



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

IEVA ŠČERBA

**Intensyvios žuvininkystės įtaka vandens telkinių mikrobiomui ir rezistomui**

Genetikos magistro studijų programos baigiamasis darbas

Darbo vadovė  
Doc. dr. Eglė Lastauskienė

Vilnius, 2020

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	3
ĮVADAS .....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	6
1.1 Pasaulinė akvakultūra .....	6
1.1.1 Intensyvi žuvininkystė.....	7
1.1.2 Antibiotikai akvakultūroje.....	7
1.1.3 Sunkieji metalai akvakultūroje.....	8
1.2 Žuvininkystės tvenkinių mikrobiomas.....	9
1.3 Atsparumo antibiotikams mechanizmai.....	11
1.3.1 Antibiotiko įsisavinimo ribojimas.....	11
1.3.2 Aktyvus antibiotiko šalinimas.....	12
1.3.3 Antibiotiko taikinio modifikacija.....	13
1.3.4 Antibiotiko inaktyvacija.....	14
1.4 Atsparumo sunkiesiems metalams mechanizmai .....	15
1.5 Bendra atsparumo antibiotikams ir metalams atranka.....	17
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	20
2.1 Tyrimo objektas bei mėginių surinkimas.....	20
2.2 Genominės DNR išskyrimas.....	22
2.3 Metagenominė analizė .....	22
2.4 Antibiotikams bei sunkiesiems metalams atsparumo genų identifikavimas.....	22
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	26
3.1 Genominės DNR išskyrimas.....	26
3.2 Sekų analizė .....	26
3.3 Mikroorganizmų bendrijų alfa įvairovė.....	28
3.4 Mikroorganizmų bendrijų struktūra nuosėdų mėginiuose .....	31
3.5 Atsparumo antibiotikams bei sunkiesiems metalams genų identifikavimas.....	38
IŠVADOS.....	39
SANTRAUKA .....	40
SUMMARY .....	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	42

## SANTRUMPOS

*arsB* – genas koduojantis arsenitų eflukso baltymą

*arsC* – genas koduojantis arsenatų reduktazę

*chrB* – genas koduojantis chromo transporterinį baltymą

*cnrC2/A3* – genai koduojantys nikelio ir vario eflukso baltymus

*copA/B* – genai koduojantys varį eksportuojančias P tipo ATPazes

*czcA/C/D* – genai koduojantys kobalto, cinko ir kadmio eflukso baltymus

*ermF* – genas koduojantis 23S rRNR metiltransferazę

*msrA* – genas koduojantis nuo ATP priklausomą eritromicino eflukso baltymą

*pbrA* – genas koduojantis šviną eksportuojančią P tipo ATPazę

*pbrT* – genas koduojantis šviną importuojantį baltymą

*strA/B* – genai koduojantys streptomyciną modifikuojančius baltymus

*tet(32)* – genas koduojantis RPP (angl. ribosomal protection proteins) priklausantį baltymą

*tet(H)* – genas koduojantis tetraciklino eflukso baltymą

*tet(M)* – genas koduojantis nekovalentiškai ribosomas modifikuojantį baltymą

*tet(W)* – genas koduojantis nekovalentiškai ribosomas modifikuojantį baltymą

*tet(X)* – genas koduojantis tetraciklino oksidoreduktazę

## IVADAS

Akvakultūra yra vienas iš sparčiausiai augančių maisto gamybos sektorių pasaulyje (Aly ir Albutti, 2014). Intensyvus baltųjų amūrų (*Ctenopharyngodon idella*), paprastųjų karpų (*Cyprinus carpio*), atlantinių lašišų (*Salmo salar*), vaivorykštinių upėtakių (*Oncorhynchus mykiss*) ir daugelio kitų žuvų veisimas padeda aprūpinti vis sparčiau augančią žmonių populiaciją gyvulinės kilmės baltymais (FAO, 2014).

Nepaisant spartaus akvakultūros augimo, esama veiksnių, ribojančių tolimesnę žuvininkystės plėtrą, vienas jų – žuvų ligos. Bakterinės ligos sukelia didelį laukinių ir kultūrinių žuvų mirtingumą. Netinkamas bei per dažnas antibiotikų naudojimas bakterinių ligų kontrolei gali sukelti antimikrobinėms medžiagoms atsparių bakterijų atsiradimą bei antibiotikams atsparumo genų plitimą (Watts ir kt., 2017). Be to, akvakultūroje naudojami ne tik antibiotikai, bet ir metalų turintys produktai parazitų kontrolei (Schlenk, 1998). Padidėjusi metalų koncentracija vandenyje bei vandens telkinių nuosėdose skatina mikroorganizmų atsparumą antibiotikams (Banquero ir kt., 2008). Ilgalaikis antibiotikų naudojimas gali negrįžtamai užteršti aplinką bei paveikti vandens telkinių mikrobiomo struktūrą (Liu ir kt., 2020). Siekiant užtikrinti tiekiamos žuvies bei aplinkos saugumą, būtina nuolat vykdyti žuvininkystės vandens telkinių mikrobiologinės taršos kontrolę.

Šio darbo tyrimo objektas – Simno žuvininkystės tvenkiniai. Šiuo metu Žuvininkystės tarnybos prie Lietuvos Respublikos žemės ūkio ministerijos Žuvivaisos skyriaus Simno poskyris yra pagrindinė Lietuvoje sykų, europinių šamų, plačiažnyplių vėžių veisimo vieta. Tvenkiniuose taip pat veisiami šamai, lynai, lydekos, vėgėlės, vaivorykštiniai upėtakai, lašišos. Simno poskyryje žuvų veisimas vykdomas nuo 1964 metų, tačiau duomenų apie tvenkinių mikroorganizmų bendrijas nėra.

Šio darbo tikslas – nustatyti intensyvios žuvininkystės įtaką mikroorganizmų bendrijų sudėties kitimui.

### **Darbo uždaviniai:**

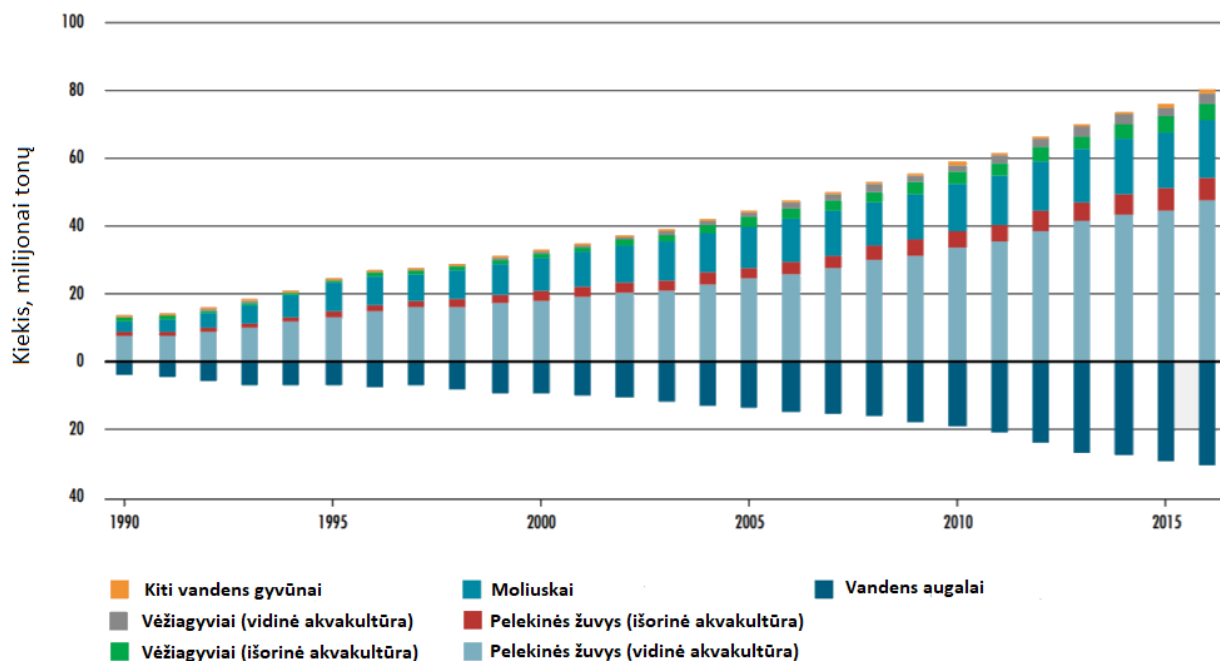
1. Identifikuoti didžiausias mikroorganizmų populiacijas Simno žuvininkystės tvenkiniuose;
2. Identifikuoti skirtumus mikroorganizmų bendrijose skirtingose tvenkinių grupėse;
3. Įvertinti Simno žuvininkystės tvenkinių ekologinę būseną, bakterijų bendrijų sandaros kontekste;

