VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Modestas Katauskis

Iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų izoliatų bioplėvelės formavimas ir atsparumas antibiotikams

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Prof. dr. Eglė Lastauskienė

Konsultantas

Dokt. Gintarė Jansonaitė

Darbas atliktas

GMC Biomokslų instituto Ekologijos ir aplinkotyros centre VU GMC Biomokslų institute, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje, Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijoje

Vilnius 2025

Turinys

Santrumpos **4**

Įvadas **5**

1. Literatūros apžvalga **6**
1.1. Komunalinių atliekų sąvartynas ... 6
1.1.1. Komunalinių atliekų sąvartynas: mikrobiomas ir aplinka ... 6
1.1.2. Komunalinių atliekų sąvartynas: keliamos rizikos ... 8
1.1.3. Komunalinių atliekų sąvartynas: atsparumas antibiotikams ... 9
1.2. Bioplėvelės ... 9
1.2.1. Bioplėvelės: formavimo ciklas ... 9
1.2.2. Bioplėvelės: sudėtis ... 10
1.2.3. Bioplėvelės: atsparumas aplinkai ... 11
1.2.4. Bioplėvelės: tolerancija antibiotikams ... 12
1.3. Antibiotikai ... 13
1.3.1. Antibiotikai: veikimo mechanizmai ... 14
1.3.2. Antibiotikai: atsparumas ... 16
1.3.3. Antibiotikai: atsparumo plitimas ... 18

2. Medžiagos ir metodai **20**
2.1. Medžiagos ... 20
2.1.1. Mikroorganizmai ... 20
2.1.2. Reagentai ... 20
2.1.3. Terpės ir tirpalai ... 21
2.1.4. Prietaisai ir įranga ... 21
2.2. Metodai ... 22
2.2.1. Mėginių surinkimo vieta ... 22
2.2.2. Bakterijų izoliatų izoliavimas ... 22
2.2.3. Genominės DNR išskyrimas ... 23
2.2.4. Izoliatų taksonominis identifikavimas ... 23
2.2.5. Ląstelių paruošimas ir bioplėvelės auginimas ... 23
2.2.6. Bioplėvelės formavimo vertinimas KV metodu ... 24
2.2.7. Bioplėvelės formavimo vertinimas pagal bioplėvelės metabolinį aktyvumą ... 25
2.2.8. Polimerazės grandininė reakcija ... 27
2.2.9. DNR elektroforezė agarozės gelyje ... 29
2.2.10. Agaro šulinėlių difuzijos metodas ... 30
2.2.11. Duomenų statistinė analizė ... 30

3. Rezultatai **32**
3.1. Kazokiškių sąvartyno kultivuojamų bakterijų izoliatų identifikacija ... 32
3.2. Bioplėvelės formavimo vertinimas KV metodu ... 33
3.3. Bioplėvelės metabolinio aktyvumo vertinimas naudojant reagentą resazuriną ... 34
3.4. Atsparumo genų identifikavimas PGR metodu vykdant elektroforezę ... 35
3.5. Izoliatų jautrumo antibiotikams vertinimas agaro šulinėlių difuzijos metodu ... 36

4. Rezultatų aptarimas **38**

Išvados **41**

Asmeninis indėlis **42**

Padėka **43**

Santrauka **44**

Abstract **45**

Naudotos literatūros sąrašas **46**

Santrumpos

EPM – ekstraląstelinės polimerinės medžiagos

AAG – antibiotikų atsparumo genai

eDNR – ekstraląstelinė deoksiribonukleorūgštis

HGP – horizontali genų pernaša

PJP – peniciliną jungiantys baltymai

KV – kristalo violetas

OT – optinis tankis

bp – bazių pora

Įvadas

Antibiotikams atsparių bakterijų plitimas yra viena didžiausių problemų, su kuria susiduria visame pasaulyje esantys sektoriai, lemiantys infekcinių ligų eigos blogėjimą, finansinius nuostolius, išaugusį mirtingumą (Hofer, 2019; Naghavi ir kt., 2024). Vis dažniau aptinkama su antibiotikų atsparumu susijusių genų aplinkos mėginiuose, o prie to reikšmingai prisideda antropogeninės taršos židiniai. Komunalinių atliekų sąvartynai laikomi svarbiu antibiotikų atsparumo genų rezervuaru – rezistomu, kuris glaudžiai susijęs su bakterijų bendruomenių sudėtimi (Bai ir kt., 2022; Yu ir kt., 2020). Vis dėl to mažai žinoma, kokie konkretūs mikroorganizmai sąvartynų aplinkoje turi šiuos atsparumo genus, kadangi dauguma tyrimų atliekami metagenominiu lygmeniu (Bai ir kt., 2022). Dėl šios priežasties siekiant įvertinti rizikas susijusias su atsparumu antibiotikams, tikslinga izoliuoti ir identifikuoti atskiras bakterijų kultūras iš sąvartyno mėginių.

Vienas svarbiausių veiksnių, leidžiančių bakterijoms išgyventi nepalankiose aplinkos sąlygose bei prisidėti prie antibiotikų atsparumo genų plitimo – gebėjimas formuoti bioplėvelę. Bioplėvelės užląstelinis matriksas veikia kaip apsauginis barjeras: jame esančios bakterijos atsparesnės aplinkos veiksniams, gali išvengti antimikrobinių medžiagų poveikio todėl pasižymi didesne tolerancija nei planktoninės ląstelės (A. Gautam ir kt., 2022; Olsen, 2015). Tarp bioplėvelėje esančių bakterijų stebima aktyvesnė horizontali genų pernaša, lemianti padidėjusius genetinės informacijos, tarp jų ir antibiotikų atsparumo genų, mainus (Banin ir kt., 2017; Michaelis & Grohmann, 2023). Dėl to bakterijų gebėjimo formuoti bioplėvelę ir atsparumo antibiotikams įvertinimas reikšmingas, siekiant suprasti jų vaidmenį plintant antibiotikų atsparumo genams aplinkoje.

Mokslinėse publikacijose atkreipiamas dėmesys į sąvartyno bakterijas, turinčias antibiotikų atsparumo genus, ir su tuo susijusį atsparumą antibiotikams, tačiau Lietuvos mastu tokio pobūdžio publikacijų trūksta. Šiame darbe tirti iš Kazokiškių sąvartyno išskirti bakterijų izoliatai – atlikta taksonominė identifikacija, įvertintas bioplėvelės formavimas ir nustatytas genotipinis bei fenotipinis atsparumas antibiotikams, siekiant geriau suprasti aplinkos bakterijų įtaką genų, lemiančių atsparumą antibiotikams, plitimui.

Darbo tikslas – įvertinti iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų izoliatų gebėjimą formuoti bioplėvelę ir nustatyti izoliatų atsparumą antibiotikams.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų izoliatų taksonominę padėtį.
2. Įvertinti iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų izoliatų gebėjimą formuoti bioplėvelę.
3. Įvertinti genų, susijusių su atsparumu tetraciklinams, makrolidams, aminoglikozidams bei β-laktaminiams antibiotikams pasiskirstymą, analizuojamuose izoliatuose.
4. Įvertinti analizuojamų izoliatų jautrumą antibiotikams fenotipiškai.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Komunalinių atliekų sąvartynas

Sąvartynas apibrėžiamas kaip specializuota ir tam pritaikyta vieta atliekų šalinimui, suspaudimui ir pylimui. Šiuo metu sąvartynas reikalauja mažesnių sąnaudų nei kiti šalinimo būdai ir yra vienintelis neperdirbamų atliekų šalinimo būdas (Vaverková, 2019). Tokie sąvartynai yra įprasta kietųjų komunalinių atliekų šalinimo praktika visame pasaulyje. Net ~ 65 % tokių atliekų patenka į sąvartynus, ~12 % komunalinių atliekų perdirbama, ~16 % panaudojama energijai išgauti, ~7 % kompostuojama (Kaza ir kt., 2018). Vis dėl to, dėl sąvartynų keliamos rizikos žmonių sveikatai, aplinkos ekosistemoms, šiltnamio efekto didinimo bei siekiant didesnio efektyvumo skatinama alternatyvių atliekų šalinimo priemonių plėtra bei vystymas (Mor & Ravindra, 2023). Dėl šių priežasčių Europos sąjungos direktyvoje nustatyti griežti reikalavimai sąvartynams bei šalinamų atliekų mažinimo tikslai (European Commission. Directorate General for the Environment., 2014). Įsigaliojus direktyvoms per pastarąjį dešimtmetį Europos sąjungos valstybėse stebimas atliekų perdirbimo, kompostavimo padidėjimas, o į sąvartynus patenkančių atliekų kiekis sumažėjo ~ 20 % (Eurostat, 2022). Nepaisant to, pagal atliekų susidarymą išlieka antroje vietoje pasaulyje, ir siekia 392 mln. tonų per metus (Shah ir kt., 2023).

Atliekos į sąvartynus patenka iš įvairių sektorių, tokių kaip, žemės ūkis, pramonė, paslaugų, sveikatos priežiūros, bei namų ūkio buitinės (komunalinės) atliekos (Minelgaitė & Liobikienė, 2019). Pastarosios pasižymi didžiausia įvairove, kurioje didžiąją dalį sudaro organinės kilmės medžiagos, antriniam perdirbimui nebetinkančios atliekos, popierius bei plastikas (Win ir kt., 2024). Dėl labai nevienalytės atliekų prigimties ir sudėtingų evoliucijos procesų sąvartynų dirvožemyje aptinkamas platus spektras organinių medžiagų, amonio jonų, sunkiųjų metalų ir neorganinių druskų (Costa ir kt., 2019; Naveen ir kt., 2017). Atliekose taip pat identifikuojami ir netinkamai utilizuojami antibiotikai, priklausantys įvairioms antibiotikų grupėms, įskaitant β-laktamus, fluorchinolonus, tetraciklinus ir kt. (P. Wang ir kt., 2019). Tokių įvairių medžiagų buvimas lemia bakterijų populiacijų įvairovę ir daro įtaką sąvartyno mikroorganizmų selektyviai atrankai, lemiančiai atsparių bakterijų pranašumą prieš jautrias ir paplitimui aplinkoje.

1.1.1. Komunalinių atliekų sąvartynas: mikrobiomas ir aplinka

Dėl didelio komunalinių atliekų raciono sąvartynai tampa viena iš dinamiškiausių sausumos ekosistemų, kuriose aptinkama didelė įvairovė mikroorganizmų populiacijų. Naudojant nuo kultivavimo priklausomus ir nepriklausomus metodus identifikuojami skirtingoms filogenetinėms grupėms priklausomi organizmai. Vertinant mikroorganizmų pasiskirstymą apie 90 % identifikuotų 16S rRNR

geno sekų priklauso bakterijų domenui. Vyraujančios bakterijos priklauso *Pseudomonadota, Actinomycetota, Acidobacteriota, Bacillota, Verrucomicrobiota, Nitrospinota* tipams. Archėjų domenui priklausomų sekų identifikuojama iki 10 %, tarp jų net 90 % priklausančių *Euryarchaeota* tipui iš kurių dominuoja *Methanomicrobiliales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales* eilės archėjos (Zainun & Simarani, 2018; R. Zhao ir kt., 2021).

Tokia sudėtis nepastovi ir nuolat kintanti, o skirtingose sąvartyno vietose vyrauja įvairios bakterijos. Pavyzdžiui *Clostridium*, *Syntrophus* ir *Sporotomaculum* skatina metano gamybą, pagreitindami angliavandenilių skaidymą sąvartynų anaerobinėse vietose (Gieg ir kt., 2014). Sąvartyno dugne taip pat lokalizuoti metanogenai ir rūgštis gaminančios bakterijos, skaidančios organines medžiagas, susidarant didžiausiam kiekiui metano (Slezak ir kt., 2015; Z. Wang ir kt., 2015). Tuo tarpu metanotrofai, tokie kaip *Methylocystis*, *Methylocaldum* gali fiksuoti išsiskyrusį metaną naudojant fermentų kompleksus ir metano monooksigenazę aerobinėmis sąlygomis sąvartyno paviršiniuose sluoksniuose (R. Zhao ir kt., 2021).

Nepaisant bendros medžiagų sąvartyno sudėties bei joje aptinkamų mikroorganizmų, nustatant sąvartyno aplinkos būklę įtakos turi ir kiti fizikiniai bei cheminiai parametrai. Šie parametrai susiję tiek su pačių mikroorganizmų augimu, tiek su sąvartyne vykstančiais biodegradacijos procesais. pH vertė glaudžiai susijusi su mikroorganizmų dauginimusi ir tiesiogiai veikia kietųjų atliekų hidrolizę, rūgštėjimą ir metanogenines reakcijas (Chakma & Mathur, 2013). Sąvartyno mėginiuose pH vertės gali svyruoti nuo 4,5 iki 9, o pats palankiausias pH kuriame vyksta efektyvi biodegradacija varijuoja nuo 5,6 iki 8 (Alavi ir kt., 2018; Bareither ir kt., 2012). Atkreiptinas dėmesys į tai, kad esant temperatūrai nuo 22 °C iki 45 °C spartėja biodegradacijos procesai, ko pasekoje į aplinką išskiriamas didesnis dujų kiekis, o tai prisideda prie pasaulinės klimato kaitos (Y. R. Zhao ir kt., 2016). Atsižvelgiant į drėgmės kiekį aplinkoje gaunamas skirtingas kiekis nuotekų, surenkamų iš sąvartyno. Esant mažesniam kritulių kiekiui surenkamų nuotekų teršalų koncentracijos didesnės lyginant su mėginiais rinktais iš šlapių sąvartynų (Abunama ir kt., 2021). Esant mažam vandens kiekiui aplinkoje stebimas fermentinės hidrolizės efektyvumo sumažėjimas (Weiss ir kt., 2019).

Identifikuoti mikroorganizmai geba išlikti sąvartyno aplinkoje ir metabolizuoti įvairius substratus. Grybeliai *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., bei *Aspergillus* spp. geba metabolizuoti lignoceliuliozę išskirdami celiuliazinius fermentus priklausančius glikozil hidrolazių šeimai (S. P. Gautam ir kt., 2012). Tokiu aktyvumu pasižymi ir kai kurios *Bacillus* spp., priklausančios bakterijos (Gaidė & Čižeikienė, 2019). Paprastai ilgos grandinės polimero skaidymas yra sudėtingas procesas susidedantis iš įvairių fizinių ir biocheminių reakcijų. Kai kuriais atvejais toks procesas reikalauja kelių mikroorganizmų bendradarbiavimo. Pavyzdžiui iš sąvartyno izoliuota *Lysinibacillus* sp. potencialiai gali skaidyti polietileną, polipropileną, polihidroksialkanoatus, o konsorciume su *Pseudomonas aeruginosa* gali suardyti įvairias polistireno plėveles ar mikroplastiką. Minėti organizmai kolonizuoja

jų paviršių sudarydami bioplėvelę, taip sukuriama hidrofilinė aplinka, kuri svarbi polistireno degradacijos proceso metu vykstančiai oksidacijai (W. Wang ir kt., 2024). Taigi komunalinių atliekų sąvartynai pasižymi didele mikroorganizmų, prisitaikiusių išgyventi kintančiomis aplinkos sąlygomis, įvairove. Jų buvimas neatsiejamas su įvairiais sąvartyno biodegradacijos procesais, tačiau toks aplinkos nepastovumas bei mikrobiologinės sudėties kintamumas gali būti tiesiogiai susijęs su keliamomis rizikomis.

1.1.2. Komunalinių atliekų sąvartynas: keliamos rizikos

Nors dabartiniai sąvartynai įrengiami laikantis numatytų kriterijų, o veikla griežtai reguliuojama, vis dar stebimas poveikis kitoms ekositemoms. Dirvožemio mėginiuose aplink sąvartynus detektuojamos didesnės sunkiųjų metalų koncentracijos, stebima ekspozicijos įtaka augalų augimui, o paplitę toksinai patenka į augalus ir juda maisto grandine, per kurią galiausiai pasiekia ir žmones (Anand & Palani, 2022; Rezapour ir kt., 2018). Kai kuriais atvejais didesnės teršalų koncentracijos aptinkamos ir vandens mėginiuose (B. Zhang ir kt., 2016). Organinių medžiagų biodegradacijos metu susidariusios sąvartyno dujos, teršia orą (Rada ir kt., 2015). Net 40–60 % šių dujų sudaro metanas, kurio gamyba intensyviausia po 1–2 metų atliekų dekompozicijos ir tęsiasi 15–25 metus, vyraujant skaidymui anaerobinėmis sąlygomis (Vaverková, 2019). Be to, į orą patenka anglies dioksidas, sieros dioksidas, azoto oksidas kurie prisideda prie rūgštinio lietaus, bendro oro užterštumo, klimato atšilimo bei daro įtaką žmonių sveikatai ir aplinkai (Yang ir kt., 2018). Tokia tarša aplinkoje per tiesiogines ir netiesiogines sąveikas gali pakenkti žmogaus sveikatai, kitiems ekosistemose gyvenantiems organizmams. Poveikis gali svyruoti nuo ūmaus apsinuodijimo iki kancerogeniškumo, endokrininės sistemos toksiškumo, genotoksiškumo, mutageniškumo, priklausomai nuo teršalų pobūdžio (Limoli ir kt., 2019).

Vienas iš pagrindinių teršalų, susijusių su sąvartynais, yra filtratas, susidaręs iš prasisunkusio lietaus, biologinio atliekų skaidymo proceso metu susidariusio bei atliekų sudėtyje esančio vandens, kuriame daug organinių medžiagų, druskų, sunkiųjų metalų jonų, antibiotikų ir kitų organinių junginių, tokių kaip chloruoti alifatiniai junginiai, pesticidai (Liu ir kt., 2015). Toks filtratas toksiškas dirvožemyje esantiems mikroorganizmams ir gali kelti grėsmę supančiai aplinkai bei egzistuojančiai ekosistemai (Baderna ir kt., 2019). Atlikti toksiškumo tyrimai su bandomaisiais organizmais, tokiais kaip bakterijos, dumbliai, augalai, žuvys, midijos ir net žinduoliais (Ghosh ir kt., 2017). Nustatyta, kad medžiagos, esančios filtrate gali sukelti genotoksinius pakitimus ląstelėse skatindamas viengrandžių bei dvigranžių DNR pažeidimus nutraukiant ryšius tarp azotinių DNR bazių. Su tuo siejami Cr, Pb, Ni metalai aptinkami sąvartyno mėginiuose (Anand & Palani, 2022). Aptinkamos ir bazių porų pakaitos, skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos kurias gali sukelti nukleotidų insercijos bei delecijos (Alabi ir kt., 2019). Sąvartyno aplinkoje, kurioje egzistuoja tiek antibiotikai, tiek kitos medžiagos,

skatinančios mutacijas, gali lemti mikroorganizmų padidėjusį atsparumą antibiotikams ir su tuo susijusių AAG atsiradimą (R. Zhang ir kt., 2022).

1.1.3. Komunalinių atliekų sąvartynas: atsparumas antibiotikams

Nepaisant tiesioginio teršalų poveikio, sąvartynai laikomi vienu iš antibiotikų atsparumo genų (AAG) rezervuaru – rezistomu. Nepanaudoti antibiotikai ir AAG patenka į sąvartynus su atliekomis iš įvairių ūkių objektų (Yu ir kt., 2020). Antibiotikų ekspozicija gali lemti selektyvų spaudimą AAG atsiradimui bei plitimui, o pati AAG gausa ir pasiskirstymas yra glaudžiai susijęs su bakterijų bendruomenių struktūra ir sudėtimi, priklausančia nuo anksčiau aptartų aplinkos sąlygų (Bai ir kt., 2022). Tuo tarpu genai, identifikuojami sąvartyno aplinkos bakterijose, gali būti perduodami tarp skirtingų mikroorganizmų per horizontalų genų pernešimą (HGP), o kai kurie klinikiniai patogenai įgyja atsparumą būtent iš aplinkos bakterijų (Qiao ir kt., 2018).

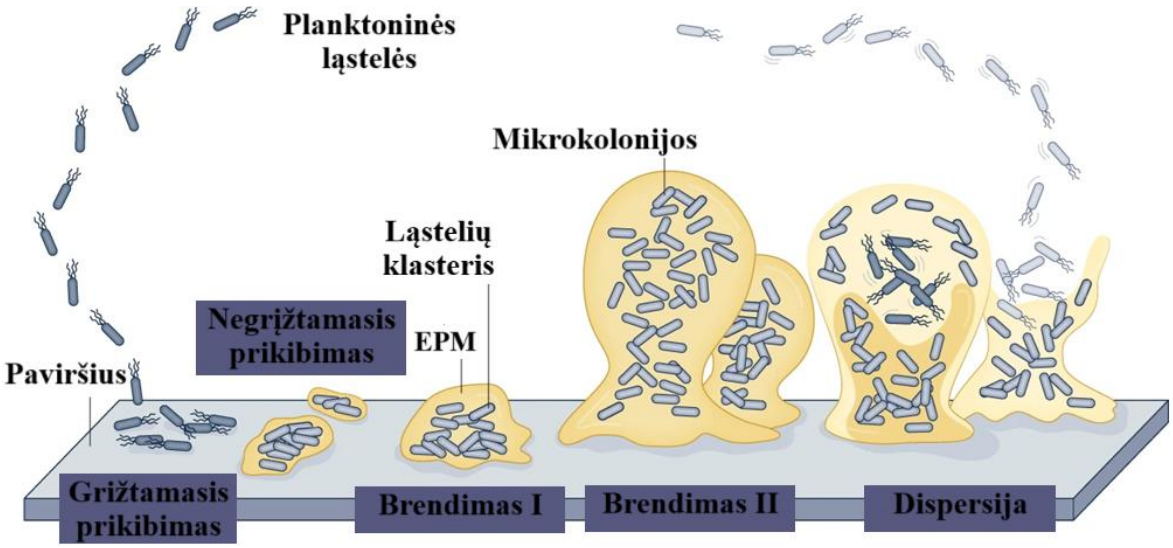
Šiai dienai tolimesnis plitimas už sąvartyno ribų asocijuojamas su tiesioginiu filtrato patekimu į aplinką (Yu ir kt., 2020). Tokiu būdu AAG aptinkamas sąvartyne plinta į aplinkines ekosistemas. Tuo tarpu informacijos apie AAG šeimininkus sąvartyno aplinkoje ir su jais susijusiais plitimo rizikos veiksniais nėra daug. Didžioji dalis tyrimų susiję su metagenominiais tyrimais, nesant atsekamumui, kokiam mikroorganizmui priklauso konkretus identifikuotas AAG (Bai ir kt., 2022). Dėl to AAG šeimininkų nustatymas sąvartynų ekosistemose yra svarbus norint nustatyti jų riziką aplinkai ir žmonių sveikatai.

