaradi delne rasti bakterij. Učinek elektroporacije je bil viden le še pri 15 in 20 kV/cm. Inaktivacija bakterij *L. plantarum* se je višala ob višanju amplitude električnega polja, največja razlika je bila opazna pri povisanju amplitude iz 5 na 10 kV/cm. Po 24 h inkubacije je bila stopnja inaktivacije bistveno nižja zaradi delne rasti bakterij. Učinek je bil statistično značilen le še pri 15 in 20 kV/cm.

#### 4.1.3.1 Primerjava inaktivacije z elektroporacijo med bakterijami *E. coli* in *L. plantarum*

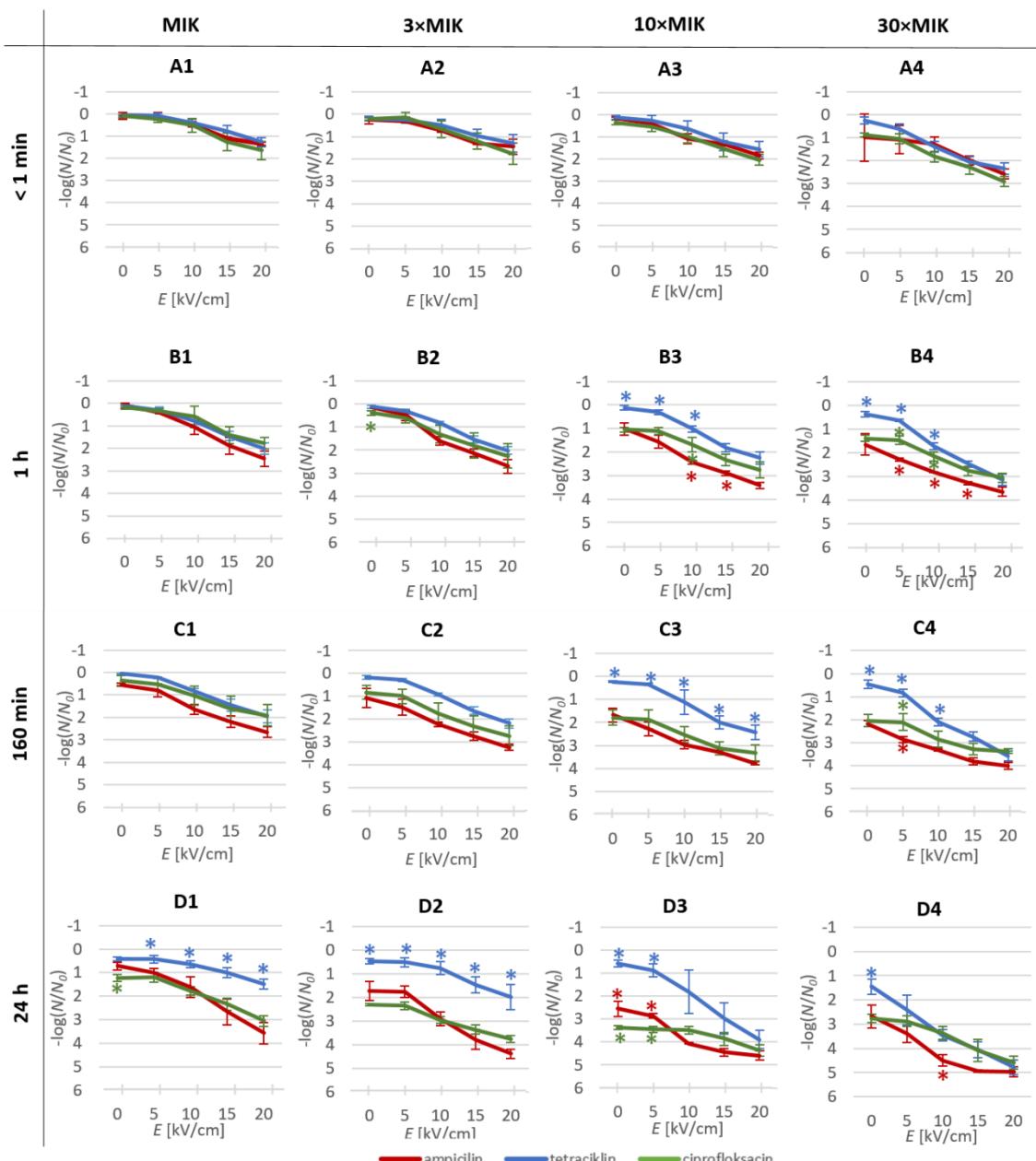


Slika 7: Primerjava inaktivacije bakterij *E. coli* ( $N=9$ ) in *L. plantarum* ( $N=6$ ) z elektroporacijo po 1-h in 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi.  $E$ =jakost električnega polja. \* označuje parametre kjer je statistično značilna razlika v inaktivaciji med bakterijama (\* za  $p<0,05$  in \*\*\* za  $p<0,001$ ).

Na sliki 7 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *E. coli* in *L. plantarum* z elektroporacijo pri različnih amplitudah električnega polja in pri dveh različnih časih inkubacije pri sobni temperaturi. 1 h po elektroporaciji je bila stopnja inaktivacije bakterij *L. plantarum* višja od stopnje inaktivacije bakterij *E. coli* pri vseh amplitudah: pri 5 kV/cm z majhno statistično značilnostjo, pri višjih amplitudah pa z veliko statistično značilnostjo. 24 h po elektroporaciji je bil učinek elektroporacije manjši kot po 1-h inkubaciji pri obeh bakterijah, med katerima pa ni bilo razlik.

#### 4.1.4 Inaktivacija s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov

##### 4.1.4.1 Inaktivacija bakterij *E. coli* s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov



Slika 8: Inaktivacija bakterij *E. coli* s kombinacijo elektroporacije in antibiotika pri različnih jakostih električnega polja, koncentracijah antibiotika in časih inkubacije pri sobni temperaturi. N=3. MIK=minimalna inhibitoma koncentracija, E=jakost električnega polja. \* označujejo parametre pri katerih je inaktivacija dosežena s posameznim antibiotikom statistično značilno različna ( $p<0,05$ ) od inaktivacij dobljenih z drugima dvema antibiotikoma pri istih parametrih (primer: modra \* označuje koncentracijo antibiotika, jakost električnega polja in čas inkubacije kjer je inaktivacija s tetraciklinom statistično različna od inaktivacij z ampicilinom in ciprofloksacinom) (objavljeno v Lovšin in sod., 2021).

Na sliki 8 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *E. coli* s tremi antibiotiki pri različnih koncentracijah (stolpci 1 do 4), štirih različnih časih inkubacije (vrstice A do D) pri sobni

temperaturi in štirimi različnimi amplitudami električnega polja. Inaktivacija je naraščala z naraščanjem amplitude električnega polja, koncentracije antibiotika in/ali časa inkubacije.

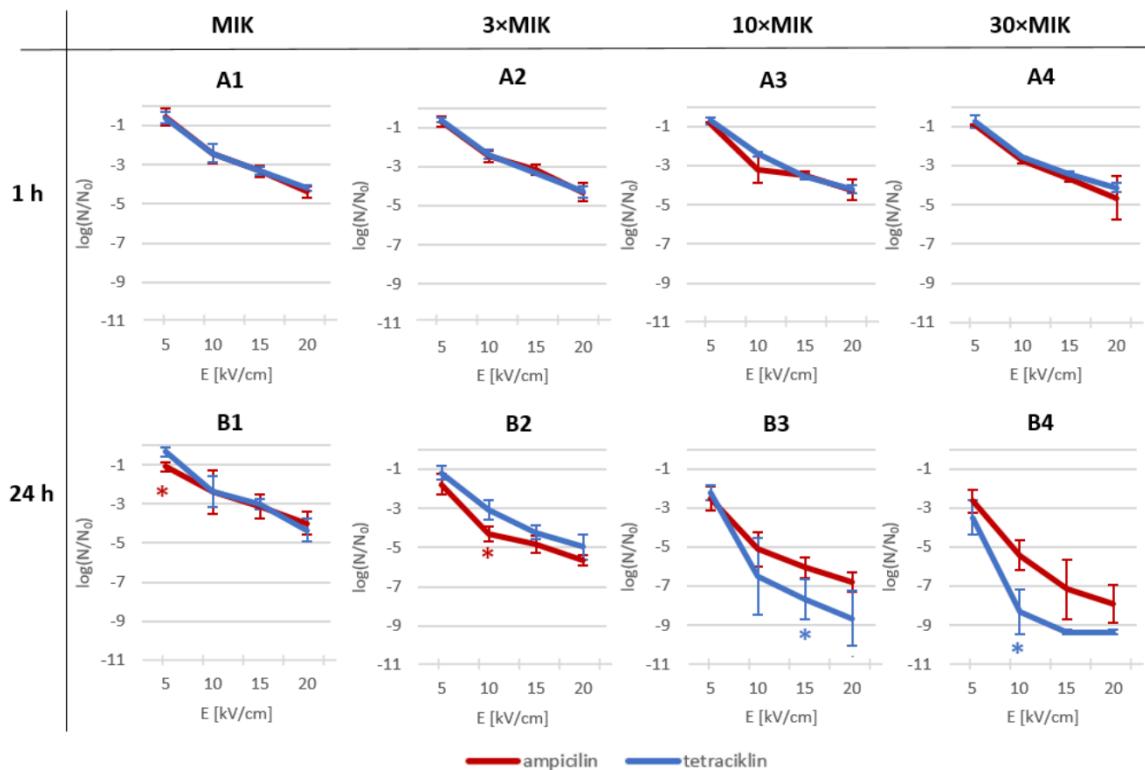
Pri najkrajšem času inkubacije (<1 min) ni bilo razlik med testiranimi antibiotiki (slika 8: A1-A4). Stopnja inaktivacije je naraščala predvsem z naraščanjem amplitude električnega polja.

Pri 1-h inkubaciji (slika 8: B1-B4) se je stopnja inaktivacije povišala predvsem ob uporabi ampicilina ali ciprofloxacinata pri koncentracijah  $10\times\text{MIK}$  in  $30\times\text{MIK}$  (slika 8: B3 in B4). Pri koncentraciji  $10\times\text{MIK}$  je bil tetraciklin najmanj učinkovit, sledi ciprofloxacin, ampicilin pa je bil najbolj učinkovit. Pri kombinaciji 20 kV/cm in koncentraciji  $10\times\text{MIK}$  ni bilo več statistično značilne razlike med vsemi tremi antibiotiki. Pri najvišji testirani koncentraciji ( $30\times\text{MIK}$ ) in nižjih amplitudah električnega polja (5 in 10 kV/cm) so bile opazne razlike v stopnji inaktivacije med vsemi tremi antibiotiki. Ampicilin je bil najbolj učinkovit, sledi ciprofloxacin, tetraciklin pa je bil najmanj učinkovit. Pri 15 kV/cm je bil ampicilin učinkovitejši od ostalih dveh antibiotikov, pri 20 kV/cm pa ni bilo več razlik. Pri nizkih koncentracijah (vrednosti MIK in  $3\times\text{MIK}$ ) ni bilo razlik med antibiotiki (slika 8: B1 in B2).

Pri 160-min inkubaciji (slika 8: C1-C4) so bili rezultati podobni tistim pri 1-h inkubaciji. Inaktivacija se je povišala predvsem pri inkubaciji z ampicilinom ali ciprofloxacinom v koncentracijah  $10\times\text{MIK}$  in  $30\times\text{MIK}$  (slika 8: C3 in C4). Pri koncentraciji  $10\times\text{MIK}$  je bil tetraciklin manj učinkovit od ampicilina in ciprofloxacinata, med katerima pa ni bilo razlik. Pri koncentraciji  $30\times\text{MIK}$  in 5 kV/cm so bile razlike med vsemi tremi antibiotiki, ampicilin je bil najbolj učinkovit in tetraciklin najmanj. Pri 10 kV/cm je bil tetraciklin manj učinkovit od ostalih dveh antibiotikov, pri višjih amplitudah pa razlik med antibiotiki ni bilo več. Pri nizkih koncentracijah (vrednosti MIK in  $3\times\text{MIK}$ ) ni bilo razlik med antibiotiki (slika 8: C1 in C2).

Pri 24-h inkubaciji (slika 8: D1-D4) se je inaktivacija povišala predvsem pri inkubaciji z ampicilinom ali ciprofloxacinom. Pri koncentracijah MIK in  $3\times\text{MIK}$  (slika 8:D1 in D2) je bil tetraciklin manj učinkovit pri vseh amplitudah, med ampicilinom in ciprofloxacinom razlik ni bilo. Pri koncentraciji  $10\times\text{MIK}$  (slika 8: D3) in najnižji amplitudi 5 kV/cm so bile razlike med vsemi tremi antibiotiki, ciprofloxacin je bil najbolj učinkovit, sledi ampicilin, najmanj učinkovit pa je bil tetraciklin. Pri višjih amplitudah razlik med antibiotiki ni bilo več. Pri koncentraciji  $30\times\text{MIK}$  (slika 8: D4) razlik skoraj ni bilo več, le pri 10 kV/cm je bil ampicilin učinkovitejši od ostalih dveh antibiotikov.

#### 4.1.4.2 Inaktivacija bakterij *L. plantarum* s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov



Slika 9: Inaktivacija bakterij *L. plantarum* s kombinacijo elektroporacije in antibiotika pri različnih jakostih električnega polja, koncentracijah antibiotika in časih inkubacije pri sobni temperaturi. N=3. MIK=minimalna inhibitorna koncentracija, E=jakost električnega polja \* označujejo parametre pri katerih sta inaktivaciji z antibiotikoma statistično značilno različni ( $p<0,05$ ) pri istih parametrih. (primer: modra \* označuje koncentracijo antibiotika, jakost električnega polja in čas inkubacije kjer je inaktivacija s tetraciklinom statistično značilno višja od inaktivacije z ampicilinom) (objavljeno v Lovšin in sod. (2024)).

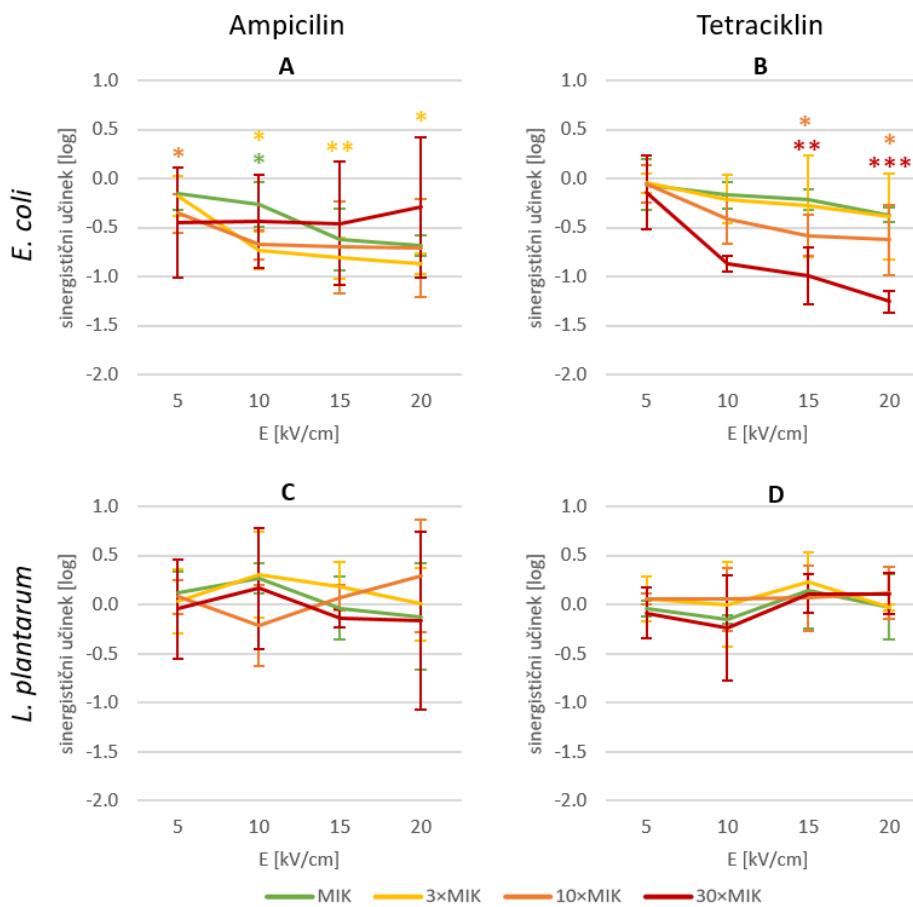
Na sliki 9 so prikazane stopnje inaktivacije bakterij *L. plantarum* z uporabo ampicilina ali tetraciklina pri štirih različnih koncentracijah (stolpci 1 do 4), dveh časih inkubacije pri sobni temperaturi (vrstici A in B), ter štirih različnih jakostih električnega polja.

Pri 1-h inkubaciji (slika 9: A1-A4) je stopnja inaktivacije naraščala s povečevanjem jakosti električnega polja. Med učinkovitostjo ampicilina in tetraciklina, ali med različnimi koncentracijami, pri posamezni amplitudi ni bilo razlik.

Pri 24-h inkubaciji (slika 9: B1-B4) je stopnja inaktivacije naraščala s povečevanjem jakosti električnega polja in koncentracije antibiotika. Le pri vrednosti MIK (slika 9: B1) so bile stopnje inaktivacije primerljive tistim pri 1-h inkubaciji, izjema je 5 kV/cm kjer je bil ampicilin učinkovitejši od tetraciklina. Pri koncentraciji 3×MIK (slika 9: B2) je bil ampicilin nekoliko učinkovitejši od tetraciklina, vendar s statistično značilnostjo le pri 10 kV/cm. Pri vrednosti 10×MIK (slika 9: B3) se je inaktivacija bistveno povisala pri povišanju amplitude iz 5 na 10 kV/cm. Pri 15 in 20 kV/cm je bil tetraciklin učinkovitejši od ampicilina. Pri vrednosti 30×MIK (slika 9: B4) se je inaktivacija prav tako najbolj povisala pri povišanju amplitude iz 5 na 10 kV/cm. Tetraciklin je bil učinkovitejši od ampicilina, s statistično značilnostjo le pri 10 kV/cm.

Pri višjih amplitudah smo bili že na meji detekcije naše metode, kar smo označili kot popolno inaktivacijo.

#### 4.1.4.3 Primerjava inaktivacije s kombinacijo elektroporacije in antibiotikov med bakterijami *E. coli* in *L. plantarum*

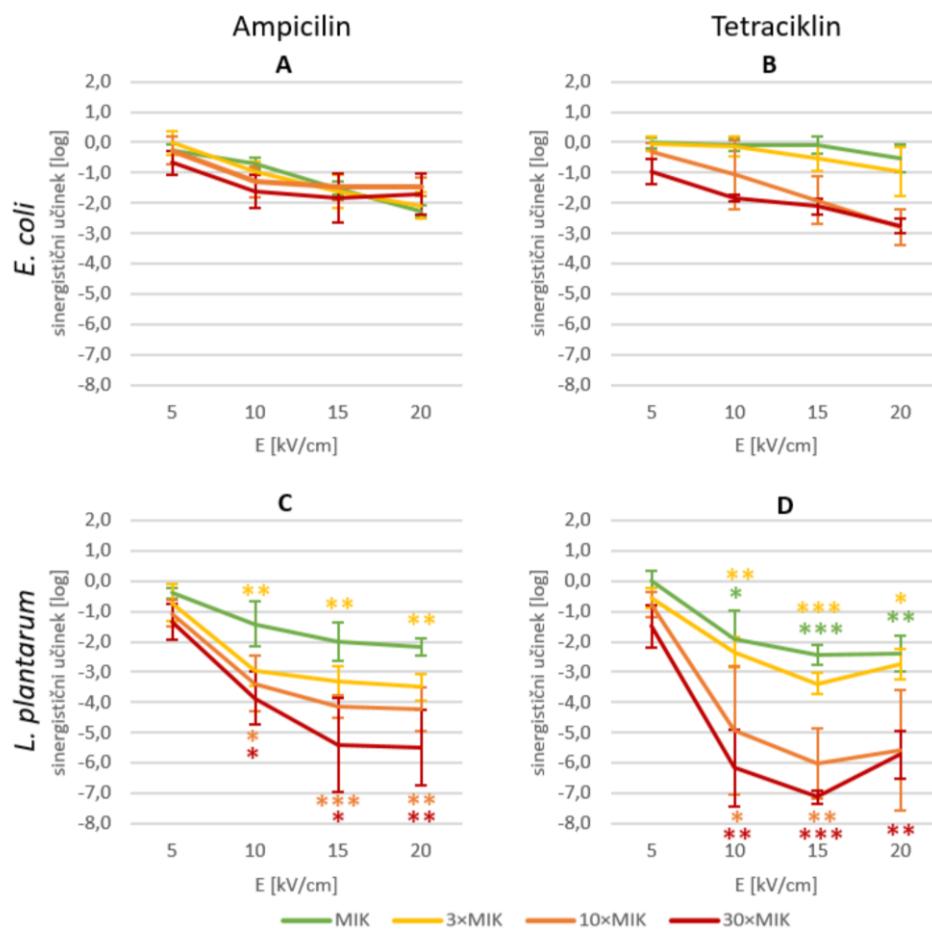


Slika 10: Sinergistični učinek kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na inaktivacijo bakterij *E. coli* in *L. plantarum* pri 1-h inkubaciji pri sobni temperaturi. N=3. E=jakost električnega polja, MIK=minimalna inhibitorna koncentracija. \* označujejo parametre pri katerih je sinergističen učinek na inaktivacijo statistično različen med bakterijama (zelena \* pri ampicilinu in bakterijah *E. coli* označuje jakost električnega polja in MIK ampicilina, kjer je sinergistični učinek statistično večji pri bakterijah *E. coli* kot pri bakterijah *L. plantarum* pri istih parametrih)(\*za  $p<0,05$ , \*\* za  $p<0,01$  in \*\*\* za  $p<0,001$ ).

Na sliki 10 so prikazani sinergistični učinki kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika na inaktivacijo obeh bakterij po 1-h inkubaciji pri sobni temperaturi. Sinergistični učinek je bil izračunan po enačbi 1; od stopnje inaktivacije kombinirane uporabe smo odšteli stopnjo inaktivacije pri sami elektroporaciji in stopnjo inaktivacije pri uporabi le antibiotika.

Sinergistični učinek kombinirane uporabe je bil za oba antibiotika večji pri bakterijah *E. coli* kot pri bakterijah *L. plantarum*. Pri ampicilinu (slika 10: A in C) so bile razlike predvsem pri vrednostih 3xMIK, in sicer z 10 do 20 kV/cm. Razlika je bila še pri vrednosti MIK z 10 kV/cm, in pri vrednosti 10xMIK s 5 kV/cm. Pri tetraciklinu (slika 10: B in D) so bile razlike pri višjih koncentracijah v kombinaciji z višjo amplitudo električnega polja: pri vrednostih 10xMIK in

30×MIK v kombinacijah z 15 ali 20 kV/cm. Nakloni posameznih delov krivulj se med *E. coli* in *L. plantarum* večinoma niso razlikovali (Priloga A). Izjema je ampicilin v koncentraciji 3×MIK med 5 in 10 kV/cm.



Slika 11: Sinergistični učinek kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotikov na inaktivacijo bakterij *E. coli* in *L. plantarum* pri 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi. N=3. E=jakost električnega polja, MIK=minimalna inhibitorna koncentracija. \* označujejo parametre pri katerih je sinergističen učinek na inaktivacijo statistično različen med bakterijama (zelena \* pri tetraciklinu in bakterijah *L. plantarum* označuje jakost električnega polja in MIK tetraciklina, kjer je sinergistični učinek statistično večji pri bakterijah *L. plantarum* kot pri bakterijah *E. coli* pri istih parametrih)(\*za  $p<0,05$ , \*\* za  $p<0,01$  in \*\*\* za  $p<0,001$ ).

Na sliki 11 so prikazani sinergistični učinki kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika na inaktivacijo obeh bakterij po 24-h inkubaciji pri sobni temperaturi.

Sinergistični učinek kombinirane uporabe je bil za oba antibiotika večji pri bakterijah *L. plantarum* kot pri bakterijah *E. coli*, kar je ravno obratno kot pri 1-h inkubaciji. Razlike so bile pri vseh kombinacijah kjer je bila koncentracija antibiotika 3×MIK ali več, skupaj z amplitudo električnega polja 10 kV/cm ali več (razen tetraciklin v koncentraciji 10×MIK z 20 kV/cm). Pri tetraciklinu (slika 11: B in D) je bil sinergistični učinek večji tudi pri najnižji koncentraciji (MIK) v kombinaciji z jakostjo električnega polja 10 kV/cm ali več. Nobenih razlik v potenciaciji inaktivacije med bakterijama ni bilo pri najnižji amplitudi 5 kV/cm ter pri ampicilinu v najnižji koncentraciji. Nakloni posameznih delov krivulj (Priloga A) so bili večji

pri *L. plantarum* pri prehodu iz 5 na 10 kV/cm, kjer preidemo iz reverzibilne v ireverzibilno elektroporacijo. Pri tetraciklinu to velja za vse koncentracije, pri ampicilinu pa le pri koncentracijah  $\geq 3\times$ MIK. Naklon je bil večji pri *L. plantarum* še v primeru ampicilina v koncentraciji 30 $\times$ MIK pri prehodu iz 10 na 15 kV/cm, ter pri tetraciklinu v koncentraciji 3 $\times$ MIK pri prehodu iz 10 na 15 kV/cm.

#### 4.1.5 Kinetika rasti bakterij *L. plantarum*

Ker smo učinek potenciacije antibiotika z elektroporacijo pri bakterijah *L. plantarum* zaznali šele po najdaljši (24 h) inkubaciji, smo analizirali tudi rastne krivulje pri sobni temperaturi po tretiranju. Dodatno smo preučili tudi rastne krivulje pri optimalni temperaturi rasti, ki znaša 37 °C.

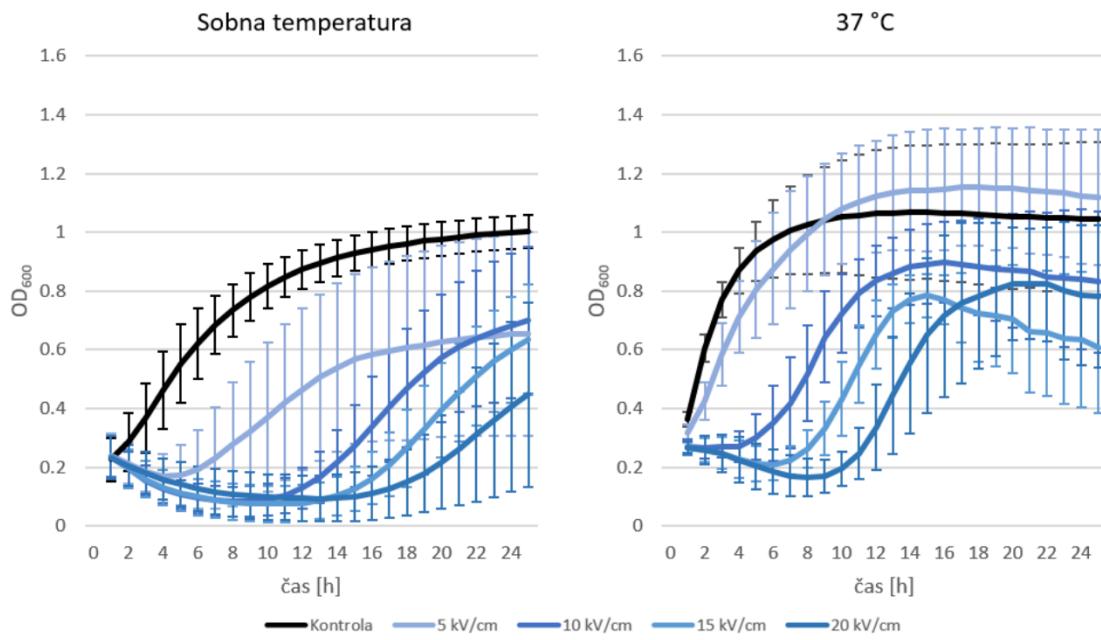
##### 4.1.5.1 Vpliv elektroporacije na kinetiko rasti bakterij *L. plantarum*

Na sliki 12 so rastne krivulje bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji in inkubaciji pri sobni temperaturi ali pri 37 °C, povprečne vrednosti analiziranih parametrov pa so v prilogi B.

Najbolj izrazita sprememba v rasti bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji je bila zamik logaritemske faze rasti, ki se je z večanjem jakosti električnega polja podaljšal. Pri inkubaciji pri sobni temperaturi je bil zamik logaritemske faze opaziti pri vseh jakostih električnega polja: za 4,8 h pri 5 kV/cm; za 10,3 h pri 10 kV/cm, za 12,5 h pri 15 kV/cm in za 12,8 h pri 20 kV/cm. Inkubacija pri optimalni temperaturi 37 °C je omogočila hitrejše okrevanje bakterij, pri 5 kV/cm zamika logaritemske faze nismo zaznali, pri višjih jakostih pa je bil zamik krajsi kot pri sobni temperaturi in sicer: 4,3 h pri 10 kV/cm, 6,7 h pri 15 kV/cm in 10,0 h pri 20 kV/cm.

Drugi učinek elektroporacije je bil znižanje končne koncentracije bakterij z naraščanjem jakosti električnega polja, kar se kaže kot znižanje končnega OD<sub>600</sub> v primerjavi s kontrolo. Pri sobni temperaturi je bil končni OD<sub>600</sub> nižji pri vseh testiranih jakostih, pri čemer je bilo znižanj najbolj izrazito pri 20 kV/cm. Inkubacija pri optimalni temperaturi 37 °C je omogočila hitrejše okrevanje in rast bakterij, zato je bil končni OD<sub>600</sub> statistično značilno nižji le pri 15 kV/cm, kjer smo opazili zmanjšanje OD<sub>600</sub> po dosegu stacionarne faze (krivulja tipa II), medtem ko pri 20 kV/cm tega pojava ni bilo.

Tretji učinek elektroporacije je bil začetna faza zmanjševanja števila bakterij (odmiranja) pri uporabi višjih jakosti električnega polja, kar se odraža kot zmanjšanje OD<sub>600</sub> še pred začetkom njihove rasti. Vzorci s tem pojavom so bili uvrščeni v kategorijo rastnih krivulj tipa III. Pri sobni temperaturi so bili to vzorci z amplitudo električnega polja 10 kV/cm ali več, pri optimalni rastni temperaturi 37 °C pa le vzorec z amplitudo 20 kV/cm.



Slika 12: Rastna dinamika bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji in pri inkubaciji pri sobni temperaturi ali 37 °C. N=6.

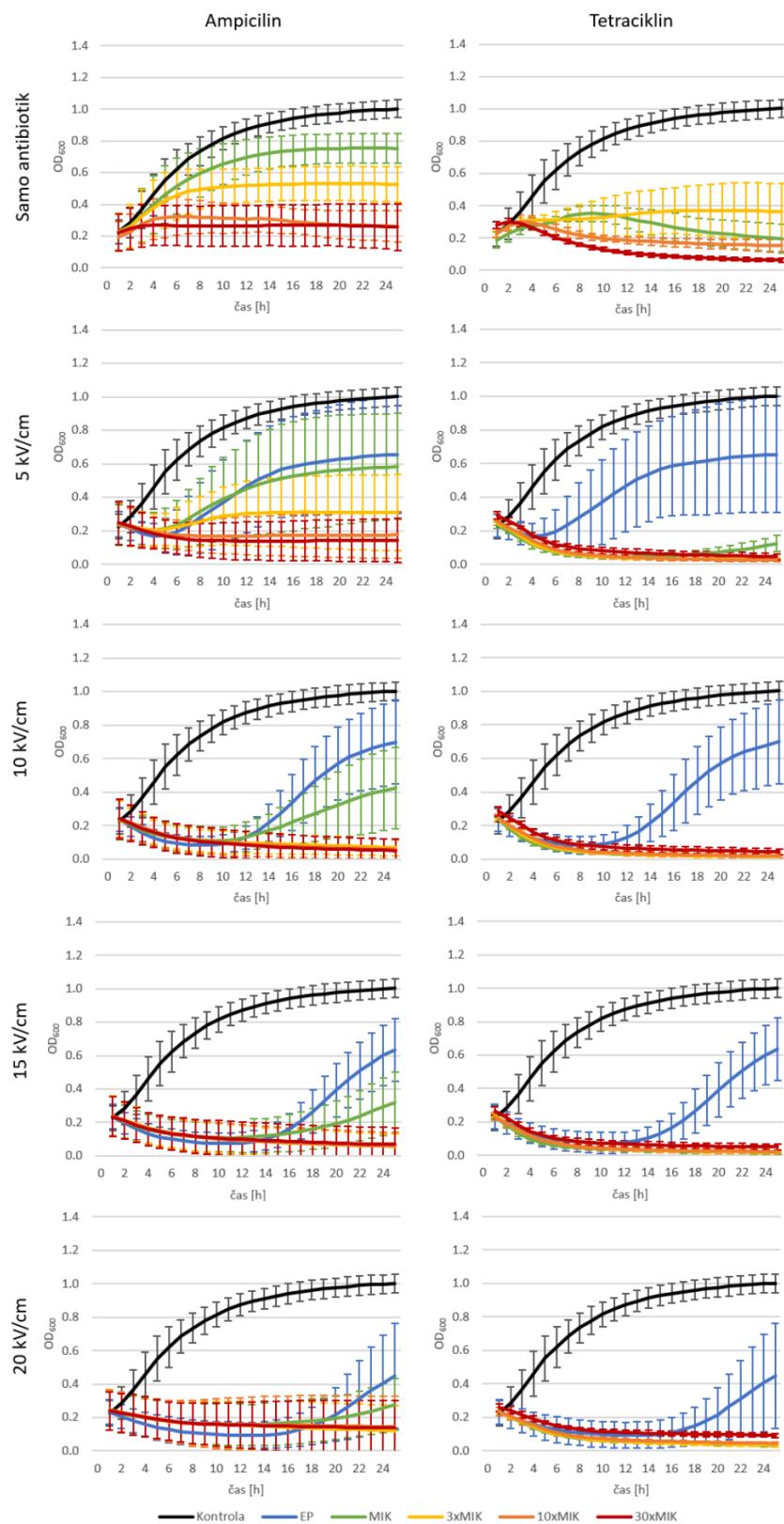
#### 4.1.5.2 Vpliv kombinacije elektroporacije in antibiotika na kinetiko rasti pri sobni temperaturi

Na sliki 13 so prikazane rastne krivulje bakterij *L. plantarum* po izpostavitvi elektroporaciji in antibiotiku, ter inkubaciji pri sobni temperaturi; povprečne vrednosti analiziranih parametrov pa so podane v prilogi C.

Izpostavljenost bakterij le antibiotiku pri sobni temperaturi je povzročila delno ali popolno inhibicijo rasti pri obeh antibiotikih. Končni OD<sub>600</sub> je bil nižji kot pri kontroli pri vseh koncentracijah za oba antibiotika, z izjemo ampicilina pri vrednosti MIK, kjer razlika ni bila statistično značilno različna. Vse krivulje, z izjemo ampicilina pri vrednosti MIK, so bile uvrščene v skupino tipa krivulj IV kjer ni bilo povišanja OD<sub>600</sub> (v primerih kjer je opaziti povišanje OD<sub>600</sub>, to ni bilo statistično značilno). Pri koncentraciji ampicilina MIK je bila krivulja tipa I (običajna rastna krivulja). Tetraciklin je imel večji vpliv na rast bakterij *L. plantarum* kot ampicilin. Majhno povišanje OD<sub>600</sub> je bilo zaznano le pri vrednostih MIK in 3×MIK, vendar ni bilo statistično značilno. Pri vrednostih 10×MIK in 30×MIK je prišlo celo do padca OD<sub>600</sub> in inaktivacije bakterij. Pri izpostavljenosti le ampicilinu, se je učinek na rast večal (padanje končnega OD<sub>600</sub>) z višanjem koncentracije, pri vrednosti 10×MIK je prišlo do popolne inhibicije rasti. Omeniti je potrebno, da vrednost MIK uporabljena za poskus ni bila popolnoma inhibitorna, ker smo uporabili višjo gostoto celic ( $10^8$  CFU/ml) kot pri določanju MIK ( $10^5$  CFU/ml).