4. Nustatyti atsparumo antibiotikams ir sunkiesiems metalams genus bakterijų populiacijose.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Pasaulinė akvakultūra

Augant žmonių populiacijai, vis daugiau vandens telkinių yra panaudojama pelekinių žuvų, vėžiagyvių, moliuskų ir kitų vandens gyvūnų veisimui. Veisiamų vandens gyvūnų ir augalų kiekiai auga jau trečią dešimtmetį iš eilės (1.1 pav.). Pagal Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos duomenis, pasaulinė akvakultūros produkcija (įskaitant vandens augalus) 2016 m. siekė 110,2 mln. tonų, o jos vertė įvertinta 243,5 milijardo dolerių. Bendrą produkciją sudarė 80 mln. tonų maistui skirtų žuvų, 30,1 milijonų tonų vandens augalų bei 37 tūkstančiai tonų ne maisto produktų (dekoratyvinės kriauklės ir perlai).



**1.1 pav.** Akvakultūros produkcijos kiekiai 1990-2016 metais (pagal Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizaciją, 2018)

Didžioji dauguma maistui skirtų žuvų veisiama gėlo vandens telkiniuose. Dėl vidutinio 5,8 proc. produkcijos prieaugio kasmet, akvakultūra išlieka greičiausiai augančiu maisto gamybos sektoriumi (FAO, 2018).

### **1.1.1 Intensyvi žuvininkystė**

Esama įvairių žuvies gėlo vandens telkiniuose veisimo būdų. Visų jų tikslas yra maksimaliai padidinti gyvūnų augimo greitį ir intensyvumą, tuo pačiu tiekiant saugius maisto produktus (Watts ir kt., 2017). Siekiant padidinti žuvų gyvybingumą, reguliariai naudojama keletas pagrindinių strategijų:

1. Ekstensyvi akvakultūra, kai plėšrūnai pašalinami, o konkurentai kontroliuojami.
2. Pusiau intensyvi akvakultūra, kai auginami gyvūnai papildomai maitinami pašarais.
3. Intensyvi akvakultūra, kai visi auginamų gyvūnų maisto poreikiai yra patenkinami.

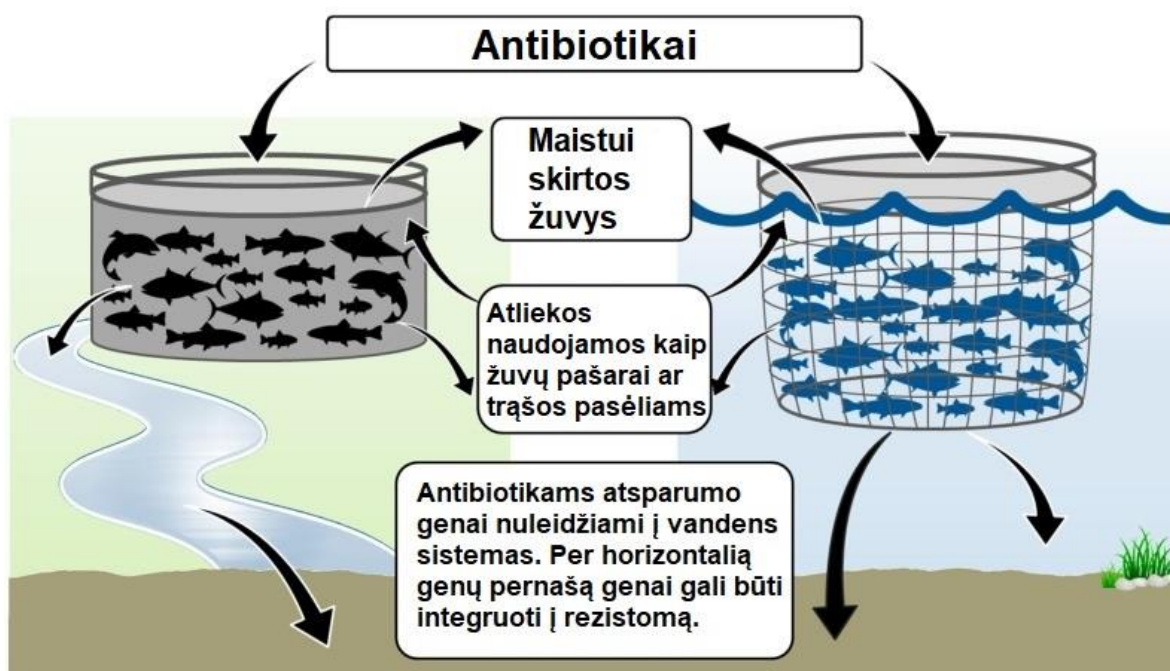
Augant vėžiagyvių bei pelekinių žuvų poreikiui, vis dažniau yra pasirenkama pusiau intensyvi arba intensyvi žuvininkystė dėl didesnio našumo ir ekonominės naudos (Dawood ir Koshio, 2016). Deja, tačiau dėl intensyvios žuvininkystės padidėja auginamų gyvūnų tankis, o vandens telkinių tarša maisto medžiagomis lemia prastą vandens kokybę. Padidėjęs organinių medžiagų kiekis lemia tvenkiniuose ištirpusio deguonies išsekvojimą, dėl ko galimas toksinių metabolitų išsiskyrimas (tokių kaip vandenilio sulfidas, metanas, amoniakas, nitritai), kurie dažnai sukelia didelį žuvų mirtingumą (Martinez ir kt., 2012). Dėl būtinybės kontroliuoti patogenų protrūkius bei užtikrinti vandens gyvūnų gyvybingumą bei greitą augimą, intensyvi žuvininkystė tapo priklausoma nuo antibiotikų ir kitų medžiagų naudojimo.

### **1.1.2 Antibiotikai akvakultūroje**

Antibiotikai akvakultūroje naudojami kaip bakterinių ligų profilaktinės ar gydomosios priemonės, kurios dažniausiai į vandens aplinką patenka kaip žuvų pašarų priedai (Aly ir Albutti, 2014). Trimetoprimas, ormetoprimas, oksitetraciklinas, florfenikolis ir eritromicinas įvardijami kaip dažniausiai naudojami antibiotikai akvakultūroje (Patil ir kt., 2016). Nors prieš tam tikras bakterines ligas egzistuoja vakcinacija, antibiotikai išlieka labai svarbia priemone kovoje su žuvų patogenais (Caruso, 2016).

Nepaisant antibiotikų privalumų, antimikrobinės medžiagos dažniausiai įvardinamos kaip bakterijų atsparumo antibiotikams priežastis (1.2 pav.). Daugelis antibiotikų yra stabilūs cheminiai junginiai, kurie nėra suskaidomi žuvų organizme. Išsiskyrę į vandenį kartu su išmatomis ir šlapimu dar ilgai gali išlikti aktyvūs (Burrige ir kt., 2010). Yra žinoma, kad mikroorganizmų bendrijas veikia žemesnės nei minimalios antibiotikų inhibitorinės koncentracijos (MIK) (Gullberg ir kt., 2011). Padidėjusi antimikrobinių medžiagų koncentracija

žuvininkystės ūkiuose spartina mikroorganizmų genetinę adaptaciją. Atsparumą bakterijos gali įgyti dėl įvykusios mutacijos, tačiau dažniausiai genų plitimas vyksta per horizontalią genų pernašą – transformaciją, transdukciją arba konjugaciją (Watts ir kt., 2017). Vis daugiau tyrėjų praneša identifikavę atsparumo genus žuvininkystės ūkiuose. Piotrowska ir kt. nustatė daugybę tetraciklinui, eritromicinui ir streptomycinui atsparumo genų karpių veisimo ūkiuose. Pranešama, kad tokie genai kaip *tet(A)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tet(34)*, *str(A)*, *str(B)*, *msr(A)*, *erm(X)*, *erm(V)*, *erm(F)* ir kt. buvo identifikuoti tiek vandenyje, tiek vandens telkinių nuosėdose (Piotrowska ir kt., 2017). Tuo tarpu Patil ir kt. nustatė keliems antibiotikams atsparių *Aeromonas* genties izoliatų.



