



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

EMILIJA ŽUKAUSKAITĖ

Mikrobiologijos studijų programos
Magistro baigiamasis darbas

**ATSPARUMO ANTIBIOTIKAMS IR SUNKIESIEMS METALAMS GENŲ
PAPLITIMAS SĄVARTYNŲ MIKROBIOTOJE**

Darbo vadovė

Prof. dr. Eglė Lastauskienė

Vilnius, 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1.1 Antibiotikų klasifikacija ir atsparumo jiems mechanizmai.....	5
1.1.1 Beta-laktaminiai antibiotikai.....	5
1.1.2 Aminoglikozidai	6
1.1.3 Tetraciklinai.....	8
1.1.4 Makrolidai.....	9
1.1.5 Chloramfenikolis ir florfenikolis.....	9
1.1.6 Chinolonai.....	10
1.1.7 Glikopeptidai.....	10
1.2 Atsparumo antibiotikams molekuliniai mechanizmai	11
1.3 Atsparumo sunkiesiems metalams genai	15
1.4 Integronai.....	17
2 MEDŽIAGOS IR METODAI.....	19
2.1 Tyrimo objektas.....	19
2.2 Genominės DNR skyrimas	20
2.2 Polimerazės grandininė reakcija	21
2.4 DNR elektroforezė	25
3 REZULTATAI.....	27
3.1 Atsparumo antibiotikams genų paplitimas sąvartynų mikrobiotoje	27
3.1.1 Atsparumo antibiotikams genai veikiančio sąvartyno mėginiuose.....	28
3.1.2 Atsparumo antibiotikams genai sąvartynų filtratuose.....	29
3.1.3 Atsparumo antibiotikams genai nebeeksploatuojamo sąvartyno mėginiuose	29
3.1.4 Atsparumo antibiotikams genai kontrolinės (nuo taršos šaltinių nutolusios) zonos mėginiuose ...	31
3.2 Atsparumo sunkiesiems metalams genų paplitimas sąvartynų mikrobiotoje.....	31
3.4 Integronų paplitimas sąvartynų mikrobiotoje	33
4 REZULTATŲ APTARIMAS	35
IŠVADOS	38
SANTRAUKA	39
SUMMARY	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS	41

SANTRUMPOS

PBP – peniciliną prijungiantys baltymai

AAC - N-acetiltransferazės

ANT - O-nukleotidiltransferazės

APH - O-fosfotransferazės

MRSA - meticilinui atsparus auksinis stafilokokas

MLSB - makrolidas-likozamidas-streptograminas B

FMO - nuo flavino priklausomos monooksigenazės

RPP - ribosomų apsaugos baltymai

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

Tris- 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

bp – bazių pora

IVADAS

Nuolatos didėjantis antibiotikams atsparių bakterijų plitimas tampa vis aktualesne šiuolaikinio pasaulio problema. Atsparumo antibiotikams krizė siejama su per dideliu ir netinkamu antimikrobinių preparatų vartojimu ir per mažu investavimu į naujų alternatyvių vaistų kūrimą. Ypač trūksta antimikrobinių preparatų, kurie veiktų prieš naujas ir dideliu atsparumu pasižyminčias gramneigiamas bakterijas, tokias kaip *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Acinetobacter baumannii* (Ventola, 2015). Dėl atsparumo vaistams infekcijas tampa sunkiau arba neįmanoma gydyti, todėl didėja sunkių infekcinių ligų plitimo ir mirties rizika. Šiuo metu pasaulyje dėl atsparumo antimikrobinėms medžiagoms kasmet miršta mažiausiai 700 000 žmonių. Pasaulio sveikatos organizacija prognozuoja, kad iki 2050 m. šis skaičius gali išaugti iki 10 mln. žmonių, o tai rodo, kad ši sveikatos problema yra pirmajai svarbos klausimas (Mancuso ir kt., 2021).

Bakterijų atsparumas antibiotikams yra siejamas tiek su genų mutacijomis, tiek ir horizontalia genų pernaša tarp tų pačių ar skirtingų bakterijų rūšių kamienų. Be to, prie atsparumo antibiotikams didėjimo prisideda ir kitos geninės determinantės, pavyzdžiui: atsparumo sunkiesiems metalams genai bei integronai (Jian ir kt., 2021). Kovoiant su atsparumo antibiotikams problema būtina skatinti inovatyvius mokslinius tyrimus bei gerinti antimikrobinių vaistų suvartojimo stebėseną (Veepanattu ir kt., 2020).

Šio darbo tyrimo objektas - Lietuvos sąvartynai. Tokia aplinka pasirinkta, atsižvelgiant, kad sąvartynai yra svarbūs antibiotikų ir atsparumo antibiotikams genų rezervuarai. Juose yra įvairių teršalų, pavyzdžiui, sunkiųjų metalų, sunkiai degraduojamų organinių cheminių medžiagų, sudėtingų mikrobų konsorciūmų ir anaerobinių skaidymo procesų, kurie palengvina antibiotikams atsparių bakterijų atsiradimą ir vystymąsi (R. Zhang ir kt., 2022).

Darbo tikslas: nustatyti atsparumo antibiotikams ir sunkiesiems metalams genų paplitimą Lietuvos sąvartynų mikrobiotoje.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti atsparumo antibiotikams genų kompoziciją veikiančio sąvartyno dirvožemio mėginiuose.
2. Įvertinti atsparumo antibiotikams genų kompoziciją nebeeksploatuojamo sąvartyno dirvožemio mėginiuose.
3. Identifikuoti atsparumo antibiotikams genus sąvartynų filtratuose.
4. Įvertinti atsparumo genų paplitimą kontrolinėje nuo taršos šaltinių nutolusios zonos dirvožemio mėginiuose.
5. Įvertinti atsparumo sunkiesiems metalams genų ir integronų paplitimą sąvartynų dirvožemio mėginiuose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

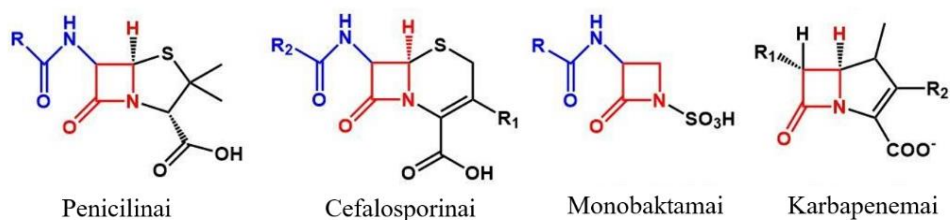
1.1 Antibiotikų klasifikacija ir atsparumo jiems mechanizmai

Antibiotikų sąvoka apima daugybę cheminių medžiagų, kurios gaminamos natūraliai, pusiau sintetiniu ar sintetiniu būdu ir naudojamos bakterijų augimui slopinti (bakteriostatiškai) arba bakterijoms nužudyti (baktericidiškai) (Manyi-Loh ir kt., 2018). Antibiotikai naudojami įvairiose srityse, įskaitant sveikatos sektorių, gyvulininkystę, žuvininkystę, sodininkystę, maisto produktų konservavimą ir kitas žmogaus ūkinės veiklos sritis (Meek ir kt., 2015). Šiai dienai išskiriama daugiau kaip 20 skirtingų antibiotikų klasių (Mahtab Uddin ir kt., 2021), iš kurių dažniausiai naudojami β-laktamai, aminoglikozidai, tetraciklinai, makrolidai, fluorochinolonai ir glikopeptidai (M. Ibrahim ir kt., 2020). Gausus ir neatsakingas antibiotikų vartojimas pagreitina antibiotikams atsparių bakterijų vystymąsi ir plitimą (Salam ir kt., 2023).

Antibiotikai turi daug patekimo kelių į aplinką, todėl jie aptinkami pačiose įvairiose ekosistemose ar net su žmogaus veikla neturinčioje nieko bendro aplinkoje. Žemės ūkio veikla (ypač tręšimas gyvulių atliekomis), akvakultūra, nuotekos yra pagrindiniai keliai, kuriais antibiotikai patenka į aplinką (Quaik ir kt., 2019). Atsparumo antibiotikams genai gali išlikti aplinkoje, o sąvartynai yra šių genų rezervuarai. Atsparumo antibiotikams genai gali išplisti į sąvartynų orą, vandenį ir dirvožemį (Li ir kt., 2024). Toliau šiame darbe aptariamos dažniausiai gamtoje paplitusios antibiotikų klasės ir pagrindinės jų savybės.

1.1.1 Beta-laktaminiai antibiotikai

Beta-laktamai yra plačiausiai pasaulyje naudojama antibiotikų klasė. Šiai klasei priklauso: penicilinai, cefalosporinai, monobaktamai ir karbapenemai (Pandey ir Cascella, 2023). Visų beta-laktaminių antibiotikų struktūros pagrindą sudaro reaktyvus beta-laktaminis žiedas, pavaizduotas 1.1 pav.



1.1 pav. Beta-laktaminių antibiotikų struktūra. Beta-laktaminis žiedas paryškintas raudonai (pagal Venkataravanappa ir kt., 2023)

Beta-laktaminiai antibiotikai yra labai efektyvūs, mažai toksiški ir veikia baktericidiškai (slopina peptidoglikano sintezę stabdant peptidų sujungimą), tačiau masinis jų naudojimas lėmė stipriai paplitusį atsparumą šiai antibiotikų klasei (Thakuria ir Lahon, 2013).

Bakterijų atsparumas beta-laktamams dažniausiai atsiranda bakterijoms gaminant fermentus beta-laktamazės, kurios hidrolizuoja beta-laktaminį žiedą. Beta-laktamazės gali būti serino arba metalo beta-laktamazės. Beta-laktaminiai antibiotikai veikia ties ląstelės peptidoglikanu, todėl beta-laktamazės yra sekretuojamos į terpę arba į periplazmą (Tooke ir kt., 2019). Dėl struktūros skirtumų cefalosporinai yra atsparesni stafilokokų gaminamoms beta-laktamazėms, lyginant su penicilinais (Craig ir Andes, 2015). Nors bakterijų atsparumas beta-laktamams dažniausiai pasireiškia gaminant beta-laktamazės, yra ir kitų atsparumo antibiotikams mechanizmų. Bakterijos siekdamos slopinti antibiotikų poveikį gali sumažinti prasiskverbimą į taikinio vietą (pvz. *Pseudomonas aeruginosa* atsparumas), pakeisti peniciliną prijungiančių baltymų (PBP) taikinio vietą (pvz. pneumokokų atsparumas penicilinui) ar išstumti iš periplazminės erdvės naudojant specifinius siurblio mechanizmus (M. E. Ibrahim ir kt., 2019).

1.1.2 Aminoglikozidai

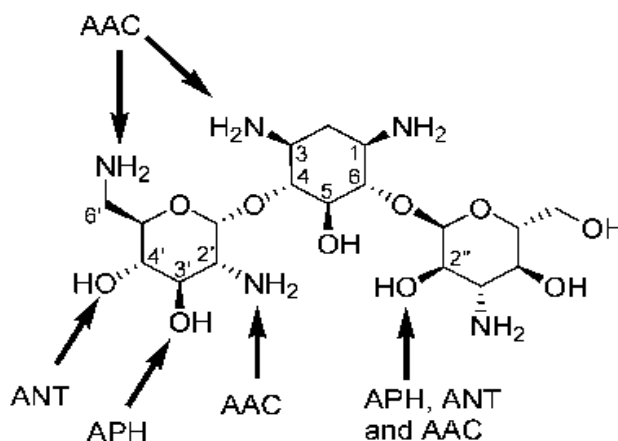
Aminoglikozidai yra stiprūs plataus veikimo spektro antibiotikai, kurie veikia slopindami baltymų sintezę. Šie antibiotikai skiriami kovoti prieš gram-neigiamas ir kai kurias gram-teigiamas bakterijas (Krause ir kt., 2016). Aminoglikozidiniai antibiotikai yra išskirtiniai tarp kitų baltymų sintezės inhibitorių tuo, kad jie yra baktericidiniai. Visi kiti baltymų sintezę slopinantys antibiotikai, įskaitant chloramfenikolį, tetraciklinus, makrolidus ir kitus, yra bakteriostatiniai (Waters ir Tadi, 2023). Aminoglikozidų šeimai priklauso tokie vaistai kaip gentamicinas, neomicinas, amikacinas, kanamicinas ir streptomicinas (Young ir kt., 2009). Streptomicinas yra pirmasis atrastas aminoglikozidinis antibiotikas, kuris pirmiausia vartojamas plaučių tuberkuliozės gydymui ir papildomai veikia kelias aerobines gram-neigiamas bakterijas. Kaip ir visi aminoglikozidai, streptomicinas yra baktericidinis antibiotikas. Streptomicinas prisijungia prie 16S RNR, esančios ant mažosios 30S ribosomos subvieneto, ir slopina jos veikimą bei stabdo tolesnę baltymų sintezę, slopindamas peptidinių jungčių susidarymą. Šiai dienai streptomicino aktyvumas yra stipriai sumažėjęs dėl besivystančio atsparumo antibiotikams (Waters ir Tadi, 2023). Kitas šios klasės antibiotikas gentamicinas naudojamas prieš gram-neigiamas bakterijas: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, taip pat *Staphylococcus* (Sojo-Dorado ir Rodríguez-Baño, 2023). Šis antibiotikas pasižymi dideliu atsparumu karščiui, tad išlieka stabilus net autoklavuojant (Mullins ir kt., 2016). Neomicinas yra efektyvus ir naudojamas prieš gram-neigiamas bakterijas. Jis ribotai absorbuojasi į kraujotaką, todėl yra ypač naudingas gydant virškinamojo trakto ligas (Veirup ir Kyriakopoulos, 2023). Tuo

tarpu kanamicinas gydymui beveik nenaudojamas, jį dažnai naudoja genų inžinerijoje kaip atrankos žymenį (Lipscomb ir kt., 2016).

Aminoglikozidai turi keletą pagrindinių atsparumo antibiotikams mechanizmų:

- Antibiotiko modifikavimas
- 16S rRNR metilinimas
- Antibiotiko išmetimas (Garneau-Tsodikova ir Labby, 2016).