1.2. Bioplėvelės

Bakterijos gamtoje gali išgyventi kaip planktoninės arba bioplėvelių sudėtyje/formoje. Bioplėveles sudaro ląstelių sankaupos, apgaubtos savarankiškai pagamintame ekstraląstelinių polimerinių medžiagų (EPM) matrikso, prilimpa viena prie kitos ir/arba prie kito paviršiaus, sudarydamos mikrokolonijas (Flemming ir kt., 2021; Vert ir kt., 2012). Teigiama, kad tokioje formoje egzistuoja net apie 80 % aptinkamų aplinkos mikroorganizmų (Flemming & Wuertz, 2019).

1.2.1. Bioplėvelės: formavimo ciklas

Bioplėvelės formavimo modelis pirmiausia buvo nustatytas tiriant *P. aeruginosa* bioplėvelės formavimo mechanizmus. Procesas, kurio metu ląstelės formuoja bioplėveles yra ciklinis ir susideda iš penkių specifinių etapo dalių pavaizduotų **1.2.1** paveiksle (Sauer ir kt., 2022).



1.2.1 paveikslas Penkių žingsnių bioplėvelės formavimo modelis. Adaptuota iš (Sauer ir kt., 2022)

Bioplėvelės formavimasis prasideda nuo pradinio pavienių, laisvai plaukiojančių planktoninių ląstelių adhezijos prie paviršiaus. Pabrėžtina ir tai, kad ląstelės formuodamos bioplėvelę gali formuoti tarpusavio agregatus (Sauer ir kt., 2022). Žinoma, kad prikibimas yra svarbus formavimo procesas, bakterijų prisitvirtinimas padidina kitų laisvai plaukiojančių ląstelių agregavimą, ko pasekoje ima formuotis kelių sluoksnių ląstelių sankaupa (Perni ir kt., 2014). Tokiam prisitvirtinimui svarbų vaidmenį atlieka, paviršiaus fizinės savybės, Van der Valso bei elektrostatinės jėgos, hidrofobinės sąveikos, taip pat planktoninių ląstelių judėjimas. Perėjime iš grįžtamojo į negrįžtamąjį prikibimą suaktyvinama ekstraląstelinių polisacharidų, specifinių ligandų, tokių kaip pilės, fimbrijos gamyba leidžiančių sudaryti tvirtą sąveiką su kolonizuojamu paviršiumi (Palmer ir kt., 2007). Priklausomai nuo aplinkos fiziko cheminių sąlygų vėliau stebimas pirminės bioplėvelės augimas. Negrįžtamai prisijungusios ląstelės auga ir dalijasi, formuojamos įvairių formų tridimensinės struktūros, kurios skirtingose vietose esančios ląstelės pasižymi skirtinga genų raiška bei metabolizmu. Vandens kanalai įsiterpę į šias tridimensines struktūras padeda keistis maisto medžiagomis, deguonimi, šalinti toksinus (Wilkins ir kt., 2014). Paskutinis bioplėvelės formavimo etapas – dispersija, jos metu planktoninės ląstelės išsilaisvina iš EPM apsuptos bioplėvelės inicijuojant matrikso skaidymą ir iš sėslios formos grįžta į judrią. Galimas ir bioplėvelės dalinis atsiskyrimas, kuomet dalis bioplėvelės matrikso atsiskiria kartu su jame esančiomis ląstelėmis. Tokiu būdu atsiskirdamos ląstelės gali kolonizuoti naujas nišas ir pradėti ciklą iš naujo (McDougald ir kt., 2012).

1.2.2. Bioplėvelės: sudėtis

Bioplėvelės matriksas sudarytas iš baltymų, polisacharidų, DNR ir kitų biomolekulių ir sudaro iki 90 % visos bioplėvelės biomasės (Arzmi ir kt., 2023). Egzopolisacharidai sudaro tvirtą ir lipnią bioplėvelės formavimo sistemą ir veikia kaip kitų baltymų, nukleorūgščių ir lipidų karkasas. Manozė,

galaktozė, N-acetilgliukozaminas ir fukozė yra svarbios bakterijų ląstelių išskiriamų egzopolisacharidų sudedamosios dalys, o jų įvairovė labai plati (Karunaratne, 2012). *P. aeruginosa* gali gaminti daugybę egzopolisacharidų, įskaitant neigiamo krūvio gulurono ir manorono rūgšties polimerą alginatą, neutralų polisacharidą sudarytą iš pasikartojančio pentasacharido , kuriame yra gliukozės, manozės ir ramnozės – Psl ir Pel, susidedantį iš katijoninių aminosacharidų. Teigiamas Pel krūvis palengvina jo prisijungimą prie ekstraląstelinės deoksiribonukleorūgšties (eDNR) bioplėvelėje formuojant jos struktūrą (Jennings ir kt., 2015). Tuo tarpu pati eDNR dalyvauja ne tik kaip struktūrinis elementas, bet ir bioplėvelės struktūros formavime, HGP, taip pat kaip signalinė molekulė, atlieka svarbų vaidmenį pirminėje adhezijos stadijoje, DNR pažaidų taisyme bei gali būti panaudota kaip organinės anglies, azoto ir fosforo šaltinis (Campoccia ir kt., 2021; Hall & Mah, 2017; McDonough ir kt., 2016). Jos kiekis valdomas reguliuojant autolizės procesus, vykdant aktyvią sekreciją ar atpalaiduojant membraninines vezikules (Okshevsky & Meyer, 2015). Tuo tarpu matrikse esančių baltymų sudėtis ir funkcijos taip pat įvairios. Kai kurie atsakingi už fermentinę biocheminių reakcijų katalizę, makromolekulių skaidymą iki mažos molekulinės masės produktų, kuriuos būtų galima pernešti į ląsteles ir panaudoti kaip energijos šaltinį (Rumbaugh & Sauer, 2020). Tokie baltymai kaip hidrolazės, esterazės, proteazės, liazės atsakingi už bioplėvelėje esančių struktūrų, tokių kaip egzopolisaharidų, eDNR, baltymų skaidymą, o jų genų raiška padidėja esant dispersijos fazei Baltymai taip pat svarbūs pirminei bioplėvelės formavimo stadijai adhezijai, matrikso moduliavimui bei galutinei – dispersijai (McDougald ir kt., 2012).

1.2.3. Bioplėvelės: atsparumas aplinkai

Bioplėvelės matriksas tarnauja kaip apsauginis barjeras – bioplėvelėse bakterijos atsparesnės aplinkos pokyčiams, mechaniniams bei cheminiams pažeidimams (A. Gautam ir kt., 2022). Pavyzdžiui ultravioletinė spinduliuotė pažeidžia tik viršutiniuose bioplėvelės sluoksniuose esančias bakterijas, o pastarosios reaguodamos į pažaidas gali pradėti gaminti pigmentus, apsaugančius jas ir kitas bakterijas gilesniuose sluoksniuose (de Carvalho, 2017a). Esant dideliems temperatūros skirtumams stebimas didesnis atsparumas tarp bioplėvelėje esančių bakterijų nei planktoninių ląstelių. Toks išgyvenamumas susijęs su karščio-šalčio šoko baltymais, bei matrikso elementais, kurių ekspresija efektyviau reguliuojama bioplėvelėje (Woo ir kt., 2023). Gebėjimas formuoti bioplėvelę taip pat prisideda prie ekstremaliomis sąlygomis gyvenančių acidofilų bei alkalofilų prisitaikymo. Didėjant rūgštiniam pH bei sunkiųjų metalų koncentracijai stebimas bioplėvelės EPM kompozicijos pasikeitimas, lemiantis mikroorganizmų adaptaciją. Pavyzdžiui padidėjęs inozitolio ir 3-o-metilgliukozės kiekis bendroje EPM struktūroje, koreliuoja su padidėjusiu toksiškumu aplinkoje (Blanco ir kt., 2019). Tyrimais įrodyta, kad bioplėvelę formuojančių bakterijų išgyvenamumas didesnis esant staigiems pH pokyčiams,

lyginant su planktoninėmis ląstelėmis (Yin ir kt., 2019). Tai patvirtina bioplėvelės struktūros suteikiamą reikšmingą apsaugą, esant ekstremalioms ir/ar kintančioms aplinkos sąlygoms sąvartynuose.

Vienas iš esminių veiksnių, lemiančių sėkmingesnį išgyvenamumą – kvorumo jutimas, paremtas bioplėvelėje esančių mikroorganizmų tarpusavio komunikacija cheminiais signalais (Y. Wang ir kt., 2022). Priklausomai nuo bakterijų rūšies kvorumo jutimo sistema skiriasi. Gram+ bakterijose vyrauja maži signaliniai peptidai veikiami per dvikomponentę atsako sistemą, o Gram- bakterijose dažniausiai aptinkami *LuxI/LuxR* sistemos N-acyl-homoserino laktonai. Tuo tarpu bendrai daugelį bakterijų vienijančios signalinės molekulės vadinamos *LuxS* sistemos autoinduktoriais. Ši sistema leidžia užtikrinti tarpląstelinę komunikaciją tarp bioplėvelėje esančių mikroorganizmų, siekiant efektyviau reaguoti į aplinkos sąlygas, įskaitant antibiotikų ekspoziciją (Zeng ir kt., 2023).

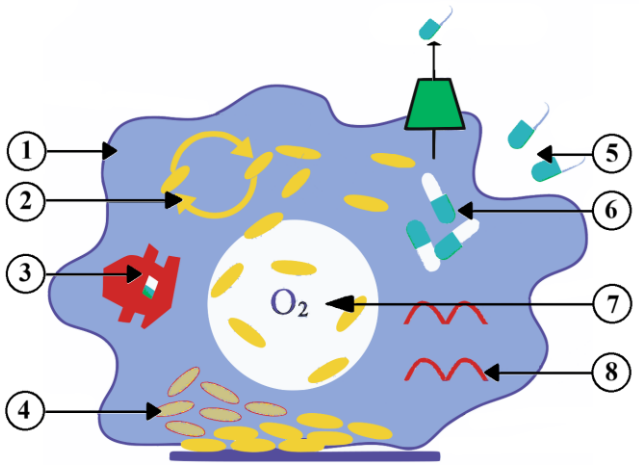
1.2.4. Bioplėvelės: tolerancija antibiotikams

Bioplėvelėse esančios bakterijos gali būti antibiotikams atsparios arba tolerantiškos. Svarbu paminėti tai, kad ir vienu ir kitu atveju dotuoju momentu bakterija išvengia antibiotiko poveikio, tačiau atsparios bakterijos fenotipas yra apibrėžtas genotipiškai atsiradus atitinkamoms mutacijoms ir/arba įgavus naują genų rinkinį ir toks atsparumas išlieka bakterijai perėjus į planktoninę stadiją (plačiau apie atsparumą **1.3.2** skyrelyje). Tuo tarpu tolerantiškumas siejamas su bakterijų savybe išvengti antibiotiko poveikio bioplėvelės aplinkoje dėl jos suteikiamos apsaugos (Olsen, 2015). Bendri veiksniai, lemiantys didesnę toleranciją antibiotikams pavaizduoti **1.2.2** paveiksle.

Nustatyta, kad bioplėvelės centre esančių bakterijų fenotipas pasikeičia t.y. sumažėja medžiagų apykaitos procesai, replikacija, transkripcija, transliacija, ląstelės sienelės sintezė, aktyvinamos toksino-antitoksino sistemos, t.y. ląstelė tampa persistuojančia. Tokiu atveju stebimas sumažėjęs antibiotiko įnešimas į ląstelės vidų bei veikimas duotuoju momentu esant tiesioginiam kontaktui su antibiotiku (J. Yan & Bassler, 2019). Nustatyta, kad bent 1 % stacionarioje fazėje esančių bakterijų bioplėvelėje tampa tolerantiškos antibiotikams (Maisonneuve & Gerdes, 2014). Antibiotiko koncentracijos sumažėjimas stebimas ir dėl didesnės vaisto pašalinimo sistemų ekspresijos, matrikso suteikiamo fizinio barjero, mažinančio antibiotiko difuziją per bioplėvelės sluoksnius (Buroni ir kt., 2014; Singh ir kt., 2016). Tokiu atveju norint pasiekti norimą koncentraciją intraląstelinėje aplinkoje prireikia kur kas didesnių antibiotiko dozių.

EPM, įeinantys į matrikso sudėtį, padeda išveiklinti antibiotikus. Neigiamai įkrauta eDNR gali sudaryti junginius su teigiamai įkrautomis antibiotikų molekulėmis pvz. aminoglikozidais, taip užkertant kelią jų patekimui į ląstelės vidų (Okshevsky & Meyer, 2015). Modelinėje *P. aeruginosa* nustatyta, kad priklausomai nuo eDNR kiekio matrikse gali būti mažinamas bioplėvelės pH, o tai lemia dvikomponentės atsako sistemos PhoPQ ir PmrAB aktyvinimą, atsakingą už lipopolisacharidų modi-

fikavimą, membranos stiprinimą, apsauginių baltymų sintezę, lemiantį jautrumo žalojančioms aplinkos sąlygoms bei antibiotikams sumažėjimą, ypač teigiamai įkrautų polimiksimų (Huang ir kt., 2020). Bioplėvelių ekstraląstelinėje aplinkoje fiksuojami didesni fermentų kiekiai, galintys nutraukti antibiotikų chemines jungtis, stebimas antibiotikų modifikavimas, ko pasekoje vaistas išveiklinamas jam dar nepasiekus tikslinės veikimo vietos ląstelėje (Orazi & O'Toole, 2019). Tokių fermentų gamyba bioplėvelėje apsaugo ne tik produkuojančias, tačiau ir kitos rūšies ląsteles, kurios negamina fermentų, galinčių išveiklinti antibiotikus (Sorg ir kt., 2016).



1.2.2 paveikslas Veiksniai susiję su tolerancijos antibiotikams padidėjimu bioplėvelėse. Bioplėvelės ląstelės (geltona), bioplėvelės matriksas (mėlyna). 1 – Bioplėvelės EPM; 2 – Tarpląstelinė komunikacija (Kvorumo jutimas, HGP); 3 – Fermentų lemiamas atsparumas; 4 – Persistuojančios ląstelės; 5 – Sumažėjusi antibiotikų difuzija per EPM; 6 – Daugiavaisčiai „efliukso" siurbliai; 7 – Mažas maistinių medžiagų bei deguonies kiekis bioplėvelės centre; 8 – eDNR. Adaptuota iš (Ashrafudoulla ir kt., 2021)

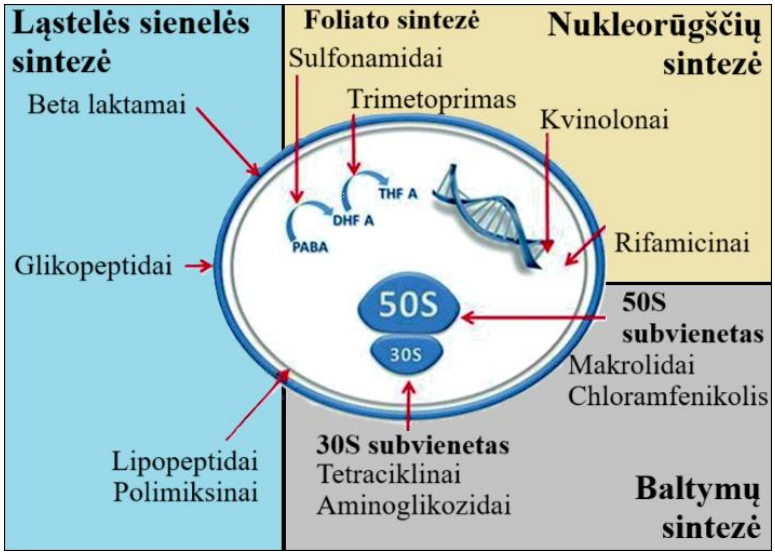
1.3. Antibiotikai

Antibiotikai yra viena sėkmingiausių medicinos terapijos formų. Tai natūralios, pusiau sintetinės ar sintetinės kilmės cheminės medžiagos, naikinančios bakterijas ar slopinančios jų dauginimąsi. Pirmasis kliniškai pritaikytas antibiotikas – penicilinas, atrastas 1928 m., Aleksandro Flemingo ir pradėtas naudoti nuo 1940, iš esmės pakeisdamas infekcinių ligų gydymo eigą (Durand ir kt., 2019). Penicilino pritaikymas klinikinėje praktikoje JAV lėmė mirštamumo nuo infekcinių ligų sumažėjimą daugiau nei 80 %, remiantis epidemiologiniais vertinimais teigiama, kad jų naudojimas prailgino vidutinę gyvenimo trukmę išsivysčiusiose šalyse ir prisidėjo prie papildomų 20–25 gyvenimo metų (Adedeji, 2016). Per kiek mažiau nei šimtmetį įregistruotos ir šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamos 22 antibiotikų klasės, kuriose antibiotikai tarpusavyje skiriasi molekuline struktūra, veikimo būdu ir aktyvumo spektru (Birkelbach ir kt., 2024). Iš jų pasaulyje ir Lietuvoje įvairiuose sektoriuose plačiai naudojami β-laktamai, aminoglikozidai, tetraciklinai, makrolidai (*HIGIENOS INSTITUTAS*, 2019.; Ibrahim ir kt., 2020). 2003 metais patvirtintas vienintelis naujos klasės antibiotikas veikiantis platų spektrą bakterijų – daptomicinas, priklausantis lipopeptidams, visi kiti per pastaruosius 30 metų

rinkoje patvirtinti antibiotikai yra esamų molekulių junginiai ir/ar modifikacijų rezultatai, pasižymintys panašiu veikimo mechanizmu kaip ir jų pirmtakai (Farha ir kt., 2025)

1.3.1. Antibiotikai: veikimo mechanizmai

Pagal veikimo pobūdį antibiotikai skirstomi į keturias pagrindines grupes ir yra atsakingi už gyvybiškai svarbių mikroorganizmų funkcijų sutrikdymą (**1.3.1** pav.), susijusių su ląstelės sienelės, baltymų, nukleorūgščių sintezės slopinimu ir gali pasižymėti bakteriocidiniu ar bakteriostatiniu veikimu (Hall & Mah, 2017).



1.3.1 paveikslas Naudojamų antibiotikų pagrindiniai veikimo taikiniai. Adaptuota iš (Munteanu & Uivarosi, 2021)

Pagrindinis antibiotikų taikinys yra ląstelės sienelė, sudaryta iš peptidoglikano tinklelinės struktūros, į kurią įeina glikano grandinė, sudaryta iš N-acetilgliukozamino ir N-acetilmurano rugšties disacharidų subvienetų, tarpusavyje susietų trumpais pentapeptidiniais tilteliais (Kapoor ir kt., 2017). Sienelės sintezę slopina plačiausiai naudojami β-laktaminiai antibiotikai, glikopeptidai (Hall & Mah, 2017). B-laktaminiai antibiotikai, tokie kaip penicilinai, cefalosporinai, karbapenemai savo struktūroje turintys β-laktaminį žiedą prisijungia prie peptidoglikano kryžminimą atliekančių fermentų transpeptidazių ir karboksipeptidazių, kitaip vadinamų peniciliną jungiančiais baltymais (PJB). Tokia sąveika užkerta kelią peptidinio ryšio susidarymui peptidoglikano kryžminimo metu (Bonomo, 2017). Glikopeptidai prisijungia prie peptidoglikano pentapeptidų D-ala D-ala šoninės grandinės taip užkertant kelią susijungimui su PJB vykdant transpeptidaciją peptidoglikano sintezės metu. Užkirtus kelią ląstelės sienelės sintezei stebimas didėjantis osmosinis slėgis ląstelės viduje ir su tuo susijusi ląstelės autolizė (Stogios & Savchenko, 2020). Tokie antibiotikai kaip lipopeptidai ar polimiksinai taip pat veikia ląstelės sienelę, tačiau priešingai nei β-laktamai ar glikopeptidai, veikia į jau susintetintą sienelę pažeisdami jos integralumą (Materon & Palzkill, 2023). Daptomicinas priklausantis lipopeptidams specifiškai veikia Gram+ bakterijų sienelę pritraukdamas Ca^{+} jonus prie sienelėje įsitvirtinusio

fosfatadilglicerolio ir prie jos prisijungdamas. Tai sienelės struktūroje sukuria skyles lemiančias K^+ jonų, ATP pratekėjimą. Polimiksinas taip pat sukelia membranos pralaidumo pokyčius, tačiau pasižymi platesniu ir stipresniu veikimo spektru (Trimble ir kt., 2016).