**1.2 pav.** Antibiotikams atsparumo genų plitimas atvirose ir uždaroje akvakultūros sistemose (pagal Watts ir kt., 2017)

Svarbu pabrėžti, kad ne tik antibiotikų panaudojimas žuvininkystėje skatina atsparumo genų atsiradimą ir plitimą. Nūdienoje didėja susirūpinimas dėl žuvininkystės ūkių užteršimo sunkiaisiais metalais. Tvirtinama, kad sunkiųjų metalų tarša veikia kaip selektyvus veiksnys plintant atsparumui antibiotikams (Baker-Austin ir kt., 2006).

### 1.1.3 Sunkieji metalai akvakultūroje

Sunkieji metalai yra vieni iš labiausiai paplitusių teršalų aplinkoje (Mohammed ir kt., 2011). Sunkieji metalai akvakultūroje atsiranda natūraliai, tačiau jų kiekis vis didėja dėl



antropogeninės veiklos, tokios kaip kasyba, pramonė, iškastinio kuro deginimas ir žemės ūkio veikla (Dickinson ir kt., 2019). Taip pat sunkieji metalai į vandens sistemas patenka kartu su žuvų pašarais. Varis, cinkas, geležis ir manganas yra naudojami kaip pašarų sudėtinės dalys. Be to, varis naudojamas įvairių priešparazitinių medžiagų gamyboje, naudojamų tinklų ir narvų apdorojimui (Burridge ir kt., 2010). Sunkieji metalai nėra biologiškai skaidomi. Patekę į vandens telkinius šie junginiai gali atsistoti nuosėdose arba kauptis vandens organizmuose (Hussein, 2015).

Ne visi sunkieji metalai yra vienodai toksiški vandens mikroorganizmams. Pavyzdžiui, cinkas (Zn), nikelis (Ni), chromas (Cr), varis (Cu) yra svarbūs mikroelementai dalyvaujantys ląstelės fiziologiniuose procesuose. Sunkieji metalai yra DNR ir RNR polimerazių (Zn), ureazės (Ni), citochromo (Cr) ir citochromo c oksidazės (Cu) komponentai (Seiler ir Berendonk, 2012). Švinas (Pb), kadmis (Cd), gyvsidabris (Hg), sidabras (Ag) ir auksas (Au) neturi reikšmės kaip mikroelementai ir pasižymi ribota fiziologine funkcija. Tokių metalų kaip Zn, Ni, Cu, kobalto (Co) ir Cr toksiškumas labai priklauso nuo koncentracijos, o elementai Ag, Cd, Hg, Pb, stibis (Sb) ir uranas (U) yra stiprūs toksinai (Nies, 1999).

Akvakultūros bakterijų bendruomenės yra stipriai veikiamos sunkiųjų metalų ir antibiotikų derinio. Ilgalaikis antibiotikų ir sunkiųjų metalų panaudojimas intensyvioje žuvininkystėje skatina ne tik genetinę mikroorganizmų adaptaciją bei atsparumą šiems junginiams, bet ir mikroorganizmų bendrijų kaitą (Liu ir kt., 2020).

## **1.2 Žuvininkystės tvenkinių mikrobiomas**

Žuvininkystės tvenkinių nuosėdos pasižymi didele organinių ir neorganinių medžiagų koncentracija. Šios medžiagos nusėda tvenkinių dugne kartu su žuvų išmatomis bei nesuėtais pašarais ir sukelia vandens telkinių eutrofikaciją bei deguonies išsekvojimą. Tokios vandens gyvūnų auginimo sąlygos gali sukelti didelį kultūrinių žuvų mirtingumą, vandens augalų išnykimą bei ligų protrūkius (Kawahara, 2009). Šie aplinkos pokyčiai atsispindi ir vandens telkinių mikrobiome. Nuosėdose esantys mikroorganizmai turi labai svarbų vaidmenį medžiagų apykaitoje vandens ekosistemose, tačiau hipoksinės nuosėdų sąlygos slopina mikroorganizmų ektoproteolitinį aktyvumą. Mikroorganizmai pereina prie heterotrofinio mitybos būdo, biogeocheminiai ciklai yra sutrikdomi, dėl ko kinta bakterijų bendrijų sandara (Leon, 2017).

Naujausi metagenominiai metodai akvakultūros aplinkoje leidžia nustatyti mikroorganizmų bendrijų sandarą. Pranešama, kad mikroorganizmų bendrijos žuvininkystės

ūkiuose varijuoja dėl auginamų skirtingų žuvų rūšių, jų auginimo būdų, vandens telkinių hidrografinių savybių, aeracijos bei sezoninių pokyčių (Tang ir kt., 2014). *Alphaproteobacteria* bei sulfatą redukuojančios bakterijos yra būdingos geltonuodegio tuno ūkiuose, *Cytophaga/Flexibacter* būdingos jūros ešerių ūkiams, o *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacteroides* ir *Proteobacteria* – lašišų ūkiuose (Leon ir kt., 2017). Nepaisant variacijos, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ir *Chloroflexi* yra dažniausiai aptinkami bakterijų tipai vandens telkiniuose. Manoma, kad šios bakterijos užtikrina tinkamą medžiagų apykaitą vandens ekosistemose. Pavyzdžiui, proteobakterijos siejamos su amoniakinio azoto oksidacija, o *Bacteroidetes* su organinių teršalų įsisavinimu bei skaidymu. Rečiau identifikuojami *Acidobacteria*, *Actinobacteria* ir *Firmicutes* (Fan ir kt., 2016). Tai patvirtina daugybė atliktų tyrimų. Liu ir kt. nustatė, kad gėluose vandens telkiniuose, kur vykdoma intensyvi žuvininkystė, nuosėdos pasižymi didesne mikroorganizmų įvairove nei vandens mėginiai. Pranešama, kad vandens mėginiuose buvo nustatyti penki dominuojantys mikroorganizmų tipai: *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Plancomycetes* ir *Bacteroides*. Nuosėdose dominavo *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* bei *Verrucomicroba* tipų mikroorganizmai. Tuo tarpu jūrų ūkių nuosėdose dominuoja ne tik *Proteobacteria* ir *Bacteroidetes*, bet ir *Acidobacteria* bei *Planctomycetes* tipų mikroorganizmai (Kawahara ir kt., 2009). Mikrobiomą sudarantys bakterijų tipai gali varijuoti dėl temperatūros pokyčių. Tang ir kt. nustatė, kad esant aukštesnei aplinkos temperatūrai baltakojų blyškiųjų krevečių (*Litopenaeus vannamei*) ūkyje, vandens mėginiuose mikroorganizmų įvairovė yra žymiai didesnė, nei žemos temperatūros mėginiuose. Tiek aukštos, tiek žemos temperatūros mėginiuose dominavo *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ir *Bacteroidetes*, taip pat buvo aptikti *Cyanobacteria*, *Firmicutes* ir *Gemmatimonadetes* tipų bakterijos. Pastebėta, kad *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* ir *Verrucomicrobia* bakterijos yra būdingos tik esant aukštai vandens temperatūrai (Tang ir kt., 2014). Akvakultūroje vandens gyvūnų ligų protrūkiai dažnai būna sezoniniai, todėl manoma, kad ligų protrūkiai gali būti glaudžiai susiję su sezoniniais mikroorganizmų populiacijų pokyčiais akvakultūros aplinkoje (Liu ir kt., 2019)..