Atsparumas aminoglikozidams dažniausiai atsiranda dėl modifikavimo juos acetilinant, fosforilinant arba adenilinant. Šias reakcijas vykdo N-acetiltransferazės (AAC), O-nukleotidiltransferazės (ANT) ir O-fosfotransferazės (APH), pavaizduotos 1.2 paveikslėlyje. Modifikuoti aminoglikozidai negali jungtis prie ribosomų 30S subvienetų, dėl to tampa nebeaktyvūs (Busscher ir kt., 2005).

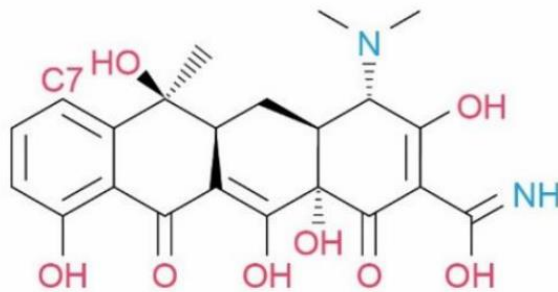


1.2 pav. Pagrindiniai aminoglikozidus modifikuojantys fermentai, veikiantys kanamiciną (pagal Busscher ir kt., 2005)

Atsparumas aminoglikozidams gali atsirasti ir dėl 16S ir 23S rRNR metilinimo. Šį atsparumą lemia fermentai rRNR metiltransferazės ArmA ir NpmA, kurios modifikuoja atitinkamai dvi pagrindines vietas G1405 ir A1408 A ir suteikia aukšto lygio atsparumą visiems kliniškai naudingiems aminoglikozidams. Metiltransferazės koduojantys genai randami plazmidėse (Lioy ir kt., 2014). Kai kurios bakterijos turi siurblius, skirtus aminoglikozidų išmetimui iš ląstelės (Jang, 2023). Pagrindinis aminoglikozidų siurblys – AcrAD-TolC sistema. Aminoglikozidų patekimas vyksta per hidrofiličius porino baltymų kanalus, o antibiotiko išmetimas per aktyvius transportinius siurblius (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Daugelyje gram-neigiamų bakterijų, įskaitant *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* pastebėta AcrAD-TolC sistema (Jang, 2023).

1.1.3 Tetraciklinai

Tetraciklinai yra plataus veikimo spektro antibiotikai, veikiantys bakteriostatiškai. Ši antibiotikų klasė jungiasi prie bakterijų ribosomų ir sąveikauja su labai konservatyvia 16S ribosominės RNR sritimi 30S ribosominiame subvienete, stabdydama transliaciją (Grossman, 2016). Tetraciklinai gali būti natūralūs (tetraciklinas, chlortetraciklinas, oksitetraciklinas ir demeklociklinas), pusiau sintetiniai (limeciklinas, meticiklinas, minociklinas, rolitetraciklinas ir doksiciklinas) ir nauji visiškai sintetiniai (tigeciklinas, eravaciklinas) (Shutter ir Akhondi, 2023). Tetraciklinų klasės vaistai turi bendrą struktūrą, kurią sudaro keturi angliavandeniliai žiedai, pavaizduoti 1.3 paveiksle, o skirtingos funkcinės grupės prijungtos prie angliavandenilių žiedų, nurodo, kaip kiekvienas vaistas prisideda prie antibakterinio aktyvumo (Bunick ir kt., 2021)

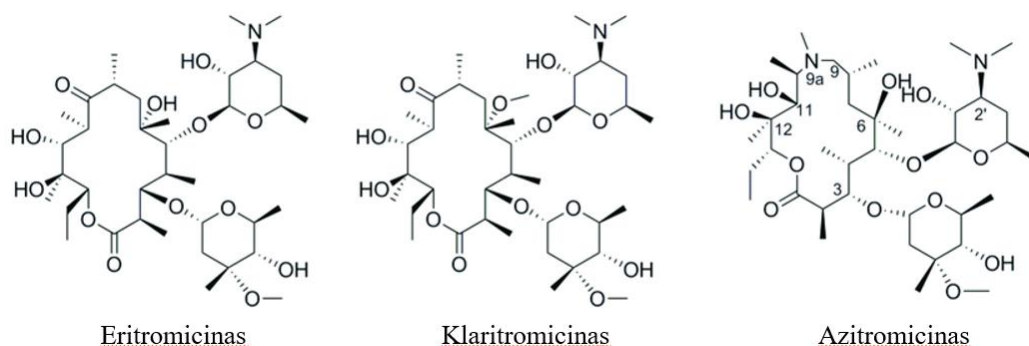


1.3 pav. Cheminė tetraciklino struktūra (pagal Bunick ir kt., 2021)

Keturi pagrindiniai mechanizmai, kuriais bakterijos tampa atsparios tetraciklinams yra tetraciklino išmetimas, antibiotiko modifikavimas, taikinio modifikavimas (rRNR mutacijos), ir ribosominė apsauga. Pirmuoju mechanizmu, bakterijose esantys siurbliai (TetA) išpumpuoja tetraciklinus iš citoplazmos (Bunick ir kt., 2021). Taip pat pastebėta, kad FMO šeimos tetraciklino destruktažės gali oksiduoti tetraciklinus, dėl to kovalentiškai sunaikinama antibiotiko struktūra ir antibiotikas tampa neaktyvus (Markley ir Wencewicz, 2018). Dar vienas atsparumo tetraciklinui mechanizmas – taikinio modifikavimas, stebimas tik bakterijose, turinčiose mažą 16S rRNR geno kopijų skaičių. 16S rRNR geno mutacijos pastebėtos *Propionibacterium acnes* (2-3 16S rRNR kopijos), *Helicobacter pylori* (1-2 16S rRNR kopijos), *Mycoplasma bovis* (1-2 16S rRNR kopijos) ir *S. pneumoniae* (4 16S rRNR kopijos) (Grossman, 2016). Galiausiai, ribosomų apsauga gali pasireikšti per ribosomų apsaugos baltymus (RPP), kurie sutrikdo tetraciklinų prisijungimą. TetO ir TetM suteikia atsparumą išstumdami tetracikliną iš 70S ribosomos. Apsauga yra specifinė tetraciklinams (Bunick ir kt., 2021).

1.1.4 Makrolidai

Makrolidai yra natūralūs junginiai, sudaryti iš laktono žiedo su prijungtomis angliavandenių liekanomis. Šiai antibiotikų klasei priklauso azitromicinas, klaritromicinas ir eritromicinas, pavaizduoti 1.4 pav. Makrolidai yra bakteriostatiniai vaistai ir veikia prisijungdami prie bakterijų 50S ribosominio subvieneto ir sustabdydami baltymų sintezę. Prisijungęs vaistas užkerta kelią iRNR translacijai (Patel ir Hashmi, 2023).



1.4 pav. Makrolidinių antibiotikų struktūra. (pagal C. M. Wang ir kt., 2017)

Viena pagrindinių atsparumo makrolidams priežasčių yra taikinio modifikavimas, kai metilinama bakterijų 23S rRNR. Makrolidai, linkozamidai ir streptogramino B antibiotikai turi sutampančias prisijungimo vietas 23S rRNR, todėl *erm* genų raiška suteikia kryžminį atsparumą ir prieš kitas antibiotikų klases - linkozamidus ir streptograminus (Munita ir Arias, 2016). Kiti atsparumo makrolidams mechanizmai yra išmetimas iš ląstelės (veikia Mef išmetimo siurbliai) ir antibiotiko modifikavimas. Už antibiotiko modifikavimą yra atsakingos fosfotransferazės ir esterazės, kurios fosforilina ir skaido makrolidus. Tuomet makrolidai nebegali prisijungti prie taikinių ribosomoje (Schroeder ir kt., 2019).

1.1.5 Chloramfenikolis ir florfenikolis

Chloramfenikolis yra plataus veikimo spektro antibiotikas, naudojamas prieš gram-teigiamas, gram-neigiamas ir anaerobines bakterijas. Šis antibiotikas yra išskiriamas iš *Streptomyces* genties bakterijų, tačiau dėl galimo šalutinio poveikio vartojamas retai, kai kiti mažiau pavojingi antimikrobiniai vaistai yra neveiksmingi ar netoleruojami. Chloramfenikolis veikia bakteriostatiškai (slopina baltymų sintezę), tačiau didelė jo koncentracija gali veikti baktericidiškai (Abdollahi ir Mostafalou, 2023).

Florfenikolis yra tiamfenikolio darinys, kurio veikimo mechanizmas toks pat kaip chloramfenikolio (Papich, 2016). Šis sintetinis tiamfenikolio ir chloramfenikolio analogas veikia

slopindamas ribosominį aktyvumą, taip sutrikdydamas bakterijų baltymų sintezę (Trif ir kt., 2023). Florfenikolis pasižymi plačiu antibakterinio aktyvumo spektru ir yra aktyvesnis už chloramfenikolį ar tiamfenikolį (Papich, 2016).

Dažniausiai pasitaikantis bakterijų atsparumo chloramfenikoliui ir florfenikoliui mechanizmas yra antibiotiko modifikavimas per įvairių tipų chloramfenikolio acetiltransferazes. Tačiau yra ir kitų atsparumo mechanizmų, pavyzdžiui, inaktyvacija fosfotransferazėmis, taikinio vietos mutacijos, chloramfenikolio fosforilinimas ir hidrolizė, taip pat specifiniai arba daugiavaisčio atsparumo siurbliai gali išmesti antibiotiką (Schwarz ir kt., 2004).

1.1.6 Chinolonai

Chinolonai yra sintetiniai, baktericidiniai, plataus veikimo spektro antibiotikų klasė, galinti stabdyti tiek gramneigiamų, tiek gramteigiamų bakterijų, įskaitant anaerobus, veiklą. Jie veikia prisijungdami prie bakterijų II tipo topoizomerazės fermentų ir sutrikdydami DNR sintezės kelią (Pham ir kt., 2019).

Dažniausiai atsparumą chinolonams lemia taikinio modifikavimas. Specifinės taikinio fermentų mutacijos susilpnina chinolono aktyviosios vietos ir fermento sąveiką. Taip pat atsparumą chinolonams lemia DNR girazę saugantys baltymai, kurie saugo nuo sąveikos su antibiotiku. Dar vienas atsparumo chinolonams mechanizmas – išmetimo siurbliai, kurie gali pašalinti chinolonus iš ląstelės ar sumažinti jų koncentraciją ląstelėje ir veiksmingumą prieš bakterijas (Sparkes ir Enoch, 2023).

1.1.7 Glikopeptidai

Glikopeptidai – baktericidiniai antibiotikai, plačiai naudojami kovoje prieš sunkias infekcijas, kurias sukelia gram-teigiamos bakterijos, pavyzdžiui, *Staphylococcus aureus* (Xu ir kt., 2022). Šie antibiotikai blokuoja peptidoglikano sintezę, tiksliau ląstelės sienelės biosintezės transglikozilinimo ir (arba) transpeptidacijos etapus (D’Achille ir Morrone, 2023). Glikopeptidinius antibiotikus galima suskirstyti į dvi kartas: pirmosios kartos glikopeptidus (vankomiciną ir teikoplaniną), kuriuos gamina dirvožemyje gyvenantys aktinomicetai, ir antrosios kartos glikopeptidus (dalbavancinas, oritavancinas ir telavancinas), kurie yra pusiau sintetiniai dariniai (Marcone ir kt., 2018).

Labiausiai išnagrinėtas ir sudėtingiausiai valdomas yra enterokokų atsparumas glikopeptidams (Levitus ir kt., 2023). Šį atsparumą lemia operonai, koduojantys specifinius fermentus. Iki šiol aprašyti devyni atsparumo operonai, įskaitant *vanA* ir *vanB*, kurie dažniausiai

aptinkami tarp klinikinių izoliatų (Lebreton ir Cattoir, 2019). Atsparios vankomicinui bakterijos pentapeptido gale vietoj Ala-Ala aminorūgščių turi Ala-Lac, tokios sekos vankomicinas negali atpažinti, todėl bakterija išvengia vankomicino ir toliau dalijasi (Selim, 2022).

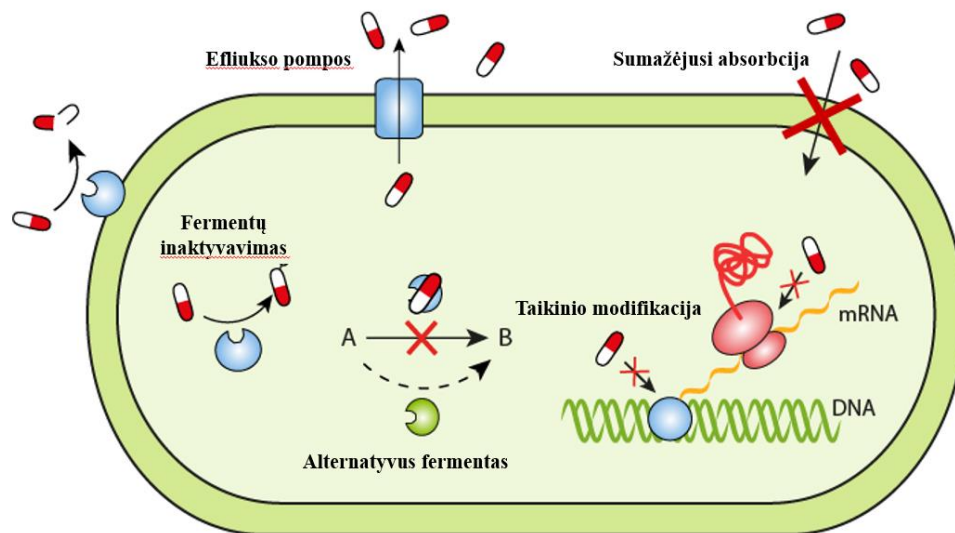
1.2 Atsparumo antibiotikams molekuliniai mechanizmai

Bakterijų atsparumas antibiotikams gali būti įgimtas arba įgytas. Įgimtas atsparumas būdingas konkrečiai rūšiai ir priklauso nuo mikroorganizmo biologijos (pavyzdžiui, *Escherichia coli* turi įgimtą atsparumą vankomicinui), o įgytas atsparumas paprastai atsiranda dėl:

- ląstelių genų mutacijų (chromosominės mutacijos) ar
- horizontalaus genų perdavimo.