Kombinacija elektroporacije in antibiotika je bila učinkovitejša od uporabe zgolj antibiotika ali zgolj elektroporacije. Tudi pri kombinirani uporabi je imel tetraciklin večji vpliv na rast, kar se sklada z rezultati, kjer smo uporabili le antibiotik. Že pri najnižji jakosti električnega polja (5 kV/cm) in najnižji koncentraciji tetraciklina (vrednost MIK) ni bilo rasti. Vse krivulje s

tetraciklinom so bile uvrščene v skupino tipa IV (brez povišanja  $OD_{600}$ ), pri vseh se  $OD_{600}$  celo zniža. Proti koncu meritev se krivulja za tetraciklin v vrednosti MIK, v kombinaciji s 5 kV/cm sicer nekoliko vzpone, a ta razlika ni bila statistično značilna. Kombinacija elektroporacije in ampicilina je vodila v inhibicijo rasti pri skoraj vseh vzorcih, krivulje so bile uvrščene v skupino IV. Izjema je bila kombinacija z najnižjo jakostjo električnega polja 5 kV/cm skupaj z najnižjo koncentracijo MIK, kjer je bila krivulja tipa I (običajna rastna krivulja). Ta je bila skoraj enaka kot krivulja, kjer smo uporabili le elektroporacijo pri 5 kV/cm. V primerjavi s krivuljo, kjer smo uporabili le ampicilin v vrednosti MIK, pa je kombinacija s 5 kV/cm vodila v zamik log faze, počasnejšo rast in nižji končni  $OD_{600}$ . Krivulje za ampicilin pri vrednosti MIK skupaj z višjimi amplitudami električnega polja so sicer povzročile dvig  $OD_{600}$ , vendar ta ni statistično značilen. Majhne poškodbe po elektroporaciji so bile torej do neke mere odpravljene tudi pri nizkih koncentracijah ampicilina in sobni temperaturi, vendar okrevanje ni bilo popolno, saj bakterije niso dosegle primerljivo gostote kot pri kontroli. Po drugi strani pa je kombinacija elektroporacije in tetraciklina vodila celo do padca  $OD_{600}$  celo pri najnižji koncentraciji in najnižji amplitudi električnega polja.



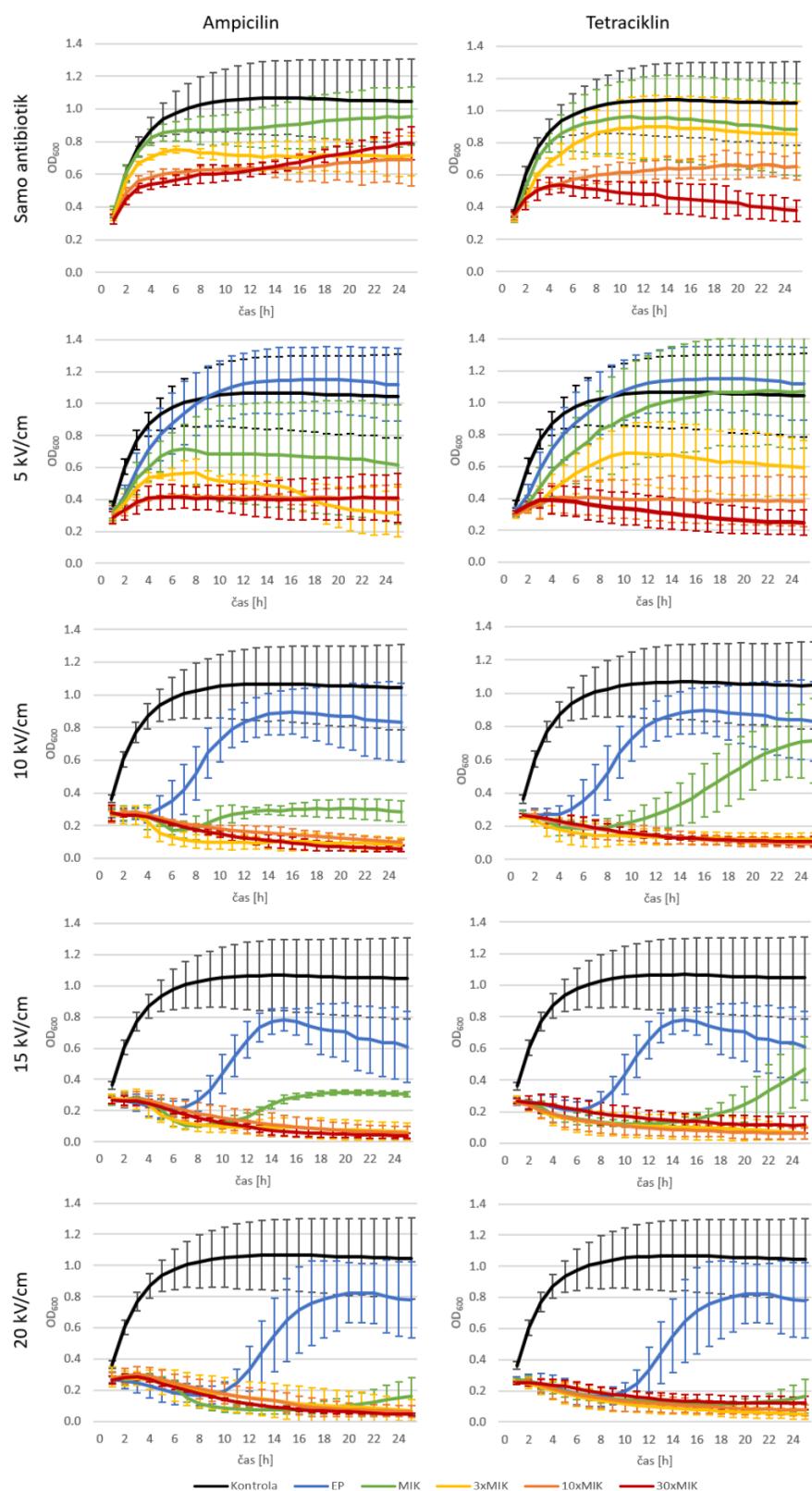
Slika 13: Rastne krivulje bakterij *L. plantarum* pri inkubaciji pri sobni temperaturi. N=6 za kontrolo in vzorce kjer smo uporabili le elektroporacijo, ter N=3 pri vzorcih samo z antibiotikom ali pri kombinacijah. EP=elektroporacija; MIK=minimalna inhibitorna koncentracija (objavljeno v Lovšin in sod. (2024)).

#### 4.1.5.3 Vpliv kombinacije elektroporacije in antibiotika na kinetiko rasti pri 37 °C

Na sliki 14 so prikazane rastne krivulje bakterij *L. plantarum* po izpostavitvi elektroporaciji in antibiotiku, ter inkubaciji pri 37 °C; povprečne vrednosti analiziranih parametrov pa so podane v prilogi D.

Izpostavljenost samo antibiotiku in inkubaciji pri 37 °C je večinoma vodila v krivulje tipa I, z običajno rastno krivuljo, izjema je bil tetraciklin pri vrednosti 30×MIK, kjer je bila krivulja tipa IV, povišanje OD<sub>600</sub> ni bilo statistično značilno. Tetraciklin je imel večji vpliv na rast, vendar pri koncentracijah ki so bile višje od vrednosti MIK. Rast je bila počasnejša (pri vrednostih  $\geq 3\times\text{MIK}$ ) in končni OD<sub>600</sub> je bil nižji kot pri kontroli (pri vrednostih  $\geq 10\times\text{MIK}$ ). Izpostavljenost samo ampicilinu ni imela vpliva na stopnjo rasti ali končni OD<sub>600</sub>. Ta je bil sicer nižji kot pri kontroli, ampak razlike niso bile statistično značilne. Začetni OD<sub>600</sub> je bil enak kot pri kontroli pri vseh koncentracijah in obeh antibiotikih.

Kombinacija elektroporacije in antibiotika je bila učinkovitejša od uporaba zgolj antibiotika ali zgolj elektroporacije ter je vodila v delno ali popolno inhibicijo rasti pri obeh antibiotikih. Izjema je bil tetraciklin pri najnižji koncentraciji MIK v kombinaciji s 5 ali 10 kV/cm, kjer končni OD<sub>600</sub> ni bil nižji kot pri kontroli. Izpostavljenost ampicilinu in elektroporaciji je večinoma vodila v krivulje tipa IV (brez povišanja OD<sub>600</sub>), razen pri koncentraciji MIK skupaj s 5 kV/cm, kjer je bila krivulja tipa I (običajna oblika rastne krivulje). Ta je sicer imela počasnejšo rast in nižji končni OD<sub>600</sub> kot kontrola. Začetni OD<sub>600</sub> je bil nižji pri vseh koncentracijah v kombinaciji z jakostjo električnega polja  $\geq 10$  kV/cm. Pri 5 kV/cm je bil začetni OD<sub>600</sub> nižji le pri najvišji koncentraciji. Končni OD<sub>600</sub> je bil nižji pri vseh kombinacijah ampicilina in elektroporacije. Izpostavljenost tetraciklinu v kombinaciji z elektroporacijo je prav tako večinoma vodila v krivulje tipa IV (brez povišanja OD<sub>600</sub>). Izjema sta bili kombinaciji 5 kV/cm skupaj s tetraciklinom v koncentracijah MIK ali 3×MIK, kjer sta bili krivulji tipa I (običajna oblika rastne krivulje, vendar s počasnejšo rastjo), ter kombinaciji 10 ali 15 kV/cm skupaj s tetraciklinom v koncentraciji MIK, kjer sta bili krivulji tipa III (padec OD<sub>600</sub> pred log fazo, ta je bila zakasnjena in je imela počasnejšo rast). Tudi pri tetraciklinu je bil začetni OD<sub>600</sub> nižji pri vseh koncentracijah v kombinaciji z jakostjo električnega polja  $\geq 10$  kV/cm. Pri 5 kV/cm je bil začetni OD<sub>600</sub> nižji pri koncentracijah do 10×MIK, vendar z manjšo statistično značilnostjo. Končni OD<sub>600</sub> je bil nižji skoraj pri vseh kombinacijah tetraciklina in elektroporacije razen pri najnižji koncentraciji MIK skupaj s 5 ali 10 kV/cm.

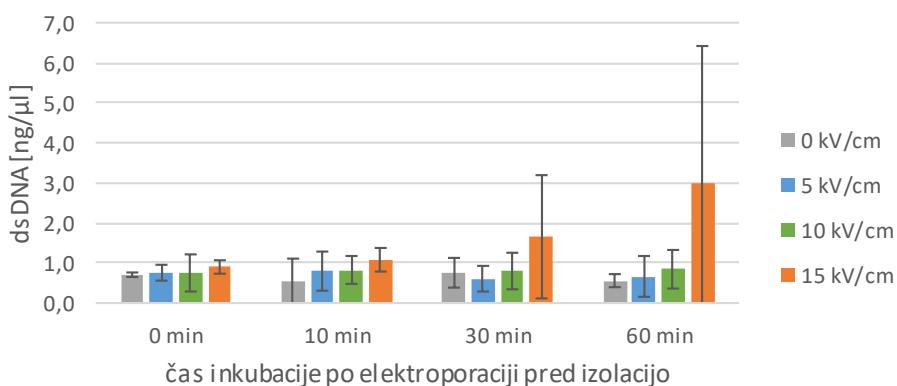


Slika 14: Rastne krivulje bakterij *L. plantarum* pri inkubaciji pri 37 °C. N=6 za kontrolo in vzorce kjer smo uporabili le elektroporacijo, ter N=3 pri vzorcih samo z antibiotikom ali pri kombinacijah. EP= elektroporacija; MIK=minimalna inhibitorna koncentracija.

## 4.2 IZTEKANJE IN FRAGMENTACIJA DNA

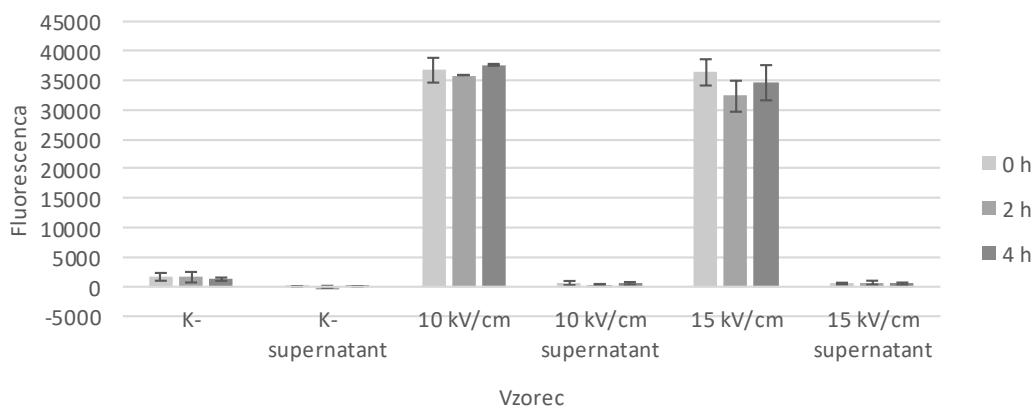
### 4.2.1 Iztekanje DNA po elektroporaciji

Količina genomske dvoverižne DNA (dsDNA) v supernatantu po elektroporaciji bakterij *E. coli* z  $1\times 1$  ms pulzom pri treh jakostih električnega polja je bila zelo nizka (slika 15), med vzorci ni bilo statistično značilnih razlik. Najvišja koncentracija dsDNA je bila pri jakosti električnega polja 15 kV/cm po 60 min inkubacije pri sobni temperaturi ( $2,44\pm 3,37$  ng/μl). Število bakterij *E. coli* je bilo pri teh pogojih zmanjšano: pri 5 kV/cm za 0,77 log, pri 10 kV/cm za 1,88 log in pri 15 kV/cm za 3,24 log.



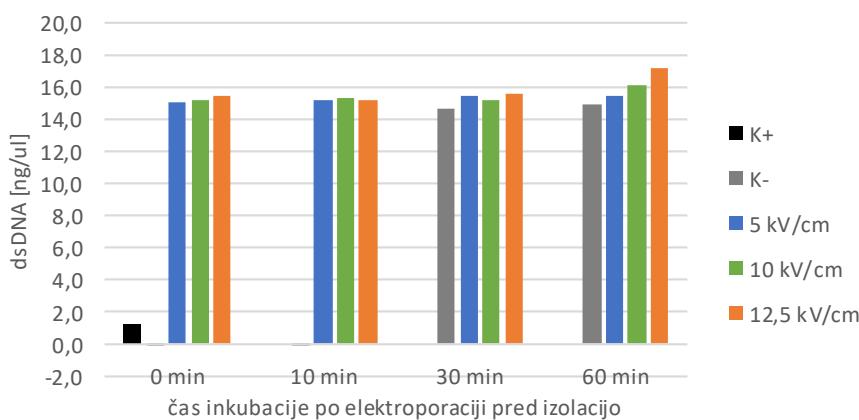
Slika 15: Koncentracija genomske dsDNA v supernatantu po elektroporaciji bakterij *E. coli* z  $1\times 1$  ms pulzom. Koncentracija genomske dsDNA v pozitivni kontroli (izolacija DNA s kitom) je bila  $19,65\pm 1,36$ . N=3.

Zaradi nizkih koncentracij iztekle genomske dsDNA pri bakterijah *E. coli*, smo v nadaljevanju preverili ali se DNA dejansko izloči iz elektroporiranih celic. Po elektroporaciji smo peletu in supernatantu dodali propidijev jodid in primerjali jakost fluorescence v vzorcih. Kot prikazuje slika 16, je večina DNA ostala v peletu. Kljub znatni inaktivaciji (do -3,24 log) in 4-h inkubaciji pri sobni temperaturi DNA ni bila izločila iz ostankov celic, zato je v supernatantu skoraj nismo zaznali.

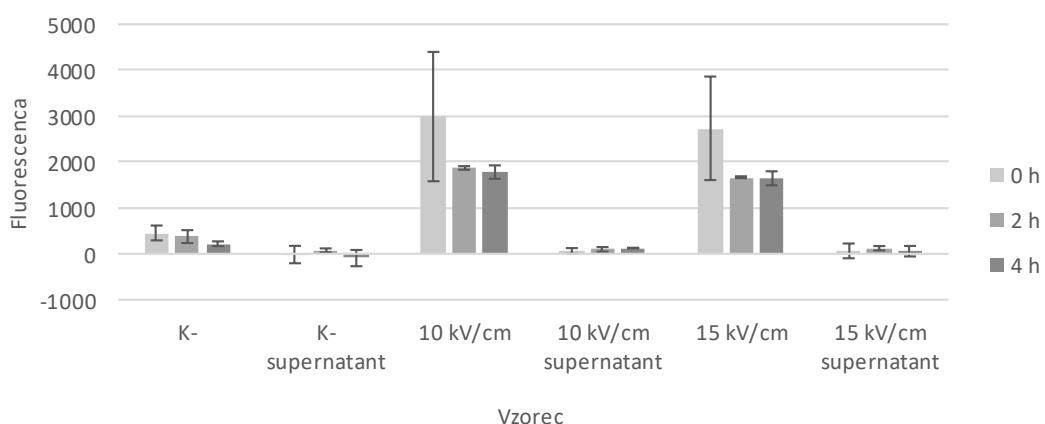


Slika 16: Detekcija DNA s propidijevim jodidom v supernatantu in peletu po elektroporaciji bakterij *E. coli*. K-=negativna kontrola brez elektroporacije. N=2.

Pri bakterijah *L. plantarum* smo po elektroporaciji dobili višje koncentracije genomske dsDNA v supernatantu (slika 17), vendar je večji del DNA ostal v peletu skupaj z ostanki celic (slika 18). Stopnja inaktivacije bakterij *L. plantarum* je znašala pri  $5 \text{ kV/cm}$   $-0,72 \text{ log}$ , pri  $10 \text{ kV/cm}$   $-3,13 \text{ log}$  in pri  $12,5 \text{ kV/cm}$   $-3,81 \text{ log}$ . Nižja maksimalna jakost električnega polja  $12,5 \text{ kV/cm}$  (slika 17), je bila uporabljena zaradi višjega toka, ki je pri  $15 \text{ kV/cm}$  že povzročil električni preboj. Ta eksperiment je bil izveden le enkrat. Pri pozitivni kontroli je bila koncentracija DNA zelo nizka, kar nakazuje, da izbrani kit za izolacijo DNA ni bil optimalen za bakterije *L. plantarum*. Dodatne kemijske ali mehanske lize nismo uporabili, da ne bi dodatno poškodovali DNA, ki smo jo nameravali uporabiti tudi za analizo fragmentiranosti iztekle DNA.



Slika 17: Koncentracija genomske dsDNA v supernatantu po elektroporaciji bakterij *L. plantarum*. K+=pozitivna kontrola (izolacija DNA s kitom), K-= negativna kontrola brez elektroporacije. N=1.

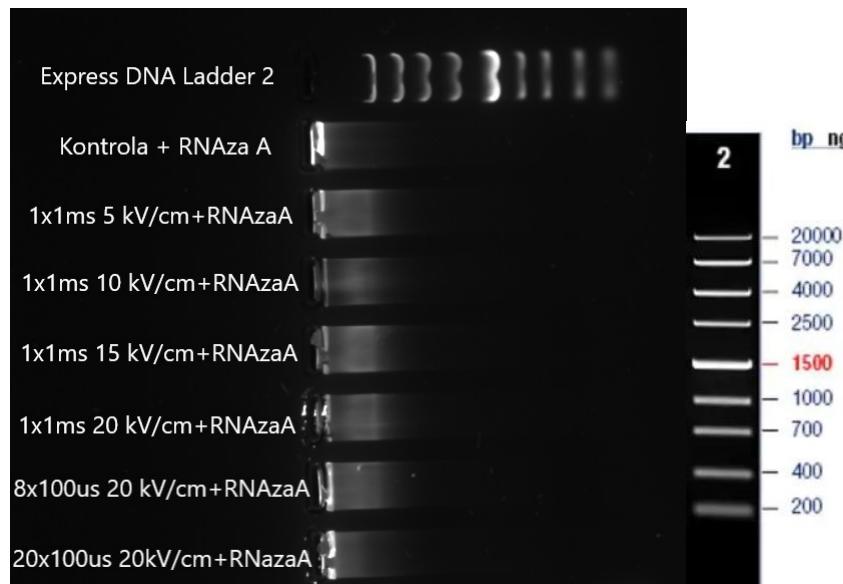


Slika 18: Detekcija DNA s propidijevim jodidom v supernatantu in peletu po elektroporaciji bakterij *L. plantarum*. K-= negativna kontrola brez elektroporacije. N=2.

Ker je že iz prve ponovitve poskusov dosledno izhajalo, da iztekanja DNA po elektroporaciji z razpoložljivo opremo in metodami ne bo mogoče zanesljivo kvantitativno ovrednotiti, smo se odločili, da druge in tretje ponovitve teh poskusov ne bomo izvajali.

#### 4.2.2 Vpliv električnih pulzov na fragmentacijo izolirane DNA

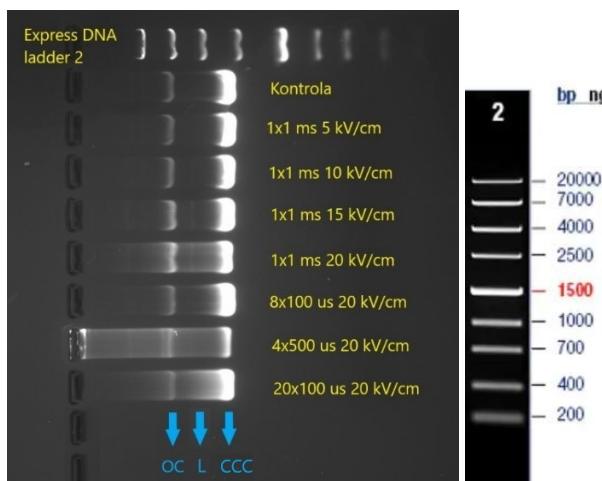
Zaradi premajhne koncentracije genomske DNA (gDNA) v supernatantu po elektroporaciji, ki so onemogočale testiranje njene fragmentiranosti, smo električnim pulzom izpostavili predhodno izolirano DNA. Parametre elektroporacije smo izbrali glede na do sedaj uporabljene parametre ( $1 \times 1$  ms, od 5 do 20 kV/cm), in dodali različno dolge pulze, pri katerih sta število pulzov in amplituda določeni glede na zmogljivost elektroporatorja. Za eksperimente smo uporabili tudi pulze  $8 \times 100$  µs, ki so pogosta izbira pri elektroporaciji celičnih linij, vključno za namen elektrotransfekcije. Na sliki 19 je prikazana agarozna gelska elektroforeza, kjer je opazna manjša fragmentacija gDNA po izpostavitvi električnim pulzom. Vidna sta dva šibka dodatna fragmenta, manjša prisotnost genomske DNA v jamici ter »razpotegnjeno« signalu.



Slika 19: Levo: agarozna gelska elektroforeza izolirane gDNA izpostavljeni električnim pulzom. Desno: ZipRuler Express DNA lestvica 2 s pripadajočimi fragmenti (bp=bazni par).

V nadaljevanju smo raziskali vpliv električnih pulzov na fragmentacijo plazmidne DNA (pDNA), in sicer plazmid pEGFP-N1 (4,7 kb). Na sliki 20 je prikazana agarozna gelska elektroforeza elektroporirane pDNA, kjer je opazno drugačno razmerje med tremi oblikami pDNA: kovalentno zaprti krog oz. ccc oblika (iz angl. »covalently closed circle«), odprt krog oz. oc oblika (iz angl.: »open circle«) in linearna oblika. Uporaba parametrov  $4 \times 500$  µs pri 20 kV/cm je povzročila tudi fragmentacijo, vidno kot razpotegnjeni signal na gelu. Izračunali smo tudi dovedeno energijo (preglednica 5) po enačbi 3, pri čemer je N število pulzov, U dovedena napetost,  $t_{pulz}$  dolžina enega pulza in I doveden tok. Iz rezultatov vidimo, da je bila največja fragmentacija prisotna pri protokolu z najvišjo dovedeno energijo.

$$\text{Dovedena energija [J]} = N \times U[V] \times t_{pulz} \times 10^{-6}[s] \times I[A] \quad \dots (3)$$



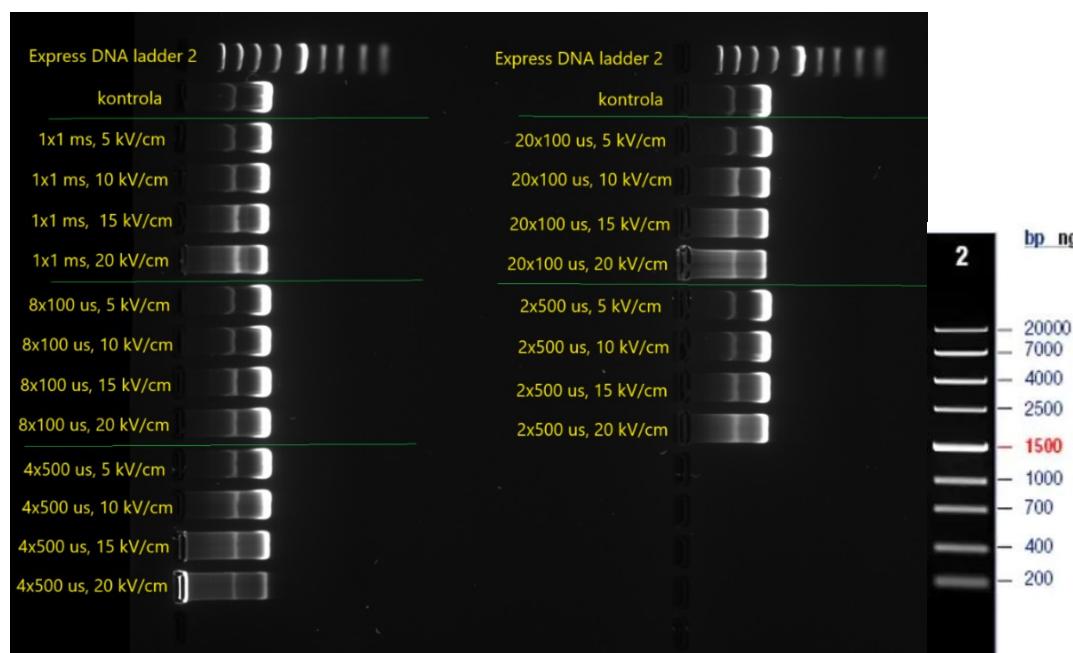
Slika 20: Levo: agarozna gelska elektroforeza izolirane pDNA izpostavljene električnim pulzom. OC=odprt krog, L=linearna oblika (velikost pEGFP-N1 je 4,7 kb), CCC= kovalentno zaprt krog. Desno: ZipRuler Express DNA lestvica 2 s pripadajočimi fragmenti (bp=bazni par).

Preglednica 5: Testirani parametri elektroporacije in dovedena energija. \*Pri 1x1 ms 20 kV/cm je prišlo do preboja, a smo vzorec vseeno nanesli na gel. Dovedene energije so izračunane po enačbi 3. N=število pulzov, U=dovedena napetost,  $t_{pulz}$ =dolžina enega pulza, I=izmerjeni tok.

Protokol	N	U [V]	$t_{pulz}$ [ $\mu$ s]	I [A]	Dovedena energija <sub>min</sub> [J]
1x1 ms, 5 kV/cm	1	500	1000	2	1
1x1 ms, 10 kV/cm	1	1000	1000	4	4
1x1 ms, 15 kV/cm	1	1500	1000	6,5	9,75
1x1 ms, 20 kV/cm *	1	2000	1000		
8x100 $\mu$ s, 20 kV/cm	8	2000	100	7,5	12
4x500 $\mu$ s, 20 kV/cm	4	2000	500	11	44
20x100 $\mu$ s, 20 kV/cm	20	2000	100	7,5	30

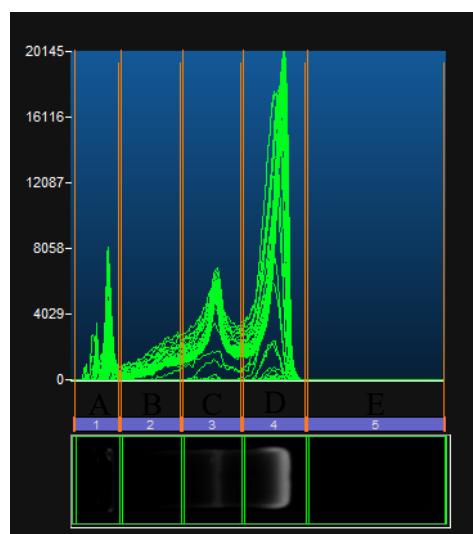
#### 4.2.2.1 Vpliv električnih pulzov na fragmentacijo izolirane pDNA

V nadaljevanju smo razširili nabor testiranih parametrov na štiri različne jakosti električnega polja za vsak tip pulzov. Na sliki 21 je prikazana agarozna gelska elektroforeza pDNA po izpostavitvi električnim pulzom.

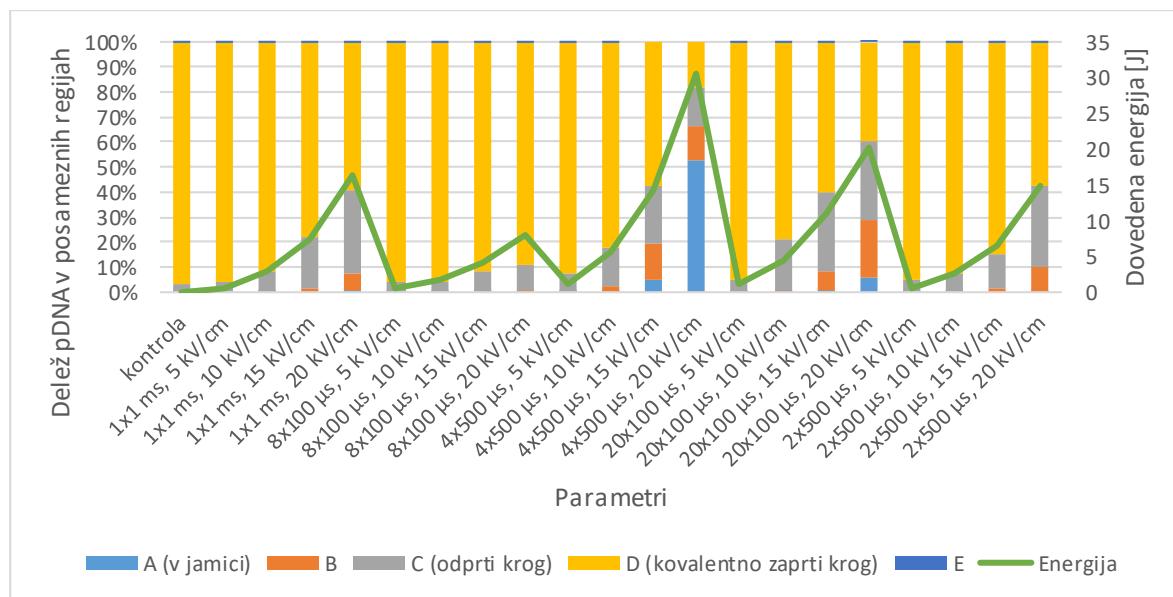


Slika 21: Levo: agarozna gelska elektroforeza pDNA izpostavljene električnimpulzom. Desno: ZipRuler Express DNA lestvica 2 s pripadajočimi fragmenti (bp=bazni par).

Za nadaljnjo analizo smo uporabili program Alliance Q9 (UviTec, Cambridge, Velika Britanija) s katerim smo posamezne vzorce na gelu razvrstili v pet regij, kot je prikazano na sliki 22. Delež DNA v posamezni regiji smo izračunali kot razmerje med jakostjo signala v določeni regiji in celotno jakostjo signala za ta vzorec (vsota jakosti vseh petih regij). Uporabljeni parametri elektroporacije, skupaj z dovedeno energijo in razporeditvijo DNA po posameznih regijah na gelu so prikazani na sliki 23. Za to analizo smo potrebovali zmerno osvetlitev brez nasičenosti signala, zato linearna oblika pDNA ni vidna.

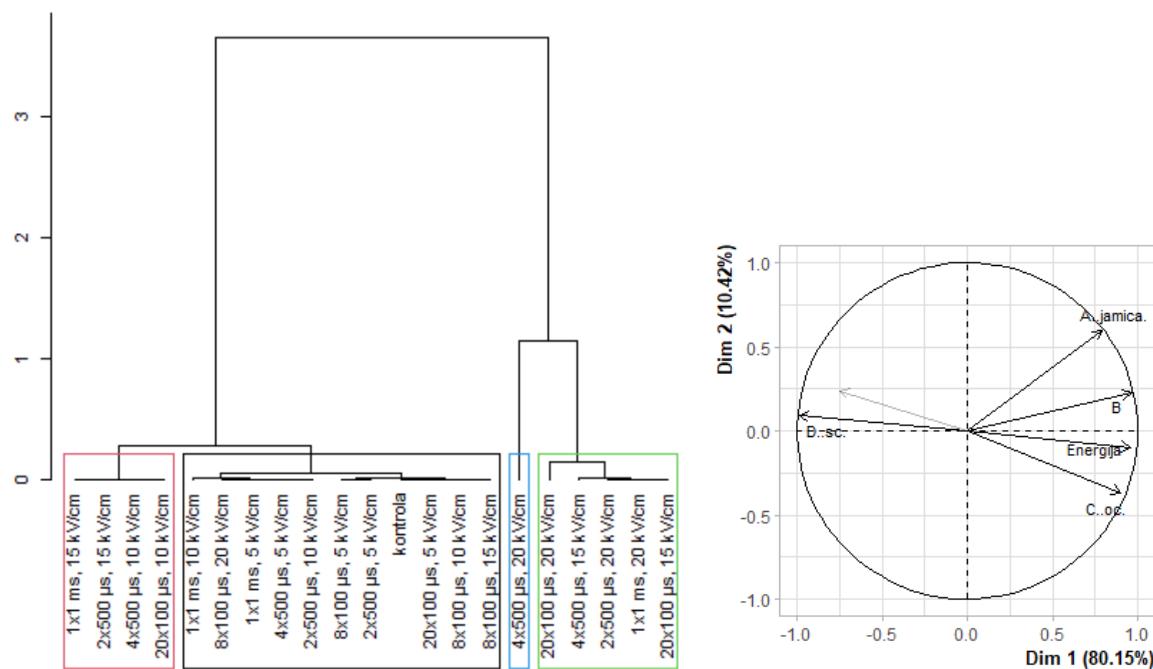


Slika 22: Regije na elektroforeznem gelu, ki smo jih uporabili za nadaljno analizo fragmentiranosti pDNA. Primer za parameter  $4 \times 500 \mu\text{s}$ ,  $15 \text{ kV/cm}$ .



Slika 23: : Delež električnim pulzom izpostavljene pDNA v posameznih regijah na gelu in pripadajoča dovedena energija (N=1).