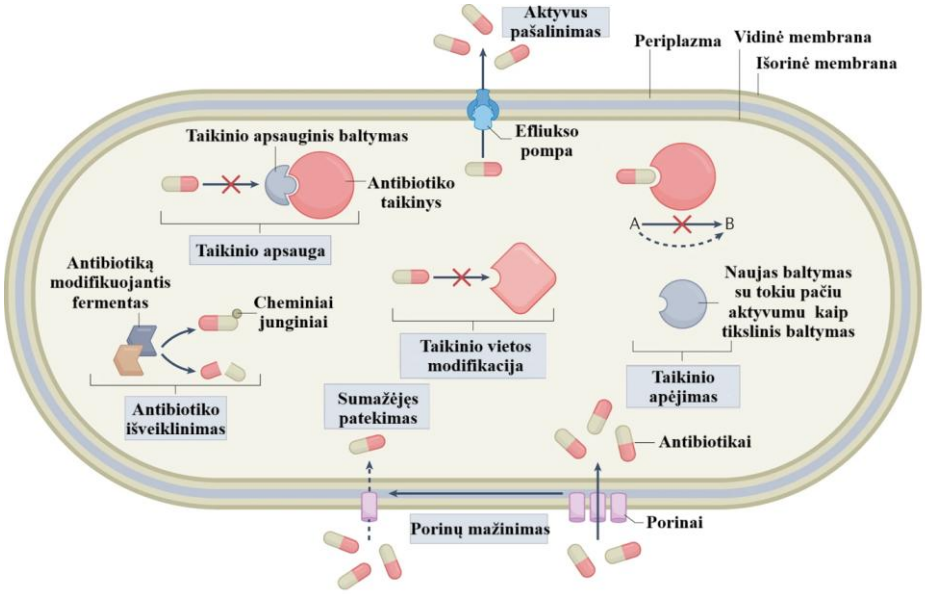
Kitas antibiotikų taikinys – ribosomos, sudarytos iš 30 S ir 50 S subvienetų, atsakingos už baltymų, reikalingų gyvybinių funkcijų palaikymui, sintezę. Baltymų sintezės slopintojams priskiriami aminoglikozidai, tetraciklinai, chloramfenikoliai, makrolidai (Hall & Mah, 2017). Teigiamai įkrauti aminoglikozidai sąveikauja su neigiamai įkrauta bakterijų ląstelės membrana ir sudaro poras, per kurias patenka į ląstelę. Citozolyje vandeniliniais ryšiais jungiasi su ribosomomis taip sutrikdant transliacijos procesą – neteisingai nuskaitomi iRNR kodonai, į peptidinę grandinę įterpiamos neteisingos aminorūgštys. Ląstelėje pradeda kauptis netaisyklingai sulankstyti, nefunkcionalūs baltymai lemiantys bakterijų žūtį (Ramirez & Tolmasky, 2010). Tetraciklinai taip pat sąveikauja su ribosomų 30S subvienetu, tačiau priešingai nei aminoglikozidai, blokuoja aminoacil- tRNR prisijungimą prie ribosomos A vietos, taip slopinant polipeptidinės grandinės sintezę ir pasižymi bakteriostatiniu veikimu (Wilson ir kt., 2020). Tokiu veikimu pasižymi ir chloramfenikolis. Prisijungęs prie 50S subvieneto aktyviojo centro taip pat neleidžia į augančią polipeptidinę grandinę įterpti naujų aminorūgščių, blokuodamas tRNR prisijungimą A srityje (Hanekamp & Bast, 2015). Makrolidų grupės antibiotikai slopina baltymų sisntezę prisijungdami prie 50 S ribosominio subvieneto 23 S rRNR ir sudarydamas fizinį barjerą ilgėjančios polipeptidinės grandinės slinkimui, tokiu būdu taip pat sustabdydami baltymų sintezę (Gomes ir kt., 2017). Visais atvejais bakterijai praradus galimybę sintetinti gyvybiškai svarbius baltymus matomas ląstelės augimo slopinimas, o kai kuriais atvejais – žūtis.

Gyvybiškai svarbių nukleorūgščių sintezės slopinimas taip pat gali sėkmingai užkirsti kelią bakterijų metabolizmui bei dauginimuisi. Tokiu veikimu pasižymi kvinolonai, rifamicinai, sulfonamidai, dihidrofolio reduktazės slopintojai (Hall & Mah, 2017). Kvinolonai jungiasi prie DNR girazės A subvieneto ir slopina jos veikimą. Tai lemia DNR superspiralės susidarymą vykdant replikaciją bei transckripciją ląstelei dalijantis ar vykdant genų ekspresiją. Nesant pakankamam DNR girazės veiksmingumui užkertamas kelias sėkmingai replikacijai ir/ar transkripcijai ko pasekoje ląstelė žūna (Pham ir kt., 2019). Sulfonamidai konkurenciniu būdu jungiasi prie bakterijų fermento dihidropteroato sintazės aktyviojo centro blokuojant tetrahidrofolio, reikalingą naujų nukleotidų susidarymui, sintezę. Dėl nukleotidų trūkumo ląstelė negali replikuoti, vykdyti transkripcijos, taisyti DNR pažaidų, ląstelės ciklas sustoja. Kartu su trimetoprimu pasižymi sinergistiniu poveikiu slopinant tetrahidrofolio sintezę taip didėjant bakteriocidiniui poveikiui platesniam bakterijų spektrui (Deng ir kt., 2018). Rifampicinas negrįžtamai prisijungdamas prie RNR polimerazės β subvieneto blokuoja pirmąjį transkripcijos etapą – iRNR sintezės inicijavimą, lemiantį baltymų sintezės stabdymą (Adams ir kt., 2021). Tokiais atvejais sutrikdomos gyvybiškai svarbios funkcijos, lemiančios ląstelės žūtį.

1.3.2. Antibiotikai: atsparumas

Antibiotikų efektyvumą mažina vis didėjantis bakterijų atsparumas, leidžiantis išlikti nepaveiktoms, aplinkoje esant antibiotikų. 2021 metais pasaulyje net apie 4,71 milijonai mirčių buvo susijusios su atsparumu antibiotikams pasižyminčiomis bakterijomis, iš kurių 1,14 milijonai buvo susiję tiesiogiai. Prognozuojama, kad 2050 metais mirčių skaičius, susijęs su atsparumu antibiotikams gali išaugti iki 10 milijonų per metus (Naghavi ir kt., 2024). Kartu didėja ir papildomos sveikatos priežiūros išlaidos, kurios gali siekti net iki 3,5 bilijonų JAV dolerių per metus (Hofer, 2019). Natūralūs antibakteriniai junginiai gaminami dirvožemio mikroorganizmų bei netinkamai utilizuojami antibiotikai sudaro selekcinį spaudimą ir skatina AAG atsiradimą, kaupimąsi ir plitimą (Wright ir kt., 2014). Prie to prisideda ir aplinkoje identifikuojami AAG ekstraląstelinėje aplinkoje, antibiotikams atsparios bakterijos, sudarančios potencialių AAG rezervuarą. Tokie AAG rezervuarai kelia grėsmę visuomenės sveikatai, nes gali patekti į klinikiniu požiūriu svarbias bakterijas (Bahram ir kt., 2018).

Siekiant išvengti antibiotiko poveikio bakterijos naudoja įvairius atsparumo mechanizmus pavaizduotus **1.3.2 paveiksle.** Kai kurie yra natūralūs, kai ląstelė panaudoja jau esamus genus antibiotiko išvengimui, o kai kurie yra įgyti, kai naujos genetinės medžiagos įgijimas suteikia naujų gebėjimų, lemiančių didesnį išgyvenamumą veikiant atitinkamais antibiotikais (Durand ir kt., 2019). Išskiriami keli pagrindiniai atsparumo mechanizmai susiję su patekimo į ląstelės vidų mažinimu, antibiotiko išveiklinimu, aktyviu išmetimu iš ląstelės, alternatyvių baltymų įgijimu, taikinio vietos modifikacija (Darby ir kt., 2023).



1.3.2 paveikslas Antibiotikų atsparumo mechanizmai adaptuota iš (Darby ir kt., 2023)

Viena efektyviausių bakterijų gynybos strategijų laikomas antibiotiko molekulės išveiklinimas fermentais. Tokie fermentai arba prijungia papildomų cheminių grupių prie antibiotiko arba jį hidro-

lizuoja. Pavyzdžiui atsparumas β-laktaminiams antibiotikams dažnai atsiranda dėl plazmidėse pernešamų β-laktamazių genų, kurių dėka bakterija geba gaminti fermentus β-laktamazes. Pastarosios hidrolizuoja amidinį ryšį esantį β-laktaminiame žiede ir suardo antibiotiką (Zhuang ir kt., 2021). Identifikuota daugiau nei 2000 natūraliai atsiradusių β-laktamazių, turinčių unikalias aminorūgščių sekas. Tokia gausa susijusi su plačiu β-laktaminių antibiotikų naudojimu, taip sukeliant aplinkos spaudimą bakterijų prisitaikymui. Tai lemia spartesnį atsparumo atsiradimą bei plitimą (Bonomo, 2017). Panašus atsparumo veikimo mechanizmas nustatomas ir makrolidams. Bakterijų gaminamos esterazės, dažniausiai EreA bei EreB, lemia atsparumą eritromicinui ir azitromicinui. Šie fermentai katalizuoja laktono žiedo hidrolizę, taip neleisdami jam prisijungti prie tikslinės taikinio vietos (Gomes ir kt., 2017). Kitokiu veikimo mechanizmu pasižymi fermentai susiję su atsparumu aminoglikozidams. Pastarieji įprastai modifikuoja antibiotikus prie jų prijungiant įvairias chemines grupes. Pavyzdžiui N-acetiltransferazės katalizuoja -NH2 grupės acetilinimą, O- nukleotidtransferazės perkelia adenozino monofosfato grupę hidroksilo grupei, O- fosfotransferazės fosforilina -OH grupę. Visais atvejais aminoglikozidų molekulėje atsiradusios modifikacijos lemia antibiotiko išveiklinimą mažinant antibiotiko afiniškumą (Ramirez & Tolmasky, 2010). N- acetiltransferazės galinčios modifikuoti aminoglikozidus taip pat acetilina ir chloramfenikolį, taip užkertant kelią jo prisijungimui prie ribosomos (Moussa ir kt., 2019).

Kadangi antibiotikų veikimas yra specifinis, bet koks taikinio pasikeitimas gali lemti nesėkmingą antibiotiko prisijungimą. Pavyzdžiui modifikacijos PJB aktyviuosiuose centruose mažina β-laktaminių antibiotikų specifiškumą. MecA genas, koduojantis pakitusios struktūros PJB gali sudaryti naują ląstelės sienelę vykdant transpeptidaciją net esant aukštoms β-laktaminių antibiotikų koncentracijoms (Bonomo, 2017). Panašus atsparumo mechanizmas nustatomas glikopeptidų grupės antibiotikams. Vienos aminorūgšties pasikeitimas pentapeptido terminalinėje dalyje iš D-la D-ala į D-ala D-lac vis dar leidžia prisijungti PJB ir vykdyti peptidoglikano sintezę, tačiau toks pokytis lemia 1000 kartų sumažėjusį vankomicino veikimą (Stogios & Savchenko, 2020). Antibiotiko prisijungimui prie tikslinės taikinio vietos gali trukdyti ir papildomi apsauginiai baltymai, molekulinės struktūros. Ribosomų apsauginiai baltymai TetO/TetM prisitvirtinę prie 30S subvieneto mechaniškai išstumia tetracikliną iš jo prisijungimo vietos, o pasikeitusi ribosomos konformacija nebeleidžia antibiotikui prisijungti pakartotinai. Erm metiltransferazės dimetilindamos 23S rRNR sumažina makrolidų afiniškumą peptidiltransferazės centrui ir lemia atsparumą eritromicinui ir siejamas su atsparumu linkozamidams bei streptograminams (Wilson ir kt., 2020). Folio rūgšties metaboliniame kelyje įprastą dihidropteroato sintazės molekulę pakeitus alternatyviu baltymu įgyjamas atsparumas sulfonamidams (Deng ir kt., 2018).

Antibiotiko efektyvumui įtakos turi jo koncentracija tikslinėje taikinio vietoje, tad jo sumažėjimas taip pat lemia atsparumo padidėjimą. Bakterijos išvystė du pagrindinius mechanizmus, garantuojančius nepakankamas antibiotiko koncentracijas taikinio vietoje, susijusius su aktyviu vaisto pašalinimu bei membranos pralaidumo mažinimu. Vienas iš pagrindinių mechanizmų yra efliukso siurbliai, kurie atsakingi už aktyvų antibiotiko pašalinimą prieš koncentracijos gradientą. Literatūroje aprašomos šešios pagrindinės jų klasės ABC (angl. *ATP-binding cassette*), RND (angl. *Resistance- nodulation-division*), MFS (angl. *Major facilitator superfamily*), MATE (angl. *Multidrug and toxic compound extrusion*), SMR (angl. *Small multidrug resistance*), PACE (angl. *Proteobacterial antimicrobial compound efflux*), kurios tarpusavyje skiriasi pagal struktūrą, substratą, naudojamą energijos šaltinį (Du ir kt., 2018). ABC siurblys panaudodamas ATP hidrolizės metu gaunamą energiją pašalina iš ląstelės eritromiciną, klaritromiciną, azitromiciną, tokiu būdu išvengiant baltymų sintezės slopinimo (Greene ir kt., 2018). Visos kitos klasės aktyviam pašalinimui naudoja Na^+, H^+ gradientą ir gali pašalinti platų spektrą antibiotikų (Du ir kt., 2018). Mobiliuosiuose genetiniuose elementuose aptinkami *tet* genai, kurie koduoja daugiau nei 20 skirtingų MFS šeimos siurblio baltymų, lemiančių tetraciklino pašalinimą, o jų ekspresija padidėja aplinkoje esant ir makrolidams bei chloramfenikoliui ir gali lemti daugiavaistį atsparumą (D. Li ir kt., 2023). Kitas alternatyvus antibiotiko koncentracijos mažinimo mechanizmas tikslinėje vietoje yra membranos pralaidumo mažinimas. Įprastomis sąlygomis hidrofiliniai antibiotikai, tokie kaip β-laktamai, kvinolonai, pro membraną patenka per poras formuojančius porinus, hidrofobiniai makrolidai difunduoja pro fosfolipidų bisluoksnį (Ghai & and Ghai, 2018). Antibiotikams atsparios bakterijos modifikuodamos membraną mažina antibiotiko patekimą į taikinio vietą. Sumažėjusi OmpF/C porinų raiška lemia mažesnį hidrofilinių antibiotikų patekimą į ląstelės vidų (Winterhalter & Ceccarelli, 2015). Aminoarabinozės bei fosfoetanolamino transferazė gali modifikuoti lipidą A mažinant jo neigiamą krūvį, o tai lemia teigiamai įkrauto polimiksino prisijungimo sumažėjimą. Plazmidėje aptinkamas *mcr-1* genas, koduojantis transferazę lemiančia lipopolisacharidų modifikavimą ir su tuo susijusį atsparumą kolistinui (Materon & Palzkill, 2023).

1.3.3. Antibiotikai: atsparumo plitimas

Atsparumo antibiotikams plitimas siejamas su HGP, o gebėjimas formuoti bioplėvelę yra viena iš pagrindinių priežasčių lemiančių spartesnį AAG plitimą, dėl palengvintos HGP. Padidėjęs ląstelių tankis, genetinė kompetencija, mobiliųjų genetinių elementų kaupimasis bioplėvelėse yra idealus veiksnių rinkinys veiksmingai HGP, kuris bioplėvelėse stebimas padidėjęs (Banin ir kt., 2017). Tai apima DNR perkėlimą iš donorinės ląstelės į recipientinę per tiesioginį kontaktą (konjugacija), eDNR paėmimą ir inkorporavimą kompetentinėsė ląstelėse (transformacija) arba bakteriofagų sukeltą DNR perkėlimą (transdukcija). (Michaelis & Grohmann, 2023). Genetinės medžiagos perdavimas iš vienos

ląstelės į kitą taip pat galimas panaudojant membranines pūsleles, galinčias talpinti viduje tiek chromosominę tiek plazmidinę DNR (C. Li ir kt., 2022). Svarbu paminėti tai, kad tokios pūslelės kintančioje aplinkoje gali išlikti ilgą laiką, tad atsparumas gali būti perduodamas nepriklausomai nuo laiko (Alves ir kt., 2016). Nustatyta, kad sumažėjusi deguonies koncentracija, subinhibicinės antibiotiko koncentracijos bei bioplėvelėje esančių bakterijų populiacijos išaugimas padidina genetinės medžiagos perdavimą (Michaelis & Grohmann, 2023). Įrodyta, kad plazmidė, kartu su AAG gali būti lengvai perduodama net tarp skirtingų rūšių bakterijų (Van Meervenne ir kt., 2014). Toks reiškinys net 700 kartų dažniau identifikuojamas tarp bioplėvelę formuojančių bakterijų (Król ir kt., 2013). Kai kuriais atvejais konjugacija, kurios metu perduodama plazmidė, identifikuojama tik tarp bioplėvelę formuojančių bakterijų, tarp planktoninių ląstelių toks procesas nestebimas. Toks fenomenas stebimas tikėtina dėl to, kad ląstelės bioplėvelėje artimiau kontaktuoja viena su kita, o pats matriksas padeda stabilizuoti šį kontaktą (Savage ir kt., 2013). Toks dėsningumas atsispindi natūraliai gamtoje aptinkamų bakterijų genetinėje įvairovėje. Identifikuojami dažnesnis AAG paplitimas tarp bioplėvelę formuojančių bakterijų, lyginant su bioplėvelės neformuojančiomis bakterijomis (Guo ir kt., 2018).

Atsparumo antibiotikams plitimui tarp bakterijų taip pat svarbų vaidmenį turi integronai. Integrono struktūroje aptinkamos skirtingų klasių *intI* integrazės, *Pc* promotoriaus sritis bei *attI* rekombinacijos sritis. Šie elementai užtikrina genų kasečių, turinčių AAG, integraciją, ekspresiją ir platinimą tarp bakterijų bei aplinkos (Akrami ir kt., 2019). Labiausiai paplitę 1-2 klasės integronai, kuriuose atitinkamai aptinkamos *IntI1* bei *IntI2* genų koduojamos integrazės. Šių elementų identifikavimas izoliatuose koreliuoja su kelių AAG aptikimu bakterijose ir yra laikomas indikatoriumi vertinant AAG plitimo riziką tarp aplinkoje ar klinikoje esančių mikroorganizmų (Sabbagh ir kt., 2021).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Mikroorganizmai

Tyrimo metu naudoti iš Kazokiškių sąvartyno išskirti bakterijų izoliatai, kurie buvo izoliuoti doktorantės Gintarės Jansonaitės, bei *P. aeruginosa* ATCC27853 (Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros, eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijos biblioteka).

2.1.2. Reagentai

- Gamintojas – **AnalaR:**

  Kalio dihodrofosfatas.
- Gamintojas – **Biolab:**

  Peptonas.
- Gamintojas – **Bio–Rad:**

  Agarozė.
- Gamintojas – **CARL ROTH:**

  Agaro – agaras; Ampicilinas; D(+)–gliukozės monohidratas; Geležies chloridas; Glicerolis; Imersinis aliejus; Mielių ekstraktas; Amonio nitratas; Streptomicinas.
- Gamintojas – **Eurofins:**

  Pradmenys (nurodyti **2.2.3**; **2.2.4**; **2.2.5**; **2.2.7**; **2.2.8** lentelėse).
- Gamintojas – **Fluka:**

  Tetraciklinas.
- Gamintojas – **Merck:**

  Etanolis; Kalio hidrofosfatas; Mėsos ekstraktas – infuzija; Magnio sulfatas; Natrio hidrofosfatas; Natrio chloridas.
- Gamintojas– **Oxoid:**

  Kazeino hidrolizatas.
- Gamintojas – **Poch:**

  Kalcio chloridas; Kalio chloridas.
- Gamintojas – **Sigma Aldrich:**

  Amfotericinas B; Eritromicinas; Etidžio bromidas; Druskos rūgštis; Krakmolas (bulvių); Kristalo violetas (KV); Resazurinas.
- Gamintojas – **Thermofisher:**

DreamTaq Green PCR Master Mix (2x); GeneJET Genomic DNA Purification Kit; GeneRuler DNA Ladder Mix (6x); Sterilus dejonizuotas vanduo be nukleazių; TriTrack DNA Loading Dye (6x).