Svarbu pabrėžti, kad žuvininkystės tvenkinių bakterijų bendrijos struktūra atspindi akvakultūros ekologinę būklę. Kalbant apie gėlavandenius tvenkinius, maisto medžiagų perteklius yra siejamas su vandens telkinių eutrofikacija bei aktyviu melsvabakterių dauginimusi. Melsvabakterės ne tik konkuruoja su vandens gyvūnais dėl deguonies, bet ir sumažina vandens kokybę (Liu ir kt., 2020). Tuo tarpu tarša organinėmis medžiagomis druskinguose vandenyse

siejama su deltaproteobakterijų dominavimu. Tikimasi, kad šios bakterijos gali būti naudojamos kaip biologiniai rodikliai vertinant jūrų žuvų ūkių nuosėdų taršos lygį (Kawahara ir kt., 2009). Žuvininkystės ūkiuose dažnai aptinkamos ir patogeninės bakterijos, kurios sukelia žuvų ligas. Tarp plačiausiai paplitusių patogenų tiek gėluose, tiek druskinguose vandenyse yra *Aeromonas* spp.. Šie mikroorganizmai pasižymi skirtingu patogeniškumu, priklausomai nuo infekuojamos žuvų rūšies. Taip pat dažnas patogenas yra *Flavobacterium* spp., sukeliantis žuvų odos ir žiaunų nekrozę (Liu, 2019). Žuvininkystės ūkiuose taip pat aptinkama vibriozę (*V. salmonicida*), mikobakteriozę (*N. crassostreae*) sukeliančių mikroorganizmų (Haenen, 2017). Didelis bakterinių infekcijų paplitimas žuvininkystės ūkiuose lemia dažną antibiotikų vartojimą, jų akumuliaciją vandens aplinkoje, o tai savo ruožtu lemia antibiotikams atsparių bakterijų dauginimąsi (Preena ir kt., 2020).

### **1.3 Atsparumo antibiotikams mechanizmai**

Bakterijų genetinė medžiaga perduodama iš vienos kartos į kitą nelytinio dauginimosi metu (vertikalus perdavimas), o genetinis maišymasis vykdomas horizontalios genų pernašos būdais: transdukcija, konjugacija ir transformacija. Horizontali genų pernaša lemia greitą bakterijų evoliuciją bei prisitaikymą prie kintančios aplinkos (Bertolla ir Simonet, 1999). Bakterijų genetinis plastiškumas leidžia atsparumo genams greitai judėti įvairiose bakterijų populiacijose.

Bakterijų atsparumas antibiotikams gali būti tiek natūralus, tiek įgytas. Atsparumo mechanizmai skirstomi į 4 pagrindines kategorijas: antibiotiko įsisavinimo ribojimas, antibiotiko taikinio modifikacija, antibiotiko inaktyvacija bei aktyvus antibiotiko pašalinimas iš ląstelės. Natūraliam atsparumui yra būdingas antibiotiko įsisavinimo ribojimas, antibiotiko inaktyvacija bei antibiotiko aktyvus šalinimas. Tuo tarpu įgyto atsparumo mechanizmams būdinga taikino modifikacija, antibiotiko inaktyvacija bei aktyvus jo šalinimas (Reygaert, 2018).

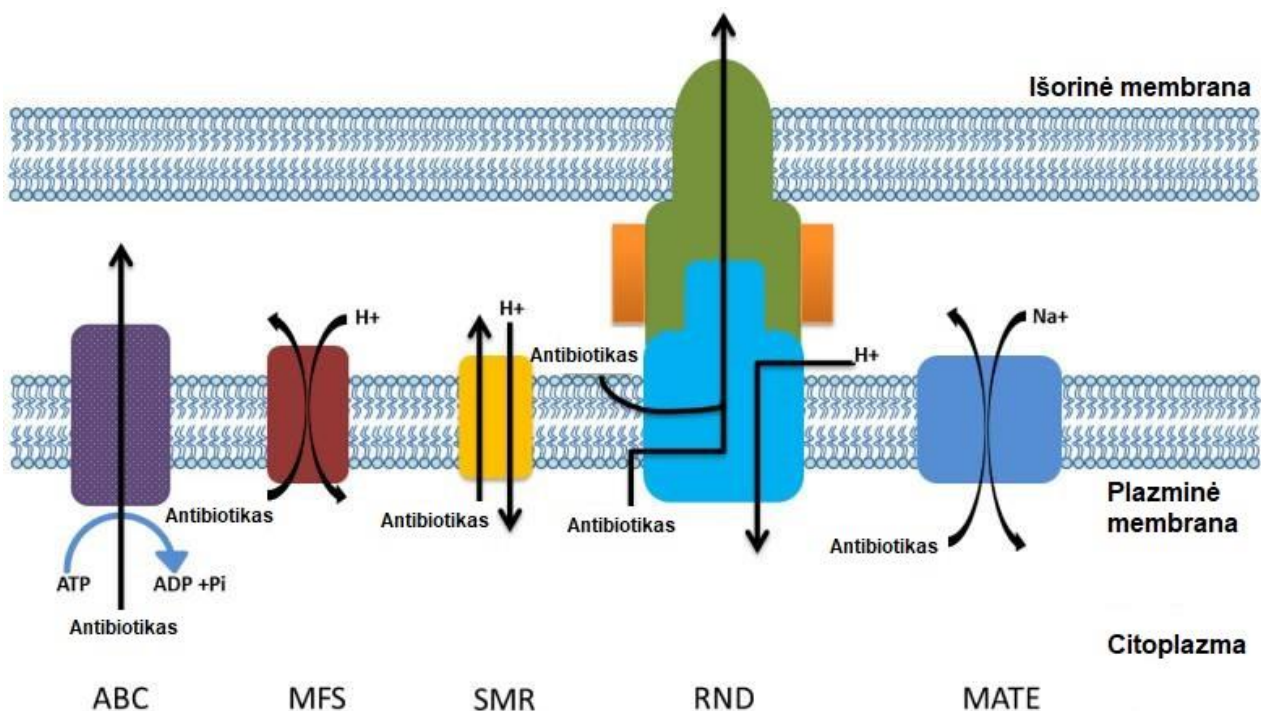
#### **1.3.1 Antibiotiko įsisavinimo ribojimas**

Daugelis antibiotikų turi viduląstelinis taikinius arba taikinius citoplazminėje membranoje. Antimikrobinė medžiaga turi prasiskverbti į išorinę arba citoplazminę membraną. Siekiant apsisaugoti, bakterijose išsivystė mechanizmai, neleidžiantys antibiotikui pasiekti savo tikslo.

Antibiotikų įsisavinimo ribojimas skiriasi gramneigiamose ir gramteigiamose bakterijose. Gramteigiamos bakterijos neturi išorinės membranos, todėl antibiotikų patekimo apribojimas nėra toks paplitęs. Tuo tarpu lipopolisacharidų sluoksnis gramneigiamose bakterijose sudaro natūralų barjerą didelėms antimikrobinių medžiagų molekulėms (Blair ir kt., 2014). Mažesnės hidrofiliinės molekulės patenka per porinus. Yra du pagrindiniai būdai, kuriais yra apribojamas antibiotikų patekimas per porinus į ląstelę: porinų skaičiaus sumažinimas bei mutacijos, kurios keičia porinų selektyvumą (Reygaert, 2018). Vienas iš pavyzdžių yra *Klebsiella pneumoniae* atsparumas. Nustatyta, kad po poveikio antibiotikais OmpK35 porino raiška buvo pakeista į OmpK36, kuris pasižymi mažesniu dydžiu. Šis pokytis teigiamai koreliavo su padidėjusiu atsparumu įvairiems  $\beta$ -laktaminiams antimikrobiniams vaistams. Panašių pavyzdžių galima rasti ir kitose klinikinės reikšmės bakterijų rūšyse, tokiose kaip *E.cloacae*, *Salmonella spp.*, *N.gonorrhoeae* ir *A.baumannii* (Munita ir Arias, 2016). Antibiotiko pralaidumo pokyčiai dažnai sukelia žemą atsparumo lygį ir dažnai yra susiję su kitais atsparumo mechanizmais, pvz. aktyviu antibiotiko pašalinimu iš ląstelės.