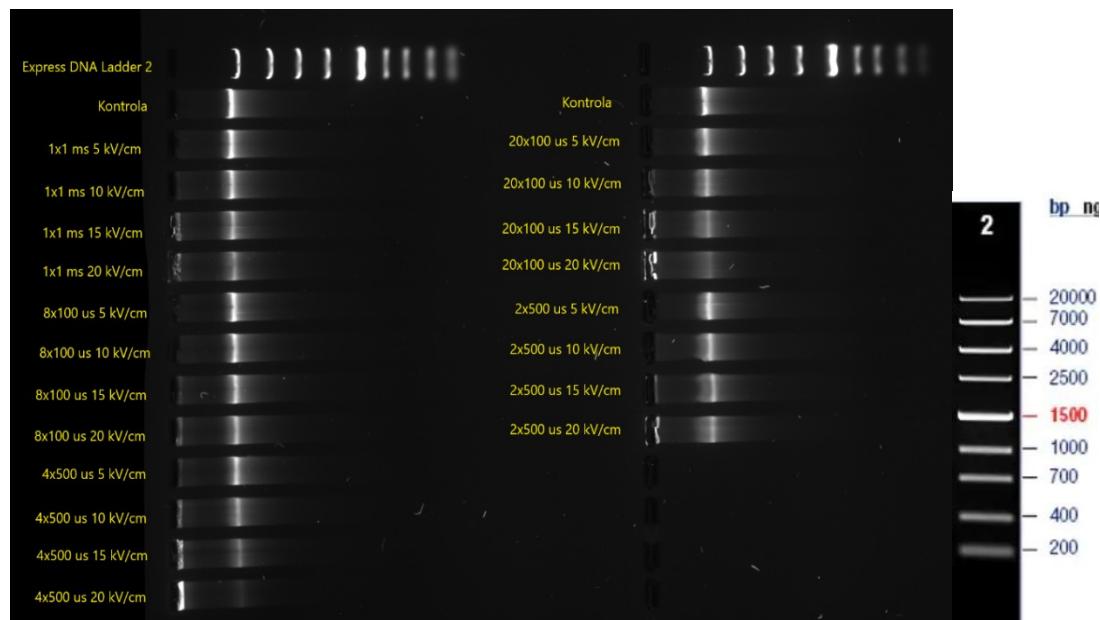
Z uporabo analize glavnih komponent oz. PCA (iz angl.: »principal component analysis«) smo vzorce razdelili v štiri skupine (slika 24: levo), na podlagi deleža pDNA v posameznih regijah in dovedene energije. Analizo smo opravili s podatki ene ponovitve. Za razvrščanje smo uporabili prvi dve dimenziji analize PCA, ki skupaj pojasnita 90,57% variabilnosti. Na razvrščanje vzorcev v skupine sta največji vpliv imela delež pDNA v ccc obliku in dovedena energija, ki imata negativno korelacijo (slika 24: desno). Vzorec s parametri 4×500 µs 20 kV/cm se najbolj razlikuje od ostalih vzorcev (skupina 4), z najvišjim deležem pDNA v regiji A (52,85 %) in najvišjo dovedeno energijo (30,55 J), ter najmanjšim deležem pDNA v ccc obliku (18,62 %). V skupino 1 so poleg kontrole razvrščeni še vzorci, kjer smo uporabili manjše število kratkih pulzov (8×100 µs pulzi) ne glede na amplitudo, več kratkih pulzov pri nizki amplitudi (20×100 µs pulzi do 5 kV/cm) ali dolge pulze pri nizki amplitudi (500 µs ali 1 ms pulzi do 10 kV/cm). Za to skupino je značilen visok delež pDNA v ccc obliku (od 88,62 do 96,31 %), ter nizki deleži pDNA v oc obliku (od 3,39 do 10,25 %) in nizka dovedena energija (od 0 do 8,01 J). V skupini 2 so vzorci kjer smo uporabili več kratkih pulzov pri srednji amplitudi (20×100 µs pulzi pri 10 kV/cm) ali dolge pulze pri srednji amplitudi (500 µs ali 1 ms pulzi pri 10 do 15 kV/cm). Za to skupino so značilne povprečne vrednosti testiranih deležev in dovedene energije (od 4,38 do 7,35 J). V skupini 3 so vzorci kjer smo uporabili več kratkih pulzov pri visoki amplitudi (20×100 µs pulzi pri 15 kV/cm ali več) ali dolge pulze pri visoki amplitudi (500 µs ali 1 ms pulzi pri 15 kV/cm ali več). Za to skupino so značilni visoka deleža pDNA v obliku odprtrega kroga (od 23,05 do 33,30 %) in v regiji B (od 6,89 do 22,19 %), ter visoka dovedena energija (od 11,09 do 20,16 J), delež pDNA v ccc obliku pa je pri teh vzorcih nizek (od 39,40 do 60,36 %).



Slika 24: Analiza glavnih komponent deležev pDNA po regijah in dovedene energije. Levo: skupine parametrov elektroporacije s podobnim deležem pDNA po regijah: skupina 1 (črna), skupina 2 (rdeča), skupina 3 (zelena) in skupina 4 (modra). Desno: faktorji spremenljivk. \*Analiza je bila izvedena na podatkih ene ponovitve.

#### 4.2.2.2 Vpliv električnih pulzov na fragmentacijo izolirane gDNA

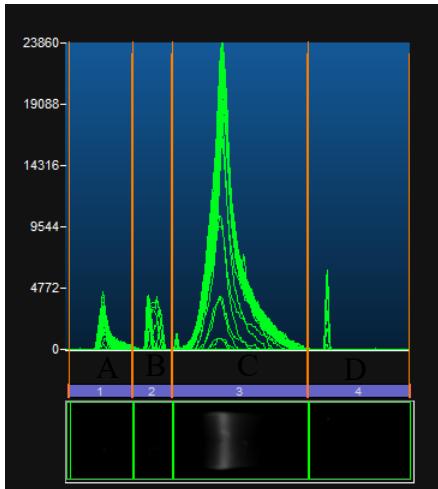
Razširjen nabor parametrov smo testirali tudi na izolirani gDNA. Na sliki 25 je prikazana agarozna gelska elektroforeza gDNA po izpostavitvi električnim pulzom.



Slika 25: Levo: agarozna gelska elektroforeza gDNA izpostavljene električnim impulzom. Desno: ZipRuler Express DNA lestvica 2 s pripadajočimi fragmenti (bp=bazni par).

Za nadaljnjo analizo smo vzorce na gelu razvrstili v štiri regije, kot je prikazano na sliki 26. Delež DNA v posamezni regiji je bil izračunan kot jakost signala v regiji glede na celoten signal

za ta vzorec (seštevek vseh štirih regij). Uporabljeni parametri elektroporacije s pripadajočo dovedeno energijo in deleži DNA v posameznih regijah na gelu so prikazani na sliki 27.



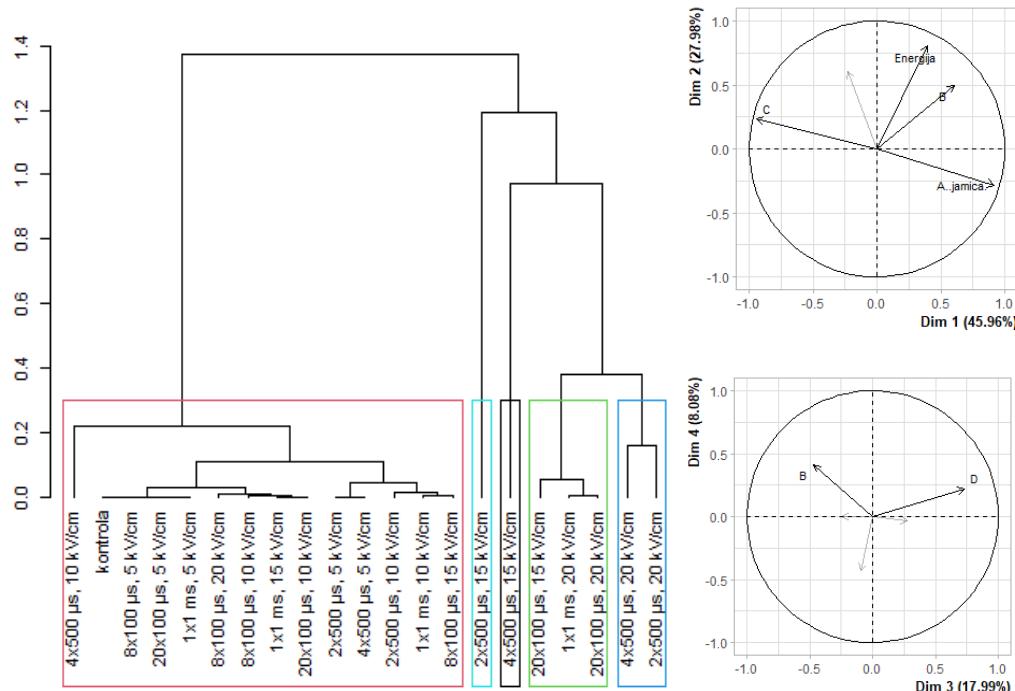
Slika 26: Regije na elektroforeznem gelu, ki smo jih uporabili za analizo fragmentiranosti gDNA. Primer za parameter  $8 \times 100 \mu\text{s}$ ,  $15 \text{ kV/cm}$ .



Slika 27: Delež električnim pulzom izpostavljene gDNA v posameznih regijah na gelu in pripadajoča dovedena energija ( $N=1$ ).

Pri analizi fragmentacije genomske DNA po izpostavitvi električnim pulzom nismo opazili korelacije med jakostjo dovedene energije in stopnjo fragmentacije DNA. Z uporabo analize glavnih komponent oz. PCA smo vzorce razdelili v pet skupin (slika 28: levo), glede na delež gDNA v posameznih regijah in dovedeno energijo, pri čemer smo analizirali podatke ene ponovitve. Za razvrščanje smo uporabili prve tri dimenzije analize PCA, ki skupaj pojasnijo 91,93 % celotne variabilnosti. Na razvrščanje vzorcev v skupine sta imela največji vpliv deleža gDNA v regijah A in C, ki imata negativno korelacijo (slika 28: desno zgoraj). V skupini 1 so poleg kontrole še vzorci, kjer smo uporabili malo kratkih pulzov ( $8 \times 100 \mu\text{s}$  pulzi) ne glede na amplitudo, več kratkih pulzov pri nizki amplitudi ( $20 \times 100 \mu\text{s}$  pulzi do  $10 \text{ kV/cm}$ ) ali dolge pulze pri nizki ali srednji amplitudi ( $500 \mu\text{s}$  ali  $1 \text{ ms}$  pulzi do  $15 \text{ kV/cm}$ ). Za to skupino sta

značilna nizka dovedena energija (od 0 do 6,09 J) in majhen delež gDNA v regiji B (od 0 do 1,09 %). V skupini 2 je le en vzorec in sicer  $2 \times 500 \mu\text{s}$  15 kV/cm, za katerega je značilen visok delež gDNA v regiji A (93,55 %) in nizek delež v regiji C (6,41 %). Tudi v skupini 3 je le en vzorec,  $4 \times 500 \mu\text{s}$  15 kV/cm, za katerega je značilen najvišji delež gDNA v regiji D (1,17 %). V skupini 4 so vzorci, kjer smo uporabili več kratkih pulzov pri visoki amplitudi ( $20 \times 100 \mu\text{s}$  pulzi pri 15 kV/cm ali več) ali dolge pulze pri visoki amplitudi (1 ms pulz pri 20 kV/cm), za katere je značilna visoka dovedena energija (od 8,34 do 15,28 J). V skupini 5 pa so vzorci, kjer smo uporabili dolge pulze pri visoki amplitudi (500  $\mu\text{s}$  pulzi pri 20 kV/cm), za katere je značilen visok delež gDNA v regiji B (od 3,17 do 7,50 %) in visoka dovedena energija (od 9,57 do 22,57 J).

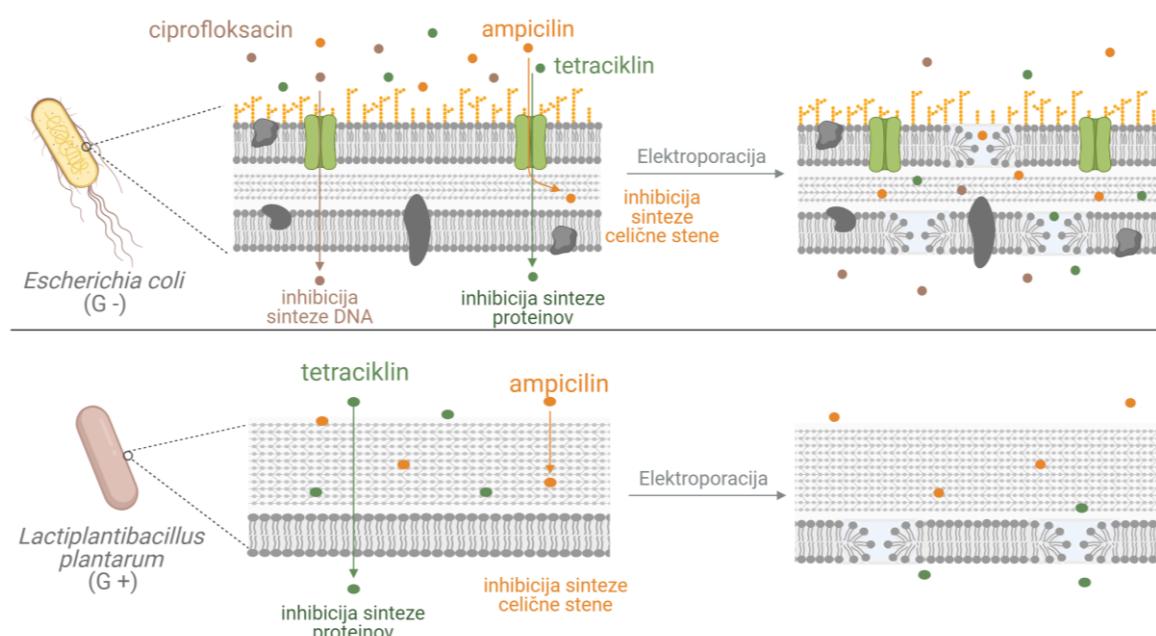


Slika 28: Analiza glavnih komponent deležev gDNA po regijah in dovedene energije. Levo: skupine parametrov elektroporacije s podobnim deležem gDNA po regijah: skupina 1 (rdeča), skupina 2 (turkizna), skupina 3 (črna), skupina 4 (zelena) in skupina 5 (modra). Desno: faktorji spremenljivk. \*Analiza je bila izvedena na podatkih ene ponovitve.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 ELEKTROPORACIJA RAZLIČNO POTENCIRA UČINKOVITOST ANTIBIOTIKOV GLEDE NA NJIHOV MEHANIZEM DELOVANJA

V prvem delu smo proučevali vpliv elektroporacije na povečanje učinkovitosti antibiotikov z različnimi mehanizmi delovanja: ampicilin (zavira sintezo celične stene), tetraciklin (zavira sintezo proteinov) in ciprofloksacin (zavira sintezo DNA). Pri bakterijah *Escherichia coli* K12 ER1821 smo zaznali največjo učinkovitost kombinirane uporabe elektroporacije z ampicilinom, pri bakterijah *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 pa s tetraciklinom.



Slika 29: Shema sestave celične stene G- bakterije *E. coli* in G+ bakterije *L. plantarum*, ter lokacije tarč treh izbranih antibiotikov (ampicilin, tetraciklin in ciprofloksacin).

Pri inaktivaciji bakterij *E. coli* s kombinirano uporabo elektroporacije in antibiotika je bila potenciacija v povprečju najvišja za ampicilin, najnižja pa za tetraciklin. To bi lahko pojasnili z lažjim dostopom do tarče v primeru ampicilina, ki mora preiti le zunanjega membrana celične stene G- bakterij *E. coli*, da bi preprečil sintezo peptidoglikana z zaviranjem peptidoglikanskih transpeptidaz. Nasprotno pa mora tetraciklin preiti preko celotne bakterijske ovojnici, da v citosolu preko vezave na ribosomsko podenoto zavre sintezo proteinov. Tetraciklin je bil sicer pri višjih koncentracijah že sam po sebi manj učinkovit v primerjavi z drugima dvema antibiotikoma. Na manjšo učinkovitost in/ali potenciacijo tetraciklina lahko vpliva tudi njegova nekoliko večja molekulskna masa (444,4 g/mol) v primerjavi z ampicilinom (349,4 g/mol) in ciprofloksacinom (331,3 g/mol) (PubChem, b. l.), ali pa ima zaviranje sinteze proteinov manjši vpliv na inaktivacijo in okrevanje bakterij *E. coli* po elektroporaciji, kot zaviranje sinteze peptidoglikana ali DNA. Pri okrevanju reverzibilno elektroporiranih bakterij *E. coli* je sinteza proteinov, RNA in peptidoglikana po nekaterih raziskavah ocenjena kot manj pomembna od razpoložljive energije in od biosinteze lipidnih molekul (García in sod., 2006). Vpliva naboja antibiotika na njegovo potenciacijo z elektroporacijo nismo zaznali. Celična stena bakterij ima

negativen naboj (Benarroch in Asally, 2020), zato bi pričakovali večji transport in s tem potenciacijo za pozitivno nabite (Chopra in Roberts, 2001) molekule tetraciklina in manjši za negativno nabite (Nairi in sod., 2017) molekule ampicilina, medtem ko bi bil transport za električno nevtralne molekule, kot je ciprofloksacin pri nevtralnem pH, nekje vmes (dos Santos in sod., 2022). Naši rezultati tega ne kažejo, iz česar lahko sklepamo, da je vpliv električnega naboja molekule, četudi morda obstaja, pri potenciaciji antibiotikov znatno šibkejši od vpliva lokacije njihove tarče.

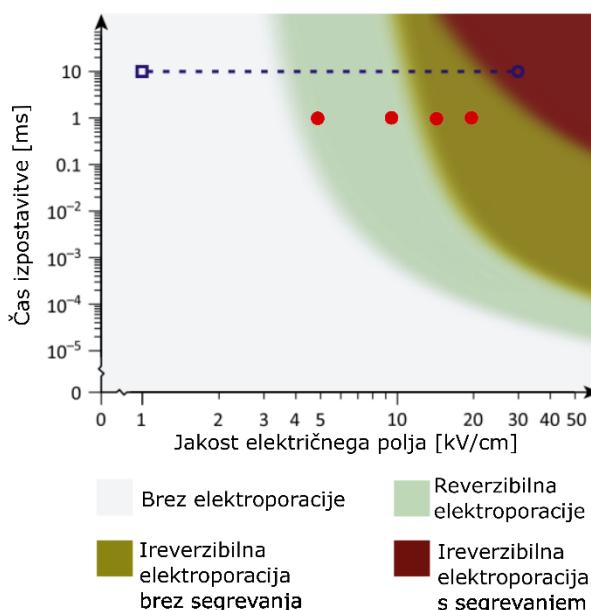
Pri inaktivaciji bakterij *L. plantarum* s kombinirano uporabo elektroporacije in antibiotika je bila potenciacija izrazito večja za tetraciklin, kot za ampicilin. To bi lahko bila posledica izboljšane permeabilizacije membrane in transporta tetraciklina do tarče znotraj bakterij, mogoče pa je tudi, da ima zaviranje sinteze proteinov večji vpliv na okrevanje in inaktivacijo bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji kot zaviranje sinteze celične stene. Ampicilin pri G+ bakterijah ne potrebuje olajšanega dostopa do tarče, saj je peptidoglikanski sloj že najbolj zunanjji sloj ovojnice, zato je bila manjša potenciacija pričakovana. Kljub temu je tudi pri ampicilinu prišlo do opazne potenciacije inaktivacije z elektroporacijo, kar nakazuje, da so poleg permeabilizacije membrane bakterij pomembni tudi drugi učinki elektroporacije, ki otežijo njihovo okrevanje (poškodbe celične stene in iztekanje molekul). Poskusi s ciprofloksacinom na tem sevu niso bili uspešni, saj so koncentracije, ki so imele pomemben učinek, toliko zvišale električno prevodnost suspenzije z bakterijami, da je pri elektroporaciji prihajalo do prebojev. Pri tem prihaja tudi do segrevanja, nastanka tlačnega vala in emitirane svetlobe, kar pomembno zamegli interpretacijo rezultatov in vnaša bistvene pristranskosti, saj je inaktivacija lahko posledica teh spremljajočih učinkov.

S tem smo potrdili našo prvo hipotezo, ki pravi, da elektroporacija različno potencira učinek antibiotika v odvisnosti od njihovega načina delovanja oziroma lokacije njegove tarče. Največjo potenciacijo inaktivacije smo dosegli pri antibiotikih, ki jim elektroporacija najizraziteje izboljša dostop do njihove tarče.

Večjo potenciacijo antibiotikov, ki zavirajo sintezo proteinov pri G+ bakterijah, so pokazali tudi Kuyukina in sod. (2020). Po elektroporaciji se je občutljivost bakterij *R. ruber* se je najbolj povečala za neomicin (zavira sintezo proteinov), vendar le, če je bil čas okrevanja pred izpostavitvijo antibiotiku 24 h. Pri krajsih časih inkubacije pa je bila potenciacija najvišja za cefazolin, ki zavira sintezo celične stene. Omeniti je potrebno, da so v študiji spremljali spremembo občutljivosti bakterij na antibiotike po elektroporaciji in inhibicijo rasti, medtem ko je nas zanimala stopnja inaktivacije. Večja potenciacija delovanja antibiotikov, ki zavirajo sintezo proteinov, je bila zaznana tudi pri G+ bakterijah MRSA, in sicer za doksiciklin ter gentamicin (Novickij in sod., 2018b). Poudariti velja še, da so v tej študiji uporabili enake masne koncentracije za vse testirane antibiotike, kar pri različnih antibiotikih pomeni bistveno različne večkratnike MIK in močno otežuje relevantne primerjave med njimi. Pri doksiciklinu in gentamicinu so tako že brez elektroporacije lahko dosegli najvišjo inaktivacijo, pri gentamicinu celo popolno inaktivacijo, pri vankomicinu in sulfametaksazolu pa uporabljene koncentracije same po sebi celo niso imele vpliva na nivo inaktivacije (Novickij in sod., 2018b). Tudi Vadlamani in sod. (2020) so pri eni G+ (*S. aureus*) in dveh G- bakterijah (*E. coli* in *P.*

*aeruginosa*) najvišjo inaktivacijo dobili v kombinaciji z antibiotiki, ki zavirajo sintezo proteinov ali RNA. Pokazali so, da lahko z elektroporacijo dosežejo inaktivacijo G<sup>-</sup> bakterij tudi z antibiotiki, ki sicer pri njih ne delujejo. Objektivna primerjava potenciacije med antibiotiki in bakterijami pa je tudi pri rezultatih te študije otežena. Tudi tu so uporabili enak nabor masnih koncentracij za vse testirane antibiotike in za vse bakterije, čeprav ima vsaka kombinacija antibiotik-bakterija svoj specifični MIK in se ti močno razlikujejo (še posebej za rezistentne seve). Preučevane bakterije pa se močno razlikujejo tudi v obliki in velikosti, kar pri enaki amplitudi električnih pulzov pomeni velike razlike v doseženi električni napetosti na ovojnici in s tem v elektroporaciji. Večina omenjenih študij je za doseganje čim višje inaktivacije uporabila visoke jakosti električnega polja in /ali veliko število pulzov, kar poleg elektroporacije vodi tudi do segrevanja ter nastanka tlačnega vala in UV svetlobe, to pa še dodatno oteži proučevanje učinka same elektroporacije.

Inaktivacija bakterij *E. coli* in *L. plantarum* se je povečevala z naraščanjem amplitude električnega polja, koncentracije antibiotika in/ali časa inkubacije. Za razliko od bakterij *E. coli*, kjer smo zaznali potenciacijo inaktivacije tudi pri nizkih koncentracijah antibiotika, so pri bakterijah *L. plantarum* nizke koncentracije antibiotika povzročile predvsem inhibicijo rasti bakterij *L. plantarum*, medtem ko do potenciacije inaktivacije ni prišlo. Nivo inaktivacije bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji in 24-h izpostavitvi antibiotikom v koncentraciji MIK je bil namreč enak kot nivo inaktivacije 1 h po elektroporaciji brez antibiotika. Če bakterije po elektroporaciji niso bile izpostavljene antibiotiku, je prišlo do okrevanja in rasti, zato je bila inaktivacija 24 h po elektroporaciji celo nižja kot po 1 h. Pri uporabi višjih koncentracij antibiotika je prišlo do inhibicije popravila poškodb in okrevanja po elektroporaciji, zato se je povisala inaktivacija obeh bakterij. Pri povisjanju električnega polja se je inaktivacija bakterij najbolj povisala pri prehodu iz 5 na 10 kV/cm, nekoliko manj tudi pri 15 in 20 kV/cm. To je v skladu z splošno ugotovitvijo (Kotnik in sod., 2015), da pri večini bakterij 1x1 ms pulz z amplitudo 5 kV/cm povzroči šibko reverzibilno elektroporacijo vsaj nekaterih bakterij, pri 10 kV/cm reverzibilno elektroporacijo večine bakterij, pri 15 in 20 kV/cm pa pri mnogih že irreverzibilno elektroporacijo (slika 30).



Slika 30: Učinki izpostavitve večine bakterijskih celic, v 250 mM saharozi, električnim pulzom različne dolžine in jakosti električnega polja. Rdeče točke označujejo naše izbrane parametre: 1×1 ms pulz pri 5, 10, 15 in 20 kV/cm. Slika 1:A v Kotnik in sod. (2015).

Učinkovitost kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika se je povečevala z daljšanjem časa izpostavitve antibiotiku in je bila največja ob najdaljši uporabljeni, 24-h izpostavitvi antibiotiku. Potreba po daljšem času izpostavitve antibiotiku se sklada z rezultati iz literature, kjer se v večini primerov uporablja 24-h inkubacijo z antibiotikom po elektroporaciji (Del Pozo in sod., 2009a; Novickij in sod., 2018b, 2018a). Najkrajšo, <1-min izpostavitev, kjer smo redčitev antibiotika po elektroporaciji izvedli takoj, ko je bilo to tehnično izvedljivo, smo preverili le pri bakterijah *E. coli* in pri takšni inkubaciji potenciacije delovanja antibiotika nismo zaznali. To nakazuje, da kratkotrajno odprtje membranskih por, ki nastopi takoj ob izpostavitvi električnim pulzom in običajno traja le nekaj 10 do 100 ns (Kotnik in sod., 2019), ni dovolj za zadostno difuzijo antibiotika v bakterije, temveč pomemben del te difuzije poteka tudi med kasnejšim, postopnim okrevanjem celične ovojnice. Podaljšanje časa izpostavitve antibiotiku po elektroporaciji na 60 in 160 min je pri bakterijah *E. coli* vodilo v povišanje inaktivacije. Ker so bili rezultati pri teh dveh časih inkubacije primerljivi, smo pri bakterijah *L. plantarum* testirali le 60-min oz. 1-h inkubacijo z antibiotikom. Glede na podatke iz literature, potenciacija učinka antibiotika po elektroporaciji nastopi že pri 10 do 15-min izpostavitvi (Vadlamani in sod., 2018, 2020), vendar takšnega časa inkubacije nismo preizkusili. V nasprotju z bakterijami *E. coli*, 1-h izpostavitev bakterij *L. plantarum* antibiotiku po elektroporaciji ni bila dovolj za povečanje transporta antibiotika preko membrane oz. njegove vezave na tarčo. Pri le 1-h izpostavitvi je bila inaktivacija bakterij *L. plantarum*, ne glede na koncentracijo antibiotika, primerljiva tisti, doseženi le z elektroporacijo. Pri povečanju transporta antibiotika so torej pomembni dolgotrajnejši učinki elektroporacije, ki omogočijo lažje fiziološko prehajanje antibiotika po elektroporaciji. Popolno okrevanje bakterij lahko traja več ur, saj morajo nadomestiti iztekle molekule in oksidirane membranske lipide, v tem času pa so bolj občutljive na druge stresne pogoje (Kotnik in sod., 2019). Do fiziološkega prehajanja antibiotika pride v manjši meri tudi brez elektroporacije (povečanje inaktivacije ob izpostavitvi le antibiotiku z

daljšanjem inkubacije), kar je pričakovano, saj večina terapij v klinični praksi temelji na več-dnevni izpostavljenosti nižjim koncentracijam antibiotika (Wormser in sod., 2000). Manjše učinkovitosti 1-h izpostavitve antibiotiku po elektroporaciji pri bakterijah *L. plantarum*, v primerjavi z *E. coli*, ne znamo natančno pojasniti, vendar bi lahko bila posledica razlik v fiziološkem prehajanju antibiotika preko membrane, odzivu na stres, popravljalnih mehanizmih, počasnejše rasti bakterij *L. plantarum*<sup>2</sup>, ali pa so vpletene še drugi mehanizmi.

Naš namen je bil pridobiti temeljni vpogled v mehanizme potenciacije, zato smo zasnovali bolj sistematičen protokol, ki nam je omogočil ločitev vplivov posameznih izbranih parametrov na potenciacijo inaktivacije. S tem pristopom smo dosegli bolj objektivne in relevantne primerjave, ter odgovor na nekatera vprašanja zakaj so določene kombinacije elektroporacije in antibiotika učinkovitejše od drugih. Odgovori na ta vprašanja so namreč pomembni za uspešno optimizacijo in uporabo takšnih kombiniranih pristopov. Za potrditev naših ugotovitev so seveda potrebne nadaljnje študije na več različnih sevih in z uporabo več različnih antibiotikov. Uporaba 1×1 ms pulza pri različnih jakostih električnega polja nam je sicer omogočila zmanjšati število parametrov elektroporacije (brez različnega števila pulzov in frekvence dovajanja pulzov), vendar bi vplivi lahko bili drugačni kot pri drugih pulzih in predvsem njihovem večjem številu, s katerim seveda potenciramo učinek. Pomembno vprašanje ostaja, kako na potenciacijo učinka antibiotika z elektroporacijo vplivajo različni mehanizmi odpornosti proti tem antibiotikom. Predpostavljamo, da bi elektroporacija najbolj povečala inaktivacijo odpornih bakterij v primerih, kjer odpornost temelji na blokiraju prehajanju antibiotika skozi ovojnicu ali na njegovem izčrpavanju iz bakterije. V primerih, kjer mehanizem odpornosti temelji na spremenjeni tarči, pa bi antibiotik stal neučinkovit in bi edini zaviralni oziroma inaktivacijski učinek bil učinek elektroporacije same.

Uporaba kombinacije elektroporacije in kliničnih antibiotikov je omejena na okolja, kjer so antibiotiki že prisotni, kot so odpadne vode iz bolnišnic in živilorejskih obratov, saj dodajanje antibiotikov predstavlja problem tako za okolje kot tudi za klinično varnost (Martinez, 2009). Glede na naše rezultate bi za potenciacijo inaktivacije bakterij potrebovali daljšo izpostavljenost antibiotiku po elektroporaciji, torej bi bilo tretirano vodo potrebno nekaj časa zadržati pred izpustom v okolje. Drugi problem so velika nihanja v koncentracijah protimikrobnih snovi v teh vodah, ki so pogosto precej nižje od tipičnih MIK teh snovi (Diwan in sod., 2013; Cheng in sod., 2020). Zato bi bilo za čiščenje odpadnih voda smiselno uporabiti protokole z visoko dovedeno energijo, ki bi že sami po sebi zagotovili zadostno inaktivacijo bakterij. Pri takšni potencialni uporabi je ključno vprašanje, kakšno je tveganje povečanja horizontalnega prenosa genov zaradi elektroporacije in s tem okrepljenega iztekanja DNA elektroporiranih bakterij v okolico, kar bi vodilo v širjenje in nastanek novih odpornosti proti antibiotikom, na kar pa še nimamo odgovora. Uporabo kombinacije elektroporacije in antibiotikov v kliniki nekateri predlagajo za zdravljenje površinskih ran, okuženih z filmotvornimi bakterijami, saj pride do porušitve strukture biofilma in večje difuzije

---

<sup>2</sup> Izbrani sev *E. coli* K12 ER1821 je imel pri 37 °C specifično hitrost rasti 1,84/h ter podvojitveni čas 0,38 h. Izbrani sev *L. plantarum* ATCC14917 pa je imel pri 37 °C specifično hitrost rasti 0,57/h ter podvojitveni čas 1,23 h.

antibiotikov (Del Pozo in sod., 2009a; Novickij in sod., 2018c, 2018a). Vendar pa so, pri uporabi v kliniki, glavna težava poškodbe gostiteljskega tkiva na mestu zdravljenja. Evkariotske celice so namreč precej večje od bakterijskih in zato bolj občutljive za elektroporacijo. Pri uporabi jakosti električnega polja, ki so potrebne za elektroporacijo bakterij in gliv, bi tako prišlo do precejšnjih poškodb okoliškega tkiva. Za uporabo kombiniranega pristopa v živilski industriji smo omejeni na protimikrobnne snovi, ki so varne in registrirane kot prehranski dodatki in/ali se že nahajajo v hrani (npr. eterična olja, organske kisline, nizin). Za sterilizacijo je potrebna bodisi visoka dovedena energija, ki že sama po sebi vodi v popolno inaktivacijo mikroorganizmov, bodisi kombinacija nižje dovedene energije z visokimi koncentracijami protimikrobnih snovi, ki preprečijo okrevanje reverzibilno elektroporiranih bakterij (Ulmer in sod., 2002). Visoke koncentracije ekstraktov naravnih snovi in eteričnih olj bi lahko imele tudi precejšen vpliv na senzorične lastnosti izdelka, kot sta vonj in okus. Za namen pasterizacije bi zadostovale nižje koncentracije protimikrobnih snovi, ki bi le inhibira le rast preživelih mikroorganizmov po elektroporaciji, še posebej ker so temperature, ki se vzdržujejo v prehranski verigi, običajno precej nižje od sobne temperature, ki smo jo uporabili v naši študiji.

## 5.2 POTENCIACIJA UČINKA ANTIBIOTIKA Z ELEKTROPORACIJO SE RAZLIKUJE PRI G– BAKTERIJAH *E. coli* IN G+ BAKTERIJAH *L. plantarum*

Kadar želimo primerjati učinkovitost potenciacije učinka antibiotika z elektroporacijo med različnimi bakterijami, moramo biti pri izboru bakterijskih sevov pazljivi. V naši nalogi smo primerjali vpliv sestave celične stene G+ in G– bakterij, zato smo izbrali bakterije podobnih oblik in velikosti, saj ta dva parametra močno vplivata na občutljivost za elektroporacijo (Kotnik in sod., 2019). Pri izboru pa smo upoštevali tudi, da izbrani vrsti bakterij nista odporni proti antibiotikom in ne tvorita spor. Celice obeh izbranih vrst bakterij so paličaste oblike, pri čemer so bakterije *E. coli* vseeno nekoliko manjše ( $2 \times 0,5 \mu\text{m}$ ) (Britannica, b. l.) v primerjavi z bakterijami *L. plantarum* ( $3 \times 0,9 \mu\text{m}$  ali več) (Landete in sod., 2010).

Pri G– bakterijah *E. coli* smo največjo potenciacijo delovanja dosegli z ampicilinom, ki mora preiti le zunanjou membrano, da doseže svojo tarčo v peptidoglikanskem sloju, pri G+ bakterijah *L. plantarum* pa s tetraciklinom, ki mora preiti tudi steno in notranjo membrano, da doseže svojo tarčo znotraj bakterij. Različno potenciacijo delovanja antibiotikov z elektroporacijo pri bakterijah *E. coli* in *L. plantarum* bi lahko pojasnili z razliko v zgradbi celične stene, saj sta bakteriji primerljive oblike in velikosti.

S tem smo potrdili našo drugo hipotezo, ki pravi, da je potenciacija učinka delovanja antibiotika, ki jo dosežemo z elektroporacijo, pri G– bakterijah značilno drugačna kot pri G+ bakterijah, zaradi različne zgradbe celične stene. Največjo potenciacijo smo dosegli pri antibiotikih, ki potrebujejo transport preko bakterijske stene, pri čemer je pomembno tudi število membran oz. slojev, ki jih mora ta preiti. Seveda pa so za splošno veljavnost te teze potrebni dodatni rezultati, pridobljeni na več vrstah bakterij in z uporabo več različnih antibiotikov.