2.1.3. Terpės ir tirpalai

- Amfotericinas B 0,01 g/L;
- Ampicilino tirpalas: 1 g/L;
- BHB agarizuota augimo terpė: $MgSO_4$ 0,2 g/L, $CaCl_2$ 0,02 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, K_2HPO_4 g/L, NH_4NO_3 1 g/L, $FeCl_3$ 0,05 g/L, agaras 15 g/l, gliukozė 4 g/l;
- Eritromicino tirpalas: 1,5 g/L;
- Fiziologinis tirpalas: NaCl 9 g/L;
- Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS), pH 7,4: NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na_2HPO_4 1,44 g/L, K_2HPO_4 0,24 g/L;
- KV tirpalas: 0,1 g/L;
- LB agarizuota augimo terpė: peptonas 10 g/L, mielių ekstraktas 5 g/L, NaCl 5 g/L, agaras 20 g/L;
- LB skysta augimo terpė: peptonas 10 g/L, mielių ekstraktas 5 g/L, NaCl 5 g/L;
- MH agarizuota augimo terpė: mėsos ekstraktas 2,0 g/L, kazeino hidrolizatas 17,5 g/L, krakmolas (bulvių) 1,5 g/L, agaras 13 g/L;
- Resazurino tirpalas: resazurinas 0,05 g/L;
- Streptomicino tirpalas: 1 g/L;
- Tetraciklino tirpalas: 3 g/L;
- Tris – acetato – EDTA buferinis tirpalas (TAE): Tris bazė – 4,84 g/L, acto rūgštis 1,21 g/L, EDTA 0,37 g/L.

2.1.4. Prietaisai ir įranga

- Centrifuga Eppendorf 5424;
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin® plus;
- Centrifuga Thermo Fisher Scientific KR 2.5i;
- Gelių elektroforezės rezervuaras MultiSUB Choice Trio Cleaver Scientific;
- Laminaras Mars ScanLaf;
- Laminaras Thermo Fisher Scientific Safe2020;
- Lašelinis bekiuvetis spektrofotometras Thermo Fisher Scientific™ Invitrogen™ Nanodrop™;
- Magnetinė maišyklė IKA® RH basic 2;

- Maišyklė VELP Scientifica.
- Mikropipetės Epperndorf;
- Mikropipetės Thermo Fisher Scientific;
- Mikroplokštelių skaitytuvas Thermo Scientific Varioskan® Flash;
- Purtyklė GFL 1083;
- Spektrofotometras Eppendorf;
- Svarstyklės KERN ADB;
- Svarstyklės KERN EG;
- Termo purtyklė Biosan (TS100C);
- Termocikleris Bio – Rad PTC Tempo 48/48;
- Termostatas Binder;
- Vizualizavimo sistema DNR Bio – Imaging Systems MiniBIS Pro;
- 96 šulinėlių polistireno mikroplokštelės Carl Roth

2.2. Metodai

2.2.1. Mėginių surinkimo vieta

Tiriamajame darbe naudojami bakterijų izoliatai išskirti iš Kazokiškių sąvartyno mėginio, surinkto 2022.08.22. d. Sąvartynas pradėtas eksploatuoti 2007 m. spalio mėnesį., Vidugirių k. 3, Vievio sen., Elektrėnai. 3,5 km į šiaurę nuo Vievio miesto, 1,7 km į rytus nuo Zelvos ežero ir 1,6 km į pietus nuo Cielgio upelio. Bendras sąvartyno sklypo plotas – 30,16 ha, sudarytas iš 6 sekcijų. Antrosios sekcijos plotas 6,0 ha, iš kurio ir paimtas mėginys, sekcija atidaryta nuo 2013 m. ir yra aktyviai veikianti. Priimamos mišrios komunalinės atliekos, tad cheminė ir biologinė sudėtis įvairi ir kintanti. Šiame tyrime nutarta tirti mėginį būtent iš antros sekcijos, kadangi ši yra aktyviai naudojama ir generuoja palyginti didesnio organinių medžiagų bei sunkiųjų metalų kiekio filtratą, pratekantį pro dirvožemį (Abdel-Shafy ir kt., 2024; *SĄVARTYNAS. Leidimas Veiklai Ir Monitoringo Ataskaita - VAATC,* s.a.)

2.2.2. Bakterijų izoliatų izoliavimas

Bakterijų kultūros išskirtos Vilniaus universiteto biologijos mokslų krypties doktorantės Gintarės Jansonaitės VU GMC Biomokslų institute, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje, Eukariotų molekulinės mikrobiologijos laboratorijoje . Išskyrimas vykdytas pagal (Morris ir kt., 2018) su keliais pakeitimais. 0,5 g mėginio suspenduota su 500 µL fiziologinio tirpalo, mėginys švelniai maišomas kelias minutes. Atlikti serijiniai skiedimai nuo 10^{-1} iki 10^{-10}. Iš kiekvieno paruošto mėginio praskiedimo 20 µL išsėjama ant modifikuotos BHB agarizuotos terpės, inkubuojama 24–48 val.

30 °C. Užaugusios bakterijų kolonijos gryninamos persėjant po vieną koloniją ant naujos agarizuotos BHB terpės ir vykdant inkubaciją anksčiau minėtomis sąlygomis, kol kolonijos atrodo morfologiškai vienodos. Tolimesniems tyrimams pasirinktos skirtingų morfologijų kolonijos, siekiant identifikuoti įvairiems taksonams priklausančius izoliatus. Išskirti izoliatai paruošiami saugojimui perkėlus bakterijų koloniją į BHB ir 15 % glicerolio tirpalą ir užšaldoma -80 °C iki tolimesnio naudojimo.

2.2.3. Genominės DNR išskyrimas

Genominė DNR išskirta iš 14 atsitiktinai atrinktų analizuojamų izoliatų naudojant genominės DNR skyrimo rinkinį GeneJET Genomic DNA Purification Kit pagal gamintojo protokolą. Prieš išskiriant genominę DNR įvertinta ląstelių sienelės struktūra Gramo dažymo metodu, siekiant efektyviai suardyti ląstelės sienelę (Tripathi & Sapra, 2025). Išskyrus genominę DNR pamatuota mėginio koncentracija spektrofotometru NanoDrop™ 2000 ir įvertintas grynumas – švarumas. Sekoskaitai naudoti mėginiai kurių nustatytos koncentracijos didesnės nei 10 ng / µL.

2.2.4. Izoliatų taksonominis identifikavimas

Iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų ir atrinktų izoliatų taksonominei padėčiai nustatyti vykdyta izoliatų 16S rRNR geno sekoskaita naudojant Nanopore sekoskaitos metodą. Sekoskaitą vykdė Dr. Aleksandras Konovalovas, VU GMC Biomokslų institute. Bibliotekos sekoskaitai paruoštos naudojant 16S Barcoding Kit 24 V14 (SQK-16S114.24) (Oxford Nanopore Technologies) pagal gamintojo rekomendacijas. Sekoskaita vykdyta naudojant MinION Mk1B sekvenatorių su Flongle adaptoriumi, Flongle Flow Cell (R10.4.1) FLO-FLG114 sekoskaitos celes (Oxford Nanopore Technologies). Taksonominiam klasifikavimui naudotas EMU algoritmas (Curry ir kt., 2022).

2.2.5. Ląstelių paruošimas ir bioplėvelės auginimas

Bioplėvelės auginimas atliekamas 96 mikrošulinėlių plokštelėje inokuliuojant su ląstelių kultūra paruošta pagal (Kragh ir kt., 2018). Ląstelių kultūros atnaujinamos perkeliant po vieną koloniją į naują Petri lėkštelę su agarizuota LB terpe, naudojant daugkartinę bakteriologinę kilpelę. Užsėta lėkštelė laikoma inkubatoriuje 30 °C temperatūroje parą laiko. Po 24 valandų ruošiama ląstelių kultūra, perkeliant po vieną koloniją į 10 ml užsukamą mėgintuvėlį su 5 ml skysta LB terpe. Paruoštas mėgintuvėlis 24 val. inkubuojamas rotacinėje purtyklėje 30 °C temperatūroje aeruojant 150 aps./min. Po 24 val. ląstelių kultūra išimama ir maišoma 10 sec. Po 1 mL kiekvienos bakterijų suspensijos perkeliama į 1,5 mL mėgintuvėlį. Ląstelės tris kartus plaunamos su 0,9 % NaCl: centrifuguojama 6000 rcf., 5 min, supernatantas pašalinamas, bakterijos resuspenduojamas su 0,9 % NaCl tirpalu. Paskutiniame etape resuspenduojama su skysta LB terpe. Matuojamas ląstelių optinis tankis (OT) spektrofotometru Eppendorf esant 600 nm bangos ilgiui, perkeliant 100 µL analizuojamos ląstelių

suspensijos į spektrofotometro kiuvetę. Gavus OT_{600} reikšmę >0,8 daromas skiedimas, siekiant didesnio matavimo tikslumo, pridedant skystos LB terpės. Įvertinus pradinį ląstelių OT_{600} atliekamas skiedimas iki OT_{600}=0,05, panaudojant skiedimo formulę:

$$OT_{600}1 \cdot V1 = OT_{600}2 \cdot V2 \qquad (\textit{1 formulė})$$

Kur:

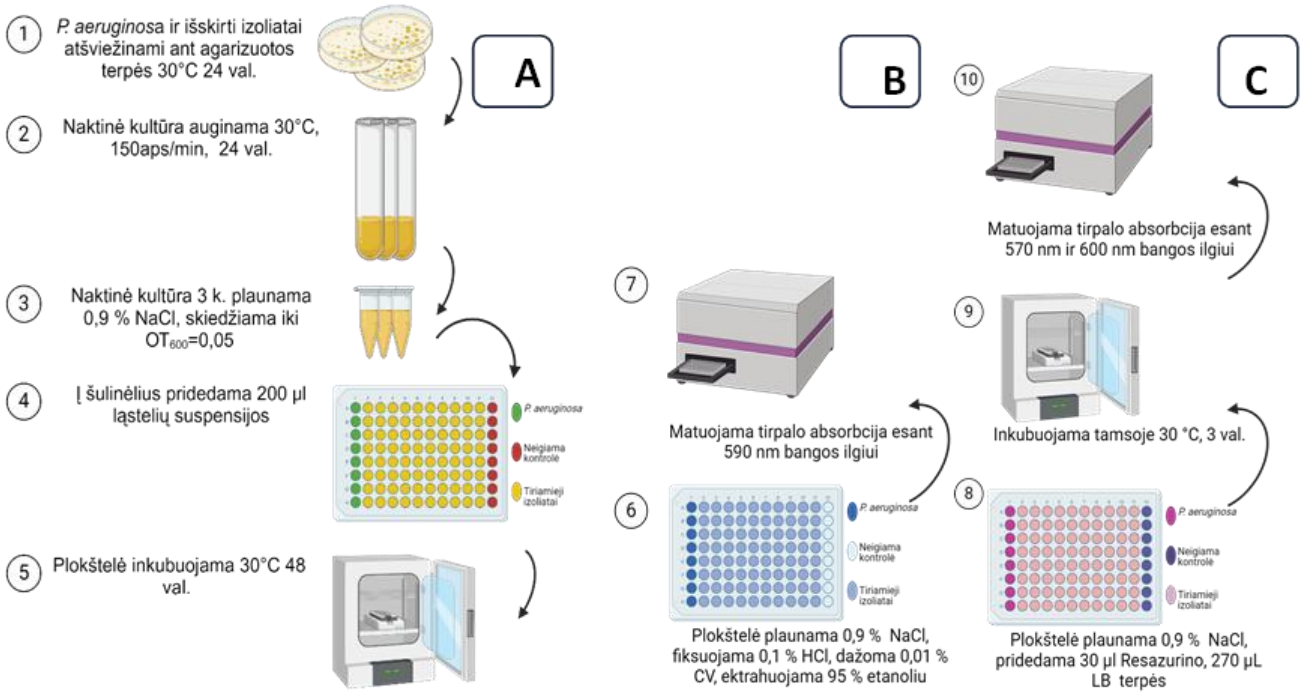
$OT_{600}1$ – pradinis OT_{600};

$OT_{600}2$ – galutinis OT_{600};

V1 – pradinis ląstelių suspensijos tūris;

V2 – galutinis ląstelių tūris.

Paruošus mėginius inokuliavimui, į 96 šulinėlių mikroplokštelės šulinėlius pridedama 200 µL ląstelių suspensijos. Galutinis šulinėliuose esantis OT_{600}=0,05. Teigiamai kontrolei naudojama *P. aeruginosa ATCC27853* ląstelių suspensija, neigiamai kontrolei į šulinėlius pripilama 200 µL LB terpės. Plokštelė inkubuojama stacionariame inkubatoriuje esant 30 °C temperatūrai. Bioplėvelės formavimasis tikrinamas po 48 val. inkubacijos 2.2.6. ir 2.2.7. skyreliuose nurodytais metodais. Auginimo darbo schema pavaizduota **2.2.1 pav. A** dalyje.



2.2.1 paveikslas. Bioplėvelės formavimo vertinimo darbo schema. A-(1-5) bioplėvelės auginimas; B-(6-7) bioplėvelės biomasės vertinimas naudojant KV metodą; C-(8-10) bioplėvelės metabolinio aktyvumo vertinimas naudojant resazuriną. Sukurta naudojant Biorender

2.2.6. Bioplėvelės formavimo vertinimas KV metodu

Po inkubacijos bioplėvelės formavimo vertinimas atliekamas KV metodu, pagal (Xu ir kt., 2016) su keliais pakeitimais, skirtu bioplėvelės biomasės įvertinimui. Tyrime naudojamas KV dažas,

kuris jungiasi prie neigiamai įkrautų gyvybingų ir negyvybingų ląstelių paviršiaus molekulių, įskaitant bioplėvelės matriksą sudarantį apie 90 % visos biolėvelės masės (Arzmi ir kt., 2023).

Planktoninės ląstelės aspiruojamos, šulinėliai 3 kartus plaunami 0,9 % NaCl tirpalu, siekiant pašalinti likusias planktonines ląsteles. Analizuojama bioplėvelė kambario temperatūroje fiksuojama pridedant 300 µL 0,1 % HCl tirpalo, inkubuojama 10 min. Fiksacijos tirpalas pašalinamas ir pridedama 300 µL 0,01 % KV tirpalo, dažoma 10 min. kambario temperatūroje. Neabsorbuotas dažas pašalinamas, bioplėvelė tris kartus plaunama su 0,9 % NaCl. Absorbavęs dažas ekstrahuojamas į šulinėlius pridedant 300 µL 95 % etanolio tirpalo, uždengus inkubuojama kambario temperatūroje 10 min. Po inkubacijos, iš kiekvieno šulinėlio 200 µL tirpalo perkeliama į naują 96 šulinėlių mikroplokštelę. Matuojama tirpalo absorbcija esant 590 nm bangos ilgiui naudojant mikroplokštelių skaitytuvą. KV metodo darbo schema pavaizduota **2.2.1 pav. B** dalyje.

Vertinant gautus rezultatus izoliatai skirstomi į bioplėvelę formuojančius stipriai, vidutiniškai, silpnai arba bioplėvelės neformuojančius remiantis apskaičiuota tirpalo absorbcijos ribine reikšme (OT_{590}K) pagal (Harika ir kt., 2020). Reikšmė gauta matuojant neigiamos kontrolės (šulinėlių be ląstelių) tirpalo OT_{590} ir naudojant formulę:

OT_{590}K= OT (neigiamos kontrolės vidurkis) +3·(neigiamų kontrolinių reikšmių standartinis nuokrypis) (*2 formulė*)

Klasifikavimui naudojami intervalai bei šio darbo metu gautų:reikšmių intervalai nurodyti **2.2.1 lentelėje**.

2.2.1 lentelė. Izoliatų gebėjimo formuoti bioplėveles klasifikavimas pagal KV metodu gautas OT reikšmes

OT_{590} reikšmių intervalai	OT_{590} reikšmių intervalai tyrimo sąlygomis	Bioplėvelės formavimas
$OT_{590} \geq 4 \times OT_{590}$K	$OT_{590} \geq 0{,}34$	Stiprus
$2OT_{590}$K $\leq OT_{590} \leq 4 \times OT_{590}$K	$0{,}17 \leq OT_{590} \leq 0{,}34$	Vidutiniškas
OT_{590}K $\leq OT_{590} \leq 2 \times OT_{590}$K	$0{,}08 \leq OT_{590} \leq 0{,}17$	Silpnas
$OT_{590} \leq OT_{590}$K	$OT_{590} \leq 0{,}08$	Neigiamas

2.2.7. Bioplėvelės formavimo vertinimas pagal bioplėvelės metabolinį aktyvumą

Bioplėvelės metabolinis aktyvumas vertinamas naudojant reagentą resazuriną pagal (Lee, 2017) su keliais pakeitimais. Tyrimo metu vertinamas gyvybingų ląstelių potencialas redukuoti reagentą resazuriną. Aktyvus reagentas dalyvauja kaip alternatyvus elektronų akceptorius elektronų pernašos grandinėje ir priima elektronus iš kofermentų, tokių kaip: NADPH, FADH, FMNH, NADH (Longhin ir kt., 2022). Resazurinas reaguodamas į aplinkos redokso būklę keičiasi iš oksiduotos (mėlynos)

formos į redukuotą (rožinę) formą. (Rampersad, 2012). Kadangi keičiasi tirpalo absorbcijos spektras, pokytis fiksuojamas matuojant tirpalo absorbciją esant 570 nm ir 600 nm bangos ilgiui.

Po bioplėvelės inkubacijos, aprašytos 2.2.5. skyrelyje, planktoninės ląstelės aspiruojamos, šulinėliai 3 kartus plaunami 0,9 % NaCl tirpalu, siekiant pašalinti likusias planktonines ląsteles. Pridedama 270 µL naujos LB terpės ir 30 µL paruošto oksiduoto resazurino tirpalo. Teigiamai kontrolei į tuščią šulinėlį pridedama naujos 270 µL LB terpės ir 30 µL visiškai redukuoto resazurino tirpalo, siekiant nustatyti maksimalias redukcijos potencialo reikšmes. Neigiamai kontrolei į tuščią šulinėlį pridedama naujos 270 µL LB terpės ir 30 µL oksiduoto resazurino tirpalo, siekiant nustatyti minimalias redukcijos potencialo reikšmes. Papildoma neigiama kontrolė naudojama į šulinėlį su bioplėvele pridedant naujos 270 µL LB terpės ir 30 µL 1×PBS tirpalo, šio šulinėlio absorbcijos (A) reikšmės minusuojamos iš gautos tiriamojo mėginio absorbcijos (A_{tx}) reikšmės, bei neigiamos kontrolės ($t0$) siekiant eliminuoti matavimo reikšmių pokytį atsiradusį dėl planktoninių ląstelių padidėjimo ir/ar tirpalo drumstumo, atsirandantį inkubacijos metu. Paruošta plokštelė 3 val. inkubuojama 30 °C temperatūroje stacionariame inkubatoriuje, tamsoje. Po inkubacijos, iš kiekvieno šulinėlio tirpalas perkeliamas į naują 96 šulinėlių mikroplokštelę. Naudojant mikroplokštelių skaitytuvą matuojama tirpalo absorbcija esant 570 nm ir 600 nm bangos ilgiui. Bioplėvelės metabolinio aktyvumo vertinimo darbo schema pavaizduota **2.2.1 pav. C** dalyje.

Vertinamas redukcijos potencialas naudojant formulę:

$$\text{Redukcijos potencialas (RP)} = \frac{(\varepsilon_{OX,600nm} \times A_{570nm,tx} - \varepsilon_{OX,570nm} \times A_{600nm,tx})}{(\varepsilon_{RED,570nm} \times A_{600nm,t0} - \varepsilon_{RED,600nm} \times A_{570nm,t0})} \cdot 100\ \% \qquad (3\ formulė)$$

Kur:

$\varepsilon_{OX,600nm}$ – molinis oksiduoto resazurino ekstincijos koeficientas esant 600 nm bangos ilgiui=117,216;

$\varepsilon_{OX,570nm}$ – molinis oksiduoto resazurino ekstincijos koeficientas esant 570 nm bangos ilgiui=80,586;

$\varepsilon_{RED,600nm}$ – molinis redukuoto resazurino ekstincijos koeficientas esant 600 nm bangos ilgiui=14,652;

$\varepsilon_{RED,570nm}$ – molinis redukuoto resazurino ekstincijos koeficientas esant 570 nm bangos ilgiui=155,677;

A – išmatuota absorbcija ties nurodytu bangos ilgiu;

$t0$ – neigiamos kontrolės reikšmė;

tx – tiriamojo mėginio reikšmė.

Vertinant gautus rezultatus izoliatai skirstomi į pasižyminčius stipriu, vidutiniu, silpnu ar neaptiktu metaboliniu aktyvumu remiantis apskaičiuota redukcijos potencialo ribine reikšme (RPK).

Reikšmė gauta matuojant neigiamos kontrolės šulinėlių (be ląstelių) tirpalo absorbciją esant 570nm bei 600nm ir naudojant formulę:

RPK= RP·(neigiamos kontrolės vidurkis) +3·(kontrolinių reikšmių standartinis nuokrypis)

(*4 formulė*)

Klasifikavimui naudojami intervalai bei šio darbo metu gautų:reikšmių intervalai nurodyti **2.2.2 lentelėje.**.

2.2.2 lentelė. Bioplėvelės metabolinio aktyvumo klasifikavimas naudojant reagentą resazuriną pagal RPK reikšmes

RP reikšmių intervalai	RP reikšmių intervalai tyrimo sąlygomis	Bioplėvelės metabolizmas
$RP \geq 4 \times RPK$	RP ≥ 28 %	Stiprus
$2 \times RPK \leq RP \leq 4 \times RPK$	14 % ≤ RP ≤ 28 %	Vidutiniškas
$RPK \leq RP \leq 2 \times RPK$	7 % ≤ RP ≤ 14 %	Silpnas
$RP \leq RPK$	RP ≤ 7 %	Neigiamas

2.2.8. Polimerazės grandininė reakcija

Siekiant tiriamuosiuose izoliatuose aptikti genus susijusius su atsparumu antibiotikams atliekama PGR (polimerazės grandininė reakcija), naudojant specifinius pradmenis nurodytus **2.2.3 lentelė 2.2.4 lentelė 2.2.5 lentelė 2.2.7 lentelė 2.2.8 lentelė** lentelėse. Pasirinktos keturios pagrindinės antibiotikų klasės plačiausiai naudojamos Lietuvoje 2006 – 2018 metais remiantis higienos instituto duomenimis. (*HIGIENOS INSTITUTAS,* s.a.). Pradmenys naudoti tikslinių produktų amplifikacijai parinkti analizuojant skirtingus literatūros šaltinius norodytus **2.2.3 lentelė 2.2.4 lentelė 2.2.5 lentelė 2.2.7 lentelė 2.2.8 lentelė** lentelėse.