Chromosominės mutacijos (dar vadinamos spontaninės mutacijos) yra gana retos (viena 10^6 – 10^8 mikroorganizmų populiacijoje) ir dažniausiai lemia atsparumą struktūriškai giminingiems junginiams. Šios mutacijos pasireiškia kaip replikacijos klaidos arba kaip klaidinga pažeistos DNR pataisa. Dauguma mutacijų atsiranda besidalijančiose ląstelėse, tačiau jos gali atsirasti ir nesidalijančiose ar lėtai besidalijančiose ląstelėse. Kai kurie biocheminio atsparumo mechanizmai yra mutacijų rezultatas. Tuo tarpu, horizontalus genų perdavimas vyksta, kai genetiniai elementai, kurie nulemia atsparumą antibiotikui, yra perduodami kitai netoliese esančiai bakterijai. Atsparumo genai gali būti perduodami plazmidėmis (konjugacija arba transformacija), transpozonais (konjugacija), integronais ir bakteriofagais (transdukcija) (Giedraitienė ir kt., 2011).

Atsparumas vienai antibiotikų klasei gali būti pasiekiamas keliais biocheminiais keliais. Skirtingos bakterijos, siekdamos išlikti atsparios antibiotiko poveikiui, gali teikti pirmenybę vieniems atsparumo mechanizmams negu kitiems. Pavyzdžiui, gramneigiamos bakterijos, siekdamos apsisaugoti nuo betalaktaminių antibiotikų, gamina β -laktamazes, o granteigiami organizmai dažniausiai modifikuoja betalaktamo taikinio vietą - peniciliną jungiančius baltymus (PBP) (Munita ir Arias, 2016). Bakterijų atsparumo antibiotikams strategijos yra: antibiotiko inaktyvacija, aktyvus antibiotiko pašalinimas (efliukso pompos), antibiotiko transportavimo stabdymas, taikinio modifikacija, alternatyvaus metabolinio kelio įjungimas ir atsparumas dėl bendros ląstelės adaptacijos. (pav. 1.5) (Jian ir kt., 2021)



1.5 pav. Bakterijų atsparumo antibiotikams strategijos (pagal El-Liethy ir kt., 2023)

Cheminė antibiotiko modifikacija

Viena iš sėkmingiausių bakterijų kovos su antibiotikais strategijų - gaminti fermentus, kurie inaktyvuoja vaistą į junginį įtraukdami tam tikrą cheminę dalį, arba kurie sunaikina pačią molekulę, todėl antibiotikas negali sąveikauti su savo taikiniu. Toks atsparumo antibiotikams mechanizmas vadinamas chemine antibiotiko modifikacija ir yra būdingas tiek gram-neigiamoms, tiek gram-teigiamoms bakterijoms (Jian ir kt., 2021). Pagrindiniai fermentai, kurie inaktyvuoja antibiotikus yra: β -laktamazės, aminoglikozidus modifikuojantys fermentai ir chloramfenikolio acetyltransferazės (Giedraitienė ir kt., 2011).

Šiuo metu yra aprašyta daugiau kaip 300 skirtingų β -laktamazės fermentų. Plataus veikimo spektro beta-laktamazės koduoja *bla* genai, kurie gali būti aptinkami tiek chromosomoje, tiek mobiliuose geno elementuose. β -laktamazės sukelia penicilinų ir cefalosporinų beta-laktamo žiedo hidrolizę, kurios metu susidaro neaktyvus produktas (Bello-López ir Rojo-Medina, 2017). Dauguma plataus veikimo spektro betalaktamazių išsivystė genetinės mutacijos būdu iš pirminių β -laktamazių, ypač TEM-1, TEM-2 ir SHV-1, aptinkamų gramneigiamose bakterijose (pvz., *Enterobacteriaceae*) (Fang ir kt., 2008). Taip pat bakterijos (pvz., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) gali gaminti CTX-M tipo β -laktamazės, kurios nėra nei TEM, nei SHV atmaina, bei OXA tipo fermentus, būdingus *Pseudomonas aeruginosa* bakterijoms (Eckert ir kt., 2006).

Bakterijos taip pat geba gaminti aminoglikozidus modifikuojančius fermentus, kurie keičia ir inaktyvuoja aminoglikozidinius preparatus ir suteikia atsparumą aminoglikozidams. Aminoglikozidus modifikuojantys fermentai gali būti skirstomi į tris poklasių: aminoglikozidų N-acetyltransferazės (AAC), aminoglikozidų O-nukleotidiltransferazės (ANT) ir aminoglikozidų O-

fosfotransferazės (APH). Kiekvienas fermentų poklasis modifikuoja aminoglikozidą skirtingoje padėtyje, susilpnina modifikuotų aminoglikozidinių antibiotikų ir bakterijų ribosomų giminingumą, todėl atsiranda atsparumas vaistams (Y. Zhang ir kt., 2023).

Kai kurioms bakterijoms būdingas genas *catI*, koduojantis fermentą chloramfenikolio acetiltransferazę. Chloramfenikolio acetiltransferazė I detoksikuoja antibiotiką chloramfenikolį ir suteikia bakterijoms atsparumą chloramfenikoliui (Mosa ir kt., 2015).

Aktyvus antibiotiko pašalinimas iš ląstelės (efliukso pompos)

Efliukso pompos – tai membranos baltymai, kurie eksportuoja antibiotikus iš ląstelės ir palaiko žemą jų viduląstelinę koncentraciją. Visų klasių antibiotikai, išskyrus polimiksinus, yra jautrūs efliukso sistemų aktyvumui. Dauguma efliukso pompų gali perpumpuoti daugybę nesusijusių antibiotikų - makrolidus, tetraciklinus, fluorochinolonus (Giedraitienė ir kt., 2011). Kai efliukso siurblio ekspresija yra pernelyg didelė, jis taip pat gali sukelti atsparumą anksčiau jautriems antibiotikams. Efliukso siurbliai ypatingi tuo, kad gali suteikti atsparumą ne tik antibiotikams, bet ir sunkiesiems metalams, išnešdami metalo jonus, tokius kaip Ag^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} ir Ni^{2+} . *Pseudomonas aeruginosa* siurblio sistema MexXY pripažinta vienu iš pagrindinių atsparumą aminoglikozidams lemiančių veiksnių (Jian ir kt., 2021).

Pagal energijos šaltinį, naudojamą substratams išpumpuoti, efliukso pompos gali būti skirstomos į pirmines ir antrines. Išstūmimo siurbliai, kurie energiją substratams per membraną perkelti gauna ATP hidrolizės metu, vadinami pirminiais išstūmimo siurbliais, o tie, kurie energiją gauna iš elektrocheminių gradientų, kuriuos sudaro protonai arba jonai, vadinami antriniais išstūmimo siurbliais. Iki šiol bakterijose buvo nustatytos šešios pagrindinės išstūmimo siurblių šeimos: ABC (ang. ATP-binding cassette superfamily), MFS (ang. major facilitator superfamily), MATE (ang. multidrug and toxic compound extrusion), RND (ang. resistance nodulation cell division family), SMR (ang. small multidrug resistance family) ir PACE (ang. proteobacterial antimicrobial compound efflux family). Nors yra įvairių tipų išstūmimo siurblių, tačiau tarp visų siurblių klasių egzistuoja substratų perteklius, todėl vieną antibiotiką gali eksportuoti keli skirtingi efliukso siurbliai, o vienas efliukso siurblys gali eksportuoti struktūriškai ir chemiškai skirtingus substratus (Gaurav ir kt. 2023).

MFS šeima yra didžiausia žinoma antrinių transporterių šeima, aptinkama bakterijose, archėjose ir eukariotuose. Literatūroje pateikiama virš 20 *Tet* genų, koduojančių membraninius baltymus, kurie priklauso MFS šeimai. Tarp šių genų priklauso ir Tet(A), Tet(B), Tet(C) ir Tet(D) genai, kurie daugiausia identifikuojami gram-neigiamose bakterijose (Pazra ir kt., 2023). Taip pat

bakterijose dažnai aptinkami Tet(L) ir Tet(K) genai, dominuojantys gram-teigiamose bakterijose (Soares ir kt., 2012). Atsparumo makrolidams genams priklauso *mef* (pvz. *mefA*, *mefE*) ir *msr* (pvz. *msrA*) (Suzuki ir kt., 2022). O atsparumą chinolonams gali suteikti *qepA1* genas, kuris koduoja efliukso siurblių, priklausančių MFS šeimai. (Brandis ir kt., 2021).

Antibiotiko patekimo stabdymas

Antibiotikų patekimas per bakterijų membranas yra esminis žingsnis, lemiantis jų poveikį specifiniams viduląsteliniais taikiniams. Dažniausiai antibiotiko įsisavinimo ribojimo mechanizmas būdingas gram-neigiamoms bakterijoms. Yra aprašomi du keliai, kuriais antibiotikai gali prasiskverbti pro išorinę membraną: hidrofobiniams antibiotikams (pvz. makrolidai) - per lipidus, o hidrofiliniams antibiotikams (pvz. β -laktamai) - per porinus (Delcour, 2009). OmpC ir OmpF yra du pagrindiniai išorinės membranos baltymai, kurie tarnauja kaip barjeras antibiotikams ir kitoms toksinėms medžiagoms, patenkančioms į ląstelės vidų. *OmpC* ir *OmpF* genus transkripcijos būdu reguliuoja dviejų komponentų reguliavimo sistema OmpR-EnvZ. Ši atsparumo antibiotikams strategija yra įvardijama *Salmonella Enteritidis* bakterijoje, manoma, kad dėl EnvZ/OmpR dviejų komponentų sistemos bakterija yra labai atspari įvairiems antibiotikams, ypač β -laktamams. (Masi ir Pagès, 2013).

Taikinio modifikacija

Dar viena bakterijų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms strategija - išvengti antibiotiko veikimo, pakeičiant jo taikinio vietą. Kad tai pasiektų, bakterijos išvystė įvairias taktikas, įskaitant taikinio apsaugą, neleidžiančią antibiotikui pasiekti jo prisijungimo vietas, ir taikinio vietos modifikacijas, dėl kurių sumažėja giminingumas antibiotiko molekulei (Munita ir Arias, 2016). Taikinio modifikacija veikia prieš kelių klasių antibiotikus, įskaitant β -laktamus, glikopeptidus, makrolidus, linkosamidus, streptograminus ir aminoglikozidus (Peterson ir Kaur, 2018). Tikslinės vietos pokyčius dažnai lemia savaiminė bakterijos chromosomoje esančio geno mutacija ir atranka veikiant antibiotikui. Kaip pavyzdį galima paminėti RNR polimerazės ir DNR girazės mutacijas, dėl kurių atsiranda atsparumas atitinkamai rifamicinams ir chinolonams (Lambert, 2005).

Daugelis antibiotikų veikia blokuodami baltymų sintezę bakterijų ribosomoje. Visų pirma, antibiotikai prisijungia prie ribosomų ir gali sutrikdyti iRNR translaciją arba blokuoti peptidinių jungčių formavimąsi peptidiltransferazės aktyviame centre (Lambert, 2012). Tačiau kai kurios modifikacijos gali padėti apsaugoti ribosomas. Bakterijose plačiai paplitę ribosomų apsaugos baltymai (ypač Tet(O) ir Tet(M)), kurie suteikia atsparumą tetraciklinui, prisijungdami prie

ribosomos ir neleisdami prisijungti tetraciklinui (Dönhöfer ir kt., 2012). Erm šeimos baltymai koduoja metiltransferazes, metilinančias 23S rRNR V domeno A2058 nukleotido N-6 padėtį. Dėl A2058 pozicijos dimetilimo, kuris sudaro MLSB antibiotikų sąveikos vietą, atsiranda atsparumas makrolidams, linkozamidams ir streptograminams. Erm dimetiltransferazių gamyba daugelyje patogeninių bakterijų yra labiausiai paplitęs atsparumo makrolidams mechanizmas (Takaya ir kt., 2013).

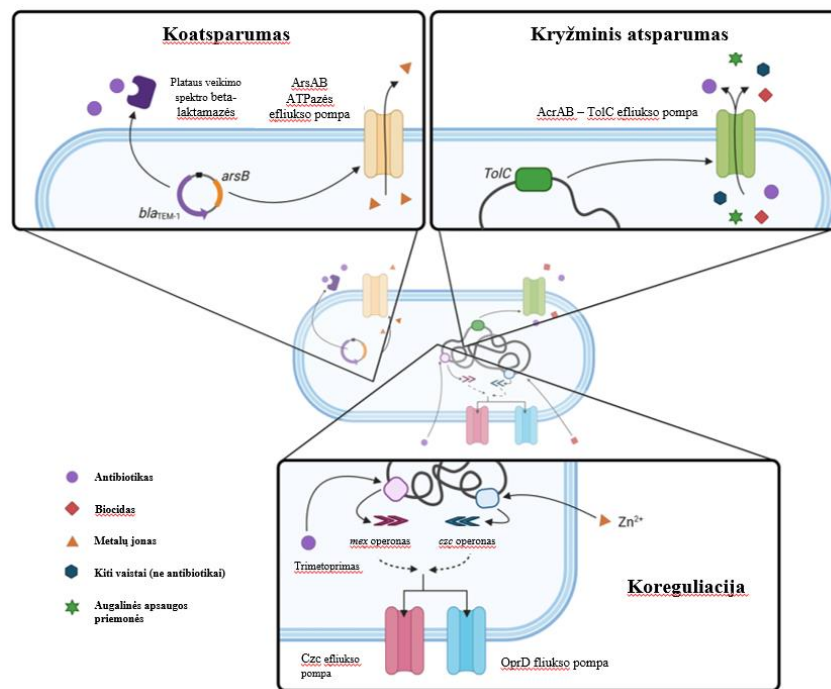
Alternatyvaus metabolinio kelio įjungimas (ang. metabolic bypass)

Taikant šį metodą bakterijos gali sukurti naujus taikinius, kurie atlieka panašias metaboline funkcijas kaip ir pirminis taikiny, tačiau jų neslopina antibiotiko molekulė. Du svarbiausi klinikiniai pavyzdžiai - enterokokų atsparumas vankomicinui, atsiradęs dėl peptidoglikano struktūros pokyčių, kuriuos sukelia *van* genų grupės, ir *S. aureus* atsparumas meticilinui, atsiradęs dėl egzogeninių PBP (Joshi ir Patil, 2023). Dar vienas būdas išvengti antimikrobinio poveikio - „apeiti“ metabolinį kelią, kurį slopina antibiotikas, perprodukuojant antibiotiko taikinį. Šio mechanizmo pavyzdys yra atsparumas trimetoprimui-sulfametoksazolui (TMP-SMX). Šio mechanizmo metu dalyvauja du pagrindiniai fermentai - dihidroptero rūgšties sintetazė (DHPS), kuri slopina SMX, ir dihidrofolato reduktazė (DHFR), kuri slopina TMP. Nors atsparumą TMP-SMX galima sukurti taikant kelias strategijas, „apėjimo“ strategija yra DHFR arba DHPS perprodukcija dėl mutacijų šiuos fermentus koduojančios DNR promotoriaus srityje. Šios mutacijos lemia padidėjusią minėtų fermentų gamybą, „užgožiančią“ TMP-SMX gebėjimą slopinti folatų gamybą ir leidžiančią bakterijoms išgyventi (Munita ir Arias, 2016).