Pri 1-h izpostavitvi antibiotiku po elektroporaciji je bil sinergistični učinek kombinirane uporabe za oba antibiotika večji pri bakterijah *E. coli*. Pri ampicilinu so bile razlike predvsem pri srednje visokih koncentracijah ( $3\times$ MIK), pri tetraciklinu pa pri višjih koncentracijah ( $10\times$ MIK in  $30\times$ MIK) v kombinaciji z visoko jakostjo električnega polja (15 in 20 kV/cm). Pri 24-h izpostavitvi antibiotiku pa je bila situacija obrnjena, saj je bil sinergistični učinek kombinirane uporabe za oba antibiotika večji pri bakterijah *L. plantarum*. Izrazito povečanje sinergističnega učinka smo zaznali za oba antibiotika pri jakostih električnega polja  $\geq 10$  kV/cm, kjer je elektroporiranih že večina bakterij. Pri visokih koncentracijah tetraciklina ( $30\times$ MIK), v kombinaciji z visoko jakostjo električnega polja (15 in 20 kV/cm) smo dosegli celo popolno inaktivacijo bakterij *L. plantarum* (več kot -9 log). Kot smo že omenili, bi lahko bila manjša učinkovitost 1-h izpostavitve antibiotiku po elektroporaciji pri bakterijah *L. plantarum*, v primerjavi z bakterijami *E. coli*, posledica razlik v fiziološkem prehajanju antibiotika preko membrane, odzivu na stres, popravljalnih mehanizmih, počasnejše rasti bakterij *L. plantarum*, ali pa so vpletene še druge mehanizmi.

Na samo elektroporacijo so bile pri vseh jakostih električnega polja bolj občutljive bakterije *L. plantarum* kot *E. coli*, pri 5 kV/cm je ta razlika sicer majhna. 24 h po elektroporaciji je bil nivo inaktivacije nižji, saj so preživele bakterije okrevale in se delile, prav tako ni bilo več razlik med izbranimi sevoma. Vpliv sestave bakterijske celične stene na občutljivost za elektroporacijo še ni povsem raziskan. Nekateri poročajo o večji občutljivosti G+ bakterij na elektroporacijo (Piggot in sod., 2011; Martens in sod., 2020), spet drugi pa o večji občutljivosti G- bakterij (Vadlamani in sod., 2018). Razlog za nasprotujoče si rezultate je pogosto primerjava bakterij, ki se razlikujejo ne samo v sestavi celične stene, ampak tudi v velikosti, obliki, debelini peptidoglikana, in drugimi faktorji, ki bi lahko vplivali na občutljivost za elektroporacijo (García in sod., 2005; Kotnik in sod., 2010; El-Hag in sod., 2011). Poleg tega večina študij uporablja zelo veliko število pulzov in/ali visoke jakosti električnega polja, kar poleg elektroporacije povzroči tudi segrevanje ter tlačni in svetlobni šok. Na problem primerjave bakterij različnih oblik in velikosti so sami opozorili tudi Vadlamani in sod. (2018), ki so večjo učinkovitost elektroporacije zaznali pri G- bakterijah *E. coli* kakor pri G+ bakterijah *S. aureus*. Podobno kot mi, so občutljivost bakterij *E. coli* in *L. plantarum* za elektroporacijo primerjali tudi García in sod. (2005), pri čemer so preučevali štiri G+ in štiri G- bakterije ter vpliv pH, ki je imel velik vpliv na občutljivost vseh testiranih bakterij za elektroporacijo. Pri nevtralnem pH 7 so bile vse G+ bakterije, z izjemo *S. aureus*, manj občutljive kot pri kislem pH 4. Nasprotno pa so bile G- bakterije pri pH 7 bolj občutljive kot pri pH 4. Če primerjamo le bakterije *E. coli* in *L. plantarum* so bile pri obeh testiranih pH vrednostih bolj občutljive bakterije *E. coli*, kar je ravno nasprotno od naših rezultatov. V raziskavi, ki so jo opravili Martens in sod. (2020), pa so z bakterijami *E. coli* primerjali bakterije *L. acidophilus*, ki so podobne oblike in velikosti kot bakterije *L. plantarum*. Pri nižji jakosti električnega polja (13,5 kV/cm) so bile bolj občutljive bakterije *E. coli*, medtem ko so bile pri višjih jakostih (18,5 in 23,5 kV/cm) bolj občutljive bakterije *L. acidophilus*. Predpostavili so, da slednji potrebuje višje jakosti električnega polja da doseže prag za elektroporacijo, zato je pri nižjih jakostih elektroporacija manj učinkovita. Pri naših rezultatih so bile bakterije *L. plantarum* bolj občutljive kot bakterije *E. coli* tudi pri le 5 kV/cm. Simulacije molekularne dinamike prav tako

kažejo na manjšo občutljivost G– bakterij za elektroporacijo, kar pripisujejo majhni mobilnosti lipopolisaharidnih molekul v zunanjji membrani (Piggot in sod., 2011).

### 5.3 ELEKTROPORACIJA TER KOMBINACIJA ELEKTROPORACIJE IN ANTIBIOTIKA VPLIVATA NA DINAMIKO RASTI BAKTERIJ *L. plantarum*

Ker pri bakterijah *L. plantarum* pri 1-h izpostavitvi antibiotiku po elektroporaciji še nismo zaznali potenciacije inaktivacije, smo se odločili spremljati tudi dinamiko rasti pri sobni temperaturi ( $\sim 22^\circ\text{C}$ ), kot pri vseh ostalih eksperimentih, in pri optimalni temperaturi rasti  $37^\circ\text{C}$ .

Po pričakovanjih je temperatura vplivala predvsem na hitrost okrevanja bakterij po elektroporaciji, ki je bilo hitrejše pri  $37^\circ\text{C}$ . Poškodbe povzročene z nizkimi jakostmi električnega polja (5 kV/cm), so se popravile zelo hitro, zato je bila krivulja rasti primerljiva kontroli (brez antibiotika in brez elektroporacije), pri sobni temperaturi pa smo pri 5 kV/cm že zaznali zamik v rasti bakterij. Zvišanje jakosti električnega polja je vodilo do daljšega okrevanja in s tem do zamika rasti, ki je tudi nekoliko počasnejša. Pri 20 kV/cm pa smo zaznali tudi dodatno inaktivacijo bakterij s padcem OD<sub>600</sub> pred okrevanjem in rastjo. Učinek inaktivacije z elektroporacijo torej ni omejen le na čas dovajanja električnih pulzov, ampak traja še nekaj časa po sami elektroporaciji. Pri sobni temperaturi je bil ta učinek še večji, saj smo dodatni padec OD<sub>600</sub> pred okrevanjem in rastjo zaznali že pri 10 kV/cm. To pomeni, da je zelo pomembno v kolikšnem času po elektroporaciji bakterije redčimo in nacepimo na gojšča, saj bo to vplivalo na končni rezultat. Neodvisno od jakosti električnega polja, so preživele bakterije pri  $37^\circ\text{C}$  v 24 h okrevale, se delile in dosegle enak OD<sub>600</sub> kot kontrola. Izjema je bila jakost električnega polja 15 kV/cm, pri kateri smo zaznali statistično značilno nižjo končno gostoto bakterij. Večjega učinka jakosti 15 kV/cm na zmanjšanje končne gostote bakterij, v primerjavi z 20 kV/cm, sicer ne znamo pojasnit. Možna razloga bi lahko bila, da elektroporacija pri jakosti 15 kV/cm pri preživelih bakterijah v povprečju povzroči ravno tolikšno raven poškodb, da so še zmožne aktivnega stresnega odgovora, za katerega porabijo precej zalog virov energije in hrani, ki bi jih sicer namenile rasti, pri jakosti 20 kV/cm pa so preživele bakterije prešibke za hiter stresni odgovor, jim pa zato viri energije in hrani v celoti ostanejo na voljo za okrevanje. Pri sobni temperaturi je bila gostota bakterij po 24 h pri vseh jakostih električnega polja nižja od kontrole. Večina krivulj je sicer ob koncu meritev še vedno bila v eksponentni fazi, zato možne končne gostote ne moremo dokončno oceniti. Je pa rastna krivulja pri jakosti 5 kV/cm že dosegla stacionarno fazo rasti, končna gostota bakterij pa je vseeno nižja kot pri kontroli, kar nakazuje, da pri ne-optimalni temperaturi bakterije ne okrevajo popolnoma.

Uporaba kombinacije antibiotika in elektroporacije je močno povečala inhibicijo rasti. Kombinacija s tetraciklinom je bila pri sobni temperaturi učinkovitejša od kombinacije z ampicilinom, je pa tetraciklin že sam po sebi imel večji vpliv na dinamiko rasti bakterij *L. plantarum*. Pri vseh kombinacijah tetraciklina in elektroporacije smo dosegli popolno inhibicijo rasti, pri ampicilinu pa so bile potrebne višje koncentracije za popolno inhibicijo rasti. Pri 5 kV/cm najnižja koncentracija ampicilina (MIK) sploh ni imela vpliva na okrevanje in rast bakterij *L. plantarum*, saj je krivulja enaka tisti, kjer smo uporabili le elektroporacijo. Ponovno

poudarjamo, da je bila gostota bakterij, uporabljena za določitev MIK po protokolu Andrews (2001), nižja ( $10^5$  CFU/ml) od gostote bakterij v naših poskusih ( $10^8$  CFU/ml), zato MIK pri poskusih ni povzročila popolne inhibicije rasti. Inkubacija pri optimalni temperaturi rasti  $37^\circ\text{C}$  je imela velik vpliv predvsem na tetraciklin, katerega učinkovitost je bila slabša kot pri sobni temperaturi, to pa je vplivalo tudi na učinkovitost kombinacije z elektroporacijo. Pri najnižji koncentraciji MIK, je bil tetraciklin manj učinkovit kot ampicilin, razen pri kombinacijah z visoko jakostjo električnega polja ( $\geq 15$  kV/cm).

#### 5.4 ELEKTROPORACIJA Z $1\times 1$ ms PULZOM NE POVZROČI IZTEKANJA gDNA V SUPERNATANT

Iztekanja genomske DNA v supernatantu po elektroporaciji bakterij *E. coli* in *L. plantarum* nismo uspeli kvantificirati, saj je vsa DNA ostala vezana na celične ostanke, torej ni bila prosto dostopna v suspenziji. Nadaljnje poskuse iztekanja gDNA smo zato opustili. Pri uporabljeni metodi velja izpostaviti, da smo za namen iztekanja gDNA preverili le parametre, ki so bili uporabljeni tudi v prejšnjem sklopu eksperimentov, in sicer  $1\times 1$  ms pulz pri različnih jakostih (amplitudah napetosti). Vitzthum in sod. (2000) so uspešno izolirali gDNA šele z uporabo protokolov, ki so povzročili popolno lizo bakterij, za kar je bila potrebna ali zelo visoka jakost električnega polja ali veliko število pulzov. Sama inaktivacija bakterij torej ni zadostovala za sprostitev gDNA v supernatant. Pri uporabi elektroporacije za inaktivacijo mikroorganizmov v odpadnih vodah bi daljša vezava gDNA na celične ostanke lahko omogočila več časa za njeno zadostno razgradnjo in uničenje DNA z nukleazami in ostalimi okoljskimi dejavniki, tako da DNA ne bi bila več funkcionalna in ne bi predstavljala tveganja za HGT. Elektroporacijo bi v naravi lahko povzročil tudi udar strele v vodna okolja (Kotnik in Weaver, 2016). Glede na naše rezultate, ki temeljijo na uporabi enega pulza, predpostavljam, da enkratni udar strele ne bi povzročil obsežnega iztekanja gDNA v okolje. Vendar pa so za natančnejše odgovore potrebne dodatne raziskave, predvsem na plazmidni DNA, ki izeka iz celice že pri nižjih jakostih dovedene energije in prenaša gene za odpornost proti antibiotikom in virulenco.

#### 5.5 ELEKTRIČNI PULZI POVZROČIJO STRUKTURNE SPREMEMBE IN FRAGMENTACIJO DNA

Prvotno smo nameravali preveriti fragmentacijo iztekle gDNA po elektroporaciji, saj bi samo iztekanje in prehod preko membrane prav tako lahko vplivalo na strukturo gDNA. Zaradi prenizkih koncentracij iztekle gDNA, smo zato preverili le vpliv električnih pulzov samih, na molekule genomske in tudi plazmidne DNA, ki smo jih predhodno izolirali z drugo metodo.

Preliminarni rezultati na pDNA (pEGFP-N1) kažejo, da zaradi izpostavitve električnim pulzom pride predvsem do odvitja plazmida, delež teh sprememb pa je bil močno odvisen od jakosti dovedene energije. V kontrolnem vzorcu (pDNA ki ni bila izpostavljena električnim pulzom) je bila skoraj vsa pDNA v tako imenovani obliki kovalentno zaprtega kroga oz. ccc obliki, ki je dodatno zvita. Z višanjem jakosti dovedene energije je prišlo do preloma ene od verig in s tem do sprostitev dodatnih navojev v obliko odprtrega kroga oz. oc obliko. Pri še višjih jakostih pa smo opazili razpoteagnjenost signalov na gelu, kar nakazuje na fragmentacijo pDNA, in

močnejši signal v začetnem delu elektroforeznega gela, kar bi lahko bila posledica nastanka terciarnih struktur in kompleksov, ki težje potujejo po agaroznem gelu. Jakost dovedene energije in delež pDNA v ccc obliku sta imela negativno korelacijo pri analizi PCA, kar pomeni, da večja kot je dovedena energija, manj pDNA je v ccc obliku. Manjši vpliv na pDNA so imeli ostali parametri elektroporacije, kot so število in dolžina pulzov, ter jakost električnega polja.

Uporaba parametrov elektroporacije z visoko dovedeno energijo lahko torej kljub povisani permeabilizaciji membrane zniža učinkovitost elektroekstrakcije ali elektrotransformacije pDNA. Učinkovitost transporta pDNA preko membrane in s tem transformacije je namreč odvisna tudi od oblike pDNA, največja je pri ccc obliku, nižja pri oc obliku in najnižja pri linearni obliki (Kotnik in sod., 2015). Za namen elektrotransfekcije evkariotskih celic se uporablja precej nižja dovedena energija, predvsem na račun nižjih jakosti električnega polja, od nekaj 100 V/cm do 2 kV/cm (Potočnik in sod., 2022), zato tam vpliva na obliko in s tem funkcionalnost pDNA ne pričakujemo. Za permeabilizacijo in elektrotransformacijo bakterijskih celic pa potrebujemo višje jakosti dovedene energije. Jakosti električnega polja, potrebnega za uspešno elektrotransformacijo, so vrstno specifične in se lahko zelo razlikujejo, vendar v splošnem velja, da je elektrotransformacija manj učinkovita pri G+ bakterijah, zaradi debelega peptidoglikanskoga sloja, še dodatno pa jo zmanjša prisotnost kapsule (Kotnik in sod., 2015; Wang in sod., 2020). Pri teh bakterijah se za namen transformacije večinoma uporablja kombinacija elektroporacije in kemiske destabilizacije ovojnice, saj sama elektroporacija ne vodi v uspešno transformacijo (Aune in Aachmann, 2010). Naši preliminarni rezultati nakazujejo, da bi razlog za zmanjšano učinkovitost transformacije lahko bil odvitev pDNA iz ccc v oc obliko, saj za permeabilizacijo teh bakterij potrebujemo precej visoke jakosti dovedene energije. Visoke jakosti električnega polja se uporabljajo tudi za namen inaktivacije bakterij. V primeru čiščenja odpadnih voda z elektroporacijo bi lahko z visoko dovedeno energijo zmanjšali transformacijsko učinkovitost iztekle pDNA in s tem tudi zmanjšali možnost za HGT.

Preliminarni rezultati izpostavitev gDNA električnim pulzom nakazujejo, da ti povzročijo fragmentacijo gDNA, kar smo opazili kot razpotegnjeno signal na agaroznem elektroforeznem gelu, ter nastanek terciarnih struktur in kompleksov, ki težje potujejo po agaroznem gelu, kar je bilo opaziti kot močnejši signal v začetnem delu elektroforeznega gela. V nasprotju z pDNA pri gDNA delež teh sprememb ni bil odvisen od dovedene energije. Kontrolnemu vzorcu so bili najbolj podobni vzorci, pri katerih smo uporabili kratke pulze (pri večjemu številu kratkih pulzov le pri nižjih amplitudah) ali daljše pulze pri nizki ali srednji amplitudi. Od kontrole sta se najbolj razlikovala vzorca, kjer smo uporabili  $2 \times 500 \mu\text{s}$  ali  $\times 500 \mu\text{s}$  pulze, zanimivo pa je, da ni šlo za najvišjo dovedeno energijo, ampak 15 kV/cm. Za natančnejšo analizo vpliva različnih parametrov elektroporacije na gDNA bi potrebovali obširnejše poskuse.

## 6 SKLEPI

- Elektroporacija poveča učinkovitost predvsem antibiotikov, ki za doseganje svoje tarče potrebujejo prehod preko membrane. Pri G+ bakterijah *L. plantarum* so to antibiotiki s tarčo v citosolu, ki potrebujejo transport preko peptidoglikana in notranje membrane. Pri G- bakterijah *E. coli* s troslojno celično steno pa je potenciacija odvisna tudi od števila membran, preko katerih mora antibiotik preiti, da doseže svojo tarčo. Največjo potenciacijo dosežemo pri antibiotikih s tarčo v peptidoglikanskem sloju, ki za dostop do te tarče potrebujejo le prehod preko zunanje membrane. Potenciacija antibiotikov, ki imajo tarčo v citosolu, je manjša.
- Elektroporacija nekoliko poveča tudi učinkovitost antibiotikov, ki že sicer lahko dosežejo svojo tarčo. Pri G+ bakterijah *L. plantarum* so to antibiotiki, katerih tarča je v zunanjem peptidoglikanskem sloju, kar kaže, da potenciacija učinka antibiotika ni omejena le na povečan transport antibiotika do površine tarče. Pomembno vlogo imajo tudi drugi mehanizmi, kot so iztekanje celične vsebine in poškodbe membrane, pri čemer bi lahko delna destabilizacija peptidoglikana omogočila lažje prerazporejanje molekul antibiotika.
- Inaktivacija s kombinacijo elektroporacije in antibiotika narašča z višanjem koncentracije antibiotika, jakostjo električnega polja in daljšanjem izpostavljenosti antibiotiku po elektroporaciji.
- Izrazita potenciacija antibiotika z elektroporacijo je dosežena pri jakostih pulzov, pri katerih je večina izpostavljenih bakterij vsaj reverzibilno elektroporiranih, kar poveča permeabilnost membrane in olajša transport antibiotika do tarče.
- Pri krajsi izpostavljenosti antibiotiku po elektroporaciji je sinergistični učinek kombinirane uporabe tako za ampicilin kot tetraciklin večji pri bakterijah *E. coli*, pri daljši izpostavljenosti antibiotiku pa pri bakterijah *L. plantarum*. Te razlike bi lahko bile posledica počasnejše rasti bakterij *L. plantarum* ali razlik v odzivanju na stres in strukturi celične stene (prisotnost/odsotnost zunanje membrane, debelina peptidoglikana, lipidna sestava,...).
- G+ bakterija *L. plantarum* je bolj dovetna za elektroporacijo kot G- bakterija *E. coli*, kar je verjetno predvsem posledica razlike v strukturi celične stene med G+ in G- bakterijami (dodatna plast ovojnici pri slednjih), saj sta bakteriji podobne oblike, so pa bakterije *L. plantarum* v povprečju vseeno nekoliko večje.
- Po elektroporaciji OD<sub>600</sub> pada, iz česar sklepamo, da celična smrt ni takojšnja; nekatere preživele bakterije ne zmorejo popraviti poškodb, zato stopnja inaktivacije po izpostavitvi le elektroporaciji še nekaj časa narašča. Zamik logaritemske faze rasti se povečuje z jakostjo električnega polja. Preostale bakterije popravijo poškodbe, rastejo

in se razmnožujejo, zato 24 ur po elektroporaciji skoraj ni več zaznati učinka na gostoto bakterij.

- Genomska DNA po elektroporaciji ne izteka v supernatant, tudi pri ireverzibilno elektroporiranih bakterijah ostane vezana na celične ostanke v peletu.
- Električni pulzi spreminjajo strukturo plazmidne DNA, pride predvsem do odvijanja iz dodatno zvitega kovalentno zaprtega kroga v obliko odprtega kroga. Delež teh sprememb je odvisen od jakosti dovedene energije, z naraščanjem energije se povečuje delež oblike odprti krog, pri zelo visoki dovedeni energiji pa pride tudi do fragmentacije plazmida. Pri primerljivi dovedeni energiji imata število in dolžina pulzov manjši vpliv.
- Elektroporacija vpliva na fragmentacijo genomske DNA, vendar stopnja fragmentacije ni odvisna od dovedene energije, števila ali dolžine pulzov.

## 6.1 HIPOTEZE

- 1) Elektroporacija različno potencira učinek antibiotika v odvisnosti od njegovega načina delovanja oziroma njegove tarče v bakteriji. Največjo potenciaciijo inaktivacije pričakujemo pri antibiotikih, ki jim elektroporacija najizraziteje poveča dostop do njihove tarče.

### HIPOTEZO SMO POTRDILI

- 2) Potenciacija učinka delovanja antibiotika, ki jo dosežemo z elektroporacijo, je pri G- bakterijah značilno drugačna kot pri G+ bakterijah, zaradi različne zgradbe celične stene.

### HIPOTEZO SMO POTRDILI

- 3) Iztekanje DNA, ki ga dosežemo z elektroporacijo, je izrazitejše pri daljših pulzih in je pri G- bakterijah značilno drugačno kot pri G+ bakterijah.

### HIPOTEZE NISMO NE POTRDILI NE OVRGLI

Iztekanja genomske DNA v supernatant zaradi elektroporacije nismo zaznali. Tudi pri ireverzibilno elektroporiranih bakterijah je gDNA ostala v peletu.

## 6.2 PRISPEVKI K ZNANOSTI

Pridobljeni rezultati nadgrajujojo znanje o potenciaciji učinka antibiotika z elektroporacijo. Čeprav je bilo že znano, da s kombiniranim pristopom lahko povečamo inaktivacijo bakterij, smo dodatno ugotovili, da je stopnja potenciacije odvisna od lokacije tarče antibiotika. Pokazali smo, da elektroporacija poveča učinkovitost predvsem tistih antibiotikov, ki za doseganje svoje tarče potrebujejo prehod preko membrane. Prav tako smo potrdili razlike v potenciaciji med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami. Ti rezultati bodo v pomoč pri optimizaciji

uporabe kombinacije elektroporacije in protimikrobnih snovi, ter pri ciljani izbiri protimikrobnih snovi glede na vrsto bakterije.

V prehrambeni industriji je uporaba takšnega kombiniranega pristopa omejena na varne protimikrobne snovi, kjer bi lahko z ustreznou optimizirano elektroporacijo dosegli povečano inaktivacijo in inhibicijo bakterij. V primeru elektroporacije odpadnih voda, ki že vsebujejo antibiotike, je učinkovito oziraoma pomembno povečanje inaktivacije bakterij manj verjetno zaradi nižjih koncentracij tipično prisotnih antibiotikov.

Pri preučevanju učinkov elektroporacije na genomsko in plazmidno DNA smo pokazali, da električni pulzi povzročajo spremembo oblike in fragmentacijo DNA. To je ključno za izboljšanje procesov elektroekstrakcije in elektrotransformacije, še posebej za tiste prokariotske celice, kjer potrebujemo visoko dovedeno energijo za njihovo permeabilizacijo. Z višanjem dovedene energije sicer povečamo permeabilnost membrane, a hkrati vplivamo tudi na odvite plazmida iz dodatno zvitega kovalentno zaprtega kroga v obliko odprtrega kroga, kar otežuje njegov transport preko membrane. Naši rezultati so pomembni tudi z vidika potencialne uporabe elektroporacije za čiščenje odpadnih voda, saj večje fragmentacije genomske in plazmidne DNA nismo zaznali. To nakazuje, da obstaja tveganje horizontalnega prenosa genov, še posebej v bolnišničnih odpadnih vodah, ki lahko vsebujejo mešanico številnih različnih patogenih in odpornih bakterij.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Izpostavitev bioloških celic električnemu polju vodi v nastanek membranskih por in povišanje permeabilnosti membrane, kar imenujemo tudi elektroporacija. Uporablja se v medicini, industriji in okoljskih aplikacijah za inaktivacijo celic ter vnos in izolacijo različnih molekul v ali iz celice. Prednosti uporabe elektroporacije za namen inaktivacije bakterij so, da ne potrebujemo dodatnih kemikalij, lahko se izognemo pretiranemu povišanju temperature, metoda ima nizek potencial za tvorjenje toksičnih stranskih produktov, pri kombiniraju z drugimi metodami pa lahko tudi zmanjšamo jakost posameznih tretmajev in s tem porabo energije. Znano je, da uporaba elektroporacije v kombinaciji s protimikrobnimi snovmi vodi v povečanje bakterijske inaktivacije, vendar pa so se dosedanje raziskave osredotočale predvsem na doseganje maksimalnega učinka in ne na vprašanje, zakaj so nekatere kombinacije pomembno učinkovitejše od drugih. Odgovori na ta vprašanja so pomembni tako z vidika temeljnega razumevanja potenciacije kot za uspešno optimizacijo in praktično uporabo takšnega kombiniranega pristopa. Da bi lahko odgovorili na zastavljena vprašanja, smo se odločili za bolj sistematičen pristop, ki nam je omogočil ločitev vplivov posameznih izbranih parametrov na potenciacijo inaktivacije dveh izbranih bakterijskih sevov. Koncentracije antibiotikov so bile določene glede na njihovo MIK, za elektroporacijo smo uporabili  $1 \times 1$  ms pulz pri različnih amplitudah, s čimer smo se izognili dodatnim parametrom trajanja in števila pulzov ter njihove ponavljalne frekvence, pri izboru predstavnika G+ in G- bakterij pa smo upoštevali, da sta seva podobne oblike in velikosti.

Primerjali smo potenciacijo učinka antibiotika z elektroporacijo glede na njegov način delovanja oziroma lokacijo njegove tarče. Uporabili smo ampicilin, ki zavira sintezo celične stene in ima tarčo v peptidoglikanskem sloju bakterijske stene, tetraciklin, ki zavira sintezo proteinov v notranjosti celice, ter ciprofloksacin, ki zavira sintezo DNA v notranjosti celice. Naši rezultati so pokazali, da elektroporacija različno potencira učinek antibiotika v odvisnosti od njegovega načina delovanja oziroma lokacije njegove tarče v bakteriji. Največjo potenciacijo smo dosegli za antibiotike, ki potrebujejo transport preko celične stene, pri čemer je pomembno tudi število ovojnici, ki jih mora ta preiti. Pri izbranem sevu G- bakterije *Escherichia coli* smo z elektroporacijo dosegli največjo potenciacijo inaktivacije za ampicilin, saj mora ta preiti le zunanjega membra, da doseže svojo tarčo v peptidoglikanskem sloju, medtem ko morata tetraciklin in ciprofloksacin preiti celotno celično steno. Pri izbranem sevu G+ bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* pa smo z elektroporacijo dosegli največjo potenciacijo inaktivacije za tetraciklin, ki potrebuje transport preko peptidoglikana in notranje membrane, medtem ko je tarčno mesto za ampicilin temu že vsaj površinsko dostopno tudi brez elektroporacije, saj je v najbolj zunanjem sloju bakterijske stene. Potenciacijo smo v manjši meri dosegli tudi za ampicilin, kar pomeni, da so poleg permeabilizacije membrane pomembni tudi drugi učinki elektroporacije, ki otežijo okrevanje celic, morda pa tudi poškodovanje tarčnega sloja stene, ki antibiotiku omogoči dostop do njene notranjosti. Razlike v potenciaciji učinka antibiotikov z elektroporacijo med bakterijami *E. coli* in *L. plantarum* bi lahko pojasnili z razliko v zgradbi celične stene, saj sta bakteriji primerljive oblike in velikosti. Možno je tudi,

da ima zaviranje proteinske sinteze, v primerjavi z zaviranjem sinteze peptidoglikana, pri bakterijah *E. coli* manjši vpliv na okrevanje celic po elektroporaciji, pri bakterijah *L. plantarum* pa večji tovrstni vpliv. Za potrditev naših ugotovitev so seveda potrebne nadaljnje študije na več različnih sevih in z uporabo več različnih antibiotikov.

Inaktivacijski učinek same elektroporacije ni prisoten le v času dovajanja pulzov, ampak še nekaj časa po elektroporaciji. Poškodbe zaradi nizkih jakosti električnega polja so se popravile zelo hitro, pri višjih jakostih pa se je čas okrevanja podaljšal. Če bakterije po elektroporaciji niso bile izpostavljene antibiotiku, so ne glede na jakost električnega polja okrevale in se delile. Na samo elektroporacijo se bile pri vseh jakostih električnega polja G+ bakterije *L. plantarum* bolj občutljive od G- bakterij *E. coli*, kar bi lahko pojasnili z razliko v sestavi celične stene, saj smo pri izboru sevov upoštevali, da so bakterije podobne velikosti in oblike. Inaktivacija bakterij z elektroporacijo ali s kombinacijo elektroporacije in antibiotika se je najbolj povišala pri prehodu iz šibke reverzibilne elektroporacije v območje reverzibilne elektroporacije večine bakterijskih celic. Sklepamo, da kratkotrajno odprtje membranskih por ob elektroporaciji ni dovolj za zadostno difuzijo antibiotika v celico, saj smo za učinkovito potenciranje učinka antibiotika potrebovali daljšo izpostavitev bakterij antibiotiku. To pomeni, da so za povečan transport antibiotika pomembni dolgotrajnejši učinki elektroporacije, ki omogočijo lažje fiziološko prehajanje antibiotika po elektroporaciji. Pri bakterijah *L. plantarum* smo potrebovali daljšo izpostavitev antibiotiku po elektroporaciji kot pri bakterijah *E. coli*, kar bi lahko bila posledica razlik v fiziološkem prehajanju antibiotika preko membrane, odzivanju na stres, popravljalnih mehanizmih, počasnejše rasti *L. plantarum*, ali pa so vpletene še drugi mehanizmi.

Naše ugotovitve so pomembne za nadaljnji razvoj kombinacije elektroporacije in protimikrobnih snovi. Večina študij se osredotoča predvsem na doseganje maksimalnega učinka na inaktivacijo bakterij, za uspešno optimizacijo metode pa je pomembno tudi temeljno razumevanje mehanizmov, saj le na osnovi tega lahko razložimo, zakaj so nekatere kombinacije učinkovitejše od drugih. Sistematični pristop nam je tako omogočil odgovoriti na nekaj pomembnih vprašanj glede vpliva načina delovanja antibiotika na njegovo potenciacijo z elektroporacijo, vpliva sestave celične stene ter vpliva časa izpostavitve antibiotiku po elektroporaciji. Glede prenosa kombiniranega pristopa v prakso pa obstajajo precejšnje ovire in omejitve. Uporaba elektroporacije in kliničnih antibiotikov je tako omejena na čiščenje takšnih odpadnih voda, ki so že onesnažene z antibiotiki, saj teh v okolje ne smemo dodajati. V medicini pa je uporabnost pristopa vprašljiva zato, ker bi električni pulzi pri jakostih, ki zagotovijo bakterijsko inaktivacijo, na mestu tretiranja neizogibno povzročili tudi poškodbe gostiteljskih celic, saj so te precej večje od bakterijskih. Več možnosti za praktično uporabo pa je v živilski industriji, kjer bi lahko za namen sterilizacije ali pasterizacije v kombinaciji z elektroporacijo uporabili protimikrofone snovi, ki so varne in registrirane kot prehranski dodatki ali pa se celo že nahajajo v hrani.

Povečanje prepustnosti membrane pri elektroporaciji omogoči prehajanje različnih molekul v in iz celice, kar je ključno za procese kot so elektroekstrakcija, elektrotransformacija, inaktivacija in sušenje biomase. Medtem, ko so se prejšnje študije večinoma osredotočale na elektroekstrakcijo plazmidne DNA za njeno izolacijo ali transformacijo bakterij, smo v okviru

te disertacije želeli preveriti, koliko in kako hitro izteka genomska DNA po elektroporaciji. Naši preliminarni rezultati so pokazali, da je vsa DNA ostala vezana na celične ostanke in ni iztekala v supernatant, zato smo te poskuse opustili. Pri elektroekstrakciji in elektrotransformaciji je pomembno tudi, ali elektroporacija povzroči spremembe v strukturi DNA. Naši preliminarni rezultati so pokazali, da izpostavitev plazmidne DNA električnim pulzom povzroči predvsem odvite plazmida iz dodatno zvitega kovalentno zaprtega kroga v odprt krog. Delež teh sprememb je naraščal z naraščanjem dovedene energije, nismo pa zaznali vpliva drugih parametrov elektroporacije, kot sta število in dolžina pulzov. Električni pulzi so vplivali tudi na fragmentacijo genomske DNA, vendar tu nismo zaznali povezave z dovedeno energijo, številom ali dolžino pulzov.

## 7.2 SUMMARY

Electroporation is a process, where biological cells are exposed to an electric field that leads to membrane pore formation and increased membrane permeability. It can be used in medicine, industry or environmental applications for cell inactivation or transport of molecules into or out of the cell. Using electroporation for bacterial inactivation has certain advantages; we don't need additional chemicals, we can avoid an excessive temperature increase, the method itself has a low potential for the formation of toxic by-products, and when combined with other methods, we can also reduce the strength of individual treatments and thus energy consumption. It is known that the use of electroporation in combination with antimicrobials leads to an increased bacterial inactivation, however, all research so far have focused mainly on maximum achievable effect and not on the question of why some combinations are significantly more effective than others. Answers to these questions are important for basic understanding of potentiation, and for successful optimization and practical use of such a combined approach. In order to be able to answer some of these questions, we took a more systematic approach, that enabled us to separate the influence of individual selected parameters on inactivation potentiation of two selected bacterial strains. Antibiotic concentrations were determined according to their MIC, for electroporation  $1\times 1$  ms pulse at different amplitudes was used, thereby avoiding the parameters like number and length of the pulses and pulse delivery frequency. Bacterial strains of similar shape and size were chosen as representative G+ and G- bacteria.

We compared the potentiation of antibiotics with different modes of action with electroporation. We used ampicillin, which inhibits cell wall synthesis and has a target in the peptidoglycan layer of bacterial cell wall, tetracycline, which inhibits protein synthesis inside the cell, and ciprofloxacin, which inhibits DNA synthesis inside the cell. Our results showed that electroporation potentiates the effect of the antibiotic differently depending on its mode of action or location of its target in the bacterium. The greatest potentiation was achieved for antibiotics that need to be transported across the cell wall, with number of envelopes it must pass being an important factor. For G- bacteria *Escherichia coli*, the greatest potentiation of inactivation by electroporation was achieved for ampicillin, as it only needs to cross the outer membrane to reach its target in the peptidoglycan layer, while tetracycline and ciprofloxacin have to cross the entire cell wall to reach their targets in the cytosol. For G+ bacteria

*Lactiplantibacillus plantarum*, the greatest potentiation of inactivation by electroporation was achieved for tetracycline, which requires transport across peptidoglycan and the inner membrane, while the target site for ampicillin is, at least on the cell wall surface, already accessible in the outermost layer of the bacterial wall even without electroporation. To a smaller extent, potentiation was achieved also for ampicillin, which means that in addition to membrane permeabilization, other effects of electroporation, that make bacterial recovery difficult, are also important. Electroporation could also damage peptidoglycan, which would enable ampicillin easier diffusion in this cell wall envelope. The differences in the potentiation of antibiotics by electroporation between *E. coli* and *L. plantarum* bacteria could be explained by the difference in the structure of the cell wall, since they are of similar shape and size. It is also possible that for *E. coli*, inhibition of protein synthesis has a smaller effect on cell recovery after electroporation, compared to the inhibition of peptidoglycan synthesis, and for *L. plantarum* inhibition of protein synthesis has a greater such effect. Further studies using several different strains and different antibiotics are needed to further confirm our findings.