PGR reakcijos mišinį sudarė 25 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X), po 1 µL tiesioginio (F) ir atvirkštinio (R) pradmens, 1 µL išskirtos genominės DNR, 22 µL sterilaus dejonizuoto vandens be nukleazių. Neigiamai kontrolei vietoje genominės DNR papildomai pridedamaa 1 µL sterilaus dejonizuoto vandens be nukleazių. PGR reakcija atliekama termocikleryje Bio – Rad T100 Thermal Cycler, pagal sąlygas:

- pradinė denatūracija – 95 °C/2 min.;
- 35 ciklai: denatūracija – 95 °C/45 s., pradmenų prilydymas* – 54 °C – 60 °C/45 s., grandinės ilginimas – 72 °C/1 min.;
- galutinis grandinės ilginimas – 72 °C/7 min..

  *Pradmenų prilydymo temperatūra apskaičiuota atsižvelgiant į PGR reakcijos mišinyje naudojamas pradmenų poras naudojant programą T_m Calculator (Thermo Fisher Scientific).

2.2.3 lentelė. Tyrime naudoti pradmenys skirti genų, susijusių su atsparumu β-laktaminiams antibiotikams, amplifikacijai

Genas	Pradmuo F-tiesioginis R- atvirkštinis	Seka (5'-3')	Prilydymo temperatūra (°C)	PGR produkto ilgis (bp)	Literatūros šaltinis
ctx-M	F-ctxU	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	54	593	(Eckert ir kt., 2006)
	R-ctxU	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG			
oxa1	F-1oxa1	GAT ATC TCT ACT GTT GCA TCT C	54	619	(Fang ir kt., 2008)
	R-1oxa1	AAT AAA CCC TTC AAA CCA TCC G			
oxa2	F-oxa2	GCC AAA GGC ACG ATA GTT GT	57	600	
	R-oxa2	TCA TCC ATC CTG TTT GGC GT			
oxa23	F-oxa23	TTA GCA CCT ATG GTA ATG CTC T	57	526	
	R-oxa23	TCC ACC CAA CCA GTC AAC CA			
shv	F-1shv	AGG ATT GAC TGC CTT TTT GCG	57	392	
	R-1shv	ATT TGC TGA TTT CGC TCG GC			

2.2.4 lentelė. Tyrime naudoti pradmenys skirti genų, susijusių su atsparumu tetraciklinu, amplifikacijai

Genas	Pradmuo F-tiesioginis R- atvirkštinis	Seka (5'-3')	Prilydymo temperatūra (°C)	PGR produkto ilgis (bp)	Literatūros šaltinis
tetA	F-tetA	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	57	210	(Ng ir kt., 2001)
	R-tetA	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG			
tetB	F-tetB	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	56	659	
	R-tetB	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG			
tetC	F-tetC	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	58	418	
	R-tetC	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC			
tedD	F-tetD	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	55	787	
	R-tetD	GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC			
tetM	F-tetM	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG	56	406	
	R-tetM	CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC			

2.2.5 lentelė. Tyrime naudoti pradmenys skirti genų, susijusių su atsparumu aminoglikozidams, amplifikacijai

Genas	Pradmuo F-tiesioginis R- atvirkštinis	Seka (5'-3')	Prilydymo temperatūra (°C)	PGR produkto ilgis (bp)	Literatūros šaltinis
aadE	F-ant- 6	AGC CGG AGG ATA TGG AAT TAT	57	463	(Ramirez & Tolmasky, 2010)
	R-ant- 6	TTCATAGGAATCCATCCGGTA			

2.2.6 lentelės tęsinys. Tyrime naudoti pradmenys skirti genų, susijusių su atsparumu aminoglikozidams, amplifikacijai

Genas	Pradmuo F-tiesioginis R- atvirkštinis	Seka (5'-3')	Prilydymo temperatūra (°C)	PGR produkto ilgis (bp)	Literatūros šaltinis
aadA1	F-ant- 3	CGC CGA AGT ATC GAC TCA AC	58	559	(Chen ir kt., 2004)
	R-ant- 3	GCG GGA CAA CGT AAG CAC TA			
aadA2	F-aad-2	GCTCAATGACCTTATGAAGGC	58	379	(Šeputiene ir kt., 2006)
	R-aad-2	GCGGGACAACGTAAGCACTA			
aadB	F-antIa	GAGCGAAATCTGCCGCTCTG	58	320	(Vakulenko ir kt., 2003)
	R-antIa	CTGTTACAACGGACTGGCC			
strB	F-aph- 6	ATC GTC AAG GGA TTG AAA CCT A	57	510	(Madsen ir kt., 2000)
	R-aph- 6	GGA TCG TAG AAC ATA TTG GCG			

2.2.7 lentelė. Tyrime naudoti pradmenys skirti genų, susijusių su atsparumu makrolidams, amplifikacijai

Genas	Pradmuo F-tiesioginis R- atvirkštinis	Seka (5'-3')	Prilydymo temperatūra (°C)	PGR produkto ilgis (bp)	Literatūros šaltinis
ermA	F-ermA	GAAGCGGTAAACCCCTCTG	58	216	(Seputiene ir kt., 2012)
	R-ermA	ACCCAAAGCTCGTTGCAGAT			
ermB	F-ermB	ATTGGAACAGGTAAAGGGCAT	56	447	
	R-ermB	ATCTGGAACATCTGTGGTATG			
mefAB	F-mefAB	AGTATCATTAATCACTAGTGCC	54	347	
	R-mefAB	GTTCTTCTGGTACTAAAAGTGG			

2.2.8 lentelė. Tyrime naudoti pradmenys skirti integrazių genų amplifikacijai

Genas	Pradmuo F-tiesioginis R- atvirkštinis	Seka (5'-3')	Prilydymo temperatūra (°C)	PGR produkto ilgis (bp)	Literatūros šaltinis
IntI1	F-IntI1	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	58	473	(Marathe ir kt., 2015)
	R-IntI1	ACATGCGTGTAAATCATCGTC			
IntI2	F-IntI2	TTGCGAGTATCCATAACCTG	55	288	(Z.-Q. Yan ir kt., 2010)
	R-IntI2	TTACCTGCACTGGATTAAGC			

2.2.9. DNR elektroforezė agarozės gelyje

PGR produktų analizė vykdoma atliekant elektroforezę agarozės gelyje. Gelio paruošimui naudojamas 1×TAE buferinis tirpalas į kurį įdedama agarozės, galutinė koncentracija 30 g/L. Tirpalas

kaitinamas mikrobangų krosnelėje keliais etapais, kol agarozė pilnai ištirpsta ir tirpalas tampa skaidrus. Į atvėsintą iki ~ 50 °C temperatūros tirpalą pridedama etidžio bromido, galutinė koncentracija 0,5 g/L. Tirpalas supilamas į stačiakampę gelio formelę su šulinėlių plokštele. Sustingęs gelis kartu su formele perkeliamas į elektroforezės indą su 1×TAE buferiniu tirpalu, visiškai apsemiančiu šulinėlius, šulinėlių plokštelė atsargiai išimama. Į šoninius šulinėlius mikropipete įnešami 4 µL DNR ilgio žymenų „GeneRuler DNA Ladder Mix“ sumaišytų su užnešimo dažais „TriTrack DNA Loading Dye“ ir dejonizuotu vandeniu be nukleazių, santykiu 3:3:12, likusieji šulinėliai užpildomi įnešant po 6 µL PGR reakcijos mišinio.

Elektroforezė vykdoma naudojant 100 V įtampą 40–50 minučių. Rezultatai vizualizuojami transiliuminatoriumi MiniBIS Pro® apšviečiant gelį UV šviesa ir fotografuojama naudojant GelCapture programą. Rezultatai vertinami analizuojant elektroforezės gelyje matomus PGR produktus pagal **2.2.3 lentelė 2.2.4 lentelė 2.2.5 lentelė 2.2.7 lentelė 2.2.8 lentelė** lentelėse nurodytus amplikonų dydžius.

2.2.10. Agaro šulinėlių difuzijos metodas

Izoliatų jautrumas antibiotikams vertintas agaro šulinėlių difuzijos metodu, atsižvelgiant į Europos jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimų komiteto (angl. European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) skelbiamą metodologiją.

Izoliatai atšviežinami perkeliant po vieną koloniją ant naujos agarizuotos LB terpės, inkubuojama 24 val 30 °C temperatūroje. Paruošiama izoliatų inokuliavimo suspensija atitinkanti 0,5 McFarland drumstumo standartą, (atitinkantį 1,5 $\times 10^8$ kolonijas formuojančių vienetų 1 mL, esant OT_{600}~0,1), perkeliant po keletą morfologiškai vienodų kolonijų į fiziologinį tirpalą. Paruoštas inokuliatas tolygiai išsėjamas ant paruoštos standartizuotos augimo lėkštelės su 20–25 mL MHA terpės, braukant trimis kryptimis per visą lėkštelės plotį su steriliu medvilės tamponėliu. Naudojant sterilų tuščiavidurį šiaudelį su 6 mm skersmeniu padaromi šulinėliai į kuriuos pridedama po 30 µL testuojamų antibiotikų (ampicilinas 1g/L, tetraciklinas 3 g/L, eritromicinas 1,5g/L, streptomicinas 1g/L) tirpalų. Teigiamai augimo kontrolei į šulinėlius pridedama 30 µL dejonizuoto vandens. Kokybės kontrolei naudojama *P. aeruginosa* ATCC27853. Vykdoma inkubacija 24 val 30 °C temperatūroje, stacionariame inkubatoriuje. Po inkubacijos vertinamos inhibicinės zonos. Izoliatai skirstomi į grupes „Jautru“ ir „Atsparu“ atsižvelgiant į inhibicinės zonos buvimą arba nebuvimą.

2.2.11. Duomenų statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant Microsoft® Office Excel® programą. Kiekybinių eksperimentų metu aprašytų **2.2.6.; 2.2.7.; 2.2.10.** skyreliuose atliekami 3 nepriklausomi pakartojimai, o darbe pateikiamas galutinis rezultatas kaip trijų nepriklausomų tyrimų vidurkis, paklaidos

pateikiamos kaip standartinis nuokrypis (ST). Statistiškai reikšmingam skirtumui nustatyti tarp kontrolės ir tiriamųjų izoliatų rezultatų naudotas t–test. Laikoma, kad gautas rezultatas statistiškai reikšmingas kai $p<0,05$.

3. Rezultatai

3.1. Kazokiškių sąvartyno kultivuojamų bakterijų izoliatų identifikacija

Siekiant nustatyti Kazokiškių sąvartyno dirvožemyje esančių bakterijų įvairovę išskirta grynų kultūrų genominė DNR iš 14 izoliatų pagal 2.2.3. skyrelyje aprašytą metodiką. Vykdyta 16S rRNR geno „Nanopore“ sekoskaita ir jų analizė pagal 2.2.4. skyrelyje aprašytą metodiką.

Iš gautų 16S rRNR geno sekoskaitos duomenų pagal EMU algoritmą nustatyta, kad Kazokiškių sąvartyno izoliatai priklauso trims skirtingiems filogenetiniams tipams: *Bacilota* (anksčiau žinomas kaip *Firmicutes*), *Actinomycetota* (*Actinobacteria*) ir *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) **3.1.1 lentelė**. Tyrime nustatytas vyraujantis tipas *Bacilota,* sudaręs apie 70–72 % bendros bakterinės bendrijos, toliau sekė *Actinomycetota* (~14 %) ir *Pseudomonadota* (~14 %). Genties lygmenyje pagal skaitinę gausą dominavo *Bacillus* genties bakterijos su 5 atstovais, tarp jų 3 *B. subtillis* rūšies bakterijos, 1 *B. licheniformis*, 1 *B. marislavi*. Taip pat identifikuoti 5 Lysinibacillus sp. YS11 bakterijos. Mažiausia dalis priskirta *Actinomycetota* ir *Pseudomonodota* tipams, kuriuose identifikuotos po dvi skirtingas bakterijų rūšis, atitinkamai *M. foliorum*, *C. Cellulans* ir *A. junii*, *P. aeruginosa*.

Atsižvelgiant į tai, kad pagal 16S rRNR geno sekoskaitos rezultatus esant >97 % sekų panašumui, su jau duomenų bazėje esančiomis, galima nustatyti rūšį, ar šios bakterijos priklauso vienam kamienui ar ne– negalime (Curry ir kt., 2022). Tolimesni tyrimai atliekami su kiekvienu izoliatu atskirai, nepriklausomai nuo to ar tai tos paties rūšies bakterija ar ne.

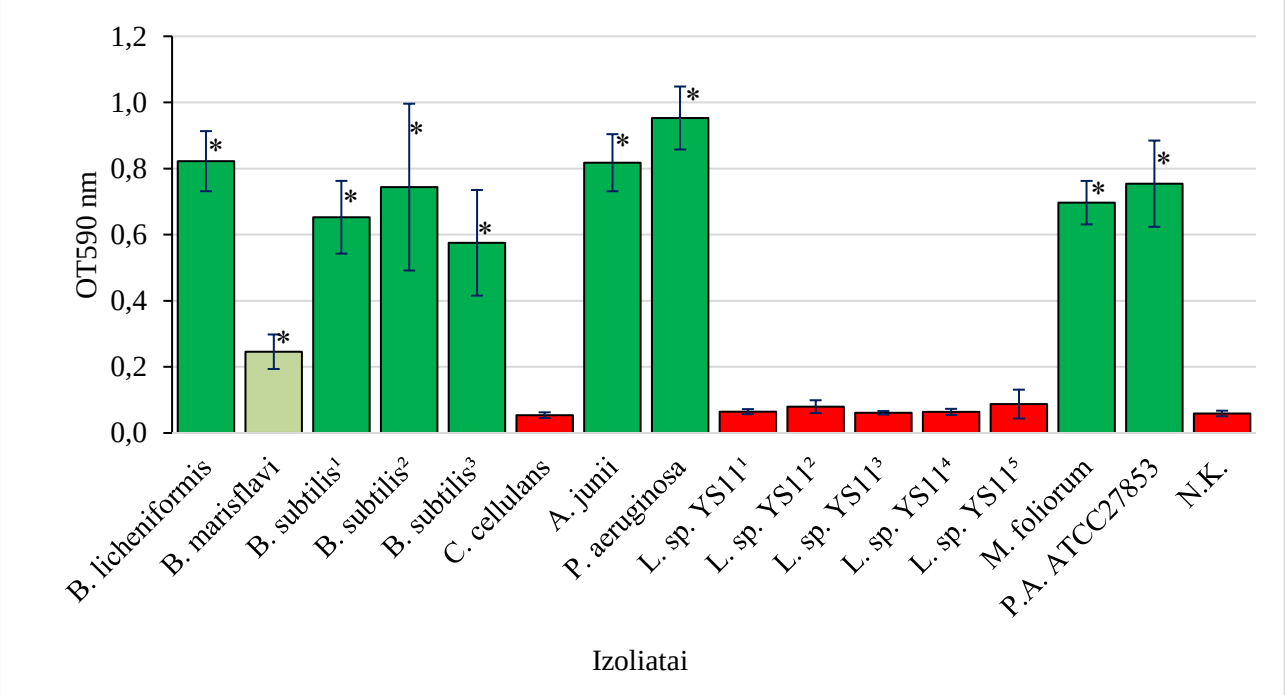
3.1.1 lentelė. Izoliatų klasifikacija remiantis 16S rRNR geno analizės rezultatais (N – izoliatų skaičius)

Tipas	*Bacilota*				*Actinomycetota*		*Pseudomonadota*	
Klasė	*Bacilli*				*Actinomycetes*		*Gammaproteo-bacteria*	
Eilė	*Caryophanales*				*Micrococcales*		*Pseudomonadales*	
Šeima	*Bacillaceae*			*Caryopha-naceae*	*Micro-bacteria-ceae*	*Promicro-monos-poraceae*	*Mo-raxella-ceae*	*Pseudo-monada-ceae*
Gen-tis	*Bacillus*			*Lysinibacil-lus*	*Micro-bacterium*	*Cellulosi-microbium*	*Acineto-bacter*	*Pseudo-monas*
Rūšis	*sub-tilis* (N3)	*licheni-formis* (N1)	*ma-risflavi* (N1)	sp. YS11 (N5)	*foliorum* (N1)	*cellulans* (N1)	*junii* (N1)	*aerugi-nosa* (N1)

3.2. Bioplėvelės formavimo vertinimas KV metodu

Šio tyrimo metu tirtas keturiolikos izoliatų gebėjimas formuoti bioplėvelę KV metodu. Kiekvienam izoliatui nustatytos iš bioplėvelės ekstrahuoto kristalo violeto absorbcijos reikšmės, o galutinis vertinimas atliktas lyginant su neigiama kontrole bei naudojant pasirinktą klasifikavimo metodiką (žr. 2.2.6. skyrelį).

Remiantis ribine tirpalo absorbcijos reikšme, kuri šio tyrimo metu yra 0,084, bei statistinio reikšmingumo testu nustatyti 8 izoliatai, kurie linkę formuoti bioplėvelę, ir 6 izoliatai kurie tiriamosiomis sąlygomis bioplėvelės neformuoja (**3.2.1 pav.**). Iš 8 bioplėvelę formuojančių izoliatų 1 bioplėvelę formuoja vidutiniškai, 7 pasižymėjo stipriu bioplėvelės formavimu. Stipriausiu bioplėvelės formavimu pasižymėjo *P. aeruginosa* izoliuotas iš Kazokiškių sąvartyno, jo absorbcijos reikšmė 0,94 ± 0,1, ~tuo tarpu kontrolinė *P. aeruginosa* ATCC27853 gauta reikšmė yra 0,75 ± 0,14. *B. marisflavi* pasižymėjo vidutiniu bioplėvelės formavimu gauta vertė yra 0,24 ± 0,05, o kitos *Bacillus* genčiai priklausančios bakterijos pasižymėjo stipriu bioplėvelės formavimu: *B. licheniformis* 0,84 ± 0,08, *B. subtilis*[1] 0,66 ± 0,12, *B. subtilis*[2] 0,69 ± 0,19 , *B. subtilis*[3] *0,58* ± 0,17. Tai pačiai *Caryophanales* eilei priklausantys *L.* sp YS11. izoliatai priskiriami biolėvelės neformuojančiai grupei atsižvelgiant tiek į ribinę tirpalo absorbcijos reikšmę tiek į statistiškai reikšmingo skirtumo tarp neigiamos kontrolės ir tiriamųjų izoliatų nebuvimą. Tokie rezultatai gauti ir *C. cellulans* atveju, bakterija priskirta bioplėvelės neformuojančiai grupei.

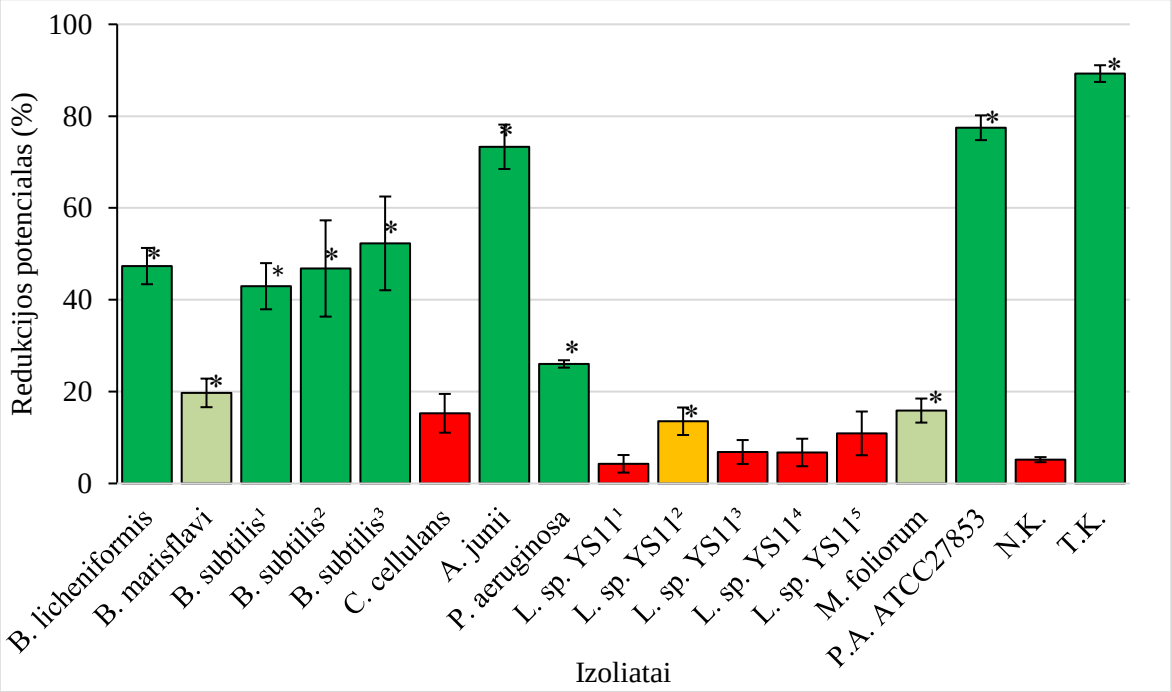


3.2.1 paveikslas. Izoliatų bioplėvelės formavimo rodikliai po 48 val. inkubacijos KV metodu matuojant OD_{590} ■ Stipriai formuojančios; ■ Vidutiniškai formuojančios; ■ Neformuojančios (N.K. Neigiama kontrolė; * p<0,05)

3.3. Bioplėvelės metabolinio aktyvumo vertinimas naudojant reagentą resazuriną

Šio tyrimo metu tirtas keturiolikos izoliatų suformuotos bioplėvelės metabolizmas naudojant reagentą resazuriną, skaičiuojant izoliatų bioplėvelės redukcijos potencialą. Kiekvienam izoliatui nustatytas redukcijos potencialas ir metabolinis aktyvumas įvertintas palyginant gautą reikšmę su neigiama kontrole bei naudojant pasirinktą klasifikavimo metodiką (žr. 2.2.7. skyrelį).