1.3 Atsparumo sunkiesiems metalams genai

Antibiotikai yra svarbus, bet ne vienintelis veiksnys, darantis įtaką atsparumo antibiotikams genų plitimui. Aplinkoje esantys sunkieji metalai veikia kaip selektyvus veiksnys plintant atsparumo antibiotikams genams (Fu ir kt., 2023). Dažniausiai aplinkoje aptinkami tokie sunkieji metalai kaip švinas (Pb), chromas (Cr), arsenas (As), cinkas (Zn), kadmio (Cd), varis (Cu), gyvsidabris (Hg) ir nikelis (Ni). Dirvožemis yra pagrindinis šių metalų rezervuaras, skirtingai nei organiniai teršalai, metalai nepasiduoda nei mikrobiniam, nei cheminiam skilimui, todėl jų bendra koncentracija dirvožemyje išlieka ilgą laiką po patekimo į aplinką (Wuana ir Okieimen, 2011).

Metalai gali nulemti atsparumą antibiotikams lemiančių genų selektyvią atranką (1.6 pav.).



1.6 pav. Koatsparumo, kryžminio atsparumo ir bendro atsparumo metalams ir antibiotikams reguliavimo mechanizmai. A paveikslėlyje pavaizduotas atsparumo metalams genas *arsB* ir atsparumo antibiotikams genas *bla_{TEM-1}*, abu yra plazmidėje ir gali būti paveldimi kartu (koatsparumas). B paveikslėlyje pavaizduotas AcrAB-TolC efluksio siurblio genas, kuris gali iš ląstelės išpumpuoti kelis antibiotikus ir biocidus (kryžminis atsparumas). C paveikslėlyje *mex* operono ir *czc* operono transkripcijos keliai yra susiję, todėl bet kurio iš jų ekspresija lemia ir *czc*, ir *oprD* efflux siurblių ekspresiją (koreguliacija) (pagal Murray ir kt., 2024)

Atsparumo metalams genai ir atsparumo antibiotikams genai gali būti genetiškai susiję DNR fragmente, todėl paveldimi kartu (Murray ir kt., 2024). Pastebėta, kad atsparumo metalams ir antibiotikams genai, nors ir rečiau, gali kartu egzistuoti ir mobiliuose genetiniuose elementuose, pvz., plazmidėse. Atsparumo sunkiesiems metalams operonai paprastai yra stabiliai integruoti į kai kurių bakterijų chromosomas, tačiau jie taip pat gali būti endogeninėse plazmidėse arba transpozonuose. Lokalizacija tame pačiame klasteryje (koatsparumas) lemia bendrą šių atsparumo genų atranką (Chenia ir Jacobs, 2017). Bakterijos, turinčios įgimtą atsparumą sunkiesiems metalams genams yra geriau prisitaikę išgyventi aplinkoje, jos dauginasi, gali įgyti ir atsparumo antibiotikams genams (Murray ir kt., 2024). Dar vienas bakterijoms būdingas mechanizmas – kryžminis atsparumas. Kryžminis atsparumas atsiranda tada, kai vienas mechanizmas (pvz., išstūmimo siurblys) vienu metu suteikia atsparumą skirtingiems junginiams. Pavyzdžiui, *Salmonella typhimurium* atveju BaeSR reguliuojamas AcrD ir MdtABC vaistų išstūmimo sistemos lemia atsparumą variui, cinkui ir β -laktaminiams antibiotikams. *Listeria monocytogenes* atveju, vaistų išstūmimo siurblys, kurį koduoja MdrL baltymas, išstumia sunkiuosius metalus - cinką, kobaltą ir kadmį, taip pat antibiotikus - eritromiciną, klindamiciną, ir biocidus, tokius kaip benzalkonio chloridas (Pal ir kt., 2017). Be bendro ir kryžminio atsparumo, bendro reguliavimo

intI5 integrazės geną (Shetty ir kt., 2023). Genų kasetėse identifikuota daugiau kaip 60 skirtingų atsparumo antibiotikams genų. Integronai labai svarbūs horizontaliam genų pernešimui, kadangi jie gali perkelti genus iš bakterijų chromosomų į plazmides ir integrazės pagalba integruoti juos į tikslinį patogeninį šeimininką ar komensalias bakterijų rūšis. Be to šie genetiniai elementai gali paimti atsparumo antibiotikams genus iš juos supančios aplinkos ir vėliau įtraukti juos į savo genų kasetes per konkrečiai vietai būdingą rekombinaciją (Bhat ir kt., 2023).

2 MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimams buvo surinkti 26 dirvožemio mėginiai iš skirtingų Lietuvos vietovių:

- Kazokiškių – veikiančio sąvartyno;
- Kariotiškių – nebeeksploatuojamo sąvartyno;
- Molėtų rajono – kontrolinės zonos.

Mėginiai buvo renkami bendradarbiaujant su Vilniaus universiteto Ekologijos ir aplinkotyros centru. Mėginių surinkimo vietos su koordinatėmis nurodytos 2.1 – 2.2 paveiksle. Vėliau dirvožemio mėginiai buvo nugabenti į Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratoriją ir laikomi -70°C temperatūroje iki tolimesnių darbų.



2.1 pav. Kazokiškių mėginių išsidėstymo žemėlapis



2.2 pav. Kariotiškių mėginių išsidėstymo žemėlapis

2.2 Genominės DNR skyrimas

Remiantis gamintojo rekomendacijomis, iš dirvožemio mėginių buvo išskirta genominė DNR naudojant ZymoBIOMICS™ DNR rinkinį (Zymo Research, JAV). Genominės DNR koncentracija pamatuota spektrofotometru NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, JAV). Išskirti mėginiai buvo saugomi -20°C temperatūroje.

Genominė DNR išskirta iš 26 dirvožemio mėginių, kurie suskirstyti pagal jų surinkimo vietą:

- Kazokiškių sąvartyno dirvožemio mėginiai: KZ1 (T), KZ2 (T), KZ3 (T), KZ4 (T), KZ4 (B), KZ5 (T), KZ5 (B)
- Kazokiškių filtratų mėginiai: KZ1 (F), KZ2 (F), KZ2 (F(2))
- Kariotiškių sąvartyno mėginiai: KR1 (T), KR1 (B), KR2 (T), KR2 (B), KR3 (T), KR3 (B), KR4 (T), KR4 (B), KR5 (T)
- Molėtų rajono dirvožemio mėginiai: C1 (T), C1 (B), C2 (T), C2 (B), C3 (T), C3 (B), C4 (B)

Dirvožemio mėginiai buvo surinkti paviršiniame dirvožemio sluoksnyje (tokiu atveju mėginys žymimas T- top) ir 10 cm gylyje (tokiu atveju mėginys žymimas B – bottom).

2.2 Polimerazės grandininė reakcija

Siekiant nustatyti atsparumo antibiotikams ir sunkiesiems metalams genus buvo atlikta polimerazės grandininė reakcija (PGR).

PGR reakcija buvo atliekama naudojant Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, JAV) pagal 2.2 lentelėje nurodytas sąlygas.

2.2 lentelė. PGR reakcijos sąlygos.

Etapai		Temperatūra (°C)	Trukmė	Ciklai
1.	Pradinė denatūracija	95	2 min	1
2.	Denatūracija	95	30 s	35
	Pradmenų prisijungimas (prilipimas)	48 – 72 ¹	30 s	
	Grandinės ilginimas	72	45-60 s ²	
3.	Baigiamasis ilginimas (inkubacija)	72	5 min	1

Pradmenų poros parinktos išsamiai išanalizavus literatūrą ir atsižvelgiant į anksčiau atliktus tyrimus. Naudoti pradmenys taikomi dažniausiai gamtoje paplitusiems atsparumo antibiotikams ir sunkiesiems metalams genams nustatyti. Pradmenys pateikti 2.3 – 2.11 lentelėse.

2.3 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo beta-laktamams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>ctx-M</i>	FCTXU	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	60	(Eckert et al., 2006)
	RCTXU	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG		
<i>oxa1</i>	FIOXA1	GAT ATC TCT ACT GTT GCA TCT C	54	(Fang et al., 2008)
	RIOXA1	AAT AAA CCC TTC AAA CCA TCC G		

¹ Pradmenų prisilydimo temperatūra buvo apskaičiuota pagal naudotą pradmenų porą, temperatūras galima matyti 2.3 - 2.5 lentelėse.

² Grandinės ilginimo trukmė apskaičiuota pagal oligonukleotido bazių poros dydį.

<i>oxa2</i>	FOXA2	GCC AAA GGC ACG ATA GTT GT	57	
	ROXA2	TCA TCC ATC CTG TTT GGC GT		
<i>oxa23</i>	FOXA23	TTA GCA CCT ATG GTA ATG CTC T	57	
	ROXA23	TCC ACC CAA CCA GTC AAC CA		
<i>Shv</i>	F1SHV	AGG ATT GAC TGC CTT TTT GCG	57	
	R1SHV	ATT TGC TGA TTT CGC TCG GC		

2.4 lentelė. Tyrimė naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo aminoglikozidams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>aadE</i>	FANT-6	AGCCGGAGGATATGGAATTAT	57	(Ramirez and Tolmasky, 2010)
	RANT-6	TTCATAGGAATCCATCCGGTA		
<i>aadA1</i>	FANT-3	CGC CGA AGT ATC GAC TCA AC	58	(Chen et al., 2004)
	RANT-3	GCG GGA CAA CGT AAG CAC TA		
<i>aadA2</i>	FAAD2	GCTCAATGACCTTATGAAGGC	58	(Šeputiene et al., 2006)
	RAAD2	GCGGGACAACGTAAGCACTA		
<i>aadB</i>	FANTIa	GAGCGAAATCTGCCGCTCTG	58	(Vakulenko et al., 2003)
	RANTIa	CTGTTACAACGGACTGGCC		
<i>strB</i>	FAPH -6	ATC GTC AAG GGA TTG AAA CCT A	57	(Madsen et al., 2000)
	RAPH -6	GGA TCG TAG AAC ATA TTG GCG		
<i>aphA1</i>	FAPHI	ATGGGCTCGCGATAATGTC	57	Sheryl et al., 2008
	RAPHI	CTCACCGAGGCAGTTCCAT		
<i>aphA2</i>	FAPHII	GAACAAGATGGATTGCACGC	55	(Maynard et al., 2003)
	RAPHII	GCTCTTCAGCAATATCACGG		
<i>aph(3'')-I</i>	F1APH-3	CTT GGT GAT AAC GGC AAT TCC	59	(Madsen et al., 2000)
	R1APH-3	CCA ATC GCA GAT AGA AGG CAA		
<i>aacC1</i>	FAAC3I	AGCAGCAACGATGTTAACGCA	61	(Ramirez and Tolmasky, 2010)
	RAAC3I	CTGCGGGATCGTCACCGTA		
<i>aadA4</i>	FAAC6b	AGT ACA GCA TCG TGA CCA ACA	59	(Machado et al., 2006)
	RAAC6b	ATG TAC ACG GCT GGA CCA TC		
<i>aacC3</i>	FAAC3Iia	GGTT CGG CCT GCT GAA TCA	60	(Ramirez and Tolmasky, 2010)
	RAAC3Iia	AA GCC CAC GAC ACC TTC TC		
<i>aac(3)IV</i>	FAAC3IV	GATGGGCCACTTGGACTGAT	59	(Chen et al., 2005)
	RAAC3IV	GCGCTCACAGCAGTGGTCAT		

2.5 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo tetraciklinams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>tetA</i>	FTETA	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	57	(Ng et al., 2001)
	RTETA	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG		
<i>tetB</i>	FTETB	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	56	
	RTETB	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG		
<i>tetC</i>	FTETC	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	58	
	RTETC	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC		
<i>tetD</i>	FTETD	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	55	
	RTETD	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC		
<i>tetM</i>	FTETM	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	56	
	RTETM	CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC		

2.6 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo makrolidams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>ermA</i>	FermA	GAAGCGGTAAACCCCTCTG	58	(Seputiene et al., 2012)
	RermA	ACCCAAAGCTCGTTGCAGAT		
<i>ermB</i>	FermB	ATTGGAACAGGTAAAGGGCAT	56	
	RermB	ATCTGGAACATCTGTGGTATG		
<i>mefAB</i>	FmefAB	AGTATCATTAACTACTAGTGCC	54	
	RmefAB	GTTCTTCTGGTACTAAAAGTGG		

2.7 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo chloramfenikoliui ir florfenikoliui genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>catI</i>	FCATI	CT ATA ACC AGA CCG TTC AGC T	58	(Lastauskienė et al., 2021)
	RCATI	TAA GCA TTC TGC CGA CAT GGA		
<i>floR</i>	FFLO	GTT TCA GGT GGC ACG AAA CC	57	
	RFLO	CGG ACA CCG TGA AGA CAA TA		

2.8 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo chinolonams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>qnrA</i>	FqnrA	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	55	(Gay et al., 2006)
	RqnrA	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA		
<i>qnrB</i>	FqnrB	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	56	
	RqnrB	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
<i>qnrS</i>	FqnrS	ACGACATTCGTCAACTGCAA	57	
	RqnrS	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
<i>qnrD</i>	FqnrD	CGAGATCAATTTACGGGGAAT	58	(Xia et al., 2010)
	RqnrD	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
<i>qepA1</i>	FqepA1	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	60	(Yamane et al., 2008)
	RqepA1	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG		