The inactivation effect of electroporation is not present only during the delivery of the pulses, but also for some time after. Low electric field strength cell damage was repaired very quickly, at higher electric field strengths the recovery time was prolonged. If the bacteria were not exposed to the antibiotic after electroporation, they recovered and divided regardless of the electric field strength. G+ bacteria *L. plantarum* were more sensitive to electroporation than G- bacteria *E. coli* at all electric field strengths, which could be explained by the difference in the cell wall structure, since they are of similar size and shape. The largest increases in inactivation rates for combined and electroporation-only treatment were observed in the transition from weak reversible electroporation to the reversible electroporation of most bacterial cells. We conclude that the short-term opening of the membrane pores during electroporation is not enough for sufficient antibiotic diffusion into the cell, since longer exposure of the bacteria to the antibiotic was needed to effectively potentiate its effect. This means that prolonged increased permeabilization effect of electroporation are responsible for increased physiological antibiotic uptake. For *L. plantarum*, longer exposure to the antibiotic after electroporation was needed than for *E. coli*, which could be the result of differences in the physiological antibiotic transport across the membrane, response to stress, repair mechanisms, slower growth of *L. plantarum*, other mechanisms may also be involved.

Our findings are important for further development of combined treatment with electroporation and antimicrobial agents. Most studies focus mainly on achieving the maximum effect on bacterial inactivation, however, to successfully optimize the method it is important to understand underlying mechanisms, which allow us to explain why certain combinations are more effective than others. Our systematic approach allowed us to answer some important questions regarding the influence of antibiotic's mode of action on its potentiation by electroporation, influence of the cell wall composition, and influence of exposure time to the antibiotic after electroporation. Transfer of such combined approach from experiments to practice has limitations. Use of electroporation and clinical antibiotics is limited to treatment of wastewaters, that are already contaminated with antibiotics, because adding antibiotics to environment is not acceptable. Its use in medicine is questionable, since electroporation

parameters that ensure bacterial inactivation, also cause surrounding host cell damage, since these are much bigger than bacterial cells. In food industry, electroporation could be used in combination with, antimicrobial substances, that are safe and registered as food additives or are already present in food, for the purpose of sterilization or pasteurization.

Increase in membrane permeability during electroporation enables transport of various molecules into and out of the cell, which is crucial for processes such as electroextraction, electrotransformation, inactivation and biomass drying. While previous studies mostly focused on transport of plasmid DNA, for electroextraction or electrotransformation, we wanted to check how much and how quickly genomic DNA leaks out of bacterial cells after electroporation. Our preliminary results showed that all genomic DNA remained bound to the cell debris and did not leak into the supernatant, so we decided not to perform further experiments. Important question for electroextraction and electrotransformation is also whether electroporation causes changes in the DNA structure. Our preliminary results showed that exposure of plasmid DNA to electric pulses primarily causes the plasmid to unwind from an additionally coiled covalently closed circle into an open circle. These changes proportionally increased with increase of delivered energy, influence of other electroporation parameters, such as number and duration of pulses, were not detected. Electric pulses also caused fragmentation of genomic DNA, however, no correlation to delivered energy, number or length of the pulses was detected.

## 8 VIRI

- Alexopoulos A., Kimbaris A. C., Plessas S., Mantzourani I., Voidarou C., Pagonopoulou O., Tsigalou C., Fournomiti M., Bontsidis C., Stavropoulou E., Papaemmanouil V., Bezirtzoglou E. 2019. Combined action of piperitenone epoxide and antibiotics against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2607, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02607>
- Anderson A. K., Finkelstein R. 1919. A study of the electro-pure process of treating milk. *Journal of Dairy Science*, 2, 5: 374–406, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(19\)94338-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(19)94338-4)
- Andrews J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, suppl. 1: 5–16, [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Aune T. E. V., Aachmann F. L. 2010. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 5: 1301–1313, <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2349-1>
- Balantič K., Weiss V. U., Pittenauer E., Miklavčič D., Kramar P. 2023. The role of lipid oxidation on electrical properties of planar lipid bilayers and its importance for understanding electroporation. *Bioelectrochemistry*, 153: 108498, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108498>
- Barrau C., Teissié J., Gabriel B. 2004. Osmotically induced membrane tension facilitates the triggering of living cell electroporabilization. *Bioelectrochemistry*, 63, 1-2: 327–332, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.11.009>
- Batista Napotnik T., Polajžer T., Miklavčič D. 2021. Cell death due to electroporation – A review. *Bioelectrochemistry*, 141: 107871, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107871>
- Benarroch J. M. Asally M. 2020. The microbiologist's guide to membrane potential dynamics. *Trends in Microbiology*, 28, 4: 304–314, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.008>
- Berdejo D., Pagán E., García-Gonzalo D., Pagán R. 2019. Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving food safety. *Current Opinion in Food Science*, 30: 14-20, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.004>
- Britannica. The bacterial cell. Morphological features of bacteria, <https://www.britannica.com/science/bacteria/Capsules-and-slime-layers> (20. feb. 2024)
- Campoli-Richards D. M., Monk J. P., Price A., Benfield P., Todd P. A., Ward A. 1988. Ciprofloxacin. *Drugs*, 35, 4: 373–447, <https://doi.org/10.2165/00003495-198835040->

00003

Cheng D., Ngo H. H., Guo W., Chang S. W., Nguyen D. D., Liu Y., Wei Q., Wei D. 2020. A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches. *Journal of Hazardous Materials*, 387: 121682, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121682>

Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232–260, <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>

Del Pozo J. L., Rouse M. S., Patel R. 2008. Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review. *International Journal of Artificial Organs*, 31, 9: 786-795, <https://doi.org/10.1177/039139880803100906>

Del Pozo J. L., Rouse M. S., Mandrekar J. N., Sampedro M. F., Steckelberg J. M., Patel R. 2009a. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 1: 35-40, <https://doi.org/10.1128/AAC.00237-08>

Del Pozo J. L., Rouse M. S., Mandrekar J. N., Steckelberg J. M., Patel R. 2009b. The electricidal effect: reduction of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* biofilms by prolonged exposure to low-intensity electrical current. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 1: 41-45, <https://doi.org/10.1128/AAC.00680-08>

Delso C., Berzosa A., Sanz J., Álvarez I., Raso J. 2023. Microbial decontamination of red wine by pulsed electric fields (PEF) after alcoholic and malolactic fermentation: effect on *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, and oenological parameters during storage. *Foods*, 12, 2: 278, <https://doi.org/10.3390/foods12020278>

Demiryurek Y., Nickaeen M., Zheng M., Yu M., Zahn J. D., Shreiber D. I., Lin H., Shan J. W. 2015. Transport, resealing, and re-poration dynamics of two-pulse electroporation-mediated molecular delivery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848, 8: 1706–1714, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.04.007>

Diwan V., Stålsby Lundborg C., Tamhankar A. J. 2013. Seasonal and temporal variation in release of antibiotics in hospital wastewater: estimation using continuous and grab sampling. *PLoS ONE*, 8, 7: e6871, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068715>

Djukić-Vuković A., Meglič S. H., Flisar K., Mojović L., Miklavčič D. 2021. Pulsed electric field treatment of *Lacticaseibacillus rhamnosus* and *Lacticaseibacillus paracasei*, bacteria with probiotic potential. *LWT*, 152: 112304, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112304>

- Djuzenova C. S., Zimmermann U., Frank H., Sukhorukov V. L., Richter E., Fuhr G. 1996. Effect of medium conductivity and composition on the uptake of propidium iodide into electroporabilized myeloma cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1284, 2: 143–152, [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00119-8)
- Donate A., Burcus N., Schoenbach K., Heller R. 2015. Application of increased temperature from an exogenous source to enhance gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry*, 103: 120-123, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.007>
- Dos Santos E. C., Rozynek Z., Hansen E. L., Hartmann-Petersen R., Klitgaard R. N., Løbner-Olesen A., Michels L., Mikkelsen A., Plivelic T. S., Bordallo H. N., Fossum J. O. 2022. Direct synthesis of ultrathin FER zeolite nanosheets via a dual-template approach. *RSC Advances*, 12: 14183-14189, <https://doi.org/10.1039/D2RA01334G>
- El-Hag A. H., Jayaram S. H., Rodriguez Gonzalez O., Griffiths M. W. 2011. The influence of size and shape of microorganism on pulsed electric field inactivation. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 10, 3: 133–138, <https://doi.org/10.1109/TNB.2011.2163078>
- Eleršek T., Flisar K., Likozar B., Klemenčič M., Golob J., Kotnik T., Miklavčič D. 2020. Electroporation as a solvent-free green technique for non-destructive extraction of proteins and lipids from *Chlorella vulgaris*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 443, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00443>
- Emmanuel E., Keck G., Blanchard J. M., Vermande P., Perrodin Y. 2004. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment International*, 30, 7: 891–900, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.004>
- Fernandes M. M., Carvalho E. O., Lanceros-Mendez S. 2019. Electroactive smart materials: novel tools for tailoring bacteria behavior and fight antimicrobial resistance. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7: 277, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00277>
- Freebairn D., Linton D., Harkin-Jones E., Jones D. S., Gilmore B. F., Gorman S. P. 2013. Electrical methods of controlling bacterial adhesion and biofilm on device surfaces. *Expert Review of Medical Devices*, 10, 1: 85-103, <https://doi.org/10.1586/erd.12.70>
- Gabriel B., Teissie J. 1995. Spatial compartmentation and time resolution of photooxidation of a cell membrane probe in electroporabilized chinese hamster ovary cells. *European Journal of Biochemistry*, 228, 3: 710–718, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0710m.x>
- García D., Gómez N., Raso J., Pagán R. 2005. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 4: 388-395, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.003>

García D., Mañas P., Gómez N., Raso J., Pagán R. 2006. Biosynthetic requirements for the repair of sublethal membrane damage in *Escherichia coli* cells after pulsed electric fields. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 3: 428-435, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02795.x>

Garner A. L. 2019. Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 19: 7917-7929, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10067-y>

Golberg A., Rubinsky B. 2010. The effect of electroporation type pulsed electric fields on DNA in aqueous solution. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 9, 4: 423–430, <https://doi.org/10.1177/153303461000900412>

Golberg A., Felix Broelsch G., Vecchio D., Khan S., Hamblin M. R., Austen W. G., Sheridan R. L., Yarmush M. L. 2015. Pulsed electric fields for burn wound disinfection in a murine model. *Journal of Burn Care and Research*, 36, 1: 7-13, <https://doi.org/10.1097/BCR.0000000000000157>

Gurtovenko A. A., Lyulina A. S. 2014. Electroporation of asymmetric phospholipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 118, 33: 9909–9918, <https://doi.org/10.1021/jp5028355>

Gusbeth C., Frey W., Volkmann H., Schwartz T., Bluhm H. 2009. Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere*, 75, 2: 228-233, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.066>

Haberl-Meglič S., Levičnik E., Luengo E., Raso J., Miklavčič D. 2016. The effect of temperature and bacterial growth phase on protein extraction by means of electroporation. *Bioelectrochemistry*, 112: 77-82, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.08.002>

Haberl Meglič S., Janež N., Peterka M., Flisar K., Kotnik T., Miklavčič D. 2020. Evaluation and optimization of protein extraction from *E. coli* by electroporation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 543187, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.543187>

Haberl S., Jarc M., Štrancar A., Peterka M., Hodžić D., Miklavčič D. 2013a. Comparison of alkaline lysis with electroextraction and optimization of electric pulses to extract plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Journal of Membrane Biology*, 246, 11: 861-867, <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9580-5>

Haberl S., Kandušer M., Flisar K., Hodžić D., Bregar V. B., Miklavčič D., Escoffre J. M., Rols M. P., Pavlin M. 2013b. Effect of different parameters used for in vitro gene electrotransfer on gene expression efficiency, cell viability and visualization of plasmid DNA at the membrane level. *The Journal of Gene Medicine*, 15, 5: 169–181,

<https://doi.org/10.1002/jgm.2706>

Hocquet D., Muller A., Bertrand X. 2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 93, 4: 395–402, <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.01.010>

Huang K., Jiang T., Wang W., Gai L., Wang J. 2014. A comparison of pulsed electric field resistance for three microorganisms with different biological factors in grape juice via numerical simulation. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 7: 1981–1995, <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1272-3>

Juma A., Lemoine P., Simpson A. B. J., Murray J., O'Hagan B. M. G., Naughton P. J., Dooley J. G., Banat I. M. 2020. Microscopic investigation of the combined use of antibiotics and biosurfactants on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1477, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01477>

Khan S. I., Blumrosen G., Vecchio D., Golberg A., McCormack M. C., Yarmush M. L., Hamblin M. R., Austen W. G. 2016. Eradication of multidrug-resistant pseudomonas biofilm with pulsed electric fields. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 3: 643–650, <https://doi.org/10.1002/bit.25818>

Kim J. P., Jin D. R., Lee W., Chae M., Park J. 2020. Occurrence and removal of veterinary antibiotics in livestock wastewater treatment plants, South Korea. *Processes*, 8, 6: 720, <https://doi.org/10.3390/pr8060720>, <https://doi.org/10.3390/pr8060720>

Korem M., Goldberg N. S., Cahan A., Cohen M. J., Nissenbaum I., Moses A. E. 2018. Clinically applicable irreversible electroporation for eradication of micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 67, 1: 15–21, <https://doi.org/10.1111/lam.12996>

Kotnik T., Pucihar G., Miklavčič D. 2010. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation - mediated molecular transport. *Journal of Membrane Biology*, 236, 1: 3–13, <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9279-9>

Kotnik T., Frey W., Sack M., Haberl Meglič S., Peterka M., Miklavčič D. 2015. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 33, 8: 480–488, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.002>

Kotnik T., Weaver J. C. 2016. Abiotic gene transfer: rare or rampant? *Journal of Membrane Biology*, 249, 5: 623–631, <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9897-y>

Kotnik T., Rems L., Tarek M., Miklavčič D. 2019. Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annual Review of Biophysics*, 48, 1: 63–91, <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-052118-115451>

- Kuyukina M. S., Varushkina A. M., Ivshina I. B. 2020. Effects of electroporation on antibiotic susceptibility and adhesive activity to n-hexadecane in *Rhodococcus ruber* IEGM 231. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56, 6: 729–735, <https://doi.org/10.1134/S0003683820060083>
- Lamarche C., Da Silva C., Demol G., Dague E., Rols M. P., Pillet F. 2018. Electrical discharges in water induce spores' DNA damage. *PLoS ONE*, 13, 8: e0201448, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201448>
- Landete J. M., Rodriguez H., Curiel J. A., de las Rivas B., de Felipe F. L., Muñoz R. 2010. Degradation of phenolic compounds found in olive products by *Lactobacillus plantarum* strains. V: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Preedy V. R., Watson R. R. (ur.). Tokyo, Academic Press: 387-396, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7>
- Lovšin Ž., Klančnik A., Kotnik T. 2021. Electroporation as an efficacy potentiator for antibiotics with different target sites. *Frontiers in Microbiology*, 12: 722232, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722232>
- Lovšin Ž., Kotnik T., Klančnik A. 2024. Antibiotic's target site affects the potentiation of *Lactiplantibacillus plantarum* inhibition and inactivation by electroporation. *Frontiers in Microbiology*, 15: 1331714, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1331714>
- Martens S. L., Klein S., Barnes R. A., TrejoSanchez P., Roth C. C., Ibey B. L. 2020. 600-ns pulsed electric fields affect inactivation and antibiotic susceptibilities of *Escherichia coli* and *Lactobacillus acidophilus*. *AMB Express*, 10: 55, <https://doi.org/10.1186/s13568-020-00991-y>
- Martín-Belloso O., Sobrino-López A. 2011. Combination of pulsed electric fields with other preservation techniques. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 6: 954-968, <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0512-z>
- Martinez J. L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157, 11: 2893–2902, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Matos T., Senkbeil S., Mendonça A., Queiroz J. A., Kutter J. P., Bulow L. 2013. Nucleic acid and protein extraction from electropermeabilized *E. coli* cells on a microfluidic chip. *Analyst*, 138, 24: 7347–7353, <https://doi.org/10.1039/c3an01576a>
- Michel O., Pakhomov A. G., Casciola M., Saczko J., Kulbacka J., Pakhomova O. N. 2020. Electropermeabilization does not correlate with plasma membrane lipid oxidation. *Bioelectrochemistry*, 132: 107433, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107433>

Miklavcic D., Novickij V., Kranjc M., Polajzer T., Haberl Meglic S., Batista Napotnik T., Romih R., Lisjak D. 2020. Contactless electroporation induced by high intensity pulsed electromagnetic fields via distributed nanoelectrodes. *Bioelectrochemistry*, 132: 107440, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107440>

Montanari C., Tylewicz U., Tabanelli G., Berardinelli A., Rocculi P., Ragni L., Gardini F. 2019. Heat-assisted pulsed electric field treatment for the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: effects of the presence of citral. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1737, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01737>

Mosqueda-Melgar J., Raybaudi-Massilia R. M., Martín-Beloso O. 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 3: 328–340, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.09.003>

Müller W. A., Sarkis J. R., Marczak L. D. F., Muniz A. R. 2022. Molecular dynamics insights on temperature and pressure effects on electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1864, 12: 184049, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184049>

Muñoz A., Palgan I., Noci F., Cronin D. A., Morgan D. J., Whyte P., Lyng J. G. 2012. Combinations of selected non-thermal technologies and antimicrobials for microbial inactivation in a buffer system. *Food Research International*, 47, 1: 100-105, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.001>

Nagler M., Podmirseg S. M., Griffith G. W., Insam H., Ascher-Jenull J. 2018. The use of extracellular DNA as a proxy for specific microbial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 6: 2885-2898, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8786-y>

Nairi V., Medda L., Monduzzi M., Salis A. 2017. Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica. *Journal of Colloid and Interface Science*, 497: 217–225, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.021>

Narsetti R., Curry R. D., McDonald K. F., Clevenger T. E., Nichols L. M. 2006. Microbial inactivation in water using pulsed electric fields and magnetic pulse compressor technology. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34, 4: 1386-1393, <https://doi.org/10.1109/TPS.2006.878386>

PubChem. Ampicillin, National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin> (19. mar. 2024)

PubChem. Ciprofloxacin, National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin> (19. mar. 2024)

PubChem. Tetracycline, National Center for Biotechnology Information,

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetracycline> (19. mar. 2024)

Novickij V., Švediene J., Paškevičius A., Markovskaja S., Girkontaite I., Zinkevičiene A., Lastauskiene E., Novickij J. 2018a. Pulsed electric field-assisted sensitization of multidrug-resistant *Candida albicans* to antifungal drugs. Future Microbiology, 13, 5: 535-546, <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0245>

Novickij V., Švedienė J., Paškevičius A., Markovskaja S., Lastauskienė E., Zinkevičienė A., Girkontaitė I., Novickij J. 2018b. Induction of different sensitization patterns of MRSA to antibiotics using electroporation. Molecules, 23, 7: 1799, <https://doi.org/10.3390/molecules23071799>

Novickij V., Zinkevičienė A., Perminaitė E., Čėsna R., Lastauskienė E., Paškevičius A., Švedienė J., Markovskaja S., Novickij J., Girkontaitė I. 2018c. Non-invasive nanosecond electroporation for biocontrol of surface infections: an in vivo study. Scientific Reports, 8, 1: 14516, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32783-7>

Novickij V., Zinkevičienė A., Stanevičienė R., Gruškienė R., Servienė E., Vepštaitė-Monstavičė I., Krivorotova T., Lastauskienė E., Sereikaitė J., Girkontaitė I., Novickij J. 2018d. Inactivation of *Escherichia coli* using nanosecond electric fields and nisin nanoparticles: a kinetics study. Frontiers in Microbiology, 9: 3006, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03006>

Novickij V., Lastauskiene E., Staigvila G., Girkontaite I., Zinkevičiene A., Švediene J., Paškevičius A., Markovskaja S., Novickij J. 2019. Low concentrations of acetic and formic acids enhance the inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* with pulsed electric fields., BMC Microbiology, 19, 1: 73, <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1447-1>

Novickij V., Rembiałkowska N., Szłasa W., Kulbacka J. 2022. Does the shape of the electric pulse matter in electroporation? Frontiers in Oncology, 12: 958128, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.958128>

Nowosad K., Sujka M., Pankiewicz U., Kowalski R. 2021. The application of PEF technology in food processing and human nutrition. Journal of Food Science and Technology, 58, 2: 397–411, <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04512-4>

Paraskeva P., Graham N. J. D. 2002. Ozonation of municipal wastewater effluents. Water Environment Research, 74, 6: 569–581, <https://doi.org/10.2175/106143002X140387>

Piggot T. J., Holdbrook D. A., Khalid S. 2011. Electroporation of the *E. coli* and *S. aureus* membranes: molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes. Journal of Physical Chemistry B, 115, 45: 13381-13388, <https://doi.org/10.1021/jp207013v>

Pillet F., Formosa-Dague C., Baaziz H., Dague E., Rols M. P. 2016a. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific Reports*, 6: 19778, <https://doi.org/10.1038/srep19778>

Pillet F., Marjanovič I., Reberšek M., Miklavčič D., Rols M. P., Kotnik T. 2016b. Inactivation of spores by electric arcs. *BMC Microbiology*, 16: 148, <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0764-x>

Polak A., Tarek M., Tomšič M., Valant J., Ulrich N. P., Jamnik A., Kramar P., Miklavčič D. 2014. Electroporation of archaeal lipid membranes using MD simulations. *Bioelectrochemistry*, 100: 18–26, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.12.006>

Potočnik T., Sachdev S., Polajzer T., Maček Lebar A., Miklavčič D. 2022. Efficient gene transfection by electroporation—in vitro and in silico study of pulse parameters. *Applied Sciences*, 12, 16: 8237, <https://doi.org/10.3390/app12168237>

Rems L., Viano M., Kasimova M. A., Miklavčič D., Tarek M. 2019. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporabilization: a molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry*, 125: 46–57, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.07.018>

Rems L., Kasimova M. A., Testa I., Delemotte L. 2020. Pulsed electric fields can create pores in the voltage sensors of voltage-gated ion channels. *Biophysical Journal*, 119, 1: 190–205, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.05.030>

Rieder A., Schwartz T., Schön-Hölz K., Marten S. M., Süß J., Gusbeth C., Kohnen W., Swoboda W., Obst U., Frey W. 2008. Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 6: 2035–2045, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03972.x>

Rockenbach A., Sudarsan S., Berens J., Kosubek M., Lazar J., Demling P., Hanke R., Mennicken P., Ebert B. E., Blank L. M., Schnakenberg U. 2019. Microfluidic irreversible electroporation—a versatile tool to extract intracellular contents of bacteria and yeast. *Metabolites*, 9, 10: 211, <https://doi.org/10.3390/metabo9100211>

Rubin A. E., Usta O. B., Schloss R., Yarmush M., Golberg A. 2019. Selective inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* with pulsed electric fields and antibiotics. *Advances in Wound Care*, 8, 4: 136–148, <https://doi.org/10.1089/wound.2018.0819>

Ruhr E., Sahl H. G. 1985. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 5: 841–845, <https://doi.org/10.1128/AAC.27.5.841>

Ruzgys P., Jakutavičiūtė M., Šatkauskienė I., Čepurnienė K., Šatkauskas S. 2019. Effect of electroporation medium conductivity on exogenous molecule transfer to cells in vitro. *Scientific Reports*, 9, 1: 1436, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38287-8>

Sachdev S., Feijoo Moreira S., Keehnen Y., Rems L., Kreutzer M. T., Boukany P. E. 2020. DNA-membrane complex formation during electroporation is DNA size-dependent. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862, 2: 183089, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183089>

Saldaña G., Álvarez I., Condón S., Raso J. 2014. Microbiological aspects related to the feasibility of PEF technology for food pasteurization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 11: 1415-1426, <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.638995>

Schottroff F., Kastenhofer J., Spadiut O., Jaeger H., Wurm D. J. 2021. Selective release of recombinant periplasmic protein from *E. coli* using continuous pulsed electric field treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 586833, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.586833>

Schwartz T., Hoffmann S., Obst U. 2003. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 3: 591–601, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02019.x>

Shah M. M., Mandiga P. 2020. Physiology, plasma osmolality and oncotic pressure. *StatPearls*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544365/>

Sherba J. J., Hogquist S., Lin H., Shan J. W., Shreiber D. I., Zahn J. D. 2020. The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific Reports*, 10, 1: 3053, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59790-x>

Silhavy T. J., Kahne D., Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 5: a000414, 1 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

Somolinos M., García D., Mañas P., Condón S., Pagán R. 2008. Effect of environmental factors and cell physiological state on pulsed electric fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 3: 260-267, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.021>

Song J., Joshi R. P., Schoenbach K. H. 2011. Synergistic effects of local temperature enhancements on cellular responses in the context of high-intensity, ultrashort electric pulses. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 49, 6: 713-718, <https://doi.org/10.1007/s11517-011-0745-z>

Ulmer H. M., Heinz V., Gänzle M. G., Knorr D., Vogel R. F. 2002. Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer.

Journal of Applied Microbiology, 93, 2: 326-335, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01699.x>

Vadlamani A., Detwiler D. A., Dhanabal A., Garner A. L. 2018. Synergistic bacterial inactivation by combining antibiotics with nanosecond electric pulses. Applied Microbiology and Biotechnology, 102, 17: 7589-7596, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9215-y>

Vadlamani R. A., Dhanabal A., Detwiler D. A., Pal R., McCarthy J., Seleem M. N., Garner A. L. 2020. Nanosecond electric pulses rapidly enhance the inactivation of Gram-negative bacteria using Gram-positive antibiotics. Applied Microbiology and Biotechnology, 104, 5: 2217–2227, <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10365-w>

Vernier P. T., Levine Z. A., Wu Y. H., Joubert V., Ziegler M. J., Mir L. M., Tielemans D. P. 2009. Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. PLoS ONE, 4, 11: e7966, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007966>

Vitzthum F., Geiger G., Bisswanger H., Elkine B., Brunner H., Bernhagen J. 2000. Amplifiable DNA from gram-negative and gram-positive bacteria by a low strength pulsed electric field method. Nucleic Acids Research, 28, 8: e37, <https://doi.org/10.1093/nar/28.8.e37>

Wang C., Cui Y., Qu X. 2020. Optimization of electrotransformation (ETF) conditions in lactic acid bacteria (LAB). Journal of Microbiological Methods, 174: 105944, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105944>

Wang M. S., Wang L. H., Bekhit A. E. D. A., Yang J., Hou Z. P., Wang Y. Z., Dai Q. Z., Zeng X. A. 2018. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing. Journal of Food Engineering, 223: 32–41, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.035>

Wang T., Xie X. 2023. Nanosecond bacteria inactivation realized by locally enhanced electric field treatment. Nature Water, 1, 1: 104–112, <https://doi.org/10.1038/s44221-022-00003-2>

WHO. 2023a. Water, sanitation and hygiene (WASH). World Health Organisation, [\(27. okt. 2023\)](https://www.who.int/health-topics/water-sanitation-and-hygiene-wash#tab=tab_1)

WHO. 2023b. Foodborne diseases. World Health Organisation, [\(27. okt. 2023\)](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1)

Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H. G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. Journal of Biological Chemistry, 276, 3: 1772–1779, <https://doi.org/10.1074/jbc.M006770200>

Wormser G. P., Nadelman R. B., Dattwyler R. J., Dennis D. T., Shapiro E. D., Steere A. C., Rush T. J., Rahn D. W., Coyle P. K., Persing D. H., Fish D., Luft B. J. 2000. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases*, 31, suppl. 1: 1–14, <https://doi.org/10.1086/314053>

Wright A. J. 1999. The penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 3: 290–307, <https://doi.org/10.4065/74.3.290>

Xue G. P., Johnson J. S., Dalrymple B. P. 1999. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods*, 34, 3: 183–191, [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00087-6)

Yan Z., Hao C., Yin L., Liu K., Qiu J. 2021. Simulation of the influence of temperature on the dynamic process of electroporation based on finite element analysis. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 49, 9: 2839–2850, <https://doi.org/10.1109/TPS.2021.3100878>

Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C. M. A. P., Harris H. M. B., Mattarelli P., O'Toole P. W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G. E., Gänzle M. G., Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 4: 2782–2858, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhou J., Hung Y. C., Xie X. 2021. Making waves: pathogen inactivation by electric field treatment: from liquid food to drinking water. *Water Research*, 207: 117817, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117817>

Zulkefli N. S., Kim K. H., Hwang S. J. 2019. Effects of microbial activity and environmental parameters on the degradation of extracellular environmental DNA from a eutrophic lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 18: 3339, <https://doi.org/10.3390/ijerph16183339>

## ZAHVALA

Iskrena zahvala mentorju prof. dr. Tadeju Kotniku za strokovno podporo, spodbudo ter natančne pregledne in nasvete pri pisanju tako člankov kot doktorske naloge. Hvala tudi somentorici izr. prof. dr. Anji Klančnik za strokovno podporo pri mojem delu in spodbudo.

Hvala članom komisije, za pregled moje doktorske disertacije ter konstruktivne komentarje in nasvete.

Hvala Poloni Komel za pomoč pri izvedbi poskusov.

Hvala tudi vsem sodelavcem Laboratorija za biokibernetiko za nasvete, spodbudo in prijetna druženja. Posebna zahvala Tjaši in Aleksandri, za zabavna druženja ob kavici, kjer smo reševale tako strokovne kot motivacijske probleme.

Najlepša zahvala pa gre mojim najbližnjim in prijateljem, ki so mi stali od strani in me spodbujali.

To delo je financirala Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) preko programa za mlade raziskovalce. Poskusi so bili izvedeni v okviru Infrastrukturnega programa: Mreža raziskovalnih infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (IP-0510).

## PRILOGE

### PRILOGA A

Nakloni posameznih delov krivulj sinergističnih učinkov kombinirane uporabe elektroporacije in antibiotika (N=3) pri prehodih iz 5 na 10, 10 na 15 in 15 na 20 kV/cm. V zadnjem stolpcu tudi primerjava naklonov med *E. coli* in *L. plantarum* (\* za  $p<0,05$ ; \*\* za  $p<0,01$ ; \*\*\* za  $p<0,001$ ).

čas inkubacije	antibiotik	koncentracija [kV/cm]	$\Delta E$	<i>E. coli</i>		<i>L. plantarum</i>		<i>E. coli</i> vs. <i>L. plantarum</i> <i>p</i> vrednost
				naklon	sd	naklon	sd	
1 h	ampicilin	MIK	10-5	-0,022	0,045	0,029	0,050	0,2630
1 h	ampicilin	MIK	15-10	-0,073	0,038	-0,061	0,036	0,7171
1 h	ampicilin	MIK	20-15	-0,012	0,050	-0,017	0,172	0,9642
1 h	ampicilin	3xMIK	10-5	-0,110	0,037	0,055	0,081	0,0325 *
1 h	ampicilin	3xMIK	15-10	-0,016	0,048	-0,023	0,095	0,9106
1 h	ampicilin	3xMIK	20-15	-0,013	0,021	-0,037	0,069	0,5896
1 h	ampicilin	10xMIK	10-5	-0,064	0,062	-0,059	0,104	0,9516
1 h	ampicilin	10xMIK	15-10	-0,005	0,066	0,058	0,096	0,4012
1 h	ampicilin	10xMIK	20-15	-0,0005	0,011	0,044	0,105	0,5394
1 h	ampicilin	30xMIK	10-5	0,001	0,054	0,042	0,074	0,4875
1 h	ampicilin	30xMIK	15-10	-0,003	0,053	-0,060	0,112	0,4708
1 h	ampicilin	30xMIK	20-15	0,032	0,065	-0,005	0,199	0,7735
1 h	tetraciklin	MIK	10-5	-0,021	0,054	-0,022	0,023	0,9860
1 h	tetraciklin	MIK	15-10	-0,009	0,040	0,059	0,082	0,2634
1 h	tetraciklin	MIK	20-15	-0,031	0,035	-0,033	0,136	0,9805
1 h	tetraciklin	3xMIK	10-5	-0,032	0,034	-0,012	0,044	0,5534
1 h	tetraciklin	3xMIK	15-10	-0,014	0,060	0,045	0,067	0,3243
1 h	tetraciklin	3xMIK	20-15	-0,021	0,022	-0,050	0,068	0,5180
1 h	tetraciklin	10xMIK	10-5	-0,073	0,051	0,001	0,057	0,1757
1 h	tetraciklin	10xMIK	15-10	-0,033	0,044	0,002	0,017	0,2710
1 h	tetraciklin	10xMIK	20-15	-0,009	0,067	0,012	0,088	0,7603
1 h	tetraciklin	30xMIK	10-5	-0,146	0,059	-0,030	0,128	0,2260
1 h	tetraciklin	30xMIK	15-10	-0,024	0,042	0,069	0,072	0,1261
1 h	tetraciklin	30xMIK	20-15	-0,053	0,061	-0,00004	0,074	0,3920
24 h	ampicilin	MIK	10-5	-0,090	0,065	-0,204	0,179	0,3484
24 h	ampicilin	MIK	15-10	-0,165	0,013	-0,116	0,180	0,6265
24 h	ampicilin	MIK	20-15	-0,150	0,018	-0,036	0,091	0,0914
24 h	ampicilin	3xMIK	10-5	-0,194	0,016	-0,451	0,042	0,0002 ***
24 h	ampicilin	3xMIK	15-10	-0,133	0,054	-0,072	0,067	0,2576
24 h	ampicilin	3xMIK	20-15	-0,090	0,073	-0,035	0,094	0,4405
24 h	ampicilin	10xMIK	10-5	-0,207	0,006	-0,462	0,117	0,0217 *
24 h	ampicilin	10xMIK	15-10	-0,034	0,012	-0,153	0,108	0,1126
24 h	ampicilin	10xMIK	20-15	0,001	0,034	-0,016	0,096	0,7815

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A

čas inkubacije	antibiotik	koncentracija	$\Delta E$ [kV/cm]	<i>E. coli</i>		<i>L. plantarum</i>		<i>E. coli</i> vs. <i>L. plantarum</i>	
				naklon	sd	naklon	sd	p vrednost	
24 h	ampicilin	30xMIK	10-5	-0,187	0,037	-0,500	0,078	0,0015	**
24 h	ampicilin	30xMIK	15-10	-0,044	0,070	-0,309	0,141	0,0322	*
24 h	ampicilin	30xMIK	20-15	0,026	0,058	-0,018	0,135	0,6300	
24 h	tetraciklin	MIK	10-5	-0,012	0,011	-0,381	0,137	0,0122	*
24 h	tetraciklin	MIK	15-10	-0,005	0,026	-0,106	0,127	0,2423	
24 h	tetraciklin	MIK	20-15	-0,087	0,050	0,012	0,123	0,2506	
24 h	tetraciklin	3xMIK	10-5	-0,018	0,037	-0,359	0,049	0,0002	***
24 h	tetraciklin	3xMIK	15-10	-0,078	0,015	-0,205	0,059	0,0167	*
24 h	tetraciklin	3xMIK	20-15	-0,090	0,088	0,128	0,155	0,0843	
24 h	tetraciklin	10xMIK	10-5	-0,154	0,179	-0,828	0,353	0,0307	*
24 h	tetraciklin	10xMIK	15-10	-0,168	0,072	-0,217	0,227	0,7404	
24 h	tetraciklin	10xMIK	20-15	-0,175	0,043	0,086	0,432	0,3154	
24 h	tetraciklin	30xMIK	10-5	-0,177	0,078	-0,936	0,275	0,0061	**
24 h	tetraciklin	30xMIK	15-10	-0,053	0,034	-0,190	0,268	0,3849	
24 h	tetraciklin	30xMIK	20-15	0,056	0,267	0,278	0,139	0,2068	

## PRILOGA B

Povprečja parametrov rastnih krivulj bakterij *L. plantarum* po elektroporaciji in pri inkubaciji pri sobni temperaturi ali 37 °C. N=6. \* označujejo statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (\* za  $p<0,05$ ; \*\* za  $p<0,01$ ; \*\*\* za  $p<0,001$ ). / označuje podatke, kjer zamika log faze ni bilo zaznati.