### 1.3.2 Aktyvus antibiotiko šalinimas

Bakterijos turi gerai išsivysčiusias sistemas, leidžiančias ląstelėms aktyviai šalinti toksiškus junginius. Šios sistemos gali būti specifinės vienam ar net keliems substratams. Šis atsparumo mechanizmas veikia platų antimikrobinių medžiagų spektrą, įskaitant  $\beta$ -laktamus, fluorochinolonus ir kt. (Munita ir Arias, 2016). Esama penkių pagrindinių transporterinių baltymų šeimų, leidžiančių bakterijoms apsisaugoti nuo žalingo antibiotikų poveikio: MFS (ang. major facilitator superfamily), SMR (ang. small multidrug resistance family), RND (ang. resistance-nodulation-cell-division family), ABC (ang. ATP-binding cassette family), MATE (ang. multidrug and toxic compound extrusion family) (1.3 pav.). Šie baltymai skiriasi pagal struktūrą, naudojamos energijos šaltinį, substratus bei pasiskirstymą skirtingose bakterijų rūšyse. RND šeima dažniausiai aptinkama tik gramneigiamose bakterijose, o MFS – tik gramteigiamose (Reygaert, 2018).



1.3 pav. Pagrindinės transporterinių baltymų šeimos (pagal Reygaert, 2018)

Atsparumas tetraciklinui yra vienas iš geriausiai aprašytų antibiotikų eflukso pavyzdžių. *Tet* genai koduoja membraninius baltymus, priklausančius MFS šeimai. MFS siurbliai turi didžiausią substrato įvairovę kaip grupė, tačiau pavieniai baltymai yra specifiski substratui. Šie baltymai naudoja protonų varomąją jėgą tetraciklino, oksitetraciklino ir chlortetraciklino molekulėms pašalinti (Poole, 2005). Yra nustatyta daugiau nei 20 įvairių *Tet* genų, kurių dauguma koduojami mobiliuose genomo elementuose: plazmidėse, transpozonuose, integronuose. Didžioji dalis šių genų yra būdinga gramneigiamoms bakterijoms. *Tet(A)*, *Tet(B)*, *Tet(C)*, *Tet(D)*, *Tet(E)* genai identifikuoti *Enterobacteriaceae* mikroorganizmų šeimoje. Tuo tarpu *Tet(L)* bei *Tet(K)* genai vyrauja gramteigiamose bakterijose (Soares ir kt., 2012).

### 1.3.3 Antibiotiko taikinio modifikacija

Vienas dažniausių atsparumo mechanizmų yra antibiotiko taikinio modifikacija. Šis atsparumo mechanizmas remiasi taikinio apsauga arba antibiotiko prisijungimo vietos modifikacija, dėl kurios mažėja antibiotiko afiniškumas taikiniui (Munita ir Arias, 2016).

Ribosomos yra vieni pagrindinių antibiotikų taikinių. Jungdamiesi prie ribosomų, antibiotikai trikdo mRNR translaciją arba blokuoja peptidinių jungčių formavimąsi peptidiltransferazės aktyviame centre (Lambert, 2012). Bakterijos apsaugo ribosomas jas

modifikuodamos. Bakterijų *erm* genų šeima koduoja metiltransferazes, kurios metilina 23S rRNR taip sumažindamos antibiotiko afiniškumą. Dimetilinimas A2058 pozicijoje ne tik sukelia atsparumą eritromicinui, bet ir sąlygoja kryžminį atsparumą struktūriškai besiskiriantiems linkozamidams ir streptograminams, dėl jų prisijungimo vietų persidengimo. Erm metiltransferazės yra būdingos gramneigiamiems stafilokokams, streptokokams, enterokokams bei klostridijoms, tačiau vis dažniau identifikuojamos ir gramteigiamose bakterijose (Dzyubak ir Yap, 2016).

Bakterijos ne tik prisitaikė modifikuoti ribosomas, bet ir jas apsaugoti. Ribosomų apsaugą nuo tetraciklino neigiamo poveikio lemia RPP baltymai (ang. ribosome protection proteins), iš kurių labiausiai paplitę yra TetO ir TetM (Connell ir kt., 2003). Šie baltymai priklauso GTPazių elongacijos faktorių superšeimai ir baltymų sintezėje veikia kaip EF-G ir EF-Tu elongacijos faktorių homologai. TetO ir TetM sąveikauja su ribosoma ir katalizuoja tetraciklino pašalinimą iš jo prisijungimo vietos. Pranešama, kad TetM baltymas tiesiogiai pašalina antibiotiko molekulę sąveikaudamas su 16S rRNR IV domenu bei tetraciklino prisijungimo vieta. Pasikeitus ribosomos konformacijai antibiotikas yra ne tik pašalinamas, bet ir užkertamas kelias jo pakartotiniam prisijungimui (Dönhöfer ir kt., 2012).

### 1.3.4 Antibiotiko inaktyvacija

Esama dviejų antibiotikų inaktyvacijos būdų: antimikrominių medžiagų hidrolizė arba antibiotiko modifikacija prijungiant įvairias chemines grupes (dažniausiai fosforilo, adenilo ir acetilo grupes) (Wright, 2005). Nustatyti tūkstančiai fermentų galinčių skaidyti bei modifikuoti  $\beta$ -laktamus, aminoglikozidus, fenikolius ir makrolidus (Blair, 2014).

$\beta$ -laktamai yra plačiausiai naudojama antibiotikų klasė. Atsparumas  $\beta$ -laktamams sąlygojamas bakterijų gaminamų fermentų  $\beta$ -laktamazių, kurie hidrolizuoja  $\beta$ -laktamo žiedą ir taip inaktyvuoja antibiotiką (Bush ir Bradford, 2016). Genai, koduojantys  $\beta$ -laktamazes paprastai vadinami *bla* genais. Šie genai yra randami tiek chromosomoje, tiek mobiliuose genomo elementuose. Pagal Ambler klasifikaciją,  $\beta$ -laktamazės skirstomos į 4 grupes (A, B, C, D) remiantis jų aminorūgščių sekomis (Tooke ir kt., 2019). Fermentai taip pat skirstomi į tris funkcinės grupės remiantis substrato specifiškumu: cefalosporinazės, serino  $\beta$ -laktamazės ir metalo  $\beta$ -laktamazės. Serino  $\beta$ -laktamazės turi kovalentinės katalizės veikimo mechanizmą. Serinas aktyviajame centre vykdo nukleofilinę ataką laktamo žiede, dėl ko žiedas yra išardomas, o antibiotikas inaktyvuojamas. Metalo  $\beta$ -laktamazės taip pat vykdo nukleofilinę ataką, tačiau

vietoje serino liekanos yra naudojami cinko jonai kaip fermento kofaktoriai (Wright, 2005). Pranešama, kad gramneigiamoms bakterijoms yra būdingos visų keturių  $\beta$ -laktamazių grupės, o gramteigiamoms bakterijoms dažniausiai yra būdingi tik A grupės fermentai (Reygaert, 2018).

Kalbant apie antibiotiko inaktyvaciją, būtina paminėti ir antrą apsaugos būdą – įvairių cheminių grupių prijungimą prie antimikrobinės molekulės. Modifikuojančių fermentų sintezė yra plačiai paplitęs įgyto atsparumo antibiotikams mechanizmas tiek gramneigiamose, tiek gramneigiamose bakterijose. Esama daugelio antibiotikus modifikuojančių fermentų, tačiau dažniausiai jie katalizuoja acetilinimą (amidoglikozidų, chloramfenikolio, streptograminų), fosforilinimą (aminoglikozidų, chloramfenikolio) bei adenilinimą (aminoglikozidų, linkozamidų). (Munita ir Arias, 2016). Įvairių cheminių grupių pernešimas lemia sumažėjusį avidiškumą taikiniui, dėl ko padidėja antibiotiko minimali inhibitorinė koncentracija (MIK). Pavyzdžiui, aminoglikozidiniai antibiotikai yra ypač jautrūs modifikacijai. Paprastai tai yra didelės molekulės su daugybe neapsaugotų hidroksilo ir amido grupių. Aminoglikozidus modifikuojantys fermentai sukelia aukštą atsparumą antibiotikams (Blair ir kt., 2014).