Remiantis ribine redukcijos potencialo reikšme, kuri šio tyrimo metu 7,05 %, bei statistinio reikšmingumo testu nustatyta, kad 9 izoliatų bioplėvelė pasižymėjo metaboliniu aktyvumu, o 5 šio aktyvumo neturėjo **(3.3.1 pav.)**.



3.3.1 paveikslas. Izoliatų bioplėvelės metabolinio aktyvumo vertinimo rezultatai skaičiuojant resazurino redukcijos potencialą (%) ■ Stipri redukcija; ■ Vidutiniška redukcija; ■ Silpna redukcija; ■ Nėra redukcijos; N.K. Neigiama kontrolė; T.K. Teigiama kontrolė * $p<0,05$.

Iš 9 metaboliniu aktyvumu pasižyminčių izoliatų 6 pasižymėjo stipriu metaboliniu aktyvumu, jų redukcijos potencialas yra didesnis nei 40 %, skirtumai lyginant su neigiama kontrole statistiškai reikšmingi. Visi tiriamieji izoliatai pasižymėjo lėtesniu metabolizmu nei referentinė *P. aeruginosa* ATCC27853, kuri tyrime naudota kaip teigiama kontrolė. Didžiausias metabolinis aktyvumas nustatytas *A. junii* formuojamai bioplėvelei 73,32 % ± 4,84 %. *Bacillus subtilis* rūšiai priskirti izoliatai pasižymėjo panašiu metaboliniu aktyvumu kuris siekė 42,96 % ± 5,03 %, 46,82 % ± 10,48 %, 52,29 % ± 10,21 %, atitinkamai *B. subtilis*¹, *B. subtilis*², *B. subtilis*³ izoliatams. Visi *L.* sp. YS11 izoliatai neformavo bioplėvelės kuri parodytų metabolinį aktyvumą išskyrus *L.* sp. YS11² izoliatą, kurio bioplėvelės metabolinis aktyvumas nustatytas silpnas, siekiantis 13,55 % ± 2,99 % ir yra statistiškai patikimas. Tuo tarpu *L.* sp. YS11⁵ izoliato formuojama bioplėvelė taip pat pasižymėjo silpnu metaboliniu

aktyvumu ir siekė 10,91 % ± 4,79 % tačiau toks gautas rezultatas nėra statistiškai patikimas. Toks rezultatas gautas ir su *C. cellulans* izoliatu, nustatytas redukcijos potencialas 15,28 % ± 4,22 % tačiau toks rezultatas nėra statistiškai patikimas.

3.4. Atsparumo genų identifikavimas PGR metodu vykdant elektroforezę

Šio tyrimo metu siekta identifikuoti genus susijusius su atsparumu antibiotikams tiriamuosiuose izoliatuose. Atlikta PGR reakcija su visais tiriamaisiais izoliatais 2.2.8. skyrelyje nurodytomis sąlygomis ir vykdyta elektroforezė agarozės gelyje bei gelio vizusalizacija kaip aprašyta 2.2.9. skyrelyje. Gauti galutiniai rezultatai pateikti

3.4.1 lentelėje.

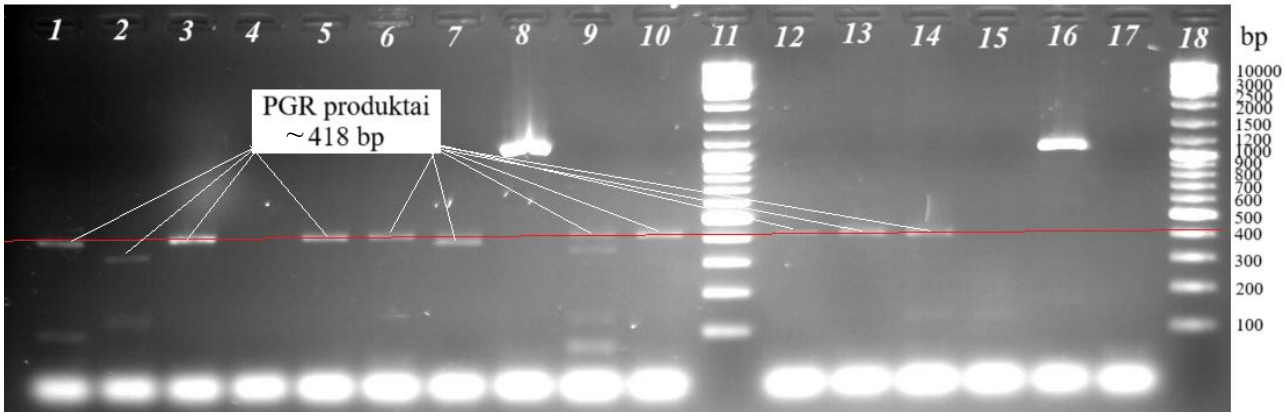
3.4.1 lentelė. Genų, susijusių su atsparumu antibiotikams, paplitimas izoliatuose

	B-laktamai					Tetraciklinai					Makrolidai			Aminoglikozidai					Integrazės		
	Ctx-M	*Oxa1*	*Oxa2*	*Oxa23*	*Shv*	*tetA*	*tetB*	*tetC*	*tetD*	*tetM*	*ermA*	*ermB*	*mefAB*	*aadE*	*aadA1*	*aadA2*	*aadB*	*strB*	*IntI1*	*IntI2*	*Iš viso*
B. licheniformis								■							■						2
B. marisflavi								■											■		2
B. subtilis[1]		■		■				■	■						■		■				6
B. subtilis[2]		■		■					■												3
B. subtilis[3]		■		■				■	■								■		■		6
C. cellulans								■													1
A. junii		■		■				■													3
P. aeruginosa	■																■				2
L. YS11[1]			■		■			■													3
L. YS11[2]			■		■			■													3
L. YS11[3]			■		■			■													3
L. YS11[4]			■		■			■													3
L. YS11[5]			■		■			■													3
M. foliorum																	■	■			2
P.A. ATCC 27853	■																■				2
Iš viso:	2	4	5	4	5	0	0	11	3	0	0	0	0	0	2	0	5	1	2	0	41

Didžiausias AAG kiekis nustatytas β-laktaminių antibiotikų grupei. Iš tirtų penkių AAG aptikti visi penki, o sumuojant keturiolikos izoliatų gautus produktus identifikuota dvidešimt AAG susijusių su atsparumu β-laktaminiams antibiotikams. Iš jų *Oxa1, Oxa2, Oxa23* identifikuoti dažniausiai, o *Ctx-M* geno paplitimas nustatytas rečiausias ir identifikuotas tik *P. aeruginosa* izoliate iš Kazokiškių sąvartyno bei referentinėje *P. aeruginosa* ATCC 27853. Tuo tarpu AAG susijusių su makrolidų grupės antibiotikais išvis neaptikta.

Iš tirtų 5 AAG susijusių su atsparumu aminoglikozidams nustatyti *aadA1* bei *aadB*, atitinkamai dvejuose ir penkiuose izoliatuose. Tuo tarpu genas *strB* aptiktas tik *M. foliorum* izoliatuose.

Iš dvejų tirtų integrazių genų aptiktas tik *IntI1 B. marisflavi* bei *B. subtilis*[3] izoliate. Dažniausias su atsparumu tetraciklinams susijęs genas nustatytas *tetC*, jis aptiktas 11 iš 14 tirtų atvejų ir tai plačiausiai paplitęs AAG lyginant su kitomis grupėmis. Genai identifikuoti remiantis PGR produktų vizualizacija elektroforezės agarozės gelyje, nuotrauka pateikta (**3.4.1 pav.**). Kitas su atsparumu tetraciklinams genas *tetD* aptiktas trejuose *B. subtilis* izoliatuose.



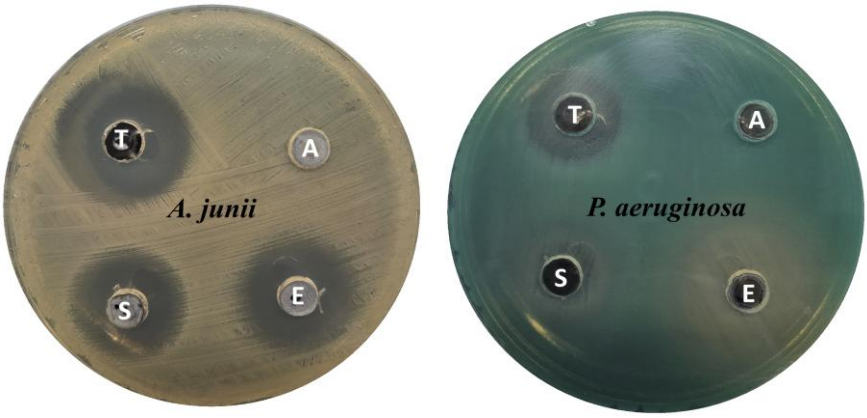
3.4.1 paveikslas. Geno *tetC* PGR produktai vizualizuoti elektroforezės agarozės gelyje metodu. Šulinėliai: 1- *B. licheniformis*; 2- *B. marisflavi*; 3- *B. subtilis*[1]; 4- *B. subtilis*[2]; 5- *B. subtilis*[3]; 6- *C. Cellulans*; 7- *A. junii*; 8- *P. aeruginosa*; 9- *L.* sp. YS11.[1]; 10- *L.* sp. YS11[2]; 11-DNR ilgio žymenys; 12- *L.* sp. YS11[3]; 13- *L.* sp. YS11[4]; 14- *L.* sp. YS11[5]; 15- *M. foliorum*; 16- *P. aeruginosa* ATCC27853; 17-Neigiama kontrolė; 18- DNR ilgio žymenys.

3.5. Izoliatų jautrumo antibiotikams vertinimas agaro šulinėlių difuzijos metodu

Visų izoliatų jautrumas keturių grupių antibiotikams (β-laktamai (ampicilinas), tetraciklinai(tetraciklinas), makrolidai(eritromicinas), aminoglikozidai(streptomicinas)) tirtas agaro šulinėlių difuzijos MHA terpėje metodu aprašytu 2.2.10. skyrelyje.

Atsižvelgiant į inhibicinės augimo zonos buvimą arba nebuvimą po inkubacijos su pasiriktais antibiotikais nustatyti 4 izoliatai atsparūs ampicilinui (*C. Cellulans, A. junii, P. aeruginosa, M. folio-*

rum). Atkreiptinas dėmesys į tai, kad *P. aeruginosa* izoliatas taip pat pasižymėjo atsparumu eritromicinui bei streptomicinui, inhibicinės zonos nebuvimas matomas **3.5.1 pav.**. Sąveikoje matomas žalio



3.5.1 paveikslas. *A. junii* ir *P. aeruginosa* jautrumo antibiotikams vertinimas agaro šulinėlių difuzijos metodu vertinant inhibicines zonas. (A- ampicilinas; T- tetraciklinas; E- eritromicinas; S- streptomicinas)

pigmento pianocianino nebuvimas, tačiau gyvybingumas išlikęs. **3.5.1 pav.** pateiktas kaip viso tyrimo pavyzdinis paveikslas, bendri rezultatai pateikti **3.5.1 lentelėje.**

Visi kiti izoliatai buvo jautrūs analizuojamiems antibiotikams. Didžiausios inhibicinės zonos buvo stebimos inkubuojant izoliatus su tetraciklinu ir siekė iki 18 mm, tokia inhibicija nustatyta vykdant inkubaciją su *B. licheniformis*. Mažiausios inhibicinės zonos stebimos inkubuojant izoliatus su streptomicinu ir siekė iki 11 mm *M. foliorum* atveju. Visi *L.* sp. YS11 izoliatai pasižymėjo panašiu jautrumu visais analizuojamais atvejais. Tuo tarpu *B. subtilis* izoliatų inhibicinės zonos tarpusavyje nežymiai skyrėsi. Vykdant inkubaciją su ampicilinu inhibicija vidutiniškai siekė 12 mm ± 3 mm, tetraciklinu – 11 mm ± 3 mm, eritromicinu – 15 mm ± 2 mm, streptomicinu – 6 mm ± 1 mm.

3.5.1 lentelė Izoliatų jautrumo antibiotikams vertinimas agaro šulinėlių difuzijos metodu, matuojant augimo inhibicijos zonas po inkubacijos su nurodytais antibiotikais.

	Augimo zonos inhibicija (ø mm)			
Izoliatai	Ampicilinas 10 µg	Tetraciklinas 30 µg	Eritromicinas 15 µg	Streptomicinas 10 µg
B. licheniformis	8	18	12	8
B. marisflavi	14	16	13	5
B. subtilis[1]	15	10	14	7
B. subtilis[2]	10	15	16	7
B. subtilis[3]	13	8	13	5
C. cellulans	0	7	4	7
A. junii	0	9	5	4
P. aeruginosa	0	5	0	0
L. sp. YS11[1]	12	14	6	7
L. sp. YS11[2]	11	15	6	7
L. sp. YS11[3]	11	15	6	7
L. sp. YS11[4]	11	15	6	7
L. sp. YS11[5]	11	15	6	7
M. foliorum	0	13	9	11

4. Rezultatų aptarimas

Mikroorganizmai nuo seno natūraliai egzistuoja aplinkoje kartu su žmonėmis, gyvūnais ir kitais organizmais. Kaip ir kiti gyvi sutvėrimai, jie yra veikiami aplinkos veiksnių, kurie gali juos arba sunaikinti, arba padaryti stipresniais. Tyrinėjant klinikinius patogenus pastebima statistiškai patvirtinta koreliacija tarp AAG ir bioplėvelių susidarymo, kuri lemia didesnį išgyvenamumą (Bakkeren ir kt., 2019). Tokios tendencijos aktyviai stebimos su pasaulio sveikatos organizacijos nustatytame „ESKAPE“ sąraše esančiomis *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* sp. bakterijomis (Dan ir kt., 2023; Fernández-Billón ir kt., 2023; Qi ir kt., 2016; Santajit & Indrawattana, 2016). Naujausi tyrimai rodo, kad ne tik klinikinių, antibiotikams atsparių, bakterijų aptikimas ligoninėse lemia spartesnį atsparumo paplitimą, prie to prisideda ir aplinkoje aptinkamos bakterijos, o kai kurie AAG susiję su atsparumu antibiotikmas kilę iš aplinkos bakterijų (Forsberg ir kt., 2015; Zhuang ir kt., 2021). Stebint užsienio publikacijas matomas augantis susidomėjimas aplinkos bakterijomis, turinčiomis atsparumą antibiotikams, tačiau Lietuvos mastu tokio tipo tyrimų trūksta. Šio tyrimo metu siekta apjungti kelias atsparumo antibiotikams determinantes, susijusias su aplinkos mikroorganizmų atsparumo antibiotikams genotipu – identifikuojant atsparumo genus, fenotipu – įvertinant jų jautrumą antibiotikams, bei riziką, susijusią su šių bakterijų bioplėvelės formavimu.

Atsižvelgiant į tai, kad bakterijų bendruomenės aptinkamos aplinkos mėginiuose atlieka svarbų vaidmenį nustatant AAG gausumą ir įvairovę įvairiose aplinkose (Bahram ir kt., 2018) pirmoje šio tyrimo dalyje įvertinta Kazokiškių sąvartyno mikrobiologinė sudėtis nustatant keturiolikos atsitiktinių kultivuojamų bakterijų taksonominė padėtis. Nustatytos trims dominuojantiems bakterijų tipams priklausančios bakterijos. *Bacilota* sudarė apie 72 % bendros bakterinės bendrijos, *Actinomycetota* – ~14 % ir *Pseudomonadota* – ~14 % (**3.1.1 lentelė**). Šių tipų atstovų didžiausia gausa identifikuota ir kituose Lietuvos aplinkos mėginiuose, tokiuose kaip agrokultūros dirvožemis, seni miškai, pievos (Kačergius ir kt., 2023; Sivojienė ir kt., 2024). Lyginant su kitų šalių tyrimų rezultatais toks pasiskirstymas atitinka gautus rezultatus (Chukwuma ir kt., 2021; He ir kt., 2023; Marathe ir kt., 2015)

Trečdalis identifikuotų izoliatų priklauso *Bacillus* genčiai. Šios bakterijos pasižymi atsparumu nepalankioms aplinkos sąlygoms, gali gyventi įvairiose aplinkose, įskaitant dirvožemį, vandenį ir orą (Valencia-Marin ir kt., 2024). Šių bakterijų gebėjimas formuoti sporas vaidina svarbų vaidmenį jų išlikimui aplinkoje kurioje gausu sunkiųjų metalų (Soni ir kt., 2016). Tad nenuostabu, kad šio tyrimo metu trečdalis identifikuotų izoliatų priklauso *Bacillus* genčiai.

AAG genų pernašai svarbus veiksnys yra bakterijų gebėjimas formuoti bioplėvelę. Šio tyrimo metu nustatyta, kad didžioji dalis identifikuotų bakterijų formuoja bioplėveles. Vertinant KV ir resa-

zurino redukcijos rezultatus (**3.2.1; 3.3.1 paveikslai**) galime teigti, kad 8 izoliatai formuoja bioplėveles ir tai sudaro daugiau nei 50 %. Šia savybe nepasižymėjo tik *C. Cellulans* ir *L.* sp. YS11. Atsižvelgiant į tai, kad *L.* sp. YS11[12345] izoliatų atveju bioplėvelės formavimas nenustatytas KV metodu, vertinant formuojamos bioplėvelės metabolizmą redukcijos procentas žemas, o atsparumo bei jautrumo antibiotikams profiliai gauti vienodi, galima manyti, kad tai vienam kamienui priklausantys izoliatai. Tokiu atveju, bioplėvelės formavimas detektuojamas 80 % atvejų. Toks aplinkos izoliatų gebėjimas formuoti bioplėveles stebimas ir kituose tyrimuose (Flemming & Wuertz, 2019).

Šiame tyrime nustatytų bakterijų gebėjimas formuoti bioplėvelę gali prisidėti prie šių organizmų išlikimo, plitimo aplinkoje bei AAG perdavimo. Bakterijų formuojama bioplėvelė šiems mikroorganizmams padeda išgyventi nepalankias, nuolat kintančias sąvartyno aplinkos sąlygas, tokias kaip: ultravioletinė spinduliuotė, temperatūros pokyčiai, maisto medžiagų trūkumas, antibiotikų ekspozicija (de Carvalho, 2017b; Fauzia ir kt., 2020; Yin ir kt., 2019). Tai vienas iš veiksnių, lemiančių tolimesnį šių bakterijų judėjimą ekosistemose.

Šio tyrimo metu identifikuoti *B. subtilis*[123] izoliatai pasižymėjo stipriu bioplėvelės formavimu, o išskirtoje genominėje DNR identifikuoti tetC bei tetD genai (

3.4.1 lentelė)., susiję su atsparumu tetraciklinui per vaisto pašalinimo sistemas. Identifikuotos bakterijos dalyvauja sąvartyno biodegradacijos procesuose, formuodamos bioplėvelę ir sudarydamos sąveiką per EPM suaktyvina metalų koroziją (Elumalai ir kt., 2019) kas padidina koreliaciją tarp sunkiųjų metalų bioprieinamumo ir atsparumo antibiotikams. Toks ryšys nustatytas per Acr AB-TolC Efflux pompas akcentuojant atsparumą tetraciklinui ir CO *B. subtilis* bakterijose (Vats ir kt., 2022). Vertinant šių izoliatų fenotipinį atsparumą agaro difuzijos metodu rezistentiškumas tetraciklinui nenustatytas. Tokie kontraversiški skirtumai gauti ir kito tyrimo metu kuriame iš 25 izoliatų kuriuose buvo aptikti *tet* atsparumo genai, net 14 iš jų taip pat buvo jautrūs tetraciklinui (Gargano ir kt., 2021). Tokį rezultatą galima paaiškinti tuo, kad ne tik Efflux pompos, koduojamos genų *tetA, tetB, tetC, tetD*, prisideda prie atsparumo tetraciklinui, tačiau ir kiti mechanizmai. Aptinkami genai koduojantys baltymus, apsaugančius ribosomas, išveiklinančius tetraciklinus (Ahmad ir kt., 2021). Be to, galima manyti, kad aptikti genai tetraciklinui jautriuose izoliatuose nebuvo ekspresuojami pakankamai ir/ar ekspresija išvis nevyko šiame tyrime naudotomis eksperimentinėmis sąlygomis. Neatmetamas ir antibiotiko atsparumo geno nutildymas (angl. silencing of antibiotic resistance by mutation), kuomet įprastomis sąlygomis turimas genas suteikia atsparumą, tačiau dėl genetinių defektų šie genai tampa neaktyvūs (Kime ir kt., 2019). Dėl šių priežasčių gali būti gaunami klaidingai teigiami rezultatai.