INKUBACIJA	VZOREC	TIP KRIVULJE	ZAČETNI OD <sub>600</sub>	ZAMIK LOG FAZE [h]	STOPNJA RASTI [h <sup>-1</sup> ]	KONČNI OD <sub>600</sub>
Sobna temperatura	kontrola	I	0,286	/	0,343	1,002
	5 kV/cm	I	0,214	4,833 *	0,254	0,654 **
	10 kV/cm	III	0,196	10,333 ***	0,331	0,699 *
	15 kV/cm	III	0,195	12,500 ***	0,338	0,632 **
	20 kV/cm	III	0,205	12,833 ***	0,308	0,447 ***
37 °C	kontrola	I	0,365	/	0,600	1,050
	5 kV/cm	I	0,315 ***	/	0,365 **	1,120
	10 kV/cm	I	0,272 ***	4,250 ***	0,361 **	0,830
	15 kV/cm	II	0,263 ***	6,667 ***	0,361 **	0,610 ***
	20 kV/cm	III	0,270 ***	10,000 ***	0,464	0,780

## PRILOGA C

Povprečja parametrov rastnih krivulj bakterij *L. plantarum* po tretiranju s kombinacijo elektroporacije in antibiotika ter inkubaciji pri sobni temperaturi. N=3 za vzorce in N=6 za kontrolo. \* označujejo statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (\* za  $p<0,05$ ; \*\* za  $p<0,01$ ; \*\*\* za  $p<0,001$ ). Z / so označeni podatki kjer zamika log faze ali stopnje rasti ni bilo zaznati.

ANTIBIOTIK	VZOREC	TIP KRIVULJE	ZAČETNI OD <sub>600</sub>	ZAMIK LOG FAZE [h]	STOPNJA RASTI [h <sup>-1</sup> ]	KONČNI OD <sub>600</sub>
ampicilin	/	kontrola	I	0,286	/	1,002
		MIK	I	0,263	/	0,752
		3xMIK	IV	0,261	/	0,525 **
		10xMIK	IV	0,228	/	0,261 ***
		30xMIK	IV	0,248	/	0,258 ***
		5 kV/cm MIK	I	0,223	4,000	0,582 *
		5 kV/cm 3xMIK	IV	0,229	/	0,308 ***
		5 kV/cm 10xMIK	IV	0,221	/	0,175 ***
		5 kV/cm 30xMIK	IV	0,227	/	0,143 ***
		10 kV/cm MIK	IV	0,205	/	0,420 ***
		10 kV/cm 3xMIK	IV	0,209	/	0,069 ***
		10 kV/cm 10xMIK	IV	0,218	/	0,058 ***
		10 kV/cm 30xMIK	IV	0,212	/	0,051 ***
		15 kV/cm MIK	IV	0,205	/	0,319 ***
		15 kV/cm 3xMIK	IV	0,213	/	0,059 ***
		15 kV/cm 10xMIK	IV	0,208	/	0,061 ***
		15 kV/cm 30xMIK	IV	0,212	/	0,069 ***
		20 kV/cm MIK	IV	0,228	/	0,277 ***
		20 kV/cm 3xMIK	IV	0,227	/	0,121 ***
		20 kV/cm 10xMIK	IV	0,231	/	0,144 ***
		20 kV/cm 30xMIK	IV	0,225	/	0,138 ***
tetraciklin		MIK	II	0,227	/	0,198 ***
		3xMIK	IV	0,274	/	0,363 ***
		10xMIK	IV	0,273	/	0,154 ***
		30xMIK	IV	0,300	/	0,062 ***
		5 kV/cm MIK	IV	0,197	/	0,124 ***
		5 kV/cm 3xMIK	IV	0,212	/	0,028 ***
		5 kV/cm 10xMIK	IV	0,218	/	0,024 ***
		5 kV/cm 30xMIK	IV	0,260	/	0,045 ***
		10 kV/cm MIK	IV	0,183	/	0,017 ***
		10 kV/cm 3xMIK	IV	0,194	/	0,016 ***
		10 kV/cm 10xMIK	IV	0,202	/	0,018 ***
		10 kV/cm 30xMIK	IV	0,249	/	0,044 ***
		15 kV/cm MIK	IV	0,177	/	0,017 ***
		15 kV/cm 3xMIK	IV	0,188	/	0,016 ***
		15 kV/cm 10xMIK	IV	0,189	/	0,022 ***
		15 kV/cm 30xMIK	IV	0,225	/	0,050 ***
		20 kV/cm MIK	IV	0,198	/	0,033 ***
		20 kV/cm 3xMIK	IV	0,200	/	0,034 ***
		20 kV/cm 10xMIK	IV	0,205	/	0,045 ***
		20 kV/cm 30xMIK	IV	0,241	/	0,093 ***

## PRILOGA D

Povprečja parametrov rastnih krivulj bakterij *L. plantarum* po tretiranju s kombinacijo elektroporacije in antibiotika ter inkubaciji pri 37 °C. N=3 za vzorce in N=6 za kontrolo. \* označujejo statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (\* za  $p<0,05$ ; \*\* za  $p<0,01$ ; \*\*\* za  $p<0,001$ ). Z / so označeni podatki kjer zamika log faze ali stopnje rasti ni bilo zaznati.

ANTIBIOTIK	VZOREC	TIP KRIVULJE	ZAČETNI OD <sub>600</sub>	ZAMIK LOG FAZE [h]	STOPNJA RASTI [h <sup>-1</sup> ]	KONČNI OD <sub>600</sub>
ampicilin	/	kontrola	I	0,365	/	0,600
		MIK	I	0,370	/	0,504
		3xMIK	I	0,347	/	0,527
		10xMIK	I	0,327	/	0,449
		30xMIK	I	0,323	/	0,334 *
		5 kV/cm MIK	I	0,320	/	0,336 *
		5 kV/cm 3xMIK	IV	0,303	/	0,320 ***
		5 kV/cm 10xMIK	IV	0,303	/	0,400 ***
		5 kV/cm 30xMIK	IV	0,287 ***	/	0,410 ***
		10 kV/cm MIK	IV	0,267 ***	/	0,283 ***
		10 kV/cm 3xMIK	IV	0,260 ***	/	0,083 ***
		10 kV/cm 10xMIK	IV	0,263 ***	/	0,100 ***
		10 kV/cm 30xMIK	IV	0,277 ***	/	0,057 ***
		15 kV/cm MIK	IV	0,267 ***	/	0,303 ***
		15 kV/cm 3xMIK	IV	0,277 ***	/	0,070 ***
		15 kV/cm 10xMIK	IV	0,263 ***	/	0,057 ***
		15 kV/cm 30xMIK	IV	0,267 ***	/	0,040 ***
		20 kV/cm MIK	IV	0,280 ***	/	0,160 ***
		20 kV/cm 3xMIK	IV	0,287 ***	/	0,073 ***
		20 kV/cm 10xMIK	IV	0,273 ***	/	0,063 ***
		20 kV/cm 30xMIK	IV	0,270 ***	/	0,047 ***
tetraciklin	MIK	I	0,327	/	0,580	0,883
	3xMIK	I	0,340	/	0,301 **	0,850
	10xMIK	I	0,343	/	0,291 **	0,620*
	30xMIK	IV	0,360	/	/	0,377 ***
	5 kV/cm MIK	I	0,300 *	/	0,268 **	1,070
	5 kV/cm 3xMIK	I	0,290 *	0,667	0,149 ***	0,593 ***
	5 kV/cm 10xMIK	IV	0,297 *	/	/	0,383 ***
	5 kV/cm 30xMIK	IV	0,317	/	/	0,250 ***
	10 kV/cm MIK	III	0,270 ***	9,333 ***	0,181 ***	0,717
	10 kV/cm 3xMIK	IV	0,260 ***	/	/	0,120 ***
	10 kV/cm 10xMIK	IV	0,270 ***	/	/	0,093 ***
	10 kV/cm 30xMIK	IV	0,267 ***	/	/	0,110 ***
	15 kV/cm MIK	III	0,267 ***	15 ***	0,208 ***	0,473 ***
	15 kV/cm 3xMIK	IV	0,273 ***	/	/	0,063 ***
	15 kV/cm 10xMIK	IV	0,257 ***	/	/	0,060 ***
	15 kV/cm 30xMIK	IV	0,270 ***	/	/	0,113 ***
	20 kV/cm MIK	IV	0,273 ***	/	/	0,163 ***
	20 kV/cm 3xMIK	IV	0,260 ***	/	/	0,053 ***
	20 kV/cm 10xMIK	IV	0,257 ***	/	/	0,077 ***
	20 kV/cm 30xMIK	IV	0,250 ***	/	/	0,120 ***

## PRILOGA E

Testirani parametri elektroporacije, dovedena in deleži plazmidne DNA v posameznih regijah na gelu (N=1).

PROTOKOL	Dovedena energija [J]	A (v jamici)	B	C (odprtikrog)	D (dodatno zvita)	E
kontrola	0	0,00%	0,00%	3,39%	96,31%	0,30%
1x1 ms, 5 kV/cm	0,59	0,00%	0,00%	3,82%	95,96%	0,23%
1x1 ms, 10 kV/cm	2,79	0,00%	0,04%	8,49%	91,35%	0,11%
1x1 ms, 15 kV/cm	7,35	0,00%	1,49%	20,18%	77,92%	0,41%
1x1 ms, 20 kV/cm	16,28	0,63%	6,89%	33,30%	58,95%	0,24%
8x100 µs, 5 kV/cm	0,40	0,00%	0,00%	3,69%	95,68%	0,63%
8x100 µs, 10 kV/cm	1,72	0,00%	0,02%	4,44%	95,05%	0,50%
8x100 µs, 15 kV/cm	4,11	0,00%	0,05%	8,29%	90,98%	0,68%
8x100 µs, 20 kV/cm	8,01	0,00%	0,59%	10,25%	88,62%	0,55%
4x500 µs, 5 kV/cm	1,19	0,15%	0,01%	7,77%	91,75%	0,33%
4x500 µs, 10 kV/cm	5,55	0,00%	1,97%	15,85%	81,84%	0,33%
4x500 µs, 15 kV/cm	14,29	4,81%	14,27%	23,05%	57,87%	0,00%
4x500 µs, 20 kV/cm	30,55	52,85%	13,61%	14,93%	18,62%	0,00%
20x100 µs, 5 kV/cm	1,00	0,01%	0,01%	5,24%	94,37%	0,37%
20x100 µs, 10 kV/cm	4,38	0,01%	1,01%	20,01%	78,64%	0,35%
20x100 µs, 15 kV/cm	11,09	0,28%	7,78%	31,56%	60,36%	0,02%
20x100 µs, 20 kV/cm	20,16	6,22%	22,19%	32,18%	39,40%	0,01%
2x500 µs, 5 kV/cm	0,67	0,11%	0,13%	4,74%	94,38%	0,64%
2x500 µs, 10 kV/cm	2,61	0,00%	0,04%	7,26%	92,38%	0,33%
2x500 µs, 15 kV/cm	6,65	0,00%	1,29%	14,04%	84,59%	0,08%
2x500 µs, 20 kV/cm	14,80	0,14%	10,34%	31,90%	57,57%	0,05%

## PRILOGA F

Testirani parametri elektroporacije, dovedena energija in deleži genomske DNA v posameznih regijah na gelu (N=1).

PROTOKOL	Dovedena	A (v jamici)	B	C	D
	energija [J]				
kontrola	0	0,04%	0,01%	99,95%	0,00%
1x1 ms, 5 kV/cm	0,40	0,75%	0,07%	99,18%	0,00%
1x1 ms, 10 kV/cm	2,12	11,16%	0,43%	88,31%	0,10%
1x1 ms, 15 kV/cm	5,51	0,03%	0,00%	99,94%	0,04%
1x1 ms, 20 kV/cm	11,72	0,97%	1,80%	97,20%	0,03%
8x100 µs, 5 kV/cm	0,33	0,00%	0,01%	99,99%	0,00%
8x100 µs, 10 kV/cm	1,33	0,15%	0,04%	99,72%	0,10%
8x100 µs, 15 kV/cm	3,36	15,87%	0,10%	83,87%	0,16%
8x100 µs, 20 kV/cm	6,09	5,74%	0,44%	93,82%	0,00%
4x500 µs, 5 kV/cm	0,79	20,28%	0,54%	79,17%	0,02%
4x500 µs, 10 kV/cm	4,00	40,79%	0,07%	59,14%	0,00%
4x500 µs, 15 kV/cm	10,21	0,41%	0,09%	98,33%	1,17%
4x500 µs, 20 kV/cm	22,57	19,37%	3,17%	77,28%	0,18%
20x100 µs, 5 kV/cm	0,84	0,16%	0,00%	99,83%	0,01%
20x100 µs, 10 kV/cm	3,32	3,06%	0,10%	96,84%	0,01%
20x100 µs, 15 kV/cm	8,34	21,56%	2,52%	75,90%	0,01%
20x100 µs, 20 kV/cm	15,28	6,41%	0,84%	92,72%	0,03%
2x500 µs, 5 kV/cm	0,48	16,19%	0,48%	83,33%	0,00%
2x500 µs, 10 kV/cm	2,07	4,67%	1,09%	93,96%	0,27%
2x500 µs, 15 kV/cm	5,24	93,55%	0,04%	6,41%	0,00%
2x500 µs, 20 kV/cm	9,57	43,66%	7,50%	48,84%	0,00%

## PRILOGA G

Znanstvena objava z naslovom: »Electroporation as an Efficacy Potentiator for Antibiotics With Different Target Sites«.



ORIGINAL RESEARCH  
published: 18 October 2021  
doi: 10.3389/fmicb.2021.722232



# Electroporation as an Efficacy Potentiator for Antibiotics With Different Target Sites

Zana Lovšin<sup>1</sup>, Anja Klančnik<sup>2</sup> and Tadej Kotnik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, <sup>2</sup> Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Aleksandra P. Djukić-Vuković,  
University of Belgrade, Serbia

### Reviewed by:

Allan L. Garner,  
Purdue University, United States

Guying Li,  
Guangdong University of Technology,  
China

### \*Correspondence:

Tadej Kotnik  
tadej.kotnik@fe.uni-lj.si

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Physiology and Metabolism,  
a section of the journal  
*Frontiers in Microbiology*

Received: 08 June 2021

Accepted: 29 September 2021

Published: 18 October 2021

### Citation:

Lovšin Ž, Klančnik A and Kotnik T  
(2021) Electroporation as an Efficacy  
Potentiator for Antibiotics With  
Different Target Sites.  
*Front. Microbiol.* 12:722232.  
doi: 10.3389/fmicb.2021.722232

**Keywords:** electroporation, antibiotics, mode of action, combined antibacterial treatments, wastewater treatment, treatment time

## INTRODUCTION

Antibiotic resistance is a global health threat associated with increased morbidity, mortality, hospitalization, and healthcare costs (Laxminarayan et al., 2013; Prieri et al., 2017; Klein et al., 2019). There is thus high motivation for development of novel approaches combining multiple antibacterial strategies that have different modes of action (Alexopoulos et al., 2019; Berdejo et al., 2019; Douafer et al., 2019; Juma et al., 2020). Among the promising complementary techniques for such approaches is electroporation, in which exposure of bacteria to short electric pulses of sufficient strength permeabilizes their membranes, thereby facilitating the uptake of diverse compounds, including antibiotics (Garner, 2019). Electroporation is highly optimizable through adjustment of pulse amplitude and duration, reproducible, and effective across a broad range of microorganisms [see Table 1 in Kotnik et al. (2015)]. Moreover, due to the physical nature of the main underlying mechanism – formation of aqueous pores in the membranes (Kotnik et al., 2019) – bacteria cannot develop resistance against it.

Electroporation alone can also cause bacterial death, but the levels of inactivation typically achieved are insufficient for general stand-alone use, providing motivation for development of synergistic treatments (Martin-Belloso and Sobrino-López, 2011; Berdejo et al., 2019). For food and beverage preservation, the combination of electroporation with antibacterials has been shown to decrease required pulse amplitudes and increase achievable inactivation rates (Berdejo et al., 2019). However, the range of antibacterials permissible for such applications is in practice limited to substances that either occur also naturally in food (e.g., acetic acid, citric acid, lactic acid, cinnamaldehyde, and linalool) or are registered as food additives (e.g., nisin, triethyl citrate).

For any application outside clinical and veterinary medicine, addition of antibiotics is generally problematic due to the involved health risks and/or the resulting environmental burden. However, wastewaters from hospitals and livestock farms are already inherently contaminated with clinical and veterinary antibiotics, respectively (Diwan et al., 2013; Kim et al., 2020), as well as with a broad range of bacteria including strains resistant to different antibiotics (Hocquet et al., 2016). As a result, downstream wastewater treatment plants where all these antibiotics and bacteria accumulate become hotbeds for cross-acquisition of bacterial antibiotic resistance and for release of resistance genes into the environment, where they can further contribute to the spread of resistance (Rizzo et al., 2013). The ensuing problem is further aggravated by hospitals' use and subsequent release into wastewater of novel and last-resort antibiotics, for which it is of paramount importance to retain the absence of bacterial resistance.

These problems are increasingly recognized as being critical both for human health and for the environment, and thus approaches to reduce the concentration of viable bacteria, antibiotics, and/or antibiotic resistance genes – preferably all three – in wastewaters are now being proposed and tested. For on-site treatment of wastewaters prior to their release into the

communal sewage, various designs have been proposed based on ozonation, ultraviolet light, and/or microalgal biodegradation (Paulus et al., 2019; Leng et al., 2020).

With wastewaters already containing various bacteria and antibiotics, methods that render the bacterial envelope permeable, thus facilitating the permeation of antibiotics into the bacteria and potentiating their efficacy, emerge as straightforward candidates for the first "line of attack." Once the bacterial load is sufficiently reduced, subsequent treatment can focus on degradation/removal of the antibiotics and the bacterial resistance genes. As permeabilization based on additives (e.g., detergents, enzymes, and microbeads) would cause additional pollution of the treated wastewater, the acceptable options are limited to green techniques, such as ultrasonication, freeze-thawing, and electroporation. Among these, electroporation is most widely recognized and used due to its general effectiveness, efficiency, and applicability to a broad range of microorganisms (Aune and Achmann, 2010; Kotnik et al., 2015; Eleršek et al., 2020). Furthermore, in contrast to the mainstream water treatment method of chlorination, which in wastewaters can create genotoxic adsorbable organic chlorides (Emmanuel et al., 2004), delivery of electric pulses does not increase wastewater genotoxicity even at highest amplitudes and durations used in practice for electroporation (Gusbeth et al., 2009).

To date, the majority of studies that have combined electroporation and antibacterials [see Table 2 in Garner (2019)] have focused on substances permissible in food and beverage processing. Still, five recent studies have quantified the potentiation of inactivation rates for combination of electroporation and clinical antibiotics (Korem et al., 2018; Novickij et al., 2018a; Vadlamani et al., 2018, 2020; Rubin et al., 2019), with their exposure parameters and results summarized in Table 1. Two further studies (Kuyukina et al., 2020; Martens et al., 2020) used the disk diffusion test to study electroporation-induced increase in susceptibility of *Rhodococcus ruber* to five and *Escherichia coli* to four different antibiotics, at increasing concentrations, and confirmed that such susceptibility increases are generally achievable.

As summarized in Table 1, the studies to date have shown that electroporation generally potentiates the efficacy of antibiotics, and that potentiation is achievable whether the antibiotic targets the synthesis of nucleic acids (ciprofloxacin, rifampicin), proteins (doxycycline, erythromycin, gentamicin, mupirocin, streptomycin, and tobramycin), or the cell wall (oxacillin, penicillin G, and vancomycin). Still, a systematic evaluation of the possible dependence of this potentiation on the antibiotic's mode of action is lacking, yet needed for a broader understanding and recognition of electroporation as an effective potentiator of antibiotics, and for its implementation in practice. Moreover, for cross-comparison of potentiation rates achievable for different antibiotics, the most informative approach is to proceed for each investigated antibiotic from its minimum inhibitory concentration (MIC), which has to date only been used in one study to investigate a single antibiotic (Korem et al., 2018).

Also, where stated in these previous studies, the post-pulse incubation times before diluting out of the antibiotics

**TABLE 1** | Summary of the five reports on combined antibacterial use of clinical antibiotics and electroporation.

Study	Bacteria	Antibiotic		Pulse parameters				Maximum effect (IR = inactivation rate; VR = viability rate)
		Type	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pulse duration ( $\mu\text{s}$ )	Number of pulses	Pulse amplitude (kV/cm)	Repetition frequency (Hz)	
Novickij et al., 2018a	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Ciprofloxacin	1, 10, 100, and 1,000	100	8	5, 10, 15, 20	1,000	<25% VR @ 20 kV/cm, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		Doxycycline	1, 10, 100, and 1,000					<3% VR @ 20 kV/cm, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		Gentamicin	1, 10, 100, and 1,000					<1% VR @ 15 kV/cm, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		Sulfamethoxazole	1, 10, 100, and 1,000					<5% VR @ 20 kV/cm, $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$
		Vancomycin	1, 10, 100, and 1,000					<16% VR @ 20 kV/cm, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Rubin et al., 2019	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mix of penicillin G (500–5,000 U/mL), streptomycin (0.5–5 mg/mL), nystatin (antimycotic, 62.5–625 U/mL)		60	200	$\leq 3.1$	2.8	Same IR @ ~30–45% lower pulse amplitude
Korem et al., 2018 Vadiamani et al., 2018	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacillin	0.5x, 1x, 2 $\times$ MIC (MIC = 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	100	~50 pulses 2.0 kV and ~60 pulses 1.5 kV		1	Same IR @ ~8–13% lower pulse amplitude
		Tobramycin	0.2, 2, and 20	0.3	1,000 pulses 20 kV/cm, 445 pulses 30 kV/cm, or 250 pulses 40 kV/cm		1	No detectable VR @ $\geq 0.5 \times$ MIC
		<i>Escherichia coli</i>						$>5.5 \log_{10}$ IR @ 40 kV/cm, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Rifampicin	0.2, 2, 20				$>4.2 \log_{10}$ IR @ 30 kV/cm, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		<i>Escherichia coli</i>						$>5.2 \log_{10}$ IR @ 30 kV/cm, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Vadiamani et al., 2020	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Mupirocin	2, 20	0.3	500 pulses 20 kV/cm or 222 pulses 30 kV/cm		1	$>8.5 \log_{10}$ IR @ 30 kV/cm, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		<i>Escherichia coli</i>						$\leq 6.5 \log_{10}$ IR
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						$\leq 4.5 \log_{10}$ IR
		<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Rifampicin	2, 20				$\leq 1.3 \log_{10}$ IR
		<i>Escherichia coli</i>						$\leq 6.3 \log_{10}$ IR
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						$\leq 6.4 \log_{10}$ IR
		<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Erythromycin	2, 20				$\leq 2.1 \log_{10}$ IR
		<i>Escherichia coli</i>						$\leq 4.4 \log_{10}$ IR
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						$\leq 1.0 \log_{10}$ IR
		<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Vancomycin	2, 20				$\leq 5.3 \log_{10}$ IR
		<i>Escherichia coli</i>						$\leq 4.5 \log_{10}$ IR
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						$\leq 1.4 \log_{10}$ IR

have been as long as 24 h (Novickij et al., 2018a; Kuyukina et al., 2020; Martens et al., 2020). Implementation of such a long incubation for on-site hospital wastewater treatment would require a reservoir in which the undiluted antibiotic concentration would be retained until release into the communal sewage (and thus dilution), and the required reservoir volume would likely be prohibitive. Lastly, in these previous studies, bacteria were subjected to at least 8 and up to 1,000 consecutive pulses per treatment, which maximized the effect, but at the cost of adding to the list of parameters (bacterial strain, antibiotic type, antibiotic concentration, pulse duration, pulse amplitude, and post-treatment incubation time) two more – the number of pulses and their repetition frequency.

Here, we compared the *E. coli* inactivation potentiation by electroporation for three antibiotics with different modes of action: ampicillin (inhibits cell wall synthesis), ciprofloxacin (inhibits DNA replication), and tetracycline (inhibits protein synthesis). The inactivation rates were investigated at antibiotic concentrations from the MIC to 30-fold the MIC, exposure to a single 1-ms electric pulse with amplitudes from 5 to 20 kV/cm, and a post-pulse pre-dilution incubation from  $\lesssim 1$  min to 24 h.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strain and Growth Conditions

To exclude the effect of resistance and virulence genes, the non-resistant and non-pathogenic *E. coli* K12 ER1821 strain was used (New England Biolabs, Ipswich, MA, United States), and was propagated according to the protocol of the supplier. The cells were cultured in lysogeny broth rich medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) at 37°C, with agitation. The growth curve was measured from a starting culture with optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.01, and the middle exponential phase was determined at 3.5 h of incubation.

### Antibiotics and Minimum Inhibitory Concentration Determination

Three antibiotics with different modes of action were used in this study: (i) ampicillin (#A9518; Sigma-Aldrich), which inhibits cell wall synthesis by binding to bacterial penicillin-binding protein transpeptidases, thus preventing them from catalyzing cross-linking of peptidoglycan chains (Wright, 1999); (ii) ciprofloxacin (#17850; Sigma-Aldrich), which inhibits DNA replication by binding to and thus blocking bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV (Madurga et al., 2008); and (iii) tetracycline (#T3383; Sigma-Aldrich), which inhibits protein synthesis by preventing the attachment of aminoacyl-tRNA to the A-site of the bacterial 30S ribosomal subunit (Chopra and Roberts, 2001).

To allow for cross-comparisons of the potentiation achievable for each of these antibiotics, the minimum inhibitory concentration (MIC) for each antibiotic was determined against the *E. coli* strain used, as the lowest concentration of the antibiotic that inhibited visible growth of the *E. coli* during the incubation. This is to be distinguished from the

minimum bactericidal concentration, MBC, which is higher and is defined as the lowest concentration of an antibiotic that kills at least 99.9% of the bacteria. The standard protocol of agar dilution and overnight incubation was followed for MIC determination (Andrews, 2001), with the MIC values so determined given in section "Antibiotics Minimum Inhibitory Concentrations." Experiments were then carried out at the antibiotic concentrations corresponding to MIC,  $3 \times$  MIC,  $10 \times$  MIC, and  $30 \times$  MIC, with the multiples of MIC used to compensate for the shorter post-pulse pre-dilution incubation times used in these experiments compared to the overnight incubation used for MIC determination.

### Sample Preparation

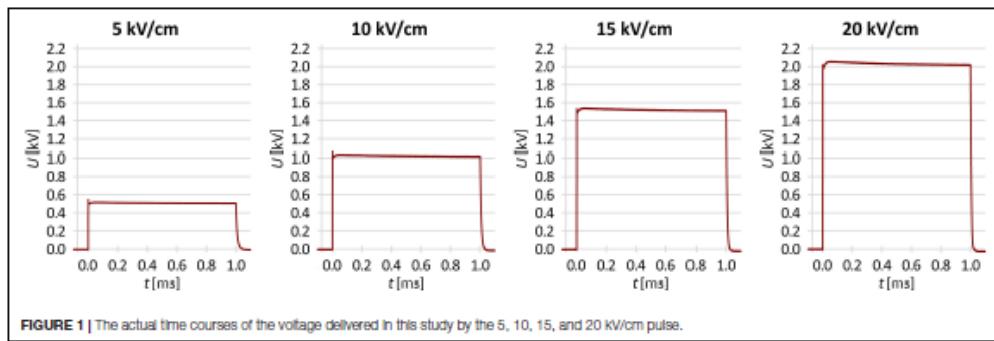
Oversight *E. coli* cultures were initiated by inoculation of one colony from lysogeny broth agar plate to 50 mL lysogeny broth, with overnight incubation at 37°C, with agitation. The following morning OD<sub>600</sub> was measured, and fresh 250 mL lysogeny broth was inoculated for the starting OD<sub>600</sub> of 0.01. The cultures were grown to the middle exponential growth phase, which occurred at 3.5 h at 37°C, with agitation. The cells were then centrifuged, washed with 250 mM sucrose, centrifuged again, and resuspended in 16 mL 250 mM sucrose.

### Treatment: Antibiotic Concentrations, Electric Pulse Amplitudes, and Post-pulse Pre-dilution Incubation Times

For each antibiotic, the concentrations used were 0 (no antibiotic), MIC,  $3 \times$  MIC,  $10 \times$  MIC, and  $30 \times$  MIC. For the electric pulse, the amplitudes used were 0 (no pulse delivery), 5, 10, 15, and 20 kV/cm. For post-pulse pre-dilution incubation at room temperature with the same antibiotic at the same concentration as in the treatment, the incubation times used were  $\lesssim 1$  min (dilution right after pulse delivery), 60 min, 160 min, and 24 h.

For each combination of parameters, the experiments were performed three times on different days, with altered order in which the parameters were varied for each of three repetitions of the experiment. The treatment with no antibiotic and no pulse delivery was considered as the control.

A 3-mL volume of prepared washed culture was added to 3 mL of 250 mM sucrose (for control and electroporation-only experiments), or to 3 mL of 250 mM sucrose supplemented with an antibiotic at the final concentration required (i.e., MIC or multiples thereof) as stated above. Electroporation was performed using the HVP-VG square wave pulse generator (IGEA, Carpi, Italy). The samples (140  $\mu$ L) were placed between two parallel stainless-steel electrodes with a 1-mm gap, and a single 1-ms rectangular electric pulse was delivered. The voltages applied were 500, 1,000, 1,500, and 2,000 V, for electric pulse amplitude (i.e., voltage-to-distance ratio) of 5, 10, 15, and 20 kV/cm, respectively, with the actual time courses of the voltage for each pulse amplitude as measured with LeCroy HDO4104A oscilloscope and HVD3206A voltage probe (Teledyne Technologies, Thousand Oaks, CA, United States) shown in Figure 1. Then, a 100- $\mu$ L volume



was taken from each sample, and mixed with 100  $\mu\text{L}$  of either lysogeny broth (for control and electroporation-only experiments) or lysogeny broth supplemented with the antibiotic at the final concentration required for the post-pulse pre-dilution incubation.

### Determination of Inactivation Rate

After the treatment and the post-treatment incubation, the *E. coli* samples were serially diluted in 0.9% NaCl, and for each dilution, three drops of 10  $\mu\text{L}$  were plated on a lysogeny broth agar plate. After the drops dried, the plates were incubated overnight at 37°C. The *E. coli* counts were recorded for each dilution (colony counts from 3 to 30), and the colony forming units (CFU)/mL were calculated from the mean number of colonies (mean of the three drops). The *E. coli* inactivation rates were calculated as  $-\log_{10}(N/N_0)$ , where  $N$  is the *E. coli* CFU/mL of the sample, and  $N_0$  is the *E. coli* CFU/mL of the control ( $\log_{10}$  will henceforth be referred to as log).

### Statistical Analysis

The experiments were repeated three times on different days for each antibiotic, and the treatment data were normalized to the control (i.e., sample with no antibiotic and no pulse delivery) and expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The data were post-processed in R Commander 2.6 (developed by John Fox at McMaster University, Hamilton, Canada, and available under the GNU General Public License). To compare the effects of the three antibiotics, one-way analysis of variance was used (ANOVA;  $p < 0.05$ ) for each combination of electric pulse amplitude, antibiotic concentration, and post-pulse pre-dilution incubation time. Tukey's HSD multiple comparison test for evaluation of the difference was used when ANOVA indicated a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). In Figure 2, asterisks indicate data points where the effect with one antibiotic was statistically significantly different from each of the other two (e.g., a data point for ampicillin was assigned an asterisk if it was significantly different from both ciprofloxacin and tetracycline, and similarly with data points for the other two antibiotics).

## RESULTS

### Antibiotics Minimum Inhibitory Concentrations

The minimum inhibitory concentrations (MICs) against *E. coli* were determined initially, using the standard protocol of agar dilution and overnight incubation of the *E. coli* with each antibiotic. The MICs were 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ampicillin, 0.025  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for ciprofloxacin, and 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for tetracycline. As to compensate for the much shorter incubation times used in most of our subsequent experiments combining antibiotics with electroporation, we performed these at MIC as well as at 3  $\times$  MIC, 10  $\times$  MIC, and 30  $\times$  MIC, with corresponding concentrations in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  given in Table 2.

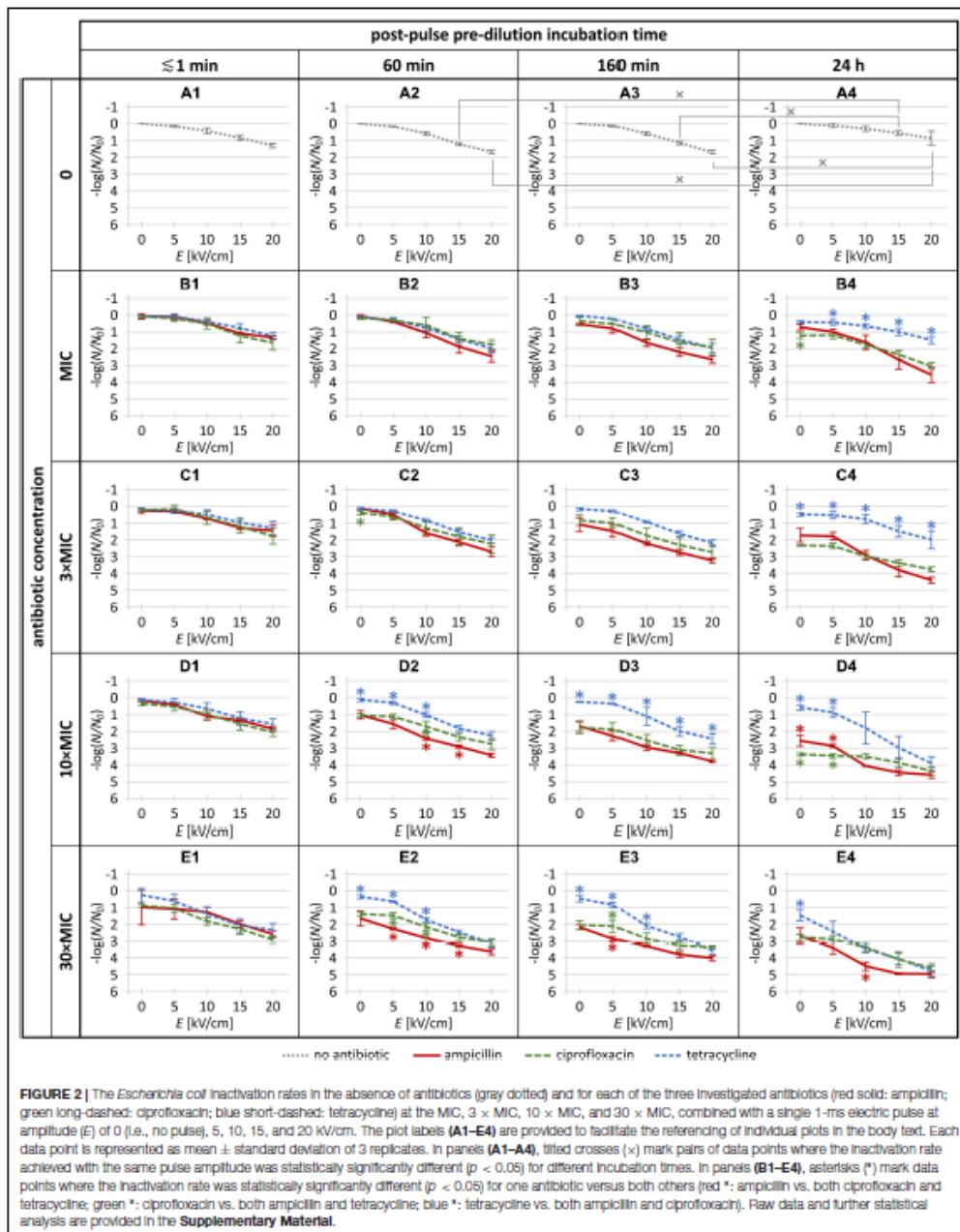
Of note, even the highest antibiotic concentrations used here (i.e., 30  $\times$  MIC, as determined in overnight *E. coli* cultures) were not bactericidal even after 24 h of incubation with each of the antibiotics. This was because while the growth of *E. coli* cells was inhibited throughout the incubation, after the transfer to rich growth medium they recovered (e.g., see Figure 2E4).