#### **1.4 Atsparumo sunkiesiems metalams mechanizmai**

Be antibiotikų, akvakultūroje naudojamos ir kitos pagalbinės medžiagos, kurių sudėtyje yra sunkiųjų metalų. Nūdienoje didėja susirūpinimas ne tik dėl atsparumo antibiotikams, bet ir sunkiesiems metalams. Egzistuoja penki pagrindiniai atsparumo sunkiesiems metalams mechanizmai: patekimo į ląstelę ribojimas, aktyvus šalinimas, metalų redukcija, viduląstelinis bei ekstraląstelinis metalų surišimas metabolitais (Ianieva, 2009).

Ląstelės sienelės, membranos ar apvalkalo pakitimai yra metalų patekimo ribojimo pavyzdžiai. Bakterijų ekstraląsteliniai polisacharidai geba bioabsorbuoti metalų jonus ir taip neleisti jiems sąveikauti su gyvybiškai svarbiais ląstelių komponentais. Mikroorganizmų sintetinami egzopolisacharidai (EPS) suriša metalų katijonus. Parodyta, kad EPS sluoksnis tokiose bakterijose kaip *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ir *Arthrobacter viscosus* žymiai pagerina išgyvenamumą metalais turtingoje aplinkoje (Bruins ir kt., 2000). Metalų absorbcija yra pasyvus procesas, todėl negyvų ląstelių sienelės taip pat suriša jonus. Pavyzdžiui, *Pseudomonas aeruginosa* bioplevelė, kurios periferijoje esančios ląstelės yra negyvybingos, yra žymiai atsparesnė vario, švino ir cinko jonams nei planktoninės ląstelės (Ianieva, 2009). Metalų jonų surišimas lemia žemą apsaugos lygį dėl riboto surišimo vietų skaičiaus bei jų prisotinimo.

Antras atsparumo sunkiesiems metalams būdas remiasi aktyviu metalų jonų transportu į užląstelinę erdvę. Transmembraniniai baltymai metalo jonams iš ląstelės eksportuoti naudoja ATP hidrolizę arba elektrocheminį gradientą (Ianieva, 2009). Viena iš sistemų, naudojančių elektrocheminio gradiento energiją koduoja *Czc* operonas. Operonas sąlygoja atsparumą kobalto, cinko bei vario jonams. *CzcCB2A* kompleksas sudarytas iš *CzcA*, *CzcB* bei *CzC* baltymų, kuriuos atitinkamai koduoja *CzcA*, *CzcB*, *CzC* genai. *CzcA* sudarytas iš dviejų didelių hidrofiliųjų domenu, lokalizuotų plazminėje membranoje. Šis baltymas priklauso RND baltymų šeimai ir veikia kaip katijonų/protonų antiporteris (Grosse ir kt., 1999). *CzcA* sąlygoja žemą atsparumo metalams lygį, pilnam atsparumui užtikrinti būtini visi trys *CzcCB2A* komplekso baltymai (Nies, 2000).

Trečias atsparumo mechanizmas yra metalo jonų redukcija iki mažiau toksiškų formų, pakeičiant jų valentingumą. Būtent šis mechanizmas yra naudojamas bakterijų siekiant apsisaugoti nuo ypatingai toksiškų divalenčių gyvsidabrio jonų, besirišančių su tiolio grupėmis, kurių yra apstu fermentuose bei kituose baltymuose (Irawati ir kt., 2012). Atsparumas  $Hg^{2+}$  jonams yra koduojamas *mer* operono, kuris aptinkamas gramteigiamose bei gramneigiamose bakterijose. Tipinis *mer* operonas gramneigiamose bakterijose susideda iš *merR* geno, promotoriaus *P<sub>merTPAD</sub>* bei *merTP(C/F)AD(E)* genų. *merR* geno produktas – MerR baltymas, kurio funkcija yra aktyvuoti *P<sub>merTPAD</sub>* promotorių, aplinkoje atsiradus  $Hg^{2+}$  jonams. *merT*, *merP* bei *merC* genų produktai suriša divalenčius gyvsidabrio jonus periplazminėje erdvėje ir transportuoja juos į citoplazmą, kur gyvsidabrio reduktazė *merA* katalizuoja  $Hg^{2+}$  redukciją iki  $Hg^0$  (Brownt ir kt., 2003).  $Hg^0$  yra lakus, todėl pasišalina iš ląstelės garuodamas (Valls ir de Lorenzo, 2002).

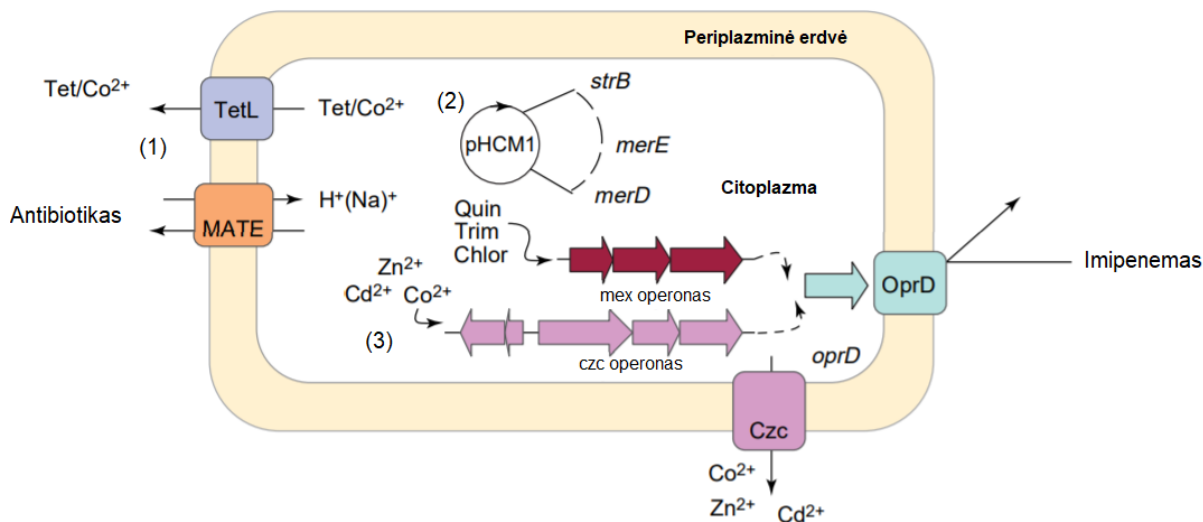
Bakterijos taip pat geba surišti pavojingus metalų jonus viduląstelinėje ar ekstraląstelinėje erdvėje. CopA, CopB bei CopC baltymai, būdingi *Pseudomonas syringae*, suriša vario jonus periplazminėje bei ekstraląstelinėje erdvėje (Ianieva, 2009). Tuo tarpu viduląstelinėje erdvėje metalų jonai yra surišami fitochelatinų ir metalotioninų. Metalotioninai (MT) yra mažos molekulinės masės peptidai, kuriuose yra gausu cisteino. Visi MT cisteinai dalyvauja koordinacinio ryšio su metalų divalenčiais jonais susidaryme (Klaassen ir kt., 1999). Toks bakterijų atsparumas nėra dažnas. Ilgą laiką buvo manyta, kad metalotioninai yra būdingi tik melsvabakterėms *Synechococcus* sp. (Ji, 1995). 2008 metais MT peptidai taip pat buvo identidikuoti *Mycobacterium* spp. (Blindauer, 2011).



## 1.5 Bendra atsparumo antibiotikams ir metalams atranka

Atsparių antibiotikams bakterinių patogenų plitimas kelia didelį susirūpinimą. Atsparumo antibiotikams toliau sėkmingai plinta, nepaisant griežto antibiotikų naudojimo reglamentavimo. Vis dažniau pranešama, kad sunkiųjų metalų tarša veikia kaip selektyvus veiksnys plintant atsparumo antibiotikams genams. Bendra šių genų atranka gali vykti dviem mechanizmais. Vienas jų yra bendras atsparumas (koatsparumas), kai skirtingi atsparumo determinantai yra lokalizuoti tame pačiame genetiniame elemente. Kitas mechanizmas yra kryžminis atsparumas, kai vienas atsparumo determinantas sąlygoja atsparumą ir antibiotikams, ir metalams (1.4 pav.) (Nguyen ir kt. 2019).