2.9 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo glikopeptidams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>vanA</i>	FvanA	TCAGCTTTGCATGGCAAGTC	59	(Dutka-Malen et al., 1995)
	RvanA	GCTCCTCTGCTGAAAGGTCT		
<i>vanB</i>	FvanB	CGGCAGGACAATATGATGGA	57	
	RvanB	GCTGTCAATCAGTGCAGGAA		
<i>vanC1</i>	FvanC1	GGTATCAAGGAAACCTC	50	
	RvanC1	CTTCCGCCATCATAGCT		
<i>vanC2/3</i>	FvanC23	CTCCTACGATTCTCTTG	49	
	RvanC23	CGAGCAAGACCTTTAAG		
<i>vanD</i>	FvanD	CATCAGGAAGCACAGCC	56	(Domingo et al., 2005)
	RvanD	GCTGCTGTCATCATGCG		
<i>vanE</i>	FvanE	TGTAGGTTGTGGTATCGGA	53	
	RvanE	ATTCTCGCTAATCCTTTGCA		
<i>vanG</i>	FvanG	GATGAAATCGAACTGTCAAG	52	
	RvanG	AATGCCTTTCATCATATTGG		

2.10 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti atsparumo sunkiesiems metalams genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>arsB</i>	arsB_F arsB_R	GTSAARCCSTTYTCGATGGC GCRAASGCSAHSAYCATGAT	50	(Roosa et al., 2014)
<i>arsC</i>	arsC_F arsC_R	GTAATACGCTGGAGATGATCCG TTTTCTGCTTCATCAACGAC	59	(Sultan et al., 2020)
<i>arrA</i>	arrA_F arrA_R	AAGGTGTATGGAATAAAGCGT TTG TBGGHGAYTT CCTGTGATTTTCAGGTGCCCAITYV GGNGT	63	(Escudero et al., 2013)
<i>copA</i>	copA_F copA_R	ATGTGGAACRSARATGCGKATGA AGYTTTCAGGCCSGBAATACG	56	(Roosa et al., 2014)
<i>nccA</i>	nccA_F nccA_R	TTYAGCCAGGTVACSGTSATYTT GCYGCRTCSGCRGACCAGRTA	54	
<i>pbrT</i>	pbrT_F pbrT_R	AGCGCGCCCAGGAGCGCAGCG TCTT GGC TCG AAG CCG TCG AGTA	61	
<i>chrB</i>	chrB_F chrB_R	GTCGTTAGCTTGCCAACATC CGGAAAGCAAGATGTCGATCG	56	(Adekanmbi et al., 2019)

2.11 lentelė. Tyrime naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, skirti identifikuoti integrazių genus

Genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'-3'	Prisilydimo temperatūra (°C)	Šaltinis
<i>Int11</i>	FInt11 RInt11	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG ACATGCGTGTAATCATCGTC	58	(Marathe et al., 2013)
<i>Int12</i>	FInt12 RInt12	TTACCTGCACTGGATTAAGC TTGCGAGTATCCATAACCTG	54	(Abbasi et al., 2020)

2.4 DNR elektroforezė

PGR rezultatai buvo vertinami atliekant elektroforezę agaroziniame gelyje. Geliui pagaminti buvo naudojama agarozė ir 1 × TAE buferinis tirpalas. Produktams, kurių dydis 250 – 1000 bp, naudojant 1 × TAE buferį, buvo paruošiamas 1 % agarozės gelis, o mažesniems nei 250 bp – 3 % gelis. Tuomet 100ml 1 × TAE buferyje (40 mM Tris-HCl, 20 mM acto rūgšties, 1 mM EDTA, pH 8,0) ištirpinama atitinkamai 1 g arba 3 g agarozės. Agarozė su buferiniu tirpalu buvo virinama 2-3 min. mikrobangų krosnelėje iki visiško išsilydymo agarozė ir atvėsinama iki 50-60°C temperatūros. Po to įpilama 5 µl etidžio bromido tirpalo.

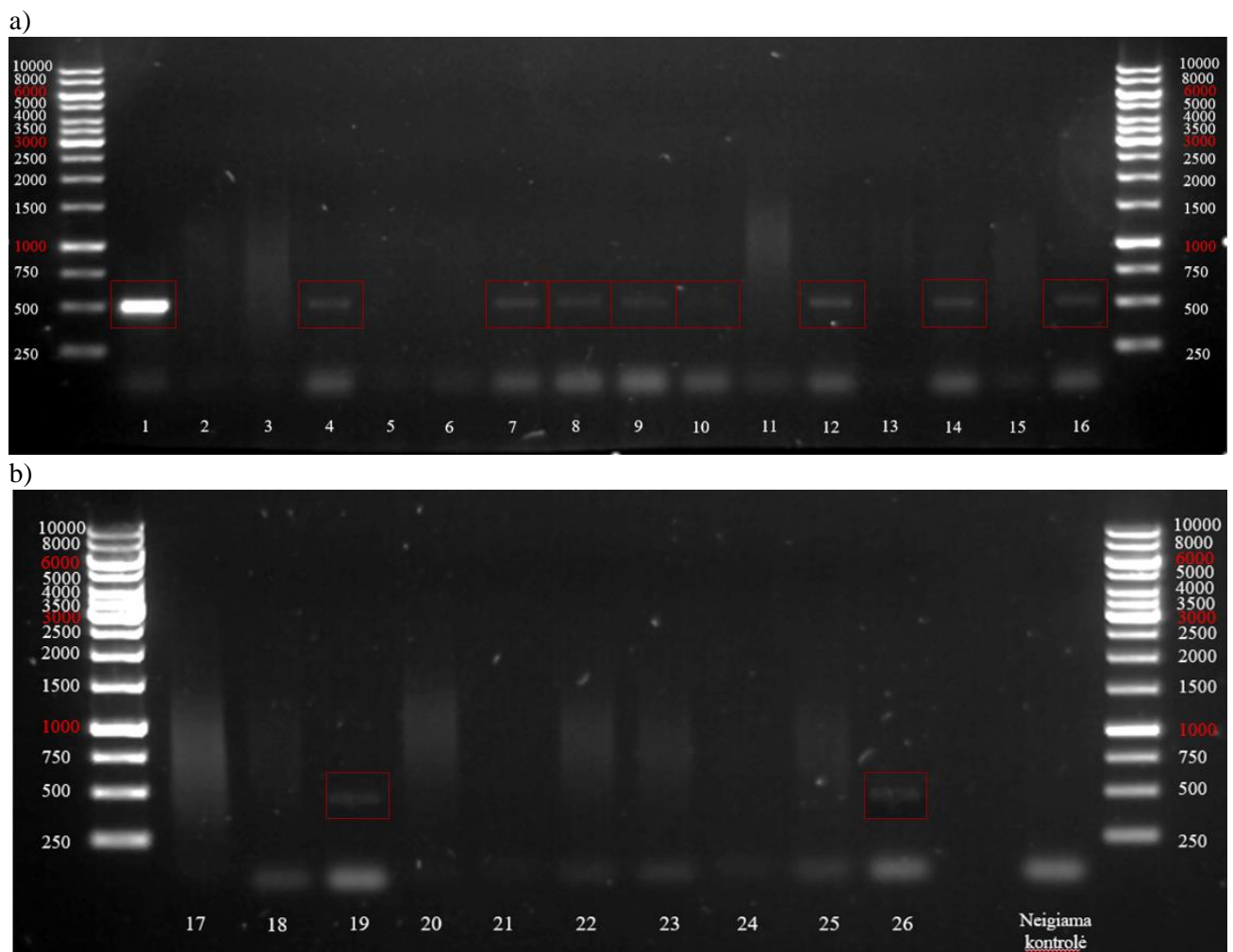
Paruoštas agarozės tirpalas buvo supilamas į elektroforezės aparato gelio užpylimo rėmelį su šukutėmis ir laukiama, kol gelis sustings. Sustingus geliui jis perkeliamas į elektroforezės vonelę, užpilamas $1 \times$ TAE buferiniu tirpalu, kad būtų apsemti gelio šulinėliai. Į šulinėlį automatine pipete buvo supilama DNR ilgio standartų mišinys, 3 % agarozės gelyje naudotas DNR ilgio standartas - GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 1 % agarozės gelyje GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Į kitus šulinėlius buvo supilami analizuojami mėginiai po PGR reakcijos sumaišyti su $6 \times$ užnešimo dažu (Loading Dye; Sorpo). Elektroforezė vykdoma CONSORT E 865 (CONSORT nv, Belgija), naudojant elektrinio lauko stiprį 7 V/cm ir 120V įtampą, kol dažas numigruoja apie $\frac{3}{4}$ gelio.

Po elektroforezės gelis vizualizuojamas transiliuminatoriumi MiniBIS Pro® (DNR Bio Imaging System, Izraelis), fotografuojant UV šviesoje. Galiausiai nustatomas DNR fragmentų dydis (bp) pagal naudojamą DNR ilgio standartą.

3 REZULTATAI

3.1 Atsparumo antibiotikams genų paplitimas sąvartynų mikrobiotoje

Atsparumo antibiotikams genų paplitimo vertinimo metu buvo siekiama identifikuoti atsparumo pagrindinėms antibiotikų klasėms determinantes, esančias sąvartynų ir nuo taršos vietų nutolusiuose dirvožemio mėginiuose. Buvo vertinamas atsparumo betalaktamams, aminoglikozidams, tetraciklinams, makrolidams, chloramfenikoliui ir florfenikoliui, chinolonams ir glikopeptidams genų paplitimas. Vieno iš atsparumo aminoglikozidams geno (*strB*) paplitimo rezultatai pateikti 3.1 paveiksle.



3.1 pav. *strB* geno paplitimas sąvartynų mėginiuose. *strB* geno dydis – 500 bp. Iš kraštų pažymėtas DNR ilgio standartas - GeneRuler 1 kb DNA Ladder, neigiama kontrolė – vanduo. PGR produktai matomi: Kazokiškių sąvartyno nuo 1 iki 10 (a pav.), Kariotiškių sąvartyno nuo 11 iki 19 (a ir b pav.), Molėtų rajono nuo 20 iki 26 (b pav.) mėginiuose. Suvestiniai PGR rezultatai pateikiami lentelėse toliau sekančiuose skyreliuose.

3.1.4 Atsparumo antibiotikams genai veikiančio sąvartyno mėginiuose

Atsparumo antibiotikams genų paplitimo Kazokiškių sąvartyne rezultatai pateikiami 3.1.1 lentelėje.

3.1.1 lentelė. Atsparumo antibiotikams genai Kazokiškių sąvartyno mėginiuose

	betalaktamai					Aminoglikozidai									tetraciklinai					makro- lidai		florfe- nikoliai		chinolonai					glikopeptidai					Iš viso										
	<i>ctx-M</i>	<i>oxa1</i>	<i>oxa2</i>	<i>oxa23</i>	<i>shv</i>	<i>aadE</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aadB</i>	<i>strB</i>	<i>aphA1</i>	<i>aphA2</i>	<i>aph(3)-I</i>	<i>aacC1</i>	<i>aadA4</i>	<i>aacC3</i>	<i>aac(3)IV</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>tetD</i>	<i>tetM</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefAB</i>	<i>catI</i>	<i>flor</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrD</i>	<i>qepA1</i>	<i>vanA</i>		<i>vanB</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanC2/3</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>				
Mėginio pavadinimas	KZ1 (T)																																									16		
	KZ2 (T)																																										0	
	KZ3 (T)																																										2	
	KZ4 (T)																																										6	
	KZ4 (B)																																										0	
	KZ5 (T)																																										2	
	KZ5 (B)																																											8
	Iš viso	0	0	0	0	0	0	2	1	3	3	0	1	2	1	1	1	1	1	0	3	0	2	1	0	2	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0		

Kazokiškių sąvartyno genominės DNR mėginiuose atsparumo antibiotikams genai aptikti 5 mėginiuose iš 7. Daugiausiai genų nustatyta mėginyje – KZ1 (T). Šiame mėginyje buvo rasta 16 atsparumo antibiotikams genų. Kazokiškių sąvartyno mėginiuose KZ2 (T) ir KZ4 (B) atsparumo antibiotikams genų neaptikta. Kituose mėginiuose buvo nustatyti: KZ5 (B) – 8 genai, KZ4 (T) – 6 genai KZ3 (T) ir KZ5 (T) – po 2 genus. Paviršiniame dirvožemio sluoksnyje (top) vyrauja didesnis atsparumo antibiotikams genų paplitimas nei 10 cm gylio mėginiuose (bottom).

Lyginant atsparumą skirtingoms antibiotikų klasėms daugiausiai nustatyta atsparumo aminoglikozidams ir florfenikoliui genų. Atsparumo betalaktaminiams antibiotikams genų ir atsparumo chinolonams genų veikiančio sąvartyno dirvožemio mėginiuose neaptikta. Tarp atsparumo aminoglikozidams genų daugiausiai rasta *aadB* ir *strB* genų, kurie buvo 3 mėginiuose, o *aadE* ir *aphA1* genai nebuvo aptikti nei viename mėginyje. Tarp atsparumo tetraciklinams genų daugiausiai aptikta *tetC* geno, o *tetB* ir *tetD* genai mėginiuose nenustatyti. Atsparumo makrolidams genų buvo labai nedaug, rastas 1 *ermA* genas ir 2 *mefAB* genai, o *ermB* geno nenustatyta nei viename mėginyje. Taip pat buvo identifikuoti tik pavieniai atsparumo glikopeptidams genai – *vanC1* ir *vanE*. Kazokiškių sąvartyno mėginiuose dažniausias atsparumo florfenikoliui geno *CatI* paplitimas (*CatI* aptiktas 5 iš 7 mėginių). Kitas atsparumą florfenikoliui suteikiantis genas *flor* nustatytas 2 mėginiuose.

paplitimo rezultatai Kazokiškių, Kariotiškių sąvartynų ir Molėtų rajono mėginiuose pateikiami 3.2 lentelėje.