### Inactivation With Antibiotics and Electroporation

The *E. coli* inactivation rates obtained in the absence of antibiotics and for each of the three antibiotics at the MIC, 3  $\times$  MIC, 10  $\times$  MIC, and 30  $\times$  MIC, combined with a single 1-ms electric pulse at amplitude of 0 (no pulse), 5, 10, 15, and 20 kV/cm, are presented in Figure 2, with the raw experimental data and further statistical analysis provided in the Supplementary Material.

### Electroporation Treatment Alone

When the *E. coli* cells were treated with electroporation alone (Figures 2A1–A4), 5 kV/cm amplitude had only a minor and statistically non-significant effect on inactivation rate ( $\lesssim 0.2 \log$ ) regardless of post-pulse incubation time, while as the amplitude was increased (to 10, 15, and 20 kV/cm), the inactivation rate gradually increased. This was expected, as empirically for most bacteria, a single 1-ms electric pulse with an amplitude of  $\sim 5 \text{ kV}/\text{cm}$  causes only mild and reversible electroporation, while amplitudes of 10, 15, and 20 kV/cm are roughly at the lower



**TABLE 2 |** Antibiotics and concentrations used in the experiment.

Antibiotic	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	MIC	3 $\times$ MIC	10 $\times$ MIC	30 $\times$ MIC
Ampicillin	30	90	300	900
Ciprofloxacin	0.025	0.075	0.25	0.75
Tetracycline	2.0	6.0	20	60

MIC, minimal inhibitory concentration.

end, middle, and higher end, respectively, of the range of non-thermal irreversible electroporation [e.g., see Figure 1A in Kotnik et al. (2015)]. More precisely, for each of the four post-pulse incubation times, the maximum inactivation rate was obtained at the maximum amplitude used, 20 kV/cm, reaching  $\sim$ 1.3 log for the  $\lesssim$ 1-min post-pulse incubation,  $\sim$ 1.7 log for 60- and 160-min post-pulse incubations, and  $\sim$ 0.9 log for 24-h post-pulse incubation. This relative recovery for the longest post-pulse incubation indicates that in the absence of antibiotics, the *E. coli* were gradually starting to grow and proliferate again.

We note here that in comparison to these bacterial inactivation rates obtained by electroporation alone, many studies report much higher rates, for two reasons. First, most studies have aimed for the maximum achievable effect, and have thus applied tens, hundreds, or even up to 1,000 consecutive pulses per treatment (see Table 1), while our aim was to investigate whether efficacy potentiation by electroporation for an antibiotic depends on the latter's mode of action; thus we used a single pulse to keep the analysis of the investigated dependence straightforward. Second, again to maximize the inactivation rates, some studies have applied pulse amplitudes of 30 or even 40 kV/cm, while here we used amplitudes up to 20 kV/cm, to assure that the contribution of electroporation was not entangled with those of electric arcing (with accompanying mechanical shockwaves and ultraviolet light) and thermal damage that can occur at higher pulse amplitudes.

#### Electroporation as an Efficacy Potentiator for Antibiotics

As stated previously, our main aim was to investigate whether efficacy potentiation by electroporation for an antibiotic depends on its mode of action. However, as outlined in the penultimate paragraph of the Introduction, from the perspective of limitations in practical applications, a post-pulse pre-dilution incubation time as long as 24 h is prohibitive from the aspect of the required reservoir volume, so we first tested whether this incubation time can perhaps be eliminated altogether, or at least shortened considerably. Thus, we initially considered whether reasonable potentiation can be achieved even with dilution performed right after the treatment (after  $\lesssim$ 1 min incubation), and then we focused on the roles of (longer) post-pulse pre-dilution incubation time and of antibiotic concentrations.

#### Potentiation with dilution right after pulse delivery

With the antibiotic dilution right after the electroporation pulse treatment (i.e.,  $\lesssim$ 1 min incubation), no significant difference

was seen between ampicillin, tetracycline, and ciprofloxacin (Figures 2B1–E1). With the lowest pulse amplitude (5 kV/cm), the increase in *E. coli* inactivation rate was small, particularly for the antibiotic concentrations up to  $10 \times$  MIC, and although at  $30 \times$  MIC (Figure 2E1) ampicillin and ciprofloxacin appeared more effective than tetracycline, the differences did not reach statistical significance. These data indicate that irrespective of their mode of action, efficacy of antibiotics is not significantly potentiated by electroporation when the antibiotic is diluted out within a minute or less after pulse delivery.

#### Potentiation with dilution after post-pulse incubation of 60 min, 160 min, and 24 h

When post-pulse pre-dilution incubation time was increased to 60 min, 160 min, and 24 h, relative to the  $\lesssim$ 1 min incubation the potentiation also increased for each antibiotic. Specifically, three observed parametric dependences can be inferred.

First, the antibiotic potentiation consistently increased with the increase of pulse amplitude (i.e., in each of the panels of Figure 2, each of the curves has a downward slope).

Second, the antibiotic potentiation generally also increased with the increase of antibiotic concentrations at each of these three post-pulse incubation times (Figures 2B2  $\searrow$  C2  $\searrow$  D2  $\searrow$  E2; B3  $\searrow$  C3  $\searrow$  D3  $\searrow$  E3; B4  $\searrow$  C4  $\searrow$  D4  $\searrow$  E4). A single exception here was for ciprofloxacin at 24-h post-pulse incubation for the 5 kV/cm pulse, with indication of lower *E. coli* inactivation for  $30 \times$  MIC compared to  $10 \times$  MIC, although this did not reach statistical significance (i.e., in Figure 2, the second data point of the green curve is higher in E4 than in D4).

Third, the antibiotic potentiation generally also increased with the increase of the post-pulse incubation time at each of the four antibiotic concentrations (Figures 2B2  $\searrow$  B3  $\searrow$  B4; C2  $\searrow$  C3  $\searrow$  C4; D2  $\searrow$  D3  $\searrow$  D4; E2  $\searrow$  E3  $\searrow$  E4). Here the exception was tetracycline at MIC and  $3 \times$  MIC, with indications of lower *E. coli* inactivation for 24-h than for 60- or 160-min post-pulse incubations; however, again, none of these reached statistical significance (i.e., in Figure 2, the blue curve is partly higher in B4 vs. B2 and B3, and partly higher in C4 vs. C2 and C3).

As seen in Figure 2, in many data points the differences did not reach statistical significance, although we note, as elaborated in section "Statistical Analysis," that we only marked by an asterisk those data points for an antibiotic for which its *E. coli* inactivation rate differed statistically significantly from both other antibiotics. Despite this, there was a relatively clear general trend of superior inactivation rates for ampicillin compared to ciprofloxacin and tetracycline (i.e., in Figure 2, the red curves are rather consistently below the green and blue ones), particularly for the intermediate post-pulse incubation times of 60 and 160 min. On the opposite end, potentiation of *E. coli* inactivation rates was generally the weakest with tetracycline, although at the highest concentrations combined with the highest pulse amplitude this was less pronounced (Figures 2D4, E2–E4).

In quantitative terms, all the data presented in Figure 2 for the combination of an antibiotic, electric pulse, and post-pulse incubation (60 min, 160 min, or 24 h), can be summarized into two aspects.

First, for all three incubation times, i.e., considering in Figures 2B2–E4 on all the curves the 48 data points for pulse amplitudes from 5 to 20 kV/cm, for ampicillin 42 of these data points were superior to both ciprofloxacin and tetracycline, of which 7 reached statistical significance with respect to both.

Second, if we restrict this analysis to only the 60- and 160-min post-pulse incubations, of the 32 data points that thus remain on the relevant curves (Figures 2B2–E3), for ampicillin 31 of these data points were superior to both ciprofloxacin and tetracycline, of which 6 reached statistical significance with respect to both. The only exception here was for  $3 \times$  MIC with 5 kV/cm pulse and 60 min post-pulse incubation (Figure 2C2, second data point), where ampicillin appeared to be inferior to ciprofloxacin but still superior to tetracycline, although these apparent differences did not reach statistical significance.

## DISCUSSION

Considering the different target sites of the three antibiotics, the rather consistently superior efficacy potentiation for ampicillin can be explained by its easier access to its particular target: the bacterial cell wall. Namely, ampicillin targets the sites of peptidoglycan chains cross-linkage by inhibiting the transpeptidase enzyme that catalyzes this cross-linkage, which destabilizes the local structure and the cell wall as a whole. Thus, for ampicillin to exhibit its antibacterial activity, permeation-enabling disruption of the inner (cytoplasmic) bacterial membrane is not required, in contrast to both ciprofloxacin and tetracycline that have intracellular targets (the sites of DNA replication and protein synthesis, respectively), for access to which they must permeate through all the layers of the bacterial envelope.

The data for dilution right after pulse delivery (i.e.,  $\lesssim 1$  min incubation) imply, however, that even for ampicillin, substantial efficacy potentiation requires time, with *E. coli* inactivation rates improved by an order of magnitude when the dilution of the antibiotic was delayed by 60 or 160 min, while the 24-h delay resulted in more sporadic further improvements and mostly at the highest pulse amplitudes. This suggests that shortening the post-pulse incubation time with the antibiotic from 24 h (as used in many previous studies) to one or several hours is feasible, with proportionally reduced reservoir volume required in applications for wastewater treatment.

The small and sporadic further improvements in inactivation rates with the 24-h incubation are most likely due to the physiological uptake of the antibiotics, which would occur even without electroporation by gradual permeation through the intact bacterial envelope. This is reflected in the small but rather consistent improvement of the inactivation rates for all three antibiotics at 0 kV/cm (i.e., without electric pulse delivery) at 24-h incubation compared to 60- or 160-min incubation, which is detectable also for MIC and  $3 \times$  MIC, but is more evident for  $10 \times$  MIC and even more so for  $30 \times$  MIC. The role of physiological permeation on longer time scales is also consistent with the empirical fact that in medical and

veterinary therapies with an antibiotic alone, its concentration must be maintained at a suprainingibitory level for days, and for some infections even for weeks to achieve an effective outcome (Wormser et al., 2004).

Regarding the generally weakest potentiation for tetracycline, we note that of the three antibiotics used in our study, tetracycline has the highest molecular weight (444 g/mol, vs. 331 and 349 g/mol for ciprofloxacin and ampicillin, respectively) and therefore likely requires stronger and/or more extensive electroporation for similarly potentiated permeation into bacteria. However, we stop short of postulating this as the main reason for the relatively inferior *E. coli* inactivation rates observed here for tetracycline compared to both ampicillin and ciprofloxacin.

Our finding that for a wall-targeting antibiotic, the efficacy against *E. coli* can be potentiated by electroporation to a greater extent – and/or more readily – compared to two antibiotics that target intracellular sites, is also in empirical agreement with findings from a recent study of Kuyukina et al. (2020). Although their study did not focus on the role of the antibiotic target site, for post-pulse incubation times up to 240 min they found generally superior antibiotic potentiation by electroporation for benzylpenicillin and cefazolin (which also target cell wall synthesis) compared to gentamicin, kanamycin, and neomycin (which target protein synthesis). This is particularly relevant for the more general validity of the thesis that electroporation provides superior potentiation for antibiotics that target the cell wall compared to those with intracellular targets, as *E. coli* (used in the present study) is Gram-negative, while *Rhodococcus ruber* (used by Kuyukina and colleagues) is Gram-positive, and thus the structure of their envelope differs significantly.

However, there are still some obvious and possibly other unforeseen obstacles for the application of this finding in practice. Adding antibiotics is universally problematic in terms of the resulting environmental burden, and in many applications also from the resulting risks to human health. Conversely, the applications utilizing the inherently present antibiotics, such as treatment of wastewaters from hospitals and livestock farms, are dependent on the persistently fluctuating compositions and concentrations of antibiotics, which are also generally well below their MICs (Martinez, 2009; Diwan et al., 2013; Cheng et al., 2020). Thus, although the results presented here show that at the MIC and multiples thereof, a post-pulse incubation time of 1 or 2 h may be sufficient for substantial ( $\sim 3\text{--}4$  log) inactivation rates, this may not be true for the antibiotic concentrations that occur inherently in such wastewaters.

For use in clinical or veterinary applications, and in general for combining antibiotics with electroporation against bacterial infections of eukaryotic organisms, a major and perhaps largely unsurmountable obstacle lies in the fact that most eukaryotic cells are an order of magnitude larger than bacteria. Since the transmembrane voltage induced by exposing a cell to an electric pulse of a fixed amplitude (electric field strength, that can be approximated by the voltage-to-distance ratio) is proportional to the cell size (Pauly and Schwan, 1959; Kotnik et al., 1998; Kotnik and Miklavčič, 2000), a significantly higher transmembrane

voltage is induced by the same pulse on eukaryotic cells than on bacteria. As the intensity of electroporation is strongly correlated to the induced transmembrane voltage (Kotnik et al., 2010), the application of electroporating pulses to a eukaryotic tissue infected with bacteria, or in general to a mix of eukaryotic cells and bacteria, will typically result in extensive damage to the eukaryotic tissue (through irreversible electroporation) before achieving electroporation of bacteria.

For use in food industry, the range of permissible antibacterials is limited to those that either occur naturally in foods or are approved as food additives, but if superior potentiation by electroporation for substances targeting the bacterial cell wall holds generally true for antibacterials, applications for food and beverage preservation can (re)focus on those among the permissible substances that target the wall. Currently, one such substance widely recognized as targeting the wall is nisin (Malanovic and Lohner, 2016; Modugno et al., 2018), and there is at least one report of its potentiation by electroporation, achieving moderate ( $\sim 2\text{--}3$  log) inactivation rates against *E. coli* (Novickij et al., 2018b). However, at least one study found no potentiating effect of electroporation for nisin against either *E. coli* or *Salmonella typhimurium* (Saldanha et al., 2012), while the efficacy of nisin alone is largely limited to Gram-positive bacteria (Asaduzzaman and Sonomoto, 2009) and can only be extended to Gram-negative bacteria by artificially modifying the nisin molecule (Field et al., 2015; Zhou et al., 2016) or by binding nanocomposites to it (Vukomanović et al., 2017). There is thus ample motivation for systematic search and identification of antibacterials that are permissible in foods and target the cell wall of Gram-negative as well as Gram-positive bacteria, as this class of compounds should provide optimal candidates for broad and strong potentiation by electroporation applicable also in food and beverage preservation.

## CONCLUSION

For the understanding of the dependence of the antibiotic efficacy potentiation by electroporation on the antibiotic's target site, our results presented above suggest that for antibiotics targeting the bacterial cell wall, this potentiation can be higher than for antibiotics with intracellular targets. For broader testing and a deeper understanding of this thesis, further studies are needed, performed with a broader range of antibiotics and on a broader range of bacteria, including comparisons for antibiotic-sensitive vs. antibiotic-resistant strains, and for bacteria in different growth stages. Identification of substances permissible

in foods and targeting the cell wall of both Gram negative and Gram positive bacteria might provide candidate antibacterials for broad and strong potentiation by electroporation applicable also in food industry.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ŽL set up the experimental plan, conducted the experiments, processed, analyzed, interpreted the results, and wrote part of the manuscript. TK set up the concept of the experiments, supervised the work, interpreted the results, and wrote part of the manuscript. AK wrote part of the manuscript. All authors have reviewed and approved the final manuscript.

## FUNDING

The authors acknowledge the financial support for this research from the Slovenian Research Agency (Javna Agencija za Raziskovalno Dejavnost – ARRS) within the Research Programme "Electroporation-Based Technologies and Treatments" (Grant No. P-2-0249) and the Junior Researcher funding for ŽL (Grant No. MR-53516). The experiments were performed within the Infrastructure Programme "Network of research infrastructure centers at the University of Ljubljana (MRIC UL)" (Grant No. IP-0510).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Saša Haberl Meglič for practical advice, and Duša Hodžič and Lea Vukanović for technical assistance.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.722232/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Alexopoulos, A., Kimbaris, A. C., Plessas, S., Mantzourani, I., Voidarou, C., Pagonepoulou, O., et al. (2019). Combined action of piperitenone epoxide and antibiotics against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 10:2607. doi: 10.3389/fmicb.2019.02607
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl\_1.S
- Asaduzzaman, S. M., and Sonomoto, K. (2009). Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 475–487. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.01.003
- Aune, T. E. V., and Achmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1301–1313. doi: 10.1007/s00253-009-2349-1
- Berdejo, D., Pagán, E., García-Gonzalo, D., and Pagán, R. (2019). Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving

- food safety. *Curr. Opin. Food Sci.* 30, 14–20. doi: 10.1016/j.cofs.2018.08.004
- Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Liu, Y., et al. (2020). A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: water pollution problems and control approaches. *J. Hazard. Mater.* 387:121682. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121682
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Diwan, V., Stålsby Lundborg, C., and Tamhankar, A. J. (2013). Seasonal and temporal variation in release of antibiotics in hospital wastewater: estimation using continuous and grab sampling. *PLoS One* 8:e68715. doi: 10.1371/journal.pone.0068715
- Douafer, H., Andrieu, V., Phanstiel, O., and Brunel, J. M. (2019). Antibiotic adjuvants make antibiotics great again! *J. Med. Chem.* 62, 8665–8681. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01781
- Eleršek, T., Flisar, K., Likozar, B., Klemenčič, M., Golob, J., Kotnik, T., et al. (2020). Electroporation as a solvent-free green technique for non-destructive extraction of proteins and lipids from *Chlorella vulgaris*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:443. doi: 10.3389/fbioe.2020.00443
- Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J. M., Vermande, P., and Perrodon, Y. (2004). Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environ. Int.* 30, 891–900. doi: 10.1016/j.envint.2004.02.004
- Field, D., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2015). Bioengineering lantibiotics for therapeutic success. *Front. Microbiol.* 6:1363. doi: 10.3389/fmicb.2015.01363
- Friari, M., Kumar, K., and Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *J. Infect. Public Health* 10, 369–378. doi: 10.1016/j.jiph.2016.08.007
- Garner, A. L. (2019). Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7917–7929. doi: 10.1007/s00253-019-10067-y
- Gusbeth, C., Frey, W., Volkmann, H., Schwartz, T., and Bluhm, H. (2009). Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere* 75, 228–233. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.066
- Hocquet, D., Müller, A., and Bertrand, X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *J. Hosp. Infect.* 93, 395–402. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.010
- Juma, A., Lemoine, P., Simpson, A. B. J., Murray, J., O'Hagan, B. M. G., Naughton, P. J., et al. (2020). Microscopic investigation of the combined use of antibiotics and biosurfactants on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 11:1477. doi: 10.3389/fmicb.2020.01477
- Kim, J.-P., Jin, D. R., Lee, W., Chae, M., and Park, J. (2020). Occurrence and removal of veterinary antibiotics in livestock wastewater treatment plants, South Korea. *Processes* 8:720. doi: 10.3390/pr8060720
- Klein, E. Y., Tseng, K. K., Pant, S., and Laxminarayanan, R. (2019). Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the Drug Resistance Index. *BMJ Glob. Health* 4:e001315. doi: 10.1136/bmjgh-2018-001315
- Korem, M., Goldberg, N. S., Cahan, A., Cohen, M. J., Nissenbaum, I., and Moses, A. E. (2018). Clinically applicable irreversible electroporation for eradication of micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 67, 15–21. doi: 10.1111/lam.12996
- Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M., and Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33, 480–488. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002
- Kotnik, T., and Miklavčič, D. (2000). Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys. J.* 79, 670–679. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76325-9
- Kotnik, T., Miklavčič, D., and Slivník, T. (1998). Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields – a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45, 3–16. doi: 10.1016/S0302-4598(97)00093-7
- Kotnik, T., Pucišar, G., and Miklavčič, D. (2010). Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *J. Membr. Biol.* 236, 3–13. doi: 10.1007/s00232-010-9279-9
- Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M., and Miklavčič, D. (2019). Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annu. Rev. Biophys.* 48, 63–91. doi: 10.1146/annurev-biophys-052118-115451
- Kuyukina, M. S., Varushkina, A. M., and Ivshina, I. B. (2020). Effects of electroporation on antibiotic susceptibility and adhesive activity to n-hexadecane in *Rhodococcus ruber* IEGM 231. *Appl. Biochem. Microbiol.* 56, 729–735. doi: 10.1134/S0003683820060083
- Laxminarayanan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., et al. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13, 1057–1098. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9
- Leng, L., Wei, L., Xiong, Q., Xu, S., Li, W., Lv, S., et al. (2020). Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: a review. *Chemosphere* 238:124680. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124680
- Madurga, S., Sánchez-Céspedes, J., Belda, I., Vila, J., and Giralt, E. (2008). Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase: towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance. *ChemBioChem* 9, 2081–2086. doi: 10.1002/cbic.200800041
- Malanovic, N., and Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1858, 936–946. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.11.004
- Martens, S. L., Klein, S., Barnes, R. A., TrejoSanchez, P., Roth, C. C., and Ibe, B. L. (2020). 600-ns pulsed electric fields affect inactivation and antibiotic susceptibilities of *Escherichia coli* and *Lactobacillus acidophilus*. *AMB Express* 10:55. doi: 10.1186/s13568-020-00991-y
- Martin-Belloso, O., and Sobrino-López, A. (2011). Combination of pulsed electric fields with other preservation techniques. *Food Bioprocess Technol.* 4, 954–968. doi: 10.1007/s11947-011-0512-z
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157, 2893–2902. doi: 10.1016/j.envpol.2009.05.051
- Modugno, C., Loupiac, C., Bernard, A., Jossier, A., Neiers, F., Perrier-Cornet, J. M., et al. (2018). Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 47, 9–15. doi: 10.1016/j.ifset.2018.01.006
- Novickij, V., Švedenė, J., Palkevičius, A., Markovskaja, S., Lastauskiene, E., Zinkevičienė, A., et al. (2018a). Induction of different sensitization patterns of MRSA to antibiotics using electroporation. *Molecules* 23:1799. doi: 10.3390/molecules23071799
- Novickij, V., Zinkevičienė, A., Stanevičienė, R., Grulškienė, R., Serviūnė, E., Vepitaitė-Monstavičė, L., et al. (2018b). Inactivation of *Escherichia coli* using nanosecond electric fields and nisin nanoparticles: a kinetics study. *Front. Microbiol.* 9:3006. doi: 10.3389/fmicb.2018.03006
- Paulus, G. K., Hornstra, I. M., Alygizakis, N., Slobodnik, J., Thomaidis, N., and Medema, G. (2019). The impact of on-site hospital wastewater treatment on the downstream communal wastewater system in terms of antibiotics and antibiotic resistance genes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 635–644. doi: 10.1016/j.ijheh.2019.01.004
- Pauly, H., and Schwan, H. P. (1959). Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z. Naturforsch. B* 14b, 125–131.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
- Rubin, A. E., Usta, O. B., Schloss, R., Yarmush, M., and Golberg, A. (2019). Selective inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* with pulsed electric fields and antibiotics. *Adv. Wound Care* 8, 136–148. doi: 10.1089/wound.2018.0819
- Saldafia, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J., and Alvarez, I. (2012). Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Res. Int.* 45, 1080–1086. doi: 10.1016/j.foodres.2011.03.059
- Vadlamani, A., Detwiler, D. A., Dhanabal, A., and Garner, A. L. (2018). Synergistic bacterial inactivation by combining antibiotics with nanosecond electric pulses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 7589–7596. doi: 10.1007/s00253-018-9215-y

- Vadlamani, R. A., Dhanabal, A., Detwiler, D. A., Pal, R., McCarthy, J., Seleem, M. N., et al. (2020). Nanosecond electric pulses rapidly enhance the inactivation of Gram-negative bacteria using Gram-positive antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2217–2227. doi: 10.1007/s00253-020-10365-w
- Vukomanović, M., Žunić, V., Kunje, Š., Jančar, B., Jeverica, S., Podlipec, R., et al. (2017). Nano-engineering the antimicrobial spectrum of lanthanotocins: activity of nisin against Gram negative bacteria. *Sci. Rep.* 7:4324. doi: 10.1038/s41598-017-04670-0
- Wormser, G. P., Nadelman, R. B., Dattwyler, R. J., Dennis, D. T., Shapiro, E. D., Steere, A. C., et al. (2004). Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 31, S1–S14. doi: 10.1086/314053
- Wright, A. J. (1999). The penicillins. *Mayo Clin. Proc.* 74, 290–307. doi: 10.4065/74.3.290
- Zhou, L., van Heel, A. J., Montalban-Lopez, M., and Kuipers, O. P. (2016). Potentiating the activity of nisin against *Escherichia coli*. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:7. doi: 10.3389/fcell.2016.00007

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Lovšin, Klančnik and Kotnik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## PRILOGA H

Znanstvena objava z naslovom: »Antibiotic's target site affects the potentiation of *Lactiplantibacillus plantarum* inhibition and inactivation by electroporation«.



### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Santi M. Mandal,  
Indian Institute of Technology Kharagpur,  
India

REVIEWED BY  
Erman Fayad,  
Taif University, Saudi Arabia  
Aleksandra P. Djukic-Vukovic,  
University of Belgrade, Serbia

\*CORRESPONDENCE

Tadej Kotnik,  
✉ tadej.kotnik@fe.uni-lj.si

RECEIVED 01 November 2023  
ACCEPTED 12 March 2024  
PUBLISHED 22 March 2024

CITATION  
Lovšin Ž, Kotnik T and Klančnik A (2024) Antibiotic's target site affects the potentiation of *Lactiplantibacillus plantarum* inhibition and inactivation by electroporation. *Front. Microbiol.* 15:1331714. doi: 10.3389/fmicb.2024.1331714

COPYRIGHT  
© 2024 Lovšin, Kotnik and Klančnik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Antibiotic's target site affects the potentiation of *Lactiplantibacillus plantarum* inhibition and inactivation by electroporation

Žana Lovšin<sup>1</sup>, Tadej Kotnik<sup>1\*</sup> and Anja Klančnik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, <sup>2</sup>Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

**Introduction:** Antibiotic resistance represents a growing global threat, and thus the motivation to develop novel and combined methods of bacterial inactivation is increasing. Electroporation is a technique in which electric pulses of sufficient strength are applied to permeabilize cells, including bacteria. Combining antibacterials with electroporation is a promising strategy to potentiate their bactericidal and bacteriostatic effectiveness. This approach has already proved useful for increasing bacterial inactivation, yet most studies so far have mainly focused on the maximal achievable effects, and less on the underlying mechanisms. We recently demonstrated that in the Gram-negative (G-) bacterium *Escherichia coli*, electroporation potentiates antibacterials targeting the peptidoglycan wall more than those with intracellular targets. However, in Gram-positive (G+) bacteria, the wall is directly accessible from the outside, and thus the dependence of potentiation on the antibacterial's target may be rather different. Here, we compare the inactivation and growth inhibition of the G+ bacterium *Lactiplantibacillus plantarum* for two antibiotics with different modes of action: ampicillin (inhibits cell-wall synthesis) and tetracycline (inhibits intracellular protein synthesis).

**Methods:** We used antibiotic concentrations ranging from 0 to  $30 \times \text{MIC}$  (minimum inhibitory concentration that we predetermined for each antibiotic), a single 1-ms electric pulse with an amplitude from 0 to 20 kV/cm, and post-pulse pre-dilution incubation of 24 h or 1 h.

**Results:** Electroporation increased the inhibition and inactivation efficiency of both antibiotics, but this was more pronounced for tetracycline, with statistical significance mostly limited to 24-h incubation. In general, both inhibition and inactivation grew stronger with increasing antibiotic concentration and electric field amplitude.

**Discussion:** Our results indicate that electroporation potentiates inactivation of G+ bacteria to a larger extent for antibiotics that inhibit intracellular processes and require transport into the cytoplasm, and to a smaller extent for antibiotics that inhibit cell-wall synthesis. This is the inverse of the relation observed in G- bacteria, and can be explained by the difference in the envelope structure: in G- bacteria the outer membrane must be breached for wall-inhibiting antibiotics to access their target, whereas in G+ bacteria the wall is inherently accessible from the outside and permeabilization does not affect this access.

KEYWORDS

*Lactiplantibacillus plantarum*, electroporation, antibiotics, mode of action, combined antibacterial treatments, treatment time

## 1 Introduction

Motivation for the development of novel methods for bacterial inactivation is increasing in human and veterinary medicine as well as in food industry. In medicine, antibiotic-resistant bacteria pose a great threat to human health and represent a great economic cost; thus, new alternative efficient methods for their inactivation are needed. In food industry, optimization of sterilization or pasteurization could include safe and effective alternative approaches that are also more nutrient-preserving and energy/cost-efficient. One such approach is combining methods with different modes of action (physical or chemical) that result in higher bacterial inactivation rates (Berdejo et al., 2019; Douafer et al., 2019; Juma et al., 2020). Among the most promising such approaches is electroporation, for which short electric pulses of sufficient strength are applied to permeabilize the bacterial envelope, which leads to increased uptake of molecules (including antibacterials) and potentiated bacterial inactivation (Garner, 2019). Electroporation is effective across a broad range of microorganisms (Kotnik et al., 2015) and can be optimized by adjusting pulse parameters (amplitude, duration, number, and frequency) to maximize the uptake of molecules and/or inactivation rate. Although it can cause bacterial death as a stand-alone treatment, inactivation rates are higher when electroporation is combined with other methods. Therefore, different complementary techniques that could achieve synergistic effects are being tested (Martin-Belloso and Sobrino-López, 2011; Berdejo et al., 2019; Lovšin et al., 2021).

Electroporation is already an established method for food preservation, freezing, extraction, decreasing drying time, and improving food quality (Nowosad et al., 2020). Numerous studies are also focusing on the combined use of electroporation and antibacterials allowed in food and beverage preservation (Berdejo et al., 2019) to eliminate food spoilers, which cause high income losses and food waste. The range of permissible antibacterials in the food industry is limited to substances that are registered as food additives (e.g., nisin and triethyl citrate) or naturally present in food (e.g., acetic acid, citric acid, lactic acid, cinnamaldehyde, and linalool). *Lactiplantibacillus plantarum*, formerly *Lactobacillus plantarum* (Zheng et al., 2020), is a food spoiler found in beer and wine; however, it is also important as a probiotic culture and starter culture for multiple food fermentations (Zheng et al., 2020). Electroporation has been proven effective for *L. plantarum* inactivation, and its combination with antibacterials has demonstrated a synergistic effect (Ulmer et al., 2002; Abram et al., 2003).

The combined use of electroporation with clinical and veterinary antibiotics is limited due to potential health risks and environmental burden. Such methods could be used for treating wastewater from hospitals and livestock farms, which are often already contaminated with antibiotics. By using methods that permeabilize membranes, one could increase the uptake of antibiotics already present in wastewaters and thus increase their effectiveness in reducing bacterial load. The acceptable options for increasing permeabilization are limited to techniques that do not cause additional pollution, such as ultrasonication, freeze-thawing, and electroporation. Among these, electroporation is the most widely used due to its general effectiveness, efficiency, and applicability to a broad range of microorganisms as well as the fact that it does not increase wastewater genotoxicity (Gusbeth et al., 2009; Aune and Aachmann, 2010; Kotnik et al., 2015; Eleršek et al., 2020). Electroporation in combination with antibacterials has

already been demonstrated to cause high inactivation rates (Garner, 2019; Lovšin et al., 2021). However, most of these studies focused on achieving the maximum effect, whereas the mechanisms of such combined use are poorly understood. To improve and optimize the use of such treatment, the underlying mechanisms must be studied; this could enable a more targeted selection of antibacterials to be used in combined treatments.

We recently demonstrated that in the Gram-negative (G-) bacterium *Escherichia coli*, electroporation potentiates ampicillin (which targets the peptidoglycan wall) more than tetracycline (which has an intracellular target) (Lovšin et al., 2021). But while in G-bacteria the outer membrane must be breached for access to the peptidoglycan wall from the outside, in Gram-positive (G+) bacteria the peptidoglycan wall is the outermost layer of the envelope and thus inherently accessible from the outside, so the dependence of potentiation on antibacterial's target may be rather different. In this study, we chose *Lactiplantibacillus plantarum*, a representative G+ bacterium relevant to both food industry (as a probiotic) and medicine (as a food spoiler), and similar in both shape and size (which affect electroporation importantly) to *E. coli*, thus allowing for cross-comparisons of the observed effects. We evaluated electroporation-induced potentiation of *L. plantarum* inactivation and inhibition by ampicillin and tetracycline, with the aim to determine whether the antibiotic's target site affects potentiation in G+ bacteria differently than in G- ones. Our results presented below suggest that this is indeed the case.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Bacterial strain and growth conditions

As a model for G+ bacteria, *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 (Microbiologics, USA) was used. Cells were cultured in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth (Merck, Germany) at 37°C with agitation. Different starting cultures were grown in a 24-well microplate in a microplate reader for 24 h with agitation at 37°C, which is in the range (30–40°C) that yields optimal growth (Slizewska and Chlebicz-Wójcik, 2020). Optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) was measured every hour to obtain growth curves. For experiments, bacteria in the middle exponential phase were used.

### 2.2 Antibiotics and the determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

Two antibiotics were used in this study: (i) ampicillin (#A9518; Sigma-Aldrich), which inhibits cell-wall synthesis by binding to bacterial penicillin-binding transpeptidases, thus preventing them from catalyzing peptidoglycan chain cross-linking (Wright, 1999); and (ii) tetracycline (#T3383; Sigma-Aldrich), which inhibits protein synthesis by preventing the attachment of aminoacyl-tRNA to the A-site of the bacterial 30S ribosomal subunit (Chopra and Roberts, 2001).

The MIC for each antibiotic was determined as the lowest concentration of the antibiotic that inhibited visible growth of *L. plantarum* during the incubation. The standard protocol for broth microdilution in 96-well microplates and overnight incubation was

used for MIC determination (Andrews, 2001). Concentrations based on MIC were chosen for more informative cross-comparisons of the potentiation rates achievable for different antibiotics. MIC multiples of 0 $\times$ , 1 $\times$ , 3 $\times$ , 10 $\times$ , and 30 $\times$  MIC were used, as 1 $\times$  MIC is generally inhibitory but not bactericidal. A higher bacterial concentration was used in our experiments ( $10^8$  CFU/mL) than that used in standard protocol for MIC determination ( $10^5$  CFU/mL), to be able to compare results presented here with our previous study (Lovšin et al., 2021).

### 2.3 *Lactiplantibacillus plantarum* treatment: antibiotic concentrations and electric pulse amplitudes

Overnight *L. plantarum* cultures were initiated by inoculation of one colony from an MRS agar plate to MRS broth (50 mL), with overnight incubation at 37°C with agitation. The following morning, OD<sub>450</sub> was measured, and fresh MRS broth (150 mL) was inoculated with starting OD<sub>450</sub> of 0.3. The cultures were grown to the middle exponential growth phase, centrifuged, and resuspended in 250 mM sucrose (20 mL).