Koatsparumas yra reiškinys, kai atsparius fenotipus koduojantys genai yra kartu tame pačiame genetiniame elemente, pavyzdžiui, plazmidėje, transpozone ar integrone. Lokalizacija tame pačiame genetiniame elemente lemia bendrą šių genų atranką. Parodyta, kad metalams ir antibiotikams atsparumo genai lokalizuoti greta, ypač plazmidėse. Osman ir kt. izoliavo halofilinių bakterijų kamieną, kuriame atsparumas antibiotikams bei metalams buvo užkoduotas toje pačioje plazmidėje. Tuo tarpu gyvulininkystės ūkyje išskirtų *Enterococcus faecium* plazmidėje buvo aptikti genai sąlygojantys atsparumą variui (*tcrB*), makrolidams (*erm(B)*) bei glikopeptidams (*vanA*) (Hasman ir Aarestrup, 2002). Parkhill ir kt., nusekvenavę *Salmonella enterica* Typhi CT18 serotipo genomą, identifikavo pHCM1 plazmidėje daugybę antibiotikams ir metalams atsparumo genų, tokių kaip *strA*, *strB*, *merE*, *merD*, *tetA* ir kt.

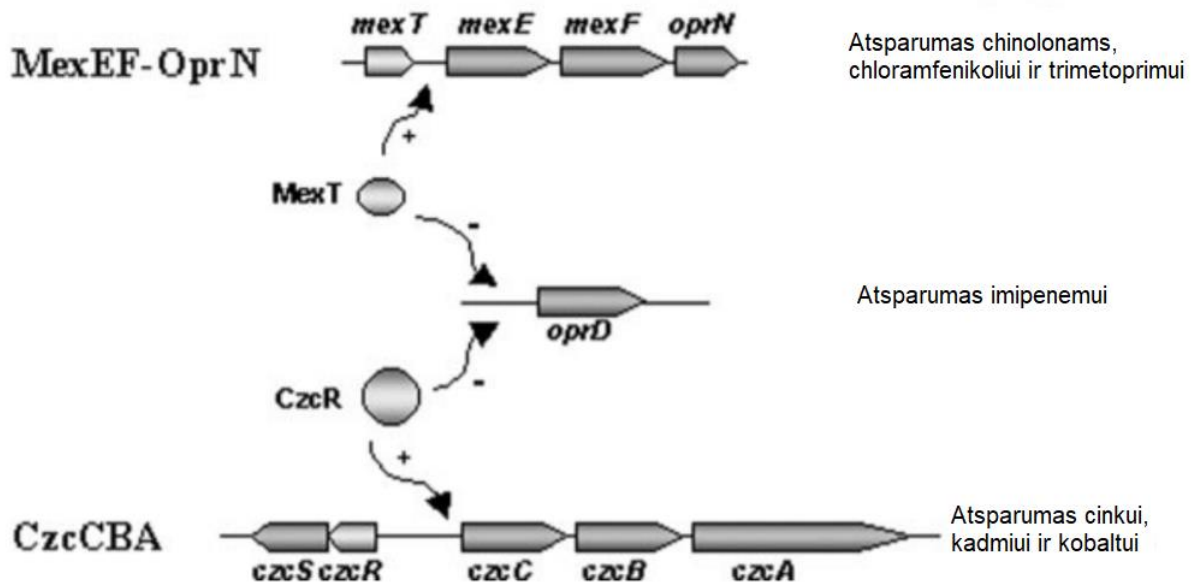


**1.4 pav.** Bendros genų atrankos molekuliniai mechanizmai. 1 – kryžminis atsparumas; 2 – koatsparumas; 3 – bendra genų reguliacija (pagal Baker-Austin ir kt., 2006). Chlor – chloramfenikolis; trim – trimetoprimas; quin – chinolonai; MATE – daugiavaisčiai atsparumo siurbliai (angl. multidrug and toxic compound extrusion); *merD* – genas koduojantis *mer* perono reguliacinį baltymą, *merE* – genas koduojantis gyvsidabrio efluksio baltymą, pHCM1 – *Salmonella typhi* CT18 plazmidė; *strB* – genas koduojantis streptomyciną modifikuojantį fermentą; tet – tetraciklinas; *tetL* – tetraciklino efluksio baltymas

Bakterijoms taip pat būdingas kryžminio atsparumo reiškiny. Atsparumo mechanizmas vienai medžiagai sąlygoja atsparumą kitai. Tas pats atsparumo mechanizmas gali būti panaudotas struktūriškai skirtingų medžiagų pašalinimui iš ląstelės (Martinez ir kt., 2009). Pavyzdžiui, *Listeria monocytogenes* daugiavaisčiai atsparumo siurbliai sukelia atsparumą tiek antibiotikams, tiek sunkiesiems metalams (Mata ir kt., 2000). Taip pat yra žinoma, jog *tetL* genas, koduojantis tetraciklino efluksio baltymą, sąlygoja atsparumą divalentiems kobalto jonams (Baker-Austin ir kt., 2006).

Tarša sunkiaisiais metais ne tik skatina bendrą atranką, bet ir padidina atsparumo antibiotikams lygį dėl bendro šių genų reguliavimo. Yra žinoma, kad sunkiųjų metalų jonai taip pat reguliuoja genų, atsakingų už atsparumą antibiotikams, ekspresiją. Parodyta, kad *Pseudomonas aeruginosa* MexEF-OprN ir CzcCBA efluksio sistemų ekspresija yra susijusi su sumažėjusia OprD porino raiška. *mex* operono baltymas MexT suaktyvina *mexEF-oprN* raišką, dėl ko atsiranda atsparumas chinolonams, chloramfenikoliui ir trimetoprimui. Tuo tarpu CzcR baltymas aktyvina *czcCBA* komplekso raišką bei lemia atsparumą cinkui, kadmiui ir kobaltui. Manoma, kad reguliaciniai baltymai MexT ir CzcR gali slopinti OprD raišką tiesiogiai arba per

dar nežinomą mechanizmą, sukeldami atsparumą antibiotikui imipenemui (1.5 pav.) (Perron ir kt., 2004).



**1.5 pav.** MexEF-OprN, CzcCBA bei *oprD* bendros reguliacijos modelis (pagal Perron ir kt., 2004). MexT – *mex* operono reguliatorius; *mexE*, *mexF*, *oprN* – genai koduojantys MexEF-OprN komplekso baltymus; *oprD* – genas koduojantis OprD poriną; CzcR – *czc* operono reguliatorius; *czcR*-*czcS* – *czc* operono reguliaciniai genai; *czcA*, *czcB*, *czcC* – genai koduojantys CzcCBA komplekso baltymus

Vandenyje bei vandens telkinių nuosėdų tarša sunkiaisiais metalais skatina mikroorganizmų atsparumą antibiotikams. Ilgalaikis pagalbinių medžiagų intensyvioje žuvininkystėje naudojimas gali negrįžtamai paveikti vandens telkinių bakterijų populiacijas (Liu ir kt., 2020). Siekiant užtikrinti tiekiamos žuvies bei aplinkos saugumą, būtina vykdyti žuvininkystės vandens telkinių mikrobiologinės taršos kontrolę.