Be to, gali būti stebimas ir kitoks scenarijus, kai atsparumas nustatomas fenotipiškai, tačiau genai atsakingi už atsparumą neidentifikuojami. Toks atvejis nustatytas iš Kazokiškių sąvartyno išskirtoje *P. aeruginosa*. Fenotipiškai stebimas inhibicinės augimo zonos nebuvimas vykdant inkubaciją su streptomicinu (**3.5. pav.**), tačiau genai susiję su atsparumu neidentifikuoti. Aplink šulinėlį, esant

didelėms antibiotiko koncentracijoms, stebimas pigmento pianocianino nebuvimas, tačiau sterili inhibicinė augimo zona nefiksuojama. Tai gali būti susiję su streptomicino veikimu bei sulėtėjusia baltymų sinteze ir/ar alternatyvių metabolinių kelių įjungimu ribojant pigmento gamybą. Atsparumas gali būti siejamas su kitais genais koduojančiais produktus susijusius su 16S rRNR metilinimu, aminoglikozidų modifikacijomis, išorinės membranos pralaidumo sumažėjimu ar Eflux pompomis aprašomomis literatūroje (Y. Zhang ir kt., 2023), ar iki šiol neidentifikuotais genais. Svarbu pabrėžti tai, jog dažnu atveju norint įvertinti jautrumą antibiotikams reikalingi kompleksiniai tyrimai, tokią tendenciją akcentuoja ir klinikiniai mikrobiologai (Yee ir kt., 2021).

Genotipo atitikimas fenotipą šiame tyrime identifikuotas *C. Cellulans, A. junii, P. aeruginosa* ir *M. foliorum* atvejais. Išskirtoje izoliatų genominėje DNR identifikuoti *oxa1* bei *oxa23* genai, koduojantys fermentus išveiklinančius β-laktaminius antibiotikus (Kotsakis ir kt., 2018). Vykdant inkubaciją su ampicilinu matomas inhibicinės augimo zonos nebuvimas. Šiuo atveju galima teigti, kad genai atsakingi už atsparumą ampicilinui identifikuoti, o raiška eksperimento sąlygomis vyksta.

Šiame darbe analizuojamų AAG aptikimas tarp bioplėveles formuojančių izoliatų dažnesnis nei tarp bioplėvelės neformuojančių izoliatų. Vertinant vidutinį AAG kiekį tenkantį vienam izoliatui tarp bioplėvelę formuojančių ir neformuojančių izoliatų nustatyta, kad tarp bioplėvelę formuojančių izoliatų šių genų aptikta 62,5 % daugiau nei bioplėvelės neformuojančų izoliatų. Tokiose bakterijų bendruomenėse stebima aktyvesnė transformacija, transdukcija bei konjugacija (Michaelis & Grohmann, 2023). Natūrali transformacija stebima *B. subtilis* bei *Acinetobacter* genčiai priklausančiose bakterijose (Dubnau & Blokesch, 2019). Teigiama, koreliacija tarp biolėvelės formavimo bei transformacijos efektyvumo nustatyta ir *S. aureaus* atveju, susijusios su atsparumu tetraciklinui bei β-laktaminiams antibiotikams (Maree ir kt., 2022). Šio tyrimo metu identifikuoti AAG gali būti siejami su paplitimu per HGP tiek tarp artimų bakterijų, tiek tarp taksonomiškai skirtingų bakterijų, ypač tarp bioplėvelę formuojančių bakterijų, o toks pranašumas padidina šių bakterijų išgyvenamumą, ir riziką, susijusią su AAG plitimu.

Apibendrinant šio tyrimo rezultatus, Kazokiškių sąvartyne nustatyta bakterijų taksonominė įvairovė atitinkanti kitų šalių aplinkos mikrobiomo tyrimus. Dauguma identifikuotų bakterijų gebėjo formuoti bioplėveles, kurios susijusios su padidėjusiu mikroorganizmų išgyvenamumu ir AAG paplitimu. Tyrimo metu nustatyta, kad bioplėvelę formuojančių izoliatų grupėje AAG dažnumas buvo 62,5 % didesnis, lyginant su neformuojančiais bioplėvelių izoliatais. Genotipiniai ir fenotipiniai atsparumo tyrimai parodė sudėtingus ir kai kuriais atvejais kontraversiškus rezultatus, pabrėžiant būtinybę taikyti kombinuotus metodus antibiotikų atsparumo vertinimui. Šie duomenys turi praktinę reikšmę, nes leidžia geriau suprasti bioplėvelių vaidmenį plintant AAG aplinkoje ir akcentuoja aplinkos mikrobiologinių tyrimų svarbą Lietuvoje, formuojant efektyvias antimikrobinio atsparumo prevencijos ir valdymo strategijas.

Išvados

1. Kultivuojami Kazokiškių sąvartyno izoliatai identifikuoti naudojant 16S rRNR sekoskaitą: 72 % priklauso *Bacilota*, 14 % – *Actinomycetota*, 14 % – *Pseudomonadota* tipams.
2. Gebėjimu formuoti biolėvelę 96 šulinėlių mikroplokštelėje pasižymėjo 80 % izoliatų, vertinant bioplėvelės biomasės kiekį didžiausiu formavimu pasižymėjo *P. aeruginosa* izoliatas, tuo tarpu metabolinis aktyvumas stipriausias *A. junii* formuojamos bioplėvelės, šių savybių neturėjo *L.* sp. YS11 izoliatai bei *C. cellulans*.
3. Izoliatuose identifikuoti atsparumo antibiotikams genai susiję su atsparumu β-laktaminių, tetraciklinų, aminoglikozidų grupių antibiotikams. Didžiausias atsparumo genų skaičius nustatytas β-laktaminių antibiotikų grupei identifikavus *ctx-M, oxa1, oxa2, oxa23* bei *Shv* genus. Tuo tarpu labiausiai paplitęs genas yra *tetC*, aptiktas 11 iš 14 izoliatų. Genų, susijusių su atsparumu makrolidams, neaptikta.
4. Identifikuoti keturi atsparūs ampicilinui izoliatai: *C. cellulans*, *A. junii*, *P. aeruginosa*, *M. foliorum*. *P. aeruginosa* izoliatas taip pat atsparus eritromicinui bei streptomicinui.

Asmeninis indėlis

Suformuluota ir įgyvendinta tyrimo idėja, jai pritarus darbo konsultantei dokt. Gintarei Jansonaitei bei vadovei prof. dr. Eglei Lastauskienei. Parengti ir optimizuoti tyrimo metodai, kuriais vadovaujantis sėkmingai suplanuoti bei atlikti eksperimentai. Gauti pirminiai duomenys išanalizuoti, atlikta statistinė analizė, parengti grafikai bei schemos. Visi baigiamojo darbo skyriai parašyti savarankiškai atlikus mokslinės literatūros bei tyrimo metu gautų duomenų analizę, korekcijos atliktos atsižvelgiant į išsakytas konsultantės ir darbo vadovės pastabas.

Padėka

Dėkoju darbo vadovei **prof. dr. Eglei Lastauskienei** už vertingas pastabas ir patarimus rengiant baigiamąjį magistro darbą bei suteiktą galimybę atlikti reikiamus tyrimus laboratorijoje.

Taip pat, dėkoju **dokt. Gintarei Jansonaitei** už izoliatus, naudotus tyrimo metu, integraciją į laboratoriją ir darbą joje, perteikiant praktinius patarimus, planuojant tyrimus bei atliekant eksperimentus laboratorijoje.

Už bendradarbiavimą identifikuojant izoliatus, dėkoju **dr. Aleksandrui Konovalovui.**

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Modestas Katauskis

Magistro baigiamasis darbas

Iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų izoliatų bioplėvelės formavimas ir atsparumas antibiotikams

SANTRAUKA

Aminoglikozidai, tetraciklinai, makrolidai ir β-laktamai – vieni plačiausiai naudojamų antibiotikų klasių Lietuvoje ir pasaulyje. Aplinkos bakterijų atsparumas ir jų gebėjimas formuoti bioplėvelę gali prisidėti prie didėjančio atsparumo antibiotikams, tad šių determinančių įvertinimas reikšmingas siekiant geriau suprasti aplinkos bakterijų įtaką genų, lemiančių atsparumą antibiotikams, plitimą.

Šio darbo metu įvertintas iš Kazokiškių sąvartyno išskirtų izoliatų gebėjimas formuoti bioplėvelę ir nustatytas atsparumas antibiotikams. Tyrimui atlikti identifikuota 14 bakterijų izoliatų išskirtų iš Kazokiškių sąvartyno, atliekant 16S rRNR genų sekoskaitą. Izoliatų gebėjimas formuoti bioplėvelę įvertintas 96 šulinėlių mikroplokštelėje Kristalo violeto metodu, o bioplėvelėje esančių ląstelių metabolinis aktyvumas nustatytas pagal resazurino redukcijos potencialą. Antibiotikų atsparumo genų paplitimas susijęs su atsparumu β-laktamams, tetraciklinams, makrolidams bei aminoglikozidams nustatytas taikant PGR analizę. Izoliatų fenotipinis jautrumas antibiotikams patikrintas agaro šulinėlių difuzijos metodu.

Identifikuoti kultivuojami bakterijų izoliatai iš kurių 72 % priklauso *Bacilota*, 14 % – *Actinomycetota*, 14 % – *Pseudomonadota* tipams. Dauguma (80 %) tirtų izoliatų pasižymėjo gebėjimu formuoti bioplėvelę 96 šulinėlių mikroplokštelėje vertinant Kristalo violeto metodu, tai patvirtinta matuojant bioplėvelėje esančių bakterijų metabolinį aktyvumą. Kontraversiški rezultatai gauti *Lysinibacillus.* sp. YS11[2] izoliato atveju, kuomet bioplėvelės formavimas nenustatytas kristalo violeto metodu, tačiau stebimas silpnas metabolinis aktyvumas. Identifikuoti genai *ctx-M*, *oxa1*, *oxa2*, *oxa23*, *shv* (atsparumas β-laktamams)*, tetD*, *tetC,* (atsparumas tetraciklinams), *aadA1*, *aadB*, *strB* (atsparumas aminoglikozidams), *IntI1* (I klasės integrono integrazė). Nustatytas didesnis šių genų paplitimas tarp bioplėvelę formuojančių bakterijų. Identifikuoti 4 izoliatai atsparūs ampicilinui. Šių izoliatų fenotipinis atsparumas koreliuoja su juose identifikuotais β-laktamazių genais (*ctx-M, oxa1, oxa23*). Kitų tirtų antibiotikų atžvilgiu visi izoliatai buvo jautrūs, išskyrus *P. aeruginosa* – nustatytas atsparumas streptomicinui bei eritromicinui, tačiau šiame izoliate genai, susiję su atsparumu aminoglikozidams bei makrolidams, nebuvo identifikuoti.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Modestas Katauskis

Master's thesis

Biofilm Formation and Antibiotic Resistance by Isolates from Kazokiškės landfill

ABSTRACT

Aminoglycosides, tetracyclines, macrolides, and β-lactams are among the most widely used classes of antibiotics in Lithuania and worldwide. The resistance of environmental bacteria and their ability to form biofilms can contribute to the growing problem of antibiotic resistance; therefore, assessing these determinants is essential for a better understanding of how environmental bacteria influence the spread of genes that confer antibiotic resistance.

In this study, the biofilm forming ability and antibiotic resistance of bacterial isolates from the Kazokiškės landfill were evaluated. Fourteen isolates were identified by Nanopore sequencing of their 16S rRNA genes. Biofilm formation was assessed in 96-well microplates using the crystal violet assay, and the metabolic activity of cells within the biofilm was measured by a resazurin reduction assay. The prevalence of antibiotic resistance genes (β-lactam, tetracycline, macrolide, and aminoglycoside resistance) was determined by PCR analysis. Phenotypic antibiotic susceptibility was tested by an agar well diffusion method.

The cultivable isolates were predominantly from the phylum *Bacillota* (72%), with smaller proportions from *Actinomycetota* (14%) and *Pseudomonadota* (14%). Most (80%) of the isolates formed biofilms based on the crystal violet assay, a finding confirmed by detectable metabolic activity in the biofilm cells. However, one isolate (*Lysinibacillus* sp. YS11^2) showed a discrepancy: no biofilm was detected by the crystal violet assay, yet weak metabolic activity was observed.

Several resistance genes were identified: *ctx-M*, *oxa1*, *oxa2*, *oxa23*, and *shv* (β-lactam resistance); *tetD* and *tetC* (tetracycline resistance); *aadA1*, *aadB*, and *strB* (aminoglycoside resistance); and *IntI1* (class 1 integron integrase). A higher prevalence of these genes was found among biofilm-forming bacteria. Four isolates were resistant to ampicillin, and this phenotypic resistance correlated with the presence of β-lactamase genes (*ctx-M*, *oxa1*, *oxa23*) in those isolates. All isolates were sensitive to the other tested antibiotics, except for one *P. aeruginosa* isolate, which was resistant to streptomycin and erythromycin; no corresponding aminoglycoside or macrolide resistance genes were detected in this isolate.

Naudotos literatūros sąrašas

Abdel-Shafy, H. I., Ibrahim, A. M., Al-Sulaiman, A. M., & Okasha, R. A. (2024). Landfill leachate: Sources, nature, organic composition, and treatment: An environmental overview. *Ain Shams Engineering Journal*, *15*(1), 102293. https://doi.org/10.1016/j.asej.2023.102293

Abunama, T., Othman, F., & Nilam, T. I. T. (2021). Comparison of landfill leachate generation and pollution potentials in humid and semi-arid climates. *International Journal of Environment and Waste Management*, *27*(1), 79. https://doi.org/10.1504/IJEWM.2021.111906

Adams, R. A., Leon, G., Miller, N. M., Reyes, S. P., Thantrong, C. H., Thokkadam, A. M., Lemma, A. S., Sivaloganathan, D. M., Wan, X., & Brynildsen, M. P. (2021). Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure. *The Journal of Antibiotics*, *74*(11), 786–798. https://doi.org/10.1038/s41429-021-00462-x

Adedeji, W. A. (2016). THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, *14*(2), 56–57.

Ahmad, F., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Environmental fate of tetracycline antibiotics: Degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives. *Environmental Sciences Europe*, *33*(1), 64. https://doi.org/10.1186/s12302-021-00505-y

Akrami, F., Rajabnia, M., & Pournajaf, A. (2019). Resistance integrons; A Mini review. *Caspian Journal of Internal Medicine*, *10*(4), 370–376. https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.370

Alabi, O. A., Sorungbe, A. A., & Adeoluwa, Y. M. (2019). *In vitro* mutagenicity and genotoxicity of raw and simulated leachates from plastic waste dumpsite. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *29*(6), 403–410. https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566426

Alavi, N., Eslami, A., & Saghi, M. H. (2018). Measurement and monitoring of anions, cations and metals in landfill leachate in Iranian metropolises. *Data in Brief*, *21*, 1818–1822. https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.11.013

Alves, N. J., Turner, K. B., Medintz, I. L., & Walper, S. A. (2016). Protecting enzymatic function through directed packaging into bacterial outer membrane vesicles. *Scientific Reports*, *6*(1), 24866. https://doi.org/10.1038/srep24866

Anand, N., & Palani, S. G. (2022). A comprehensive investigation of toxicity and pollution potential of municipal solid waste landfill leachate. *Science of The Total Environment*, *838*, 155891. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155891

Arzmi, M. H., Kamil, W. N. W. A., & Zainal, M. (2023). Chapter 2—Monospecies and polymicrobial biofilms in static and flow environment. V. Gurtler & M. Patrauchan (Sud.), *Methods in Microbiology* (T. 53, p. 51–66). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mim.2023.05.002

Ashrafudoulla, Md., Mizan, Md. F. R., Park, S. H., & Ha, S.-D. (2021). Current and future perspectives for controlling *Vibrio* biofilms in the seafood industry: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(11), 1827–1851. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767031

Baderna, D., Caloni, F., & Benfenati, E. (2019). Investigating landfill leachate toxicity *in vitro*: A review of cell models and endpoints. *Environment International*, *122*, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.024

Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S. K., Anderson, J. L., Soudzilovskaia, N. A., Bodegom, P. M., Bengtsson-Palme, J., Anslan, S., Coelho, L. P., Harend, H., Huerta-Cepas, J., Medema, M. H., Maltz, M. R., Mundra, S., Olsson, P. A., Pent, M., Põlme, S., Sunagawa, S., Ryberg,

M., … Bork, P. (2018). Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, *560*(7717), 233–237. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6

Bai, L., Tan, Z., Gong, H., Xu, M., Li, Z., Yue, J., Liu, L., Yang, D., & Li, R. (2022). Study on antibiotics, antibiotic resistance genes, bacterial community characteristics and their correlation in the landfill leachates. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(1), 445–458. https://doi.org/10.1111/jam.15229

Bakkeren, E., Huisman, J. S., Fattinger, S. A., Hausmann, A., Furter, M., Egli, A., Slack, E., Sellin, M. E., Bonhoeffer, S., Regoes, R. R., Diard, M., & Hardt, W.-D. (2019). Salmonella persisters promote the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut. *Nature*, *573*(7773), 276–280. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1521-8

Banin, E., Hughes, D., & Kuipers, O. P. (2017). Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 450–452. https://doi.org/10.1093/femsre/fux016

Bareither, C. A., Benson, C. H., Edil, T. B., & Barlaz, M. A. (2012). Abiotic and Biotic Compression of Municipal Solid Waste. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, *138*(8), 877–888. https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000660

Birkelbach, J., Seyfert, C. E., Walesch, S., & Müller, R. (2024). Harnessing Gram-negative bacteria for novel anti-Gram-negative antibiotics. *Microbial Biotechnology*, *17*(11), e70032. https://doi.org/10.1111/1751-7915.70032

Blanco, Y., Rivas, L. A., González-Toril, E., Ruiz-Bermejo, M., Moreno-Paz, M., Parro, V., Palacín, A., Aguilera, Á., & Puente-Sánchez, F. (2019). Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments. *Science of The Total Environment*, *650*, 384–393. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.440

Bonomo, R. A. (2017). β-Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(1), a025239. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239

Buroni, S., Matthijs, N., Spadaro, F., Van Acker, H., Scoffone, V. C., Pasca, M. R., Riccardi, G., & Coenye, T. (2014). Differential Roles of RND Efflux Pumps in Antimicrobial Drug Resistance of Sessile and Planktonic Burkholderia cenocepacia Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(12), 7424–7429. https://doi.org/10.1128/aac.03800-14

Campoccia, D., Montanaro, L., & Arciola, C. R. (2021). Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), Article 16. https://doi.org/10.3390/ijms22169100

Chakma, S., & Mathur, S. (2013). Postclosure Long-Term Settlement for MSW Landfills. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, *17*(2), 81–88. https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000164

Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P. F., Ayers, S., & Meng, J. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant Salmonella Serovars Isolated from Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(1), 1–7. https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.1-7.2004

Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudin, H. A., & Ismail, N. (2021). Bacterial Diversity and Community Structure of a Municipal Solid Waste Landfill: A Source of Lignocellulolytic Potential. *Life*, *11*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/life11060493

Costa, A. M., Alfaia, R. G. de S. M., & Campos, J. C. (2019). Landfill leachate treatment in Brazil – An overview. *Journal of Environmental Management*, *232*, 110–116. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.006

Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaieva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2022). Emu: Species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature Methods*, *19*(7), 845–853. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4

Dan, B., Dai ,Heping, Zhou ,Dangui, Tong ,Hongfang, & and Zhu, M. (2023). Relationship Between Drug Resistance Characteristics and Biofilm Formation in Klebsiella Pneumoniae Strains. *Infection and Drug Resistance*, *16*, 985–998. https://doi.org/10.2147/IDR.S396609

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(5), 280–295. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y

de Carvalho, C. C. C. R. (2017a). Biofilms: Microbial Strategies for Surviving UV Exposure. S. I. Ahmad (Sud.), *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (p. 233–239). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_19

de Carvalho, C. C. C. R. (2017b). Biofilms: Microbial Strategies for Surviving UV Exposure. S. I. Ahmad (Sud.), *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment* (p. 233–239). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_19

Deng, Y., Li, B., & Zhang, T. (2018). Bacteria That Make a Meal of Sulfonamide Antibiotics: Blind Spots and Emerging Opportunities. *Environmental Science & Technology*, *52*(7), 3854–3868. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06026

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: Structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(9), 523–539. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6

Dubnau, D., & Blokesch, M. (2019). Mechanisms of DNA Uptake by Naturally Competent Bacteria. *Annual Review of Genetics*, *53*(Volume 53, 2019), 217–237. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043641

Durand, G. A., Raoult, D., & Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *53*(4), 371–382. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010

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

Elumalai, P., Parthipan, P., Narenkumar, J., Anandakumar, B., Madhavan, J., Oh, B.-T., & Rajasekar, A. (2019). Role of thermophilic bacteria (Bacillus and Geobacillus) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. *3 Biotech*, *9*(3), 79. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1604-0

European Commission. Directorate General for the Environment. (2014). *General Union environment action programme to 2020 :living well, within the limits of our planet.* Publications Office. https://data.europa.eu/doi/10.2779/66315

Eurostat. (2022). *Municipal waste by waste management operations* [Dataset]. Eurostat. https://doi.org/10.2908/ENV_WASMUN

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), 707–712. https://doi.org/10.1128/jcm.01943-07

Farha, M. A., Tu, M. M., & Brown, E. D. (2025). Important challenges to finding new leads for new antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, *83*, 102562. https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102562

Fauzia, K. A., Miftahussurur, M., Syam, A. F., Waskito, L. A., Doohan, D., Rezkitha, Y. A. A., Matsumoto, T., Tuan, V. P., Akada, J., Yonezawa, H., Kamiya, S., & Yamaoka, Y. (2020). Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Phenotype of Helicobacter pylori Clinical Isolates. *Toxins*, *12*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/toxins12080473

Fernández-Billón, M., Llambías-Cabot, A. E., Jordana-Lluch, E., Oliver, A., & Macià, M. D. (2023). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofilm*, *5*, 100129. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100129

Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T. R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., & Wuertz, S. (2021). Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *7*(1), 1–5. https://doi.org/10.1038/s41522-020-00183-3

Flemming, H.-C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(4), 247–260. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9

Forsberg, K. J., Patel, S., Wencewicz, T. A., & Dantas, G. (2015). The Tetracycline Destructases: A Novel Family of Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Chemistry & Biology*, *22*(7), 888–897. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.05.017

Gaidė, I., & Čižeikienė, D. (2019). Bakterijų, išskirtų iš dirvožemio, produkuojamų celiuliazių aktyvumo tyrimai ir įvairių terpių panaudojimo galimybės celiuliazių susidarymui. *Agricultural Sciences / Zemės ukio Mokslai*, *26*(3), 145–154.