The treatment protocol was as described previously in Lovšin et al. (2021). Electroporation was performed using a square wave pulse generator (HVP-VG; IGEA, Carpi, Italy).

An electric pulse amplitude of 5, 10, 15, or 20 kV/cm was applied; for most bacteria, a single 1-ms electric pulse at ~5 kV/cm causes only mild reversible electroporation, at ~10 kV/cm reversible electroporation of most bacterial cells, at ~15 kV/cm a mix of reversible and irreversible electroporation, and at ~20 kV/cm non-thermal irreversible electroporation of most bacterial cells (Kotnik et al., 2015). Although delivering more than one pulse generally potentiates the effect further, it is at the cost of introducing additional parameters (the number of pulses and their repetition frequency). We thus opted for a single pulse, in analogy to the single-dose approach generally used in the early stages of drug development and testing. To still achieve a clearly detectable effect, the pulse length was set to 1 ms, which is at the high end of the ranges typically used (see, e.g., Table 1 in Garner, 2019).

Post-pulse pre-dilution incubation was performed at ~22°C, which is in the range (21–26°C) measured for average wastewater temperatures (Seybold and Brunk, 2013), and close to the middle of the range (2–53°C) where *L. plantarum* exhibits growth (Slizewska and Chlebić-Wójcik, 2020). Incubation time was 24 h, which is a standard protocol in many studies of combined bacterial inactivation (Del Pozo et al., 2009; Novickij et al., 2018a,b), and 1 h, to also assess the initial and short-term effects. Treatment without antibiotics and without pulse delivery was considered the control. Additionally, treatments with only antibiotic or electroporation were performed to determine their effects on inactivation when applied alone.

### 2.4 Determination of bacterial inactivation

After treatment, part of the sample was used to determine inactivation rates, as described in Lovšin et al. (2021). The limit of detection for drop plate method was 10<sup>2</sup> CFU/mL. *L. plantarum* inactivation rates were calculated as  $-\log_{10}(N/N_0)$ , where *N* is the *L. plantarum* colony-forming units (CFU)/mL of the sample, and *N<sub>0</sub>*

TABLE 1 Antibiotics and their concentrations used.

Antibiotic	Concentration (µg/mL)			
	MIC	3 × MIC	10 × MIC	30 × MIC
Ampicillin	3	9	30	90
Tetracycline	8	24	80	240

MIC, minimum inhibitory concentration.

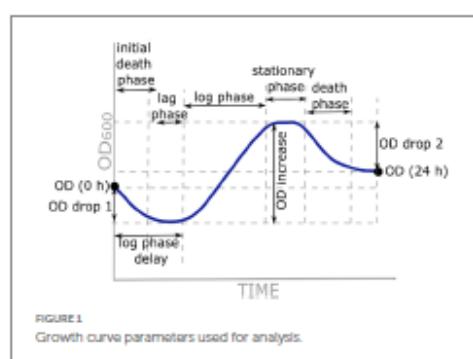


FIGURE 1  
Growth curve parameters used for analysis.

is the *L. plantarum* CFU/mL of the control ( $\log_{10}$  will henceforth be referred to as  $\log$ ). When no colonies were detected, CFU/mL was still determined as 1, to be able to calculate the logarithm.

### 2.5 Analysis of growth dynamics and inhibition

To gain insight into the events occurring during the 24 h between treatment and evaluation of the inactivation rate, we also monitored the growth dynamics and inhibition during these 24 h by direct measurements of optical density, following our previously established protocol (Sterniha et al., 2022). After treatment and 1-h incubation at room temperature, the samples (110 µL) were pipetted onto a 96-well culture plate (Merck, Germany) and incubated for 24 h in a microtiter plate reader (Tecan Infinite M200, Tecan, Austria), where OD<sub>450</sub> was measured every hour (25 measurements in total, with shaking before each measurement).

Growth curve parameters used for analysis are represented in Figure 1. OD (0h) and OD (24h) represent OD<sub>450</sub> at the beginning and end of the measurements, respectively. OD drop 1 was calculated as the difference between OD (0h) and the lowest OD<sub>450</sub> before an increase in growth. An OD increase was calculated as the difference between the maximum OD<sub>450</sub> and OD<sub>450</sub> at the beginning of the logarithmic phase. OD drop 2 was calculated as the difference between OD (24h) and maximum OD<sub>450</sub> at the beginning of the death phase. The delay of the logarithmic phase was either the length of the lag phase or the length of the initial death phase and the lag phase together. Additionally, specific growth rate  $\mu$  was calculated as the rate of increase of cell population biomass per unit of biomass concentration during the linear section of the logarithmic phase (the initial and final OD<sub>450</sub> values were read at the beginning and end of the linear part, respectively;  $t$  is the time between these two measurements):

$$\mu = \frac{\text{final } OD_{600} - \text{initial } OD_{600}}{t \times \text{initial } OD_{600}}$$

## 2.6 Statistical analysis

Experiments were repeated at least three times on different days for each antibiotic. Inactivation data were normalized to control (i.e., samples without antibiotics or pulse deliveries) and expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The data were post-processed in R Commander 2.6 (developed by John Fox at McMaster University, and available under the GNU General Public License). To compare the effect of electroporation alone on bacterial inactivation, Dunnett's test ( $p < 0.05$ ) was used to compare each treatment to the control. To compare the effects of the two antibiotics (antibiotic alone or combined treatment), F-test analysis of variance ( $p < 0.05$ ) was first used for each combination of electric pulse amplitude, antibiotic concentration, and post-pulse pre-dilution incubation time. If the variances within the groups were the same, Student's *t*-test was used ( $p < 0.05$ ) to compare the two means. If the variances were different, Welch's *t*-test was used ( $p < 0.05$ ). For analysis of growth curves,  $OD_{600}$  measurements of the medium were first subtracted from all other measurements. To determine whether the mean increase or decrease in  $OD_{600}$  (OD drop 1, OD increase and OD drop 2) was statistically significantly different from 0, Dunnett's test ( $p < 0.05$ ) was used. Different growth curve parameters were tested against the control (without antibiotics or electroporation treatment) using Dunnett's test ( $p < 0.05$ ).

## 3 Results

### 3.1 *Lactiplantibacillus plantarum* inactivation

#### 3.1.1 *Lactiplantibacillus plantarum* inactivation with antibiotics

The MICs against *L. plantarum* were determined at 3  $\mu\text{g/mL}$  for ampicillin and 8  $\mu\text{g/mL}$  for tetracycline. Experiments were then performed with antibiotics at concentrations of 0, MIC, 3  $\times$  MIC, 10  $\times$  MIC, and 30  $\times$  MIC (Table 1; see the Materials and methods section for reasoning and details).

After 24-h incubation with antibiotic at room temperature, bacterial inactivation rates increased with increasing antibiotic concentration (Figure 2, solid lines). The maximum effect of ampicillin was already achieved at 10  $\times$  MIC (mean of  $-1.41 \log$ ), whereas the maximum effect of tetracycline was achieved at 30  $\times$  MIC (mean of  $-1.88 \log$ ). At MIC and 3  $\times$  MIC, ampicillin was significantly more efficient than tetracycline; at 10  $\times$  MIC, there were no significant differences between the two antibiotics; at 30  $\times$  MIC, tetracycline was significantly more efficient than ampicillin. Of note, even after 24-h incubation at room temperature with 30  $\times$  MIC, the effect was not bactericidal for either antibiotic. Although either antibiotic caused significant *L. plantarum* inactivation and growth inhibition, the remaining bacteria recovered and divided after being transferred to rich growth medium. After incubation with the antibiotic at room temperature for only 1 h, the inactivation rates between ampicillin and tetracycline did not differ and increasing antibiotic concentrations from MIC to 30  $\times$  MIC had almost no effect on the inactivation rates (Figure 2, dashed lines).

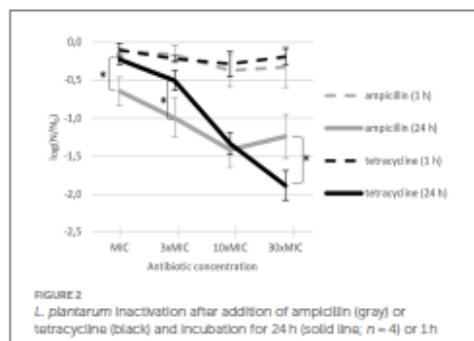


FIGURE 2  
*L. plantarum* inactivation after addition of ampicillin (gray) or tetracycline (black) and incubation for 24 h (solid line;  $n = 3$ ) or 1 h (dashed line;  $n = 3$ ). Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. MIC: minimum inhibitory concentration. Asterisks (\*) mark treatments with a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the two antibiotics for the same incubation time.

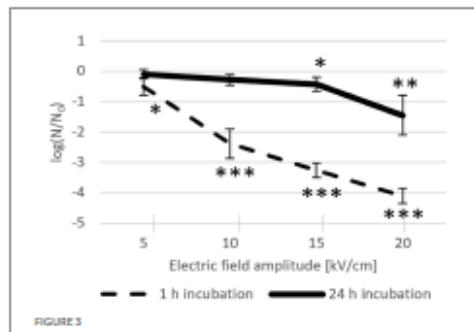


FIGURE 3  
*L. plantarum* inactivation after electroporation and 24-h (solid line,  $n = 8$ ) or 1-h (dashed line,  $n = 6$ ) incubation at room temperature. Each data point represents the mean  $\pm$  standard deviation. Asterisks (\*) mark significant differences (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ ) compared to the control (without an electric pulse).

#### 3.1.2 *Lactiplantibacillus plantarum* inactivation with electroporation

Increasing pulse amplitude increased inactivation rates after both 24-h and 1-h incubations (Figure 3). However, after 24-h incubation, this effect was notably diminished, reflecting ongoing bacterial recovery at room temperature after the initial inactivation caused by the electric pulse. Namely, although *Lactobacillus* spp. are mesophilic bacteria that grow optimally in the temperature range of 30–40°C, they can nevertheless exhibit growth in the much broader temperature range of 2–53°C (Ślizewska and Chlebicz-Wójcik, 2020). The effect of electroporation on inactivation after 1-h incubation increased consistently with increasing electric field amplitude: at 5 kV/cm, inactivation was detectable but with rather weak statistical significance (mean of  $-0.51 \log$ ), whereas at  $\geq 10$  kV/cm, inactivation increased consistently and significantly (with means of  $-2.38 \log$  at 10 kV/cm,  $-3.27 \log$  at 15 kV/cm, and  $-4.10 \log$  at 20 kV/cm). Conversely, due to bacterial recovery, 24 h after electroporation the inactivation rates were considerably lower than those after 1 h; only the effects of 15 kV/cm

cm and 20 kV/cm were clearly discernible (with means of  $-0.42 \log$  and  $-1.45 \log$ , respectively).

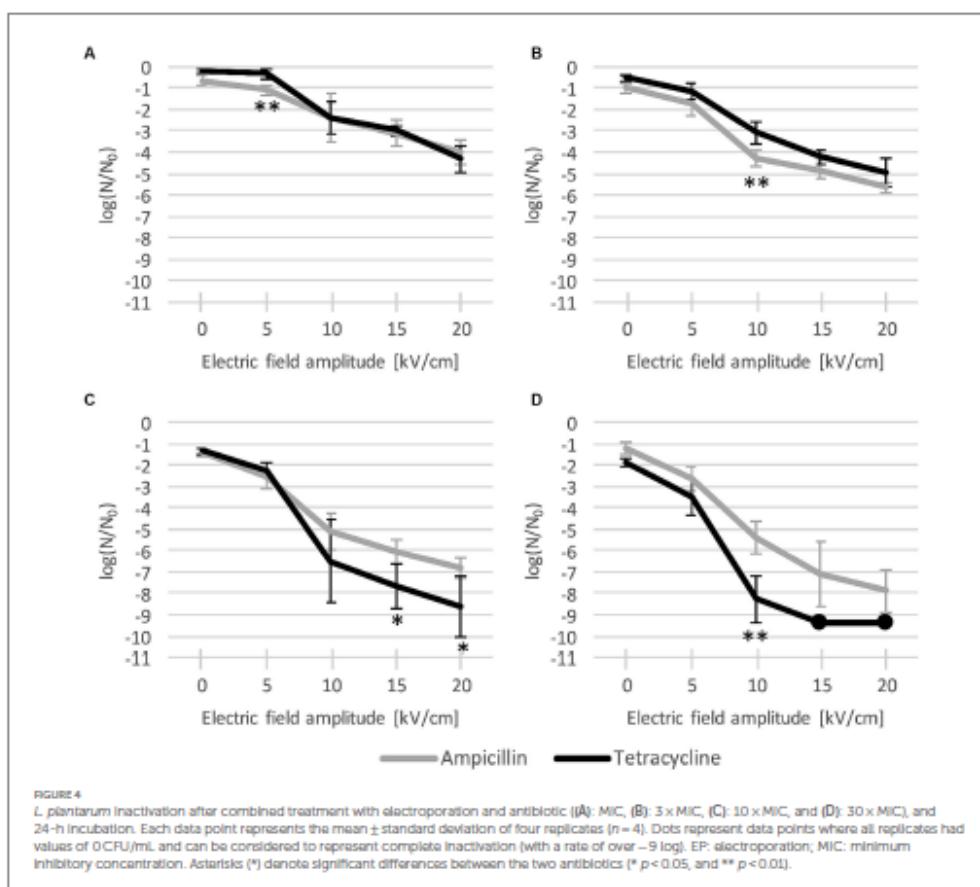
Figures 2, 3 confirm, as expected, that the incubation time had the opposite effect on inactivation rate with an antibiotic alone (where inactivation was getting stronger) compared to incubation after the electric pulse alone (where inactivation was getting weaker).

### 3.1.3 *Lactiplantibacillus plantarum* inactivation with antibiotics and electroporation combined

After 24 h of post-pulse pre-dilution incubation with each antibiotic, inactivation was potentiated, and this potentiation consistently increased with increase of antibiotic concentration and pulse amplitude (Figure 4). For both antibiotics, the biggest increase in inactivation rates was generally observed when the amplitude was increased from 5 kV/cm to 10 kV/cm, with a more gradual increase for 15 kV/cm, and an additional increase for 20 kV/cm (except for tetracycline at 30 × MIC (Figure 4D), with which practically complete inactivation was achieved already at 15 kV/cm).

As with the antibiotic applied alone, ampicillin again proved to be more effective than tetracycline at low concentrations, particularly at MIC (Figure 4A) with 5 kV/cm (with means of  $-1.10 \log$  vs.  $-0.34 \log$ ) and at 3 × MIC (Figure 4B) with 10 kV/cm ( $-4.29 \log$  vs.  $-3.09 \log$ ). Conversely, at higher concentrations, tetracycline was consistently more effective than ampicillin, particularly at 30 × MIC (Figure 4D) with 10 kV/cm ( $-8.29 \log$  vs.  $-5.43 \log$ ) and at 10 × MIC (Figure 4C) with 15 kV/cm ( $-7.68 \log$  vs.  $-6.05 \log$ ) and 20 kV/cm ( $-8.64 \log$  vs.  $-6.79 \log$ ). With tetracycline, the potentiation at 30 × MIC with 15 kV/cm and 20 kV/cm resulted in practically complete inactivation (over  $-9 \log$ ). However, this inactivation did not significantly differ from the somewhat weaker inactivation achieved with ampicillin ( $-7.14 \log$  at 15 kV/cm and  $-7.89 \log$  at 20 kV/cm) (Figure 4D).

If the post-pulse pre-dilution incubation time was shortened to only 1 h, no significant potentiation of inactivation was observed (results can be found in the Supplementary material). There were no significant differences in inactivation rates compared to those obtained when only electroporation was used, regardless of the antibiotic type and concentration. This suggests that for increased antibiotic transport



and/or binding to its target, the prolonged increased permeabilization effect of electroporation and physiological antibiotic uptake play a bigger role than the pore-forming effect during pulse delivery with its temporarily enhanced antibiotic diffusion. Production of reactive oxygen species and activation of bacterial repair mechanisms due to electroporation and antibiotic exposure could also have an impact (Djukić-Vuković et al., 2021). Further discussion is henceforth focused on results for 24-h incubation, where significant differences enabled us comparison between the two tested antibiotics.

### 3.2 Growth dynamics after treatment

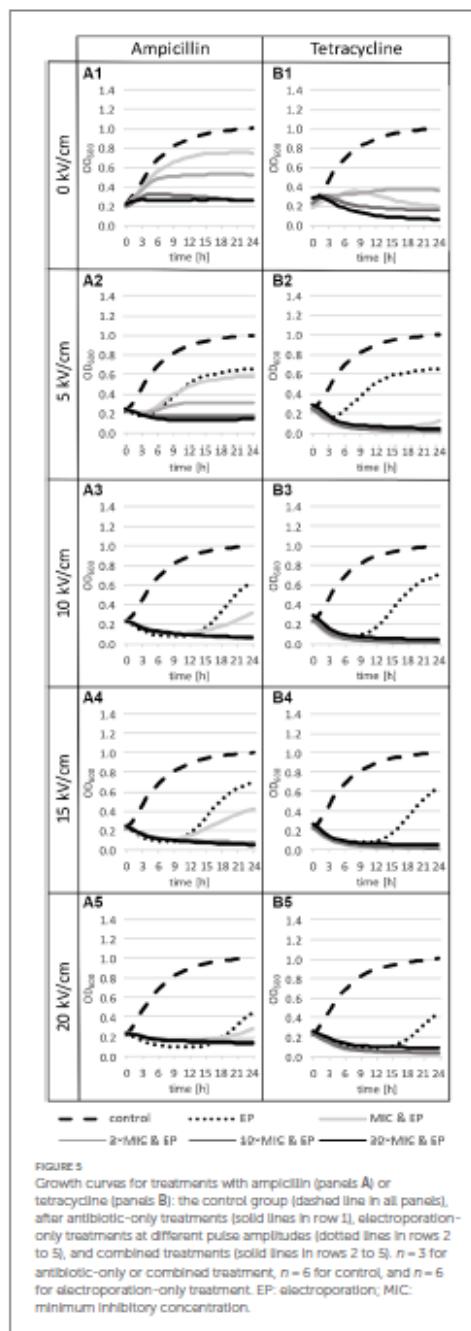
Antibiotic-only treatment generally caused growth inhibition throughout the 24-h incubation period for both antibiotics, all final  $OD_{600}$  were lower than with control (Figures 5A1,B1). Effect of tetracycline on growth was stronger than for ampicillin, low increase in  $OD_{600}$  was observed only for MIC and 3×MIC of tetracycline. At 10×MIC and 30×MIC of tetracycline, there was even some additional inactivation ( $OD$  drop 2 was statistically significant, quantitative details are included in [Supplementary material](#)). For ampicillin, effect on growth inhibition increased with increase in ampicillin concentration, with almost no growth detected at 10×MIC. Of note, in our samples MIC was not completely inhibitory due to higher bacterial density used in our experiments in comparison to bacterial density used in standard MIC determination protocol.

After electroporation-only treatment, the most obvious effect on the growth dynamic was a delay of the logarithmic phase, which increased with the increase of the electric field amplitude (Figure 5: dotted lines in rows 2 to 5). At 5 kV/cm growth was delayed for 4.8 h with weak statistical significance. The increase of the electric field amplitude to 10 kV/cm resulted in a large increase in growth delay (10.3 h), with smaller further increases at 15 kV/cm (12.5 h) and at 20 kV/cm (12.8 h). Electric pulse amplitudes  $\geq 10$  kV/cm resulted also in an initial death phase ( $OD$  drop 1) before recovery and growth (Figure 5: dotted lines in rows 3 to 5).

Growth curves show that after combined treatments, *L. plantarum* is more sensitive to tetracycline than to ampicillin (Figures 5A2–5A5,B2–B5), which is consistent with the findings for antibiotic-only treatment (Figure 5: first row). Combined treatments with ampicillin led to growth inhibition at all concentrations, except at MIC, which was insufficient to completely inhibit growth (increase in  $OD_{600}$  is visible at all electric field amplitudes, but it is statistically significant only for MIC at 5 kV/cm) (Figures 5A2–5A5). This shows that small electroporation damage is to some extent repaired at room temperature even in the presence of ampicillin at small concentrations, however bacteria do not reach the same density as with control. On the other hand, combined treatments with tetracycline even led to an additional drop in  $OD_{600}$  (Figures 5B2–5B5).

## 4 Discussion

Electroporation increased inactivation efficiency of both antibiotics, ampicillin and tetracycline, but it was consistently more pronounced for tetracycline, where at sufficient concentrations and pulse amplitudes



almost complete inactivation was achieved. This suggests that electroporation potentiates both inhibition and inactivation of Gram-positive (G+) bacteria to a larger extent for antibiotics that inhibit protein synthesis than for antibiotics that inhibit cell-wall synthesis. This is the inverse of the relation observed for the Gram-negative (G-) bacterium *E. coli*, where electroporation potentiates ampicillin more than tetracycline (Lovšin et al., 2021), and this difference can be explained straightforwardly by the difference in the envelope structure between G+ and G- bacteria. Namely, while in G- bacteria the outer membrane has to be breached for the access to the wall from the outside (and thus for ampicillin to inhibit the wall synthesis), in G+ bacteria the wall is the outermost layer of the envelope and thus inherently accessible from the outside (so ampicillin can act without envelope permeabilization). Thus electroporation potentiates primarily those antibiotics for which it facilitates the access to their target: for the antibiotics acting intracellularly the potentiating effect is pronounced both for G+ and G- bacteria, while for the antibiotics acting on the wall the potentiation via permeabilization is limited to G- bacteria.

Still, even when combined with antibiotics that have access to their target even without permeabilization, electroporation causes its own damaging effect in addition to that of the antibiotic, thus in general still leading to potentiated inhibition and inactivation. Therefore, potentiated inactivation rates altogether were still expected – and observed – for combination of ampicillin and electroporation, through additional damage caused to the bacteria by electroporation itself. It is possible though that the maximum effect of ampicillin was already approached toward  $10 \times \text{MIC}$ , as  $10 \times \text{MIC}$  and  $30 \times \text{MIC}$  had similar rates of inactivation and growth inhibition, while another factor could also be that inhibition of peptidoglycan cross-linking by ampicillin has a weaker detrimental effect on *L. plantarum* than inhibition of their protein synthesis by tetracycline. Of note, even after 24 h of incubation at room temperature with the highest concentrations ( $30 \times \text{MIC}$ ) of both antibiotics, the effects were still not bactericidal. Although the growth of *L. plantarum* was inhibited during antibiotic exposure and up to 2 log reduction was achieved, the remaining cells recovered and underwent cell division after transfer to rich growth medium. For another G+ bacterium, *Rhodococcus ruber*, the average sensitivity after electroporation was most increased for cefazolin, which inhibits cell wall synthesis, however if the regeneration time before antibiotic exposure was increased to 24 h, the highest sensitivity was observed for neomycin, which inhibits protein synthesis (Kuyukina et al., 2020). Higher electroporation potentiation of antibiotics that target protein synthesis was also reported for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Novickij et al., 2018b), and resistant G+ and G- bacteria of different shapes and sizes (Vadlamani et al., 2020). Both studies used the same mass concentrations for all antibiotics, which makes this comparisons difficult, since bacterial strains have different sensitivities to antibiotics.

Effect of combined treatments on both bacterial inactivation and growth inhibition generally increases with increase in antibiotic concentration and/or electric field amplitude. Low antibiotic concentrations led to growth inhibition after electroporation (Figure 5), but bacterial inactivation was not increased. Inactivation levels reached 24 h after treatment with electroporation and antibiotics at MIC (Figure 4A) were the same as inactivation levels reached 1 h after electroporation only treatment (Figure 3). After electroporation-only treatment bacteria were able to recover and divide, hence the lower inactivation rates after 24 h. Increasing antibiotic concentration led to increased inactivation rates, which implies that at higher

concentrations, repair of damage caused by electroporation is largely inhibited. Increasing electric field amplitude further increased inactivation levels. The largest increases in inactivation rates for combined and electroporation-only treatment were observed when electric field amplitudes were increased from 5 to 10 kV/cm, with smaller further increases at 15 and 20 kV/cm. This is in agreement with the general finding (Kotnik et al., 2015) that for most bacteria exposed to a single 1 ms pulse, the electric field amplitude of  $\sim 5 \text{ kV/cm}$  results in only mild reversible electroporation,  $\sim 10 \text{ kV/cm}$  results in reversible electroporation, and  $\sim 15\text{--}20 \text{ kV/cm}$  results in non-thermal irreversible electroporation. High field amplitudes together with high antibiotic concentrations led to complete growth inhibition in the presence of the antibiotic (amplitude of  $\geq 10 \text{ kV/cm}$  with antibiotic  $\geq 3 \times \text{MIC}$  for both antibiotics) or even complete inactivation (tetracycline at  $30 \times \text{MIC}$  with  $\geq 15 \text{ kV/cm}$ ).

Our results suggest that the difference in cell-wall structure (G+ vs. G-) has an important – even decisive – effect on the type of antibiotics expected to be efficiently potentiated by electroporation. Still, for this conclusion's more general validity, further experiments are needed – both on additional representative G+ and G- strains, and with other antibiotics targeting the cell wall vs. those targeting the intracellular processes.

Yet with any such expansion of experiments, quite some caution is needed for at least two reasons. First, bacterial cell size and shape can also affect electroporation importantly (García et al., 2005; El-Hag et al., 2011). Specifically, the voltage induced on the bacterial envelope is linearly proportional to the cell size, so that larger bacteria are generally electroporated at lower pulse amplitudes, and this voltage also depends significantly on the cell shape, with spherical cells generally electroporated at lower pulse amplitudes than elongated ones (Kotnik et al., 2010, 2019). We took care to minimize artifacts stemming from such differences, choosing for our comparison *E. coli* and *L. plantarum* as they are of similar size and both rod-shaped, and any additional comparisons would have to either conform to these (to be intercomparable), or start anew (e.g., by performing the whole comparison across a set of spherical-shaped G+ and G- bacteria of similar size).

And second, spores, produced by many G+ bacterial strains, are much more resistant to electroporation, and physical stress in general, than the bacteria that produce them (Setlow, 2010; Pillet et al., 2016). Thus, the spores surviving the treatment and then germinating within the time window in which the inhibition and inactivation are studied can significantly distort any G+ vs. G- comparison of treatments involving electroporation. To avoid such distortions, we purposefully chose the *L. plantarum* strain that does not sporulate, and this will also have to be taken into account by any further studies in picking the bacterial strains for any extended or new comparison.

## 5 Conclusion

Our results indicate that electroporation potentiates inactivation of G+ bacteria to a larger extent for antibiotics that inhibit intracellular processes and therefore require transport into the cytoplasm, and to a smaller extent for antibiotics that inhibit cell-wall synthesis. This is the inverse of the relation observed in G- bacteria, where the antibiotics inhibiting cell-wall synthesis are potentiated more than those targeting the intracellular (either DNA or protein) synthesis. This can

be explained by the difference in the envelope structure, since in G- bacteria the outer membrane must be breached for wall-inhibiting antibiotics to access their target, whereas in G+ bacteria the wall is inherently accessible from the outside, and permeabilization does not affect this access. Further studies are needed for a more general recognition of this conclusion, with additional antibiotics targeting the cell wall vs. those targeting intracellular processes, and with other representative G+ and G- strains, which for intercomparability should all be of similar size and shape, and non-sporulating.

J2-50064 (project leader TK) and J4-3088 (project leader AK), and the Junior Researcher funding for ŽL. TK is also funded by the Research Programme P2-0249, and AK by the Research Programme P4-0116. The experiments were performed within the Infrastructure Programme IP-0510 "Network of research infrastructure centers at the University of Ljubljana (MRIC UL)".

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Author contributions

ŽL: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. TK: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. AK: Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. The authors acknowledge the financial support for this research from the Slovenian Research and Innovation Agency (ARIS) within the Research Projects

## Acknowledgments

The authors would like to thank Polona Kornel for technical assistance.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmich.2024.1331714/full#supplementary-material>

## References

- Abram, H., Smell, J. P. P. M., Bos, R., and Wouters, P. C. (2003). Modelling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment. *J. Appl. Microbiol.* 94, 571–579. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01869.x
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl\_1.5
- Aune, T. E. V., and Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1301–1313. doi: 10.1007/s00253-009-2349-1
- Berdejo, D., Pagán, E., García-Gonzalo, D., and Pagán, R. (2019). Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving food safety. *Curr. Opin. Food Sci.* 30, 14–20. doi: 10.1016/j.cofs.2018.08.004
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 232–260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Del Pozo, J. L., Rouse, M. S., Mandrekar, J. N., Sampredo, M. F., Steckelberg, J. M., and Patel, R. (2009). Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 35–40. doi: 10.1128/AAC.00237-08
- Djurkic-Vukovic, A., Habert, M. S., Flisar, K., Mojovic, I., and Miklavcic, D. (2021). Pulsed electric field treatment of *Lactococcus lactis* rhamnosus and *Lactococcus lactis* paracasei, bacteria with probiotic potential. *LWT* 152:112304. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112304
- Douaifer, H., Andrieu, V., Phanstiel, O., and Brunel, J. M. (2019). Antibiotic adjuvants make antibiotics great again! *J. Med. Chem.* 62, 8665–8681. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01781
- Eleršek, T., Flisar, K., Likozar, B., Klemenčič, M., Golob, J., Kotnik, T., et al. (2020). Electroporation as a solvent-free green technique for non-destructive extraction of proteins and lipids from *Chlorella vulgaris*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:443. doi: 10.3389/fbioe.2020.00443
- El-Hag, A. H., Jayaram, S. H., Rodriguez Gonzalez, O., and Griffiths, M. W. (2011). The influence of size and shape of microorganism on pulsed electric field inactivation. *IEEE Trans. Nanobiotech.* 10, 133–138. doi: 10.1109/TNB.2011.2169078
- García, D., Gómez, N., Raso, J., and Pagán, R. (2005). Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6, 388–395. doi: 10.1016/j.ifset.2005.04.003
- Garner, A. L. (2019). Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7917–7929. doi: 10.1007/s00253-019-10067-y
- Gusbeth, C., Frey, W., Volkmann, H., Schwartz, T., and Bluhm, H. (2009). Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere* 75, 228–233. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.066
- Jurna, A., Lemotte, P., Simpson, A. B. J., Murray, I., O'Hagan, B. M. G., Naughton, P. J., et al. (2020). Microscopic investigation of the combined use of antibiotics and biosurfactants on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 11:1477. doi: 10.3389/fmich.2020.01477
- Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Habert, Meglić, S., Peterka, M., and Miklavcic, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33, 480–488. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002
- Kotnik, T., Pučbar, G., and Miklavcic, D. (2010). Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. *J. Membr. Biol.* 236, 3–13. doi: 10.1007/s00232-010-9279-9

- Kotnik, T., Rems, I., Tarek, M., and Miklavčič, D. (2019). Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models. *Annu. Rev. Biophys.* 48, 63–91. doi: 10.1146/annurev-biophys-052118-115451
- Kuyakina, M. S., Varushkina, A. M., and Ivshina, I. B. (2020). Effects of electroporation on antibiotic susceptibility and adhesive activity to n-hexadecane in *Rhodococcus ruber* IEGM 231. *Appl. Biochem. Microbiol.* 56, 729–735. doi: 10.1134/S0003683820060083
- Lovšin, Ž., Klančnik, A., and Kotnik, T. (2021). Electroporation as an efficacy potentiator for antibiotics with different target sites. *Front. Microbiol.* 12:722232. doi: 10.3389/fmicb.2021.722232
- Martin-Belliso, G., and Sobrino-López, A. (2011). Combination of pulsed electric fields with other preservation techniques. *Food Bioprocess Technol.* 4, 954–968. doi: 10.1007/s11947-011-0512-z
- Novickij, V., Švedienė, J., Pakševičius, A., Markovskaja, S., Girkantaitė, I., Zinkevičienė, A., et al. (2018a). Pulse electric field-assisted sensitization of multidrug-resistant *Candida* strains to antifungal drugs. *Nature Microbiol.* 13, 555–566. doi: 10.2217/nmb-2017-0245
- Novickij, V., Švedienė, J., Pakševičius, A., Markovskaja, S., Lastauskiene, E., Zinkevičienė, A., et al. (2018b). Induction of different sensitization patterns of MRSA to antibiotics using electroporation. *Molecules* 23:1799. doi: 10.3390/molecules23071799
- Nowosad, K., Sufka, M., Pankiewicz, U., and Kowalski, R. (2020). The application of PEF technology in food processing and human nutrition. *J. Food Sci. Technol.* 58, 397–411. doi: 10.1007/s13197-020-04512-4
- Pileti, I., Marjanović, I., Rebenšek, M., Miklavčič, D., Rols, M. P., and Kotnik, T. (2016). Inactivation of spores by electric arcs. *BMC Microbiol.* 16:148. doi: 10.1186/s12866-016-0764-x
- Setlow, P. (2010). "Resistance of bacterial spores" in *Bacterial stress responses*. eds. G. Storz and R. Hengge (Washington, DC, USA: Wiley/ASM Press), 319–332.
- Seybold, C., and Brunk, M. E. (2013). In-house waste water heat. Available at: [http://www.rehv.ae/fileadmin/REHVA\\_Journal/REHVA\\_Journal\\_2013/RJ\\_Issue\\_6/P18/18-21\\_Seybold\\_RJ130e.pdf](http://www.rehv.ae/fileadmin/REHVA_Journal/REHVA_Journal_2013/RJ_Issue_6/P18/18-21_Seybold_RJ130e.pdf)
- Słitińska, K., and Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology* 9:423. doi: 10.3390/biology9120423
- Sterniša, M., Sabotić, J., and Klančnik, A. (2022). A novel approach using growth curve analysis to distinguish between antimicrobial and anti-biofilm activities against *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 364:109520. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109520
- Ulmer, H. M., Hetz, V., Gänzle, M. G., Knorr, D., and Vogel, R. F. (2002). Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer. *J. Appl. Microbiol.* 93, 326–335. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01699.x
- Vadlamani, R. A., Dhanabal, A., Detwiler, D. A., Pal, R., McCarthy, J., Soleem, M. N., et al. (2020). Nanosecond electric pulses rapidly enhance the inactivation of gram-negative bacteria using gram-positive antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2217–2227. doi: 10.1007/s00253-020-10365-w
- Wright, A. J. (1999). The penicillins. *Mayo Clin. Proc.* 74, 290–307. doi: 10.4065/74.3.290
- Zheng, J., Willouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Maltarelly, P., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858. doi: 10.1099/ijs.0.004107

## PRILOGA I

Dovoljenje revije Frontiers in Microbiology za objavo člankov:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/about#copyright-statement>

Pri obeh člankih smo avtorji obdržali avtorske pravice, vključno s pravico reproducije člankov (“Authors are free to disseminate and re-publish their articles”).

### Open access funder and institutional mandates

Frontiers is fully compliant with open access mandates, by publishing its articles under the Creative Commons Attribution licence (CC-BY). Funder mandates such as those by the Wellcome Trust (UK), National Institutes of Health (USA) and the Australian Research Council (Australia) are fully compatible with publishing in Frontiers. Authors retain copyright of their work and can deposit their publication in any repository. The work can be freely shared and adapted provided that appropriate credit is given and any changes specified.

### Copyright statement

Under the [Frontiers Conditions for Website Use](#) and the [Frontiers General Conditions for Authors](#), authors of articles published in Frontiers journals retain copyright on their articles, except for any third-party images and other materials added by Frontiers, which are subject to copyright of their respective owners. Authors are therefore free to disseminate and re-publish their articles, subject to any requirements of third-party copyright owners and subject to the original publication being fully cited. The ability to copy, download, forward or otherwise distribute any materials is always subject to any copyright notices displayed. Copyright notices must be displayed prominently and may not be obliterated, deleted or hidden, totally or partially.

*Copyright © 2021 Lovšin, Klančnik and Kotnik. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*

#### COPYRIGHT

© 2024 Lovšin, Kotnik and Klančnik. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.