3.2 lentelė. Atsparumo sunkiesiems metalams genai sąvartynų mėginiuose

Mėginio pavadinimas	Arsenas		Varis	Nikelis		Švinas	Chromas	Iš viso
	<i>arsB</i>	<i>arsC</i>	<i>arrA</i>	<i>copA</i>	<i>nccA</i>	<i>phrT</i>	<i>chrB</i>	
KZ1 (T)	■		■	■		■		4
KZ2 (T)								1
KZ3 (T)	■							2
KZ4 (T)								0
KZ4 (B)				■				1
KZ5 (T)	■					■		2
KZ5 (B)	■		■	■		■	■	5
KZ1 (F)			■					1
KZ2 (F)	■	■	■	■				4
KZ2 (F(2))			■					1
KR1 (T)						■		1
KR1 (B)			■		■			2
KR2 (T)							■	1
KR2 (B)	■			■	■	■	■	5
KR3 (T)	■		■	■		■		4
KR3 (B)	■			■	■	■		4
KR4 (T)	■			■		■	■	5
KR4 (B)	■			■		■		3
KR5 (T)			■					1
C1 (T)								0
C1 (B)								0
C2 (T)								0
C2 (B)	■	■	■	■	■			4
C3 (T)	■			■		■		3
C3 (B)	■			■				2
C4 (B)	■					■		3
Iš viso:	14	2	9	14	5	11	4	

Atsparumo arsenui genai sudarė didžiausią dalį visų atsparumo sunkiesiems metalams rastų genų. Atsparumo arsenui geno *arsB* paplitimas Kazokiškėse buvo nustatytas 5 mėginiuose, Kariotiškėse taip pat 5 mėginiuose ir kontrolinės zonos 4 mėginiuose. Kito *arrA* geno, suteikiančio atsparumą arsenui, paplitimas buvo mažesnis: *arrA* rastas 5 Kazokiškių mėginiuose, 3 Kariotiškių mėginiuose ir 1 kontrolinės zonos mėginyje. Tuo tarpu, genas *arsC* nustatytas tik viename Kazokiškių sąvartyno mėginyje (KZ2 (F)) ir viename Molėtų rajono mėginyje (C2 (B)).

Atsparumo variui geno (*copA*) paplitimas taip pat labai didelis. Genas *copA* aptiktas 14 mėginių, iš kurių 6 mėginiai buvo Kazokiškių sąvartyno, 5 – Kariotiškių sąvartyno ir 3 Molėtų rajono kontrolinės zonos mėginiai.

Atsparumo švinui genas *phrT* identifikuotas 11 mėginių. Daugiau negu pusė (n=6) mėginių, kuriuose rastas genas *phrT*, buvo Kariotiškių sąvartyno mėginiai, 3 Kazokiškių sąvartyno mėginiai ir 2 Molėtų rajono mėginiai.

Kiti atsparumo sunkiesiems metalams genai paplitę mažiau. Atsparumo nikeliui genas *nccA* buvo aptiktas 4 Kariotiškių ir viename Molėtų rajono mėginiuose. O atsparumo chromui genas *chrB* nustatytas 3 Kariotiškių ir viename Kazokiškių mėginiuose.

Bendrai, daugiausia atsparumo sunkiesiems metalams genų nustatyta Kariotiškių sąvartyno KR2 (B) ir KR4 (T) mėginiuose ir Kazokiškių sąvartyno mėginyje KZ5 (B). Visuose minėtuose mėginiuose buvo identifikuota po 5 atsparumo sunkiesiems metalams genus. Tuo tarpu, Molėtų rajono mėginiuose atsparumo sunkiesiems metalams genų paplitimas buvo mažiausias. Molėtų rajono mėginiuose C1 (T), C1 (B), C2 (T) ir Kazokiškių sąvartyno mėginyje KZ4 (T) nenustatytas nei vienas atsparumo sunkiesiems metalams genas.

3.4 Integronų paplitimas sąvartynų mikrobiotoje

Dviejų dažniausiai pasitaikančių integronų (1 ir 2 klasės, turinčių atitinkamai *intI1* ir *intI2* integrazių genų) paplitimas Kazokiškių, Kariotiškių sąvartynų ir Molėtų rajono mėginiuose parodytas 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Integrazių genai sąvartynų mėginiuose

Mėginio pavadinimas	Integrazių genai		Iš viso
	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	
KZ1 (T)			2
KZ2 (T)			0
KZ3 (T)			1
KZ4 (T)			1
KZ4 (B)			0
KZ5 (T)			0
KZ5 (B)			0
KZ1 (F)			0
KZ2 (F)			1
KZ2 (F(2))			2
KR1 (T)			2
KR1 (B)			2
KR2 (T)			1
KR2 (B)			0
KR3 (T)			1
KR3 (B)			0
KR4 (T)			1
KR4 (B)			0
KR5 (T)			0
C1 (T)			0
C1 (B)			0
C2 (T)			0
C2 (B)			1
C3 (T)			1
C3 (B)			0
C4 (B)			0
Iš viso:	10	5	

Integrazių *intI1* ir *intI2* paplitimas buvo vertinamas 26 mėginiuose. *IntI1* geno mėginiuose buvo rasta dvigubai daugiau nei *intI2*. Genas *intI1* buvo nustatytas 5 Kazokiškių sąvartyno mėginiuose, 3 Kariotiškių sąvartyno mėginiuose ir 2 Molėtų rajono mėginiuose. O *intI2* geno paplitimas buvo nustatytas 2 Kazokiškių mėginiuose ir 3 Kariotiškių sąvartyno mėginiuose.

Iš visų mėginių tik 4 (KZ1 (T), KZ2 (F(2)), KR1 (T) ir KR1 (B)) turėjo abu integrazių genus *intI1* ir *intI2*. Daugiau integrazių genų rasta mėginiuose, kurie buvo surinkti paviršiniame dirvožemio sluoksnyje „top“ nei 10 cm gylyje „bottom“.

4 REZULTATŲ APTARIMAS

Literatūros šaltiniuose duomenų apie antibiotikams atsparias bakterijas yra daug, tačiau didžiausias dėmesys skiriamas sveikatos sektoriui, įskaitant ligonines, slaugos namus ir pacientus, kuriems reikalingi ventiliatoriai ir kraujo kateteriai. Tokioje aplinkoje labiausiai įsitvirtinę antibiotikams atsparios bakterijos yra *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ir įvairios *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* ir *Proteus*) (R. Zhang ir kt., 2022). Atsparumo antibiotikams problema egzistuoja ne tik sveikatos srityje, bet ir natūraliuose aplinkos rezervuaruose. Dirvožemis taip pat pripažintas antibiotikų ir atsparumo antibiotikams genų rezervuaru (Manyi-Loh ir kt., 2018). Šiai dienai labai nedaug žinoma apie atsparumo antibiotikams genų kiekį ir sudėtį Lietuvos žemės ūkiuose ar šalia jų esančioje aplinkoje. Kitose šalyse atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad žemės ūkio paskirties dirvožemiuose atsparių antibiotikams bakterijų populiacijos gali būti labai didelės ir įvairios (Popowska ir kt., 2012). Taip yra todėl, kad dėl intensyvaus antibiotikų naudojimo gyvulininkystėje ir kitose žemės ūkio srityse antibiotikai nuolat patenka į aplinką. Dėl to atsparumas antibiotikams plačiai paplitęs tiek paveiktose, tiek natūraliose buveinėse (Naidoo ir kt., 2020).

Siekiant įvertinti atsparumo antibiotikams problemos mastą buvo analizuojami kitų autorių atlikti tyrimai bei stebima, kokie atsparumo antibiotikams genai labiausiai išplitę žemės ūkio vietovėse ir šalia jo esančiose teritorijose. Pastebėta, kad kitų šalių sąvartynuose ir jų filtratuose gali būti aptinkami labai įvairūs antibiotikai, įskaitant fluorochinolonus, makrolidus-linkomiciną-streptomiciną (MLS), sulfonamidus, tetraciklinus, β -laktamus ir chloramfenikolį (Wu ir kt., 2022). Organinėmis ir neorganinėmis trąšomis tręštų laukų dirvožemio mėginiuose, gyvūnų išmatose, gyvūnų laikymo vietose, aplink ūkius esančiose teritorijose buvo rasta nemažai atsparumo beta-laktamams genų, iš kurių dažniausiai nustatyti *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} ir *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} (Graham ir kt., 2016; Aminov ir kt., 2021). Minėti genai yra nustatomi ir sąvartynų mikrobiotoje (Furlan ir Stehling, 2017). Danijoje taip pat buvo pastebėta, kad *bla* genų bakterijų populiacijoje randama šiek tiek mažiau nei iki 2010 metų. Tam įtakos gali turėti griežtas antibiotikų reglamentavimas ir panaudojimas žemės ūkio sektoriuose. Įdomu tai, kad kartu aptinkamo geno *intI1* procentaliai dirvožemyje padaugėjo, tai gali būti susiję su gyvulių mėšlo naudojimu žemės ūkyje (Graham ir kt., 2016). Pastaraisiais metais padaugėjo duomenų, kad dirvožemio mėginiuose plačiai paplitę atsparumo aminoglikozidams genai (Yang ir Hu, 2022). Atsparumą koduojantys determinantai *aadA*, *aadB*, *aphA1*, *strA-strB*, susiję su atsparumu aminoglikozidams, buvo gausiai išskirti iš *E. coli* izoliatų galvijų ūkiuose (Karczmarczyk ir kt., 2011). Atsparumo antibiotikams genai *aphA1*, *aadA*, *strA* ir *strB* yra plačiai paplitę ir *E. coli* izoliatuose iš sąvartynų (Allen ir kt., 2011). Taip pat *aadB* ir *aadA2* genai buvo išskirti iš *P. aeruginosa*, kuri paplitusi upėse, augaluose, dirvožemyje,

labai lengvai prie natūralios aplinkos prisitaikanti bakterija (Colinon ir kt., 2010). Miško dirvožemyje, komposte ir gyvulių išmatomis tręšiamuose laukuose nustatyti tokie atsparumo genai kaip *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(D)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(T)* ir *tet(W)* - atsparumas tetraciklinui, *aac*, *aad(A)*, *str(A)* ir *str(B)* - atsparumas streptomycinui, *erm(C)*, *erm(V)*, *erm(X)*, *msr(A)* ir *ole(B)* - atsparumas eritromicinui (Popowska ir kt., 2012). Literatūroje minima, kad *tetO* ir *tetW* yra gausiai paplitę atsparumo antibiotikams genai viso pasaulio sąvartynų mikrobiotoje. Dažniausi *tetO* ir *tetW* genų šeimininkai yra *Bacteroidetes* ir *Firmicutes* bakterijos (Wang ir kt., 2022). Kitos svarbios antibiotikų rūšys - chinolonai ir makrolidai - yra plačiai naudojami vaistai gyvūnų ligoms gydyti, o jų koncentracija mėšle ir dirvožemyje dažnai aptinkama įvairiose koncentracijos ribose. Dirvožemyje aptinkami tokie genai kaip *ermB*, *ermC*, *ermE*, *ermF* (atsparumas makrolidams) ir *qepA*, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* (atsparumas chinolonams). Visgi palyginti su chinolonams atspariomis bakterijomis ir atsparumo genais, makrolidams būdingas didesnis bakterijų atsparumo lygis ir atsparumo genų gausa (L. Wang ir kt., 2019). O *ermB* ir *mefA* genai yra vieni dažniausiai aptinkamų atsparumo antibiotikams genų sąvartynų mikrobiotoje (Li ir kt., 2024). Dar vienas antibiotikas, naudojamas gyvūnų gydymui, yra florfenikolis. Pastaruoju metu atsparumo florfenikoliui genų (ypač geno *catI*) vis dažniau randama akvakultūroje. Tam įtakos gali turėti tai, kad florfenikolis yra vienas iš žemės ūkyje leidžiamų naudoti plataus veikimo spektro antibiotikų, todėl dažnai būna pritaikomas galvijų, kiaulių, paukščių ir žuvų gydyme (Martos ir Shurmer, 2012). Na, o Teddie O. Rahube ir kt. (2014) atlikto tyrimo rezultatai rodo, kad iš dirvožemio arba daržovių mėginių galime išskirti ir atsparumo vankomicinui genus *van(A)*, *van(B)*, *van(C1)*, *van(C2/C3)*, kurie buvo minimi ir šio darbo rezultatuose. Įdomu tai, kad daugelis kitų autorių atliktų tyrimų parodė glaudų ryšį tarp dauginio atsparumo vaistams ir atsparumo (tolerancijos) sunkiųjų metalų jonams. Bakterijų kamienai išskirti iš žemės ūkio paskirties dirvožemio, į kurį patenka nuotekos, gali pasižymėti dideliu atsparumu ir metalams, ir antibiotikams. Shaġiani ir Malik (2003) iš nuotekomis laistomo dirvožemio išskyrė *Pseudomonas* gentims priklausančias bakterijas. Visi *Pseudomonas* izoliatai buvo atsparūs sunkiesiems metalams ir kloksacilinui, o daugiau nei pusė jų buvo atsparūs ir meticilinui (Popowska ir Krawczyk-Balska, 2013). Šio tyrimo rezultatai buvo lyginami ir su Lietuvoje anksčiau atliktais tyrimais, kuriuose buvo vertinamas atsparumo antibiotikams genų paplitimas. Tik nedidelė dalis tyrimų, susijusių su atsparumu antibiotikams, buvo atlikta Lietuvos žemės ūkio srityje. Priešingai nei šiame darbe, kiti tyrimai rodė mažesnę atsparumo antibiotikams genų paplitimą. Pavyzdžiui, J. Armalytė ir kt. (2019) Lietuvos laukų dirvožemio mikrobiotoje aptiko tik pavienius atsparumo antibiotikams genus. Jie suteikė atsparumo mechanizmus β-laktamams, aminoglikozidams, tetraciklinui ir eritromicinui. Buvo nustatytas *shv* genas, koduojantis plataus veikimo spektro β-laktamazę, kurio šiame darbe nebuvo aptikta. Iš kliniškai svarbių atsparumo aminoglikozidams genų rasti *aadE* (*ant(6)I*), *aadA1* (*ant(3'')-Ia*), *aadA2* (*ant(3'')Ib*) genai,

koduojantys streptomiciną modifikuojančias nukleotidiltransferazes ir suteikiantys atsparumą streptomicinui ir didelėje dalyje dirvožemio mėginių nustatytas atsparumo tetraciklinui genas *tetM*, koduojantis ribosomų apsaugos baltymą. Sąvartynų mėginiuose atsparumo aminoglikozidams ir tetraciklinams genų buvo aptikta gausiau, šiame darbe nenustatytas tik *aadE* genas (Armalytė ir kt., 2019). Kiti tyrimai, kuriuose tirti žuvininkystės tvenkiniai, taip pat nustatė nedidelį atsparumo antibiotikams genų paplitimą. G. Gobtaitytė ir kt. (2018) žuvų tvenkinių mikrobiotoje nustatė genus, lemiančius atsparumą aminoglikozidams *strB* (*aph* (6)-I), *aadA2* (*ant* (3'') Ib), *aacC3*, β-laktamams, įskaitant 3 kartos cefalosporinus (*oxa1*, *ctx-M*) ir fluorochinolonams (*qnrS*). Nors *strB* ir *aacC3* genų nustatyta ne viename sąvartynų mėginyje, priešingai atsparumo beta-laktamams ir chinolonams šiame darbe tirtų sąvartynų mėginiuose nebuvo pastebėta (Goptaitytė ir kt., 2018). Kitame tyrime buvo tiriami Simno žuvininkystės tvenkinių nuosėdų mėginiai, juose atsparumo antibiotikams genų taip pat buvo rasta netaisyklingai. Dauguma rastų genų buvo atsparūs tetraciklinams, ypač *tetM*, kurio paplitimas didelis ir šiame darbe tirtų sąvartyno mėginiuose. Taip pat nustatyti atsparumo beta-laktamams (*shv*) ir aminoglikozidams (*aphA1*, *aadA4*, *aacC1*, *aadA1* ir *aadE*) genai. Buvo tikrinamas ir integronų paplitimas. *Int11* genas buvo plačiai paplitęs tiek tvenkinių, tiek sąvartynų mėginiuose, tai rodo, kad nustatyti atsparumo antibiotikams genai gali būti mobilizuojami ir perduodami iš vienos rūšies į kitą (Lastauskienė ir kt., 2021).