Gargano, V., Sciortino, S., Gambino, D., Costa, A., Agozzino, V., Reale, S., Alduina, R., & Vicari, D. (2021). Antibiotic Susceptibility Profile and Tetracycline Resistance Genes Detection in Salmonella spp. Strains Isolated from Animals and Food. *Antibiotics*, *10*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/antibiotics10070809

Gautam, A., Lear, G., & Lewis, G. D. (2022). Time after time: Detecting annual patterns in stream bacterial biofilm communities. *Environmental Microbiology*, *24*(5), 2502–2515. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16017

Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Jamaluddin, Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2012). Diversity of Cellulolytic Microbes and the Biodegradation of Municipal Solid Waste by a Potential Strain. *International Journal of Microbiology*, *2012*, 325907. https://doi.org/10.1155/2012/325907

Ghai, I., & and Ghai, S. (2018). Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 523–530. https://doi.org/10.2147/IDR.S156995

Ghosh, P., Thakur, I. S., & Kaushik, A. (2017). Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *141*, 259–270. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.023

Gieg, L. M., Fowler, S. J., & Berdugo-Clavijo, C. (2014). Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, *27*, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.002

Gomes, C., Martínez-Puchol ,Sandra, Palma ,Noemí, Horna ,Gertrudis, Ruiz-Roldán ,Lidia, Pons ,Maria J, & and Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(1), 1–30. https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261

Greene, N. P., Kaplan, E., Crow, A., & Koronakis, V. (2018). Antibiotic Resistance Mediated by the MacB ABC Transporter Family: A Structural and Functional Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00950

Guo, X., Yang, Y., Lu, D., Niu, Z., Feng, J., Chen, Y., Tou, F., Garner, E., Xu, J., Liu, M., & Hochella, M. F. (2018). Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary. *Water Research*, *129*, 277–286. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.029

Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 276–301. https://doi.org/10.1093/femsre/fux010

Hanekamp, J. C., & Bast, A. (2015). Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *39*(1), 213–220. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.016

Harika, K., Shenoy, V. P., Narasimhaswamy, N., & Chawla, K. (2020). Detection of Biofilm Production and Its Impact on Antibiotic Resistance Profile of Bacterial Isolates from Chronic Wound Infections. *Journal of Global Infectious Diseases*, *12*(3), 129–134. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_150_19

He, R., Peng, C., Jiang, L., Han, H., Chu, Y.-X., Wang, J., Liu, C.-Y., & Zhao, N. (2023). Characteristic pollutants and microbial community in underlying soils for evaluating landfill leakage. *Waste Management*, *155*, 269–280. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.11.015

HIGIENOS INSTITUTAS. (s.a.).

Hofer, U. (2019). The cost of antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(1), 3–3. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x

Huang, J., Li ,Chen, Song ,Jiangning, Velkov ,Tony, Wang ,Lushan, Zhu ,Yan, & and Li, J. (2020). Regulating Polymyxin Resistance in Gram-Negative Bacteria: Roles of Two-Component Systems PhoPQ and PmrAB. *Future Microbiology*, *15*(6), 445–459. https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0322

Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe*, *26*(1), 15–21. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002

Yan, Z.-Q., Shen, D.-X., Cao, J.-R., Chen, R., Wei, X., Liu, L.-P., & Xu, X.-L. (2010). Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *35*(3), 269–273. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.016

Yang, H., Ma, M., Thompson, J. R., & Flower, R. J. (2018). Waste management, informal recycling, environmental pollution and public health. *Journal of Epidemiology and Community Health*, *72*(3), 237–243. https://doi.org/10.1136/jech-2016-208597

Ibrahim, M., Ahmad, F., Yaqub, B., Ramzan, A., Imran, A., Afzaal, M., Mirza, S. A., Mazhar, I., Younus, M., Akram, Q., Ali Taseer, M. S., Ahmad, A., & Ahmed, S. (2020). Chapter 4—Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. M. Z. Hashmi (Sud.), *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment* (T. 1, p. 39–69). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00004-8

Yee, R., Dien Bard, J., & Simner, P. J. (2021). The Genotype-to-Phenotype Dilemma: How Should Laboratories Approach Discordant Susceptibility Results? *Journal of Clinical Microbiology*, *59*(6), 10.1128/jcm.00138-20. https://doi.org/10.1128/jcm.00138-20

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(14), Article 14. https://doi.org/10.3390/ijms20143423

Yu, X., Sui, Q., Lyu, S., Zhao, W., Liu, J., Cai, Z., Yu, G., & Barcelo, D. (2020). Municipal Solid Waste Landfills: An Underestimated Source of Pharmaceutical and Personal Care Products in the Water Environment. *Environmental Science & Technology*, *54*(16), 9757–9768. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00565

Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., Secor, P. R., Tseng, B. S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(36), 11353–11358. https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112

Kačergius, A., Sivojienė, D., Gudiukaitė, R., Bakšienė, E., Masevičienė, A., & Žičkienė, L. (2023). Comparison of the Structure of Soil Microbial Communities of Different Ecosystems Using the Microbiome Sequencing Approach. *Soil Systems*, *7*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/soilsystems7030070

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, *33*(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Karunaratne, D. N. (2012). *The Complex World of Polysaccharides*. BoD – Books on Demand.

Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., & Woerden, F. V. (2018). *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. World Bank Publications.

Kime, L., Randall, C. P., Banda, F. I., Coll, F., Wright, J., Richardson, J., Empel, J., Parkhill, J., & O'Neill, A. J. (2019). Transient Silencing of Antibiotic Resistance by Mutation Represents a Significant Potential Source of Unanticipated Therapeutic Failure. *mBio*, *10*(5), 10.1128/mbio.01755-19. https://doi.org/10.1128/mbio.01755-19

Kotsakis, S. D., Flach, C.-F., Razavi, M., & Larsson, D. G. J. (2018). Characterization of the First OXA-10 Natural Variant with Increased Carbapenemase Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(1), 10.1128/aac.01817-18. https://doi.org/10.1128/aac.01817-18

Kragh, K. N., Alhede, M., Rybtke, M., Stavnsberg, C., Jensen, P. Ø., Tolker-Nielsen, T., Whiteley, M., & Bjarnsholt, T. (2018). The Inoculation Method Could Impact the Outcome of Microbiological Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(5), e02264-17. https://doi.org/10.1128/AEM.02264-17

Król, J. E., Wojtowicz, A. J., Rogers, L. M., Heuer, H., Smalla, K., Krone, S. M., & Top, E. M. (2013). Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid*, *70*(1), 110–119. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.003

Lee, A. (2017). MEASURING CELL-VIABILITY BY RESAZURIN (ALAMARBLUE®) ASSAY USING PHOTOPETTE® CELL. *LIFE SCIENCES*.

Li, C., Wen, R., Mu, R., Chen, X., Ma, P., Gu, K., Huang, Z., Ju, Z., Lei, C., Tang, Y., & Wang, H. (2022). Outer Membrane Vesicles of Avian PathogenicEscherichia coli Mediate the Horizontal Transmission of blaCTX-M-55. *Pathogens*, *11*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/pathogens11040481

Li, D., Ge, Y., Wang, N., Shi, Y., Guo, G., Zou, Q., & Liu, Q. (2023). Identification and Characterization of a Novel Major Facilitator Superfamily Efflux Pump, SA09310, Mediating Tetracycline Resistance in Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *67*(4), e01696-22. https://doi.org/10.1128/aac.01696-22

Limoli, A., Garzia ,E., De Pretto ,A., & and De Muri, C. (2019). Illegal landfill in Italy (EU)—A multidisciplinary approach. *Environmental Forensics*, *20*(1), 26–38. https://doi.org/10.1080/15275922.2019.1566291

Liu, Z., Wu, W., Shi, P., Guo, J., & Cheng, J. (2015). Characterization of dissolved organic matter in landfill leachate during the combined treatment process of air stripping, Fenton, SBR and coagulation. *Waste Management*, *41*, 111–118. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.044

Longhin, E. M., El Yamani, N., Rundén-Pran, E., & Dusinska, M. (2022). The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, *4*. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701

Madsen, L., Aarestrup, F. M., & Olsen, J. E. (2000). Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary Microbiology*, *75*(1), 73–82. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00207-8

Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell*, *157*(3), 539–548. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050

Marathe, N., Nagarkar, S., Vaishampayan, A., Rasane, M., Samant, S., Dohe, V., Kagal, A., Shouche, Y., & Deshpande, N. (2015). High prevalence of class 1 integrons in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *33*(2), 231–236. https://doi.org/10.4103/0255-0857.154905

Maree, M., Thi Nguyen, L. T., Ohniwa, R. L., Higashide, M., Msadek, T., & Morikawa, K. (2022). Natural transformation allows transfer of SCCmec-mediated methicillin resistance in Staphylococcus aureus biofilms. *Nature Communications*, *13*(1), 2477. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29877-2

Materon, I. C., & Palzkill, T. (2023). Structural biology of MCR-1-mediated resistance to polymyxin antibiotics. *Current Opinion in Structural Biology*, *82*, 102647. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102647

McDonough, E., Kamp, H., & Camilli, A. (2016). Ibrio cholerae phosphatases required for the utilization of nucleotides and extracellular DNA as phosphate sources. *Molecular Microbiology*, *99*(3), 453–469. https://doi.org/10.1111/mmi.13128

McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(1), 39–50. https://doi.org/10.1038/nrmicro2695

Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. *Antibiotics*, *12*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328

Minelgaitė, A., & Liobikienė, G. (2019). Waste problem in European Union and its influence on waste management behaviours. *Science of The Total Environment*, *667*, 86–93. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.313

Mor, S., & Ravindra, K. (2023). Municipal solid waste landfills in lower- and middle-income countries: Environmental impacts, challenges and sustainable management practices. *Process Safety and Environmental Protection*, *174*, 510–530. https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.04.014

Morris, S., Garcia-Cabellos, G., Enright, D., Ryan, D., & Enright, A.-M. (2018). Bioremediation of Landfill Leachate Using Isolated Bacterial Strains. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, *6*(1), 26–35. https://doi.org/10.12691/ijebb-6-1-4

Moussa, A. A., Md Nordin ,Amirah Fatihah, Hamat ,Rukman Awang, & and Jasni, A. S. (2019). High Level Aminoglycoside Resistance And Distribution Of The Resistance Genes In Enterococcus faecalis And Enterococcus faecium From Teaching Hospital In Malaysia. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 3269–3274. https://doi.org/10.2147/IDR.S219544

Munteanu, A.-C., & Uivarosi, V. (2021). Ruthenium Complexes in the Fight against Pathogenic Microorganisms. An Extensive Review. *Pharmaceutics*, *13*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060874

Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Aguilar, G. R., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Hayoon, A. G., Weaver, N. D., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., … Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, *404*(10459), 1199–1226. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1

Naveen, B. P., Mahapatra, D. M., Sitharam, T. G., Sivapullaiah, P. V., & Ramachandra, T. V. (2017). Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate. *Environmental Pollution*, *220*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.002

Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, *15*(4), 209–215. https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363

Okshevsky, M., & Meyer, R. L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, *41*(3), 341–352. https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.841639

Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *34*(5), 877–886. https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z

Orazi, G., & O'Toole, G. A. (2019). "It Takes a Village": Mechanisms Underlying Antimicrobial Recalcitrance of Polymicrobial Biofilms. *Journal of Bacteriology*, *202*(1), 10.1128/jb.00530-19. https://doi.org/10.1128/jb.00530-19

Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *34*(9), 577–588. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4

Perni, S., Preedy, E. C., & Prokopovich, P. (2014). Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, *206*, 265–274. https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.008

Pham, T. D. M., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, *10*(10), 1719–1739. https://doi.org/10.1039/C9MD00120D

Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, X., Qiu, S., & Song, H. (2016). Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in Acinetobacter baumannii. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00483

Qiao, M., Ying, G.-G., Singer, A. C., & Zhu, Y.-G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, *110*, 160–172. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.016

Rada, E. C., Ragazzi, M., Stefani, P., Schiavon, M., & Torretta, V. (2015). Modelling the Potential Biogas Productivity Range from a MSW Landfill for Its Sustainable Exploitation. *Sustainability*, *7*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/su7010482

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151–171. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003

Rampersad, S. N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, *12*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/s120912347

Rezapour, S., Samadi, A., Kalavrouziotis, I. K., & Ghaemian, N. (2018). Impact of the uncontrolled leakage of leachate from a municipal solid waste landfill on soil in a cultivated-calcareous environment. *Waste Management*, *82*, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.013

Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 571–586. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0

Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A., & Ferdosi-Shahandashti, E. (2021). Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *24*(2), 136–142. https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48905.11208

Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, *2016*(1), 2475067. https://doi.org/10.1155/2016/2475067

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(10), 608–620. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0

Savage, V. J., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). Staphylococcus aureus Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(4), 1968–1970. https://doi.org/10.1128/aac.02008-12

SĄVARTYNAS. Leidimas veiklai ir monitoringo ataskaita—VAATC. (s.a.). Gauta 2025 m. kovo 17 d., https://www.vaatc.lt/tarifai-2/

Seputiene, V., Bogdaite, A., Ruzauskas, M., & Suziedeliene, E. (2012). Antibiotic resistance genes and virulence factors in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis from diseased farm animals: Pigs, cattle and poultry. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *15*(3). http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-0ef867be-6807-48cc-89cb-20fc794ccd12

Shah, H. H., Amin, M., & Pepe, F. (2023). Maximizing resource efficiency: Opportunities for energy recovery from municipal solid waste in Europe. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, *25*(5), 2766–2782. https://doi.org/10.1007/s10163-023-01733-5

Singh, R., Sahore, S., Kaur, P., Rani, A., & Ray, P. (2016). Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences. *Pathogens and Disease*, *74*(6), ftw056. https://doi.org/10.1093/femspd/ftw056

Sivojienė, D., Masevičienė, A., Žičkienė, L., Ražukas, A., & Kačergius, A. (2024). Soil Microbial Community Structure and Carbon Stocks Following Fertilization with Organic Fertilizers and Biological Inputs. *Biology*, *13*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/biology13070534

Slezak, R., Krzystek, L., & Ledakowicz, S. (2015). Degradation of municipal solid waste in simulated landfill bioreactors under aerobic conditions. *Waste Management*, *43*, 293–299. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.017

Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). Bacillus Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(6), 1139–1148. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12231

Sorg, R. A., Lin, L., Doorn, G. S. van, Sorg, M., Olson, J., Nizet, V., & Veening, J.-W. (2016). Collective Resistance in Microbial Communities by Intracellular Antibiotic Deactivation. *PLOS Biology*, *14*(12), e2000631. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000631

Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2020). Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, *29*(3), 654–669. https://doi.org/10.1002/pro.3819

Trimble, M. J., Mlynárčik, P., Kolář, M., & Hancock, R. E. W. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(10), a025288. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288

Tripathi, N., & Sapra, A. (2025). Gram Staining. *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/

Vakulenko, S. B., Donabedian, S. M., Voskresenskiy, A. M., Zervos, M. J., Lerner, S. A., & Chow, J. W. (2003). Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(4), 1423–1426. https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1423-1426.2003

Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Guzmán-Guzmán, P., Orozco-Mosqueda, M. del C., de los Santos-Villalobos, S., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2024). Survival strategies of *Bacillus* spp. in saline soils: Key factors to promote plant growth and health. *Biotechnology Advances*, *70*, 108303. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108303

Van Meervenne, E., De Weirdt, R., Van Coillie, E., Devlieghere, F., Herman, L., & Boon, N. (2014). Biofilm models for the food industry: Hot spots for plasmid transfer? *Pathogens and Disease*, *70*(3), 332–338. https://doi.org/10.1111/2049-632X.12134

Vats, P., Kaur, U. J., & Rishi, P. (2022). Heavy metal-induced selection and proliferation of antibiotic resistance: A review. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(6), 4058–4076. https://doi.org/10.1111/jam.15492

Vaverková, M. D. (2019). Landfill Impacts on the Environment—Review. *Geosciences*, *9*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/geosciences9100431

Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, *84*(2), 377–410. https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04

Wang, Y., Bian, Z., & Wang, Y. (2022). Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(19), 6365–6381. https://doi.org/10.1007/s00253-022-12150-3

Wang, P., Wu, D., You, X., Li, W., & Xie, B. (2019). Distribution of antibiotics, metals and antibiotic resistance genes during landfilling process in major municipal solid waste landfills. *Environmental Pollution*, *255*, 113222. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113222

Wang, W., Yao, S., Zhao, Z., Liu, Z., Li, Q. X., Yan, H., & Liu, X. (2024). Degradation and potential metabolism pathway of polystyrene by bacteria from landfill site. *Environmental Pollution*, *343*, 123202. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.123202

Wang, Z., Shao, S., Zhang, C., Lu, D., Ma, H., & Ren, X. (2015). Pretreatment of vinegar residue and anaerobic sludge for enhanced hydrogen and methane production in the two-stage anaerobic system. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(13), 4494–4501. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.02.029

Weiss, N. D., Felby, C., & Thygesen, L. G. (2019). Enzymatic hydrolysis is limited by biomass–water interactions at high-solids: Improved performance through substrate modifications. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1339-x

Wilkins, M., Hall-Stoodley, L., Allan, R. N., & Faust, S. N. (2014). New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection*, *69*, S47–S52. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.014

Wilson, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 637–648. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z

Win, K. Z., Yabar, H., & Mizunoya, T. (2024). Analysis of Household Waste Generation and Composition in Mandalay: Urban–Rural Comparison and Implications for Optimizing Waste Management Facilities. *Waste*, *2*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/waste2040026

Winterhalter, M., & Ceccarelli, M. (2015). Physical methods to quantify small antibiotic molecules uptake into Gram-negative bacteria. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *95*, 63–67. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.006

Woo, J., Guk, J.-H., Yi, S., Lee, J., Song, H., Kim, W.-H., & Cho, S. (2023). Effect of biofilm formation by antimicrobial-resistant gram-negative bacteria in cold storage on survival in dairy processing lines. *International Journal of Food Microbiology*, *386*, 110019. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110019

Wright, P. M., Seiple, I. B., & Myers, A. G. (2014). The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*(34), 8840–8869. https://doi.org/10.1002/anie.201310843

Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L., & Deng, Y. (2016). Crystal Violet and XTT Assays on Staphylococcus aureus Biofilm Quantification. *Current Microbiology*, *73*(4), 474–482. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1

Zainun, M. Y., & Simarani, K. (2018). Metagenomics profiling for assessing microbial diversity in both active and closed landfills. *Science of The Total Environment*, *616–617*, 269–278. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.266

Zeng, X., Zou, Y., Zheng, J., Qiu, S., Liu, L., & Wei, C. (2023). Quorum sensing-mediated microbial interactions: Mechanisms, applications, challenges and perspectives. *Microbiological Research*, *273*, 127414. https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127414

Zhang, B., Li, G., Cheng, P., Yeh, T.-C. J., & Hong, M. (2016). Landfill Risk Assessment on Groundwater Based on Vulnerability and Pollution Index. *Water Resources Management*, *30*(4), 1465–1480. https://doi.org/10.1007/s11269-016-1233-x

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*, *05*(01), 14–20. https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2023.01.001

Zhang, R., Yang, S., An, Y., Wang, Y., Lei, Y., & Song, L. (2022). Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review. *The Science of the Total Environment*, *806*(Pt 2), 150647. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150647

Zhao, Y. R., Liu, T. J., Chen, X. S., Xie, Q., & Huang, L. P. (2016). The effect of temperature on the biodegradation properties of municipal solid waste. *Waste Management & Research*, *34*(3), 265–274. https://doi.org/10.1177/0734242X15622811

Zhao, R., Liu, J., Feng, J., Li, X., & Li, B. (2021). Microbial community composition and metabolic functions in landfill leachate from different landfills of China. *Science of The Total Environment*, *767*, 144861. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144861

Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K. Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, *285*, 117402. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402