Atsparumo antibiotikams genų plitimo tendencija dar nėra aiški. Lietuvoje trūksta duomenų apie tokias ekosistemas kaip sąvartynai, kurie gali būti potencialūs atsparumo genų rezervuarai, todėl reikėtų skatinti naujus tyrimus šia tema ir stebėti ar atsparumo antimikrobinėms medžiagoms paplitimas nesikeičia. Palyginus gautus rezultatus su ankstesniais kitų autorių tyrimais buvo pastebėta, jog sąvartynų mikrobiotoje yra nemaža dalis kitų autorių darbuose neaptiktų atsparumo antibiotikams genų. Didelis dėmesys turėtų būti skiriamas atsparumo florfenikoliui genams *catI* ir *floR*, nes jų sąvartynų mėginiuose buvo aptikta labai daug. Tačiau, priešingai nuo kitų tyrimų, tirtuose Kazokiškių ir Kariotiškių sąvartynuose nebuvo nustatytas atsparumas beta-laktamams. Taip galėjo nutikti dėl kelių priežasčių. Tikėtina, kad dėl griežto beta-laktamų reglamentavimo žemės ūkyje atsparumo beta-laktamams genų bakterijų populiacijoje galėjo sumažėti. Tikslinga būtų pakartoti tyrimą su kitais iš sąvartynų paimtais mėginiais, pakeisti pradmenis, gali būti, kad šio tyrimo metu atsparumo beta-laktamams genų nebuvo mėginiuose.

IŠVADOS

1. Kazokiškių sąvartyno dirvožemio mėginiuose identifikuoti atsparumo tetraciklinams genai (labiausiai paplitęs *tetC*), atsparumo aminoglikozidams genai (labiausiai paplitę *aadB* ir *strB*), atsparumo makrolidams genai (labiausiai paplitęs *ermA*), atsparumo florfenikoliui genai (labiausiai paplitęs - *catI*) ir atsparumo glikopeptidams genai (labiausiai paplitę *vanC1* ir *vanE*).
2. Daugiausiai atsparumo antibiotikams genų nustatyta Kariotiškių nebeeksploatuojamo sąvartyno mėginiuose – rasti 23 iš 39 tirtų atsparumo antibiotikams genai, iš kurių labiausiai paplitę atsparumo tetraciklinams genai *tetC*, *strB* ir atsparumo florfenikoliui genai *catI* ir *floR*.
3. Kazokiškių sąvartyno filtratų mėginiuose buvo nustatyti genai *tetC*, *strB*, *ermA*, *floR* ir *catI*.
4. Kontrolinėje nuo taršos šaltinių nutolusios zonos dirvožemio mėginiuose rasti atsparumo antibiotikams genai *tetB*, *tetC*, *tetM*, *aadB*, *qnrA*, *vanD* ir *catI*.
5. Kazokiškių, Kariotiškių ir Molėtų rajono sąvartynų mėginiuose nustatyti genai, suteikiantys atsparumą arsenui, variui, nikeliui, švinui ir chromui, iš kurių daugiausiai rasta atsparumo sunkiesiems metalams genų – *arsB* ir *copA*, o mažiausiai – *arsC*. Taip pat nustatyti 1 ir 2 klasės integronų genai *intI1* ir *intI2*.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Emilija Žukauskaitė
Magistro baigiamasis darbas

**ATSPARUMO ANTIBIOTIKAMS IR SUNKIESIEMS METALAMS GENŲ PAPLITIMAS
SĄVARTYŲ MIKROBIOTOJE**

SANTRAUKA

Bakterijų atsparumas antibiotikams tampa vis rimtesne visuomenės sveikatos problema. Ši problema egzistuoja ne tik sveikatos srityje, bet ir kitose ekosistemose. Tam įtakos gali turėti bakterijų genų mutacijos ir horizontalus genų perdavimas. Taip pat didėjančiai atsparumo antibiotikams problemai įtakos gali turėti ir kiti veiksniai, pavyzdžiui kryžminį atsparumą indukuojantys sunkieji metalai. Pastebėta, kad atsparumo sunkiesiems metalams genai ir atsparumo antibiotikams genai lokalizuoti tuose pačiose klasteriuose. Bakterijos, turinčios įgimtą atsparumą sunkiesiems metalams genais yra geriau prisitaikę išgyventi aplinkoje, jos dauginasi ir gali įgyti atsparumo antibiotikams genus.

Šio darbo tikslas buvo nustatyti atsparumo antibiotikams ir sunkiesiems metalams genų paplitimą Lietuvos sąvartynų mikrobiotoje. Ieškant atsparumo dažniausiai gamtoje paplitusioms antibiotikų klasėms (beta-laktamams, aminoglikozidams, tetraciklinams, makrolidams, florfenikoliui, chinolonams ir glikopeptidams) buvo surinkti 26 skirtingi dirvožemio mėginiai. Dirvožemio mėginiuose buvo ieškoma ir atsparumo sunkiesiems metalams (arsenui, variui, nikeliui, švinui, chromui) genų ir integronų.

Nustatyta, kad Lietuvos sąvartynuose labiausiai yra paplitę genai, suteikiantys atsparumą aminoglikozidams, tetraciklinams ir florfenikoliui. Kariotiškių nebeeksploatuojamo sąvartyno mėginiuose identifikuotas didžiausias atsparumas antibiotikams. Integronai buvo nustatyti daugelyje mėginių, tai rodo potencialų atsparumo antibiotikams genų mobilumą tarp rūšių. Tiriamuosiuose mėginiuose identifikuoti atsparumo sunkiesiems metalams genai, didžiausias atsparumas pastebėtas arsenui ir variui.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Emilija Žukauskaitė

Master Thesis

**PREVALENCE OF ANTIBIOTIC AND HEAVY METAL RESISTANCE GENES IN
LANDFILL MICROBIOTA**

SUMMARY

Antibiotic resistance in bacteria is an increasingly serious public health problem. This problem is detected not only in the healthcare sector but also in other ecosystems. Mutations in bacterial genes and horizontal gene transfer can play a role in the acquisition and dissemination of antibiotic resistance. Other factors, such as heavy metals, may also contribute to the growing problem due to the induction of cross-resistance. Heavy metal resistance genes and antibiotic resistance genes have been observed to be located in the same clusters. Bacteria with innate heavy metal resistance genes are better adapted to survive in the environment, reproduce faster, and can acquire antibiotic resistance genes.

This work aimed to determine the prevalence of antibiotic and heavy metal resistance genes in the microbiota from Lithuanian landfills. The resistance genes of the most common antibiotic classes (betalactams, aminoglycosides, tetracyclines, macrolides, florfenicol, quinolones, and glycopeptides) were analyzed in 26 different soil samples. Soil samples were also tested for heavy metal resistance genes (arsenic, copper, nickel, lead, chromium) and integrons.

Genes conferring resistance to aminoglycosides, tetracyclines and florfenicol were found to be the most abundant in Lithuanian landfills. Samples from the Kariotiškės landfill, which is closed now, showed the highest antibiotic resistance profile. Integrons were also detected in most samples, indicating the potential mobility of antibiotic-resistance genes between species. Heavy metal resistance genes were identified in the tested samples, with the highest resistance observed for arsenic and copper.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdollahi, M. ir Mostafalou, S. (2023). Chloramphenicol. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 837–840. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00709-0>
2. Allen, S. E., Boerlin, P., Janecko, N., Lumsden, J. S., Barker, I. K., Pear, D. L., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2011). Antimicrobial Resistance in Generic *Escherichia coli* Isolates from Wild Small Mammals Living in Swine Farm, Residential, Landfill, and Natural Environments in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 882. <https://doi.org/10.1128/AEM.01111-10>
3. Aminov, R., Popowska, M., Zalewska, M., Bła, A., Zejewska, , & Czapko, A. (2021). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. *Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org*, 1, 610656. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>
4. Armalytė, J., Skerniškytė, J., Bakienė, E., Krasauskas, R., Šiugždinienė, R., Kareivienė, V., Kerzienė, S., Klimienė, I., Sužiedėlienė, E., & Ružauskas, M. (2019). Microbial diversity and antimicrobial resistance profile in microbiota from soils of conventional and organic farming systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00892>
5. Bello-López, J. M., & Rojo-Medina, J. (2017). Detection of antibiotic resistance genes β -lactamics in bacterial strains isolated from Umbilical Cord Blood Units for transplant. *Revista Médica del Hospital General de México*, 80(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/J.HGMX.2016.05.005>
6. Bhat, B. A., Mir, R. A., Qadri, H., Dhiman, R., Almilaibary, A., Alkhanani, M., & Mir, M. A. (2023). Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1231938. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1231938/BIBTEX>
7. Brandis, G., Gockel, J., Garoff, L., Guy, L., & Hughes, D. (2021). Expression of the *qepA1* gene is induced under antibiotic exposure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(6), 1433–1440. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab045>
8. Bunick, C. G., Keri, J., Tanaka, S. K., Furey, N., Damiani, G., Johnson, J. L., & Grada, A. (2021). Antibacterial mechanisms and efficacy of sarecycline in animal models of infection and inflammation. *Antibiotics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040439>
9. Busscher, G. F., Rutjes, F. P. J. T., & van Delft, F. L. (2005). 2-Deoxystreptamine: Central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(3), 775–791. https://doi.org/10.1021/CR0404085/ASSET/CR0404085.FP.PNG_V03
10. Chenia, H. Y., & Jacobs, A. (2017). Antimicrobial resistance, heavy metal resistance and integron content in bacteria isolated from a South African tilapia aquaculture system. *Diseases of Aquatic Organisms*, 126(3), 199–209. <https://doi.org/10.3354/DAO03173>
11. Coleman, J. P., & Smith, C. J. (2014). Microbial Resistance. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05148-5>

12. Colinon, C., Jocktane, D., Brothier, E., Rossolini, G. M., Cournoyer, B., & Nazaret, S. (2010). Genetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy captive snakes: evidence of high inter- and intrasite dissemination and occurrence of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 12(3), 716–729. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.02115.X>
13. Craig, W. A., & Andes, D. R. (2015). Cephalosporins. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 1, 278-292.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00021-7>
14. D'Achille, G., & Morroni, G. (2023). Side effects of antibiotics and perturbations of mitochondria functions. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 377, 121–139. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2023.03.009>
15. Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 808. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2008.11.005>
16. Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., & Wilson, D. N. (2012). Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(42), 16900–16905. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1208037109/-/DCSUPPLEMENTAL>
17. Domingues, S., Silva, G. J. da, & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2(5), 211. <https://doi.org/10.4161/MGE.22967>
18. Doublet, B., Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Cloeckaert, A. (2005). Florfenicol resistance gene floR is part of a novel transposon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2106–2108. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.2106-2108.2005>
19. Eckert, C., Gautier, V., & Arlet, G. (2006). DNA sequence analysis of the genetic environment of various blaCTX-M genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 14–23. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKI398>
20. El-Liethy, M. A., Mahmoud, M., King Abia, A. L., & Elwakeel, K. Z. (2023). The use of nanomaterials for the elimination of antibiotic-resistant bacteria from water and wastewater: An African overview. *Antimicrobial Research and One Health in Africa*, 275–303. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23796-6_12
21. Fang, H., Ataker, F., Hedin, G., & Dornbusch, K. (2008). Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 707. <https://doi.org/10.1128/JCM.01943-07>
22. Fu, Y., Zhu, Y., Dong, H., Li, J., Zhang, W., Shao, Y., & Shao, Y. (2023). Effects of heavy metals and antibiotics on antibiotic resistance genes and microbial communities in soil. *Process Safety and Environmental Protection*, 169, 418–427. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2022.11.020>
23. Furlan, J. P. R., & Stehling, E. G. (2017). Presence of B-Lactamases Encoding Genes in Soil Samples from Different Origins. *Water, Air, and Soil Pollution*, 228(4). <https://doi.org/10.1007/S11270-017-3318-4>

24. Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, 7(1), 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>
25. Gaurav, Amit, Perwez Bakht, Mahak Saini, Shivam Pandey, and Ranjana Pathania. 2023. “Role of Bacterial Efflux Pumps in Antibiotic Resistance, Virulence, and Strategies to Discover Novel Efflux Pump Inhibitors.” *Microbiology* 169(5):1333. doi: 10.1099/MIC.0.001333.
26. Giedraitiene, A., Vitkauskiene, A., Naginiene, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina* (T. 47, Numeris 3, p. 137–146). <https://doi.org/10.3390/medicina47030019>
27. Goptaitytė, G., Skerniškytė, J., Krasauskas, R., Ružauskas, M., Armalytė, J., & Sužiedėlienė, E. (2018). Detection of antibiotic resistance determinants in bacteria isolated from fish / Gabija Goptaitytė, Jūratė Skerniškytė, Renatas Krasauskas, Modestas Ružauskas, Julija Armalytė, Edita Sužiedėlienė. *COINS 2018 - 13th international conference of life sciences : 28 February-2 March 2018 Vilnius, Lithuania : [abstracts book] / Vilnius University Students Representation. Vilnius : Vilnius University Students Representation, 2018.* <https://hdl.handle.net/20.500.12512/19758>
28. Graham, D. W., Knapp, C. W., Christensen, B. T., McCluskey, S., & Dolfing, J. (2016). Appearance of β -lactam Resistance Genes in Agricultural Soils and Clinical Isolates over the 20th Century. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep21550>
29. Grossman, T. H. (2016). Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A025387>
30. Haddaji, N. (2022). Environmental contaminants and antibiotic resistance as a One Health threat. *One Health: Integrated Approach to 21st Century Challenges to Health*, 231–252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822794-7.00010-1>
31. Yang, W., & Hu, F. (2022). Research Updates of Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methyltransferase. *Antibiotics*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11070906>
32. Ibrahim, M., Ahmad, F., Yaqub, B., Ramzan, A., Imran, A., Afzaal, M., Mirza, S. A., Mazhar, I., Younus, M., Akram, Q., Taseer, M. S. A., Ahmad, A., & Ahmed, S. (2020). Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment: Volume 1 in the Advances in Environmental Pollution Research Series*, 39–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00004-8>
33. Ibrahim, M. E., Abbas, M., Al-Shahrai, A. M., & Elamin, B. K. (2019). Phenotypic Characterization and Antibiotic Resistance Patterns of Extended-Spectrum β -Lactamase-and AmpC β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria in a Referral Hospital, Saudi Arabia. *Hindawi Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6054694>
34. Young, P. G., Walanj, R., Lakshmi, V., Byrnes, L. J., Metcalf, P., Baker, E. N., Vakulenko, S. B., & Smith, C. A. (2009). The crystal structures of substrate and nucleotide complexes of *Enterococcus faecium* aminoglycoside-2"-phosphotransferase-IIa [APH(2")-IIa] provide insights into substrate selectivity in the APH(2") subfamily. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4133–4143. <https://doi.org/10.1128/JB.00149-09>

35. Jang, S. (2023). AcrAB–TolC, a major efflux pump in Gram negative bacteria: toward understanding its operation mechanism. *BMB Reports*, 56(6), 326. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2023-0070>
36. Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049–1070. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202100201>
37. Joshi, A. A., & Patil, R. H. (2023). Metal nanoparticles as inhibitors of enzymes and toxins of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infectious Medicine*, 2(4), 294–307. <https://doi.org/10.1016/J.IMJ.2023.11.006>
38. Karczmarczyk, M., Walsh, C., Slowey, R., Leonard, N., & Fanning, S. (2011). Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7121–7127. https://doi.org/10.1128/AEM.00601-11/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_TABLE_1.DOC
39. Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A027029>
40. Lambert, T. (2012). Antibiotics that affect the ribosome. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 57–64. <https://doi.org/10.20506/RST.31.1.2095>
41. Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1471–1485. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.04.003>
42. Lastauskienė, E., Valskys, V., Stankevičiūtė, J., Kalcienė, V., Gėgžna, V., Kavoliūnas, J., Ružauskas, M., & Armalytė, J. (2021). The Impact of Intensive Fish Farming on Pond Sediment Microbiome and Antibiotic Resistance Gene Composition. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 673756. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.673756/BIBTEX>
43. Lebreton, F., & Cattoir, V. (2019). Resistance to Glycopeptide Antibiotics. *Bacterial Resistance to Antibiotics: From Molecules to Man*, 51–80. <https://doi.org/10.1002/9781119593522.CH3>
44. Levitus, M., Rewane, A., & Perera, T. B. (2023). Vancomycin-Resistant Enterococci. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>
45. Li, Y. J., Yuan, Y., Tan, W. B., Xi, B. D., Wang, H., Hui, K. L., Chen, J. B., Zhang, Y. F., Wang, L. F., & Li, R. F. (2024). Antibiotic resistance genes and heavy metals in landfill: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 464, 132395. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2023.132395>
46. Lioy, V. S., Goussard, S., Guerineau, V., Yoon, E. J., Courvalin, P., Galimand, M., & Grillot-Courvalin, C. (2014). Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA*, 20(3), 382. <https://doi.org/10.1261/RNA.042572.113>
47. Lipscomb, G. L., Conway, J. M., Blumer-Schuette, S. E., Kelly, R. M., & Adams, M. W. W. (2016). A Highly Thermostable Kanamycin Resistance Marker Expands the Tool Kit for Genetic Manipulation of *Caldicellulosiruptor bescii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4421. <https://doi.org/10.1128/AEM.00570-16>
48. Mahtab Uddin, T., Jyoti Chakraborty, A., Khusro, A., Redwan Matin Zidan, B., Mitra, S., Bin Emran, T., Dhama, K., Kamal Hossain Ripon, M., Gajdács, M., Umar Khayam Sahibzada, M.,

- Jamal Hossain, M., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, *14*, 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
49. Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10101310/S1>
50. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, *23*(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23040795>
51. Marcone, G. L., Binda, E., Berini, F., & Marinelli, F. (2018). Old and new glycopeptide antibiotics: From product to gene and back in the post-genomic era. *Biotechnology Advances* (T. 36, Numeris 2, p. 534–554). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.009>
52. Markley, J. L., & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAY), 1058. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01058>
53. Martos, P., & Shurmer, B. (2012). Sample Preparation Techniques for the Determination of Veterinary Drugs in Food Matrices. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*, 405–414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00141-1>
54. Masi, M., & Pagès, J.-M. (2013). Suppl 1: Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in Enterobacteriaceae: the OmpF/C – TolC Case. *The Open Microbiology Journal*, *7*(1), 22. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010022>
55. Meek, R. W., Vyas, H., & Piddock, L. J. V. (2015). Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? *PLoS Biology*, *13*(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002266>
56. Mosa, A., Hutter, M. C., Zapp, J., Bernhardt, R., & Hannemann, F. (2015). Regioselective Acetylation of C21 Hydroxysteroids by the Bacterial Chloramphenicol Acetyltransferase I. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, *16*(11), 1670–1679. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201500125>
57. Mullins, N. D., Deadman, B. J., Moynihan, H. A., McCarthy, F. O., Lawrence, S. E., Thompson, J., & Maguire, A. R. (2016). The impact of storage conditions upon gentamicin coated antimicrobial implants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(6), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.05.002>
58. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
59. Murray, L. M., Hayes, A., Snape, J., Kasprzyk-Hordern, B., Gaze, W. H., & Murray, A. K. (2024). Co-selection for antibiotic resistance by environmental contaminants. *npj Antimicrobials and Resistance*, *2*(1), 9. <https://doi.org/10.1038/S44259-024-00026-7>
60. Naidoo, Y., Cowan, D. A., & Pierneef, R. E. (2020). *Investigation of the microbial community composition and functional potential in Namib Desert soils*.
61. Nishiyama, M., Iguchi, A., & Suzuki, Y. (2015). Identification of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as vanC-type Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from sewage and river water in the provincial city of Miyazaki, Japan. *Journal of Environmental Science and*

- Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 50(1), 16–25. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.964599>
62. Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. G. J., & Hobman, J. L. (2017). Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Advances in Microbial Physiology*, 70, 261–313. <https://doi.org/10.1016/BS.AMPBS.2017.02.001>
63. Pandey, N., & Cascella, M. (2023). Beta-Lactam Antibiotics. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>
64. Papich, M. G. (2016). Florfenicol. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*, 327–329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00264-3>
65. Patel, P. H., & Hashmi, M. F. (2023). Macrolides. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551495/>
66. Pazra, D. F., Latif, H., Basri, C., Wibawan, I. W. T., & Rahayu, P. (2023). Distribution analysis of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from floor surface and effluent of pig slaughterhouses in Banten Province, Indonesia. *Veterinary World*, 16(3), 509–517. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.509-517>
67. Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 426686. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02928/BIBTEX>
68. Pham, T. D. M., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 10(10), 1719. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>
69. Popowska, M., & Krawczyk-Balska, A. (2013). Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAR), 40688. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2013.00044/BIBTEX>
70. Popowska, M., Rzczycka, M., Miernik, A., Krawczyk-Balska, A., Walsh, F., & Duffy, B. (2012). Influence of Soil Use on Prevalence of Tetracycline, Streptomycin, and Erythromycin Resistance and Associated Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1434. <https://doi.org/10.1128/AAC.05766-11>
71. Quaik, S., Embrandiri, A., Ravindran, B., Hossain, K., Al-Dhabi, A., Arasu, V., Ignacimuthu, S., & Ismail, N. (2019). *Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries*. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.015>
72. Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Switzerland)* (T. 11, Numeris 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
73. Schroeder, M. R., Lohsen, S., Chancey, S. T., & Stephens, D. S. (2019). High-Level Macrolide Resistance Due to the Mega Element [mef(E)/mel] in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00868>
74. Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* (T. 28, Numeris 5, p. 519–542). <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>

75. Selim, S. (2022). Mechanisms of gram-positive vancomycin resistance (Review). *Biomedical Reports*, 16(1). <https://doi.org/10.3892/BR.2021.1490>
76. Shetty, V. P., Akshay, S. D., Rai, P., & Deekshit, V. K. (2023). Integrons as the potential targets for combating multidrug resistance in Enterobacteriaceae using CRISPR- Cas9 technique. *Journal of applied microbiology*, 134(7). <https://doi.org/10.1093/JAMBIO/LXAD137>
77. Shutter, M. C., & Akhondi, H. (2023). Tetracycline. *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*, 1195–1203. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>
78. Sojo-Dorado, J., & Rodríguez-Baño, J. (2023). Gentamicin. *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*, 964–991. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>
79. Sparkes, D., & Enoch, D. A. (2023). Quinolones. *Comprehensive Pharmacology*, 7, 240–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00171-7>
80. Sujatha, S., & Praharaj, I. (2012). Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/781679>
81. Suzuki, S., Kadoya, A., Masuda, N., Sugimoto, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Takei, A., Chou, H. Y., & Wu, J. H. (2022). Macrolide resistance genes and mobile genetic elements in waterways from pig farms to the sea in Taiwan. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 29, 360–370. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2022.04.024>
82. Takaya, Akiko, Yoshiharu Sato, Tatsuma Shoji, and Tomoko Yamamoto. 2013. “Methylation of 23S rRNA Nucleotide G748 by RlmAII Methyltransferase Renders Streptococcus Pneumoniae Telithromycin Susceptible.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(8):3789. doi: 10.1128/AAC.00164-13.
83. Thakuria, B., & Lahon, K. (2013). The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 7(6), 1207–1214. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5239.3052>
84. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). *β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
85. Trif, E., Cerbu, C., Olah, D., Zăblău, S. D., Spînu, M., Potârniche, A. V., Pall, E., & Brudașcă, F. (2023). Old Antibiotics Can Learn New Ways: A Systematic Review of Florfenicol Use in Veterinary Medicine and Future Perspectives Using Nanotechnology. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/ANI13101695>
86. Veepanattu, P., Singh, S., Mendelson, M., Nampoothiri, V., Edathadatil, F., Surendran, S., Bonaconsa, C., Mbamalu, O., Ahuja, S., Birgand, G., Tarrant, C., Sevdalis, N., Ahmad, R., Castro-Sanchez, E., Holmes, A., & Charani, E. (2020). Building resilient and responsive research collaborations to tackle antimicrobial resistance—Lessons learnt from India, South Africa, and UK. *International Journal of Infectious Diseases*, 100, 278. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2020.08.057>

87. Veirup, N., & Kyriakopoulos, C. (2023). Neomycin. *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*, 1046–1052. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>
88. Venkataravanappa, L. R., Jyothi, M., Khamees, H. A., Silina, E., Stupin, V., Achar, R. R., Al-Ghorbani, M., & Khanum, S. A. (2023). Design, Synthesis, Characterization, and Analysis of Antimicrobial Property of Novel Benzophenone Fused Azetidinone Derivatives through In Vitro and In Silico Approach. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(1), 92–109. <https://doi.org/10.3390/CIMB45010007/S1>
89. Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277. <https://doi.org/Article>
90. Wang, C. M., Zhao, F. L., Zhang, L., Chai, X. Y., & Meng, Q. G. (2017). Synthesis and antibacterial evaluation of a series of 11,12-cyclic carbonate azithromycin-3-O-descladinosyl-3-O-carbamoyl glycosyl derivatives. *Molecules*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22122146>
91. Wang, L., Zhao, X., Wang, J., Wang, J., Zhu, L., & Ge, W. (2019). Macrolide- and quinolone-resistant bacteria and resistance genes as indicators of antibiotic resistance gene contamination in farmland soil with manure application. *Ecological Indicators*, 106. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2019.105456>
92. Wang, Y., Zhang, R., Lei, Y., & Song, L. (2022). Antibiotic resistance genes in landfill leachates from seven municipal solid waste landfills: Seasonal variations, hosts, and risk assessment. *The Science of the Total Environment*, 853. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.158677>
93. Waters, M., & Tadi, P. (2023). Streptomycin. *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*, 2471–2487. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>
94. Wu, D., Su, Y., Wang, P., Zhao, J., Xie, J., & Xie, B. (2022). Uncover landfilled antimicrobial resistance: a critical review of antibiotics flux, resistome dynamics and risk assessment. *National Science Open*, 1(2), 20220012. <https://doi.org/10.1360/NSO/20220012>
95. Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, 2011, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
96. Xu, M., Wang, W., & Wright, G. D. (2022). Glycopeptide antibiotic discovery in the genomic era. *Methods in Enzymology*, 665, 325–346. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2021.11.009>
97. Zhang, Y., Zhang, N., Wang, M., Luo, M., Peng, Y., Li, Z., Xu, J., Ou, M., Kan, B., Li, X., & Lu, X. (2023). The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosafety and Health*, 5(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/J.BSHEAL.2023.01.001>
98. Zhang, R., Yang, S., An, Y., Wang, Y., Lei, Y., & Song, L. (2022). Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review. *Science of The Total Environment*, 806, 150647. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150647>