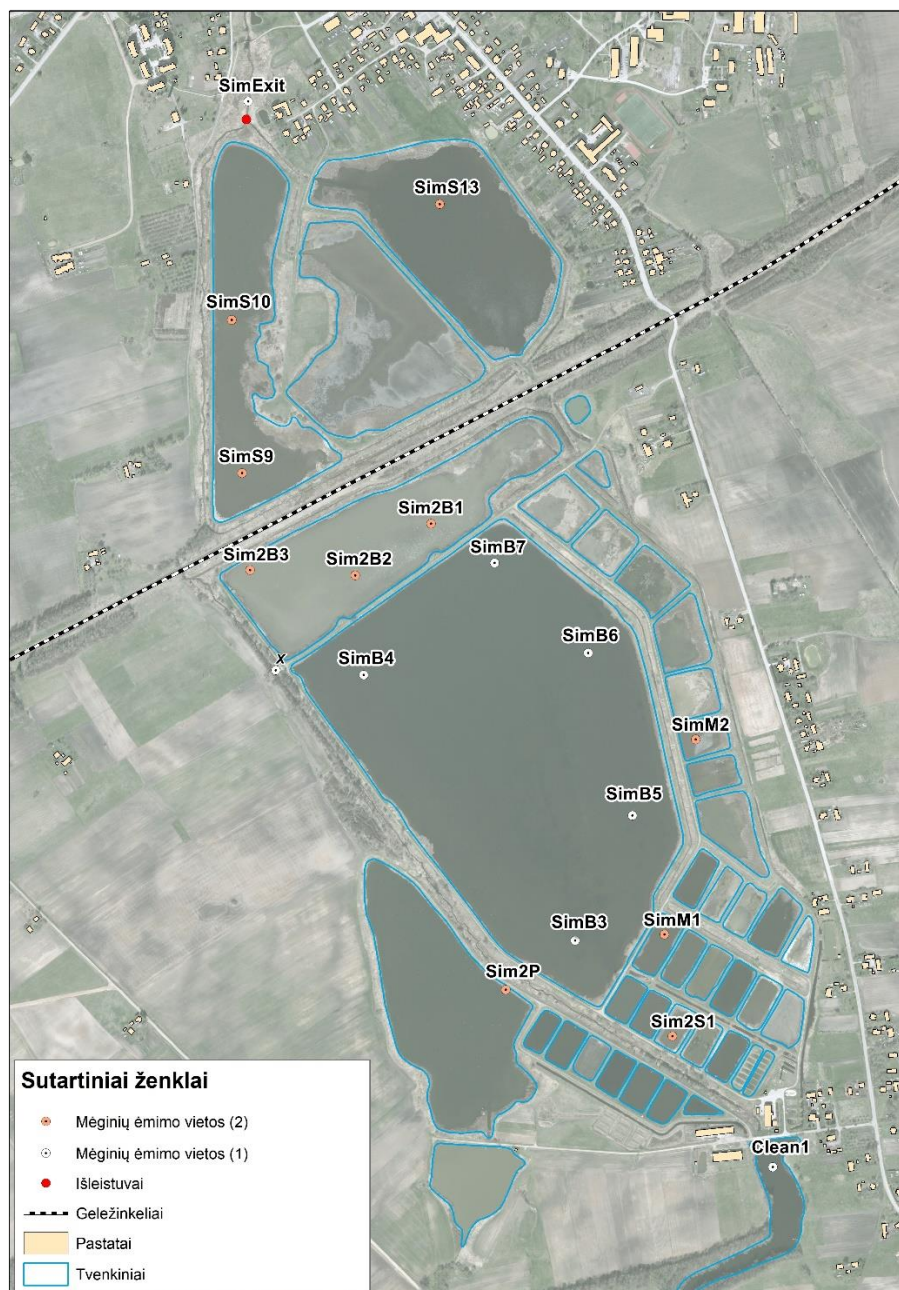
## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Tyrimo objektas bei mėginių surinkimas

Nuosėdų mėginiai buvo surinkti Simno žuvininkystės tvenkiniuose. Dugno nuosėdų mėginiai surinkti stratometru, imant paviršinį 0-5cm dugno nuosėdų sluoksnį. Iš viso buvo surinkta 18 mėginių (2.1 pav.). Mėginių paėmimo vietų koordinatės pateiktos 2.1 lentelėje.

**2.1 lentelė.** Mėginių koordinatės

Mėginys	X koordinatė	Y koordinatė
Clean1	477854,1917	6025020,309
Sim2P	477342,0717	6025360,095
SimB3	477475,571	6025454,938
SimB4	477070,0307	6025963,536
SimB5	477585,3486	6025694,657
SimB6	477500,2149	6026006,067
SimB7	477320,9862	6026178,575
SimS9	476837,0686	6026351,082
SimS10	476816,9054	6026644,569
SimS13	477215,6893	6026866,365
SimExit	476848,2704	6027063,516
Sim2B3	476852,1203	6026165,106
Sim2B2	477053,9474	6026154,866
Sim2B1	477199,2819	6026253,82
Sim2S1	477661,8638	6025271,134
SimM1	477646,6924	6025466,386
SimM2	477706,3582	6025840,376
SimBX	476901,1393	6025973,033



## 2.1 paveikslas. Mėginių išsidėstymo žemėlapis

Papildomai mėginiai buvo suskirstyti į keletą grupių, atsižvelgiant į mėginių išsidėstymą: SimS (SimS9, SimS10, SimS13), Sim2B (Sim2B1, Sim2B2, Sim2B3), SimB (SimB4, SimB5, SimB6, SimB7) bei Sim2S (SimM1, SimM2, Sim2S1). Likę mėginiai nepriskirti jokiai grupei ir bus analizuojami atskirai: Clean1 – referentinis taškas Kalesninkų tvenkinyje, kuris yra aukščiau visos hidrosistemos, SimExit –išleistuvas, Sim2P – nedidelis vandens telkinys naudojamas

laikinam žuvų laikymui, bei SimX taškas, kuriame vykdomas tvenkinių vandens nuleidimas į Dovinės upę.

Nuosėdų mėginiams atvykus į laboratoriją, jie buvo saugomi -70°C temperatūroje iki tolimesnių tyrimų pradžios.

## 2.2 Genominės DNR išskyrimas

Genominė DNR iš nuosėdų mėginių buvo išskirta naudojant ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit (Zymo Research, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtos DNR koncentracija buvo išmatuota naudojant biofotometrą (Eppendorf, Vokietija). DNR mėginiai buvo saugomi -20°C temperatūroje.

## 2.3 Metagenominė analizė

Paruošti DNR mėginiai buvo išsiųsti 16S rDNR sekvenavimui. Sekvenavimą bei bioinformatinę duomenų analizę atliko Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd. (Kinija).

## 2.4 Antibiotikams bei sunkiesiems metalams atsparumo genų identifikavimas

Antibiotikams bei sunkiesiems metalams atsparumo genų paieška buvo vykdoma atliekant polimerazės grandininės reakcijos kaip matricą naudojant išskirtą iš bakterijų genominę DNR. Pradmenys PGR reakcijoms buvo parinkti išanalizavus literatūros šaltinius. Pradmenys užsakyti iš UAB Nanodiagnostika (Lietuva). Pradmenų sekos pateikiamos 2.2 bei 2.3 lentelėse.

**2.2 lentelė.** Pradmenys skirti identifikuoti atsparumo sunkiesiems metalams genus

Geno pavadinimas	Forward pradmuo	Reverse pradmuo	Prisilydymo t, °C	Šaltinis
<i>copA</i>	TCCATACACT GGCACGGCAT	TGGATCGGGTG AGTCATCAT	54	Kamika ir kt., 2013
	CGGTCTCTA CGAATACCG CTT CAA	GAAATAGCT CATTGCCGA GGC GTT	55	Dahanayake ir kt., 2019
<i>copB</i>	TCCACGTTTGT TCACTGCTC	AGTCGGCTGTA TTGCCGTAG	53	Kamika ir kt., 2013
	TTCCTGCTC GACCAGTTG GAATAC	GGTTGGTCA ACAGGATGT CGTACT	58	Pitondo-Silva ir kt., 2016
<i>copC</i>	TGTTGAACCG CACAAGTTTC	GGTAATCGGGT GGGTATCG	54	Kamika ir kt., 2013

<i>cnrC2</i>	GAGGAAGCGC TGGATTCC	GCAATTCCATC AAAGTTGTCTT GCC	55	Kamika ir kt., 2013
<i>cnrA3</i>	GGACATTACC AACAAGCAGG	CACAAACGTCA GCGACAG	51,5	Kamika ir kt., 2013
<i>chrB</i>	GTCGTTAGCTT GCCAACATC	CGGAAAGCAAG ATGTTCGATCG	57	Kamika ir kt., 2013
<i>czcA</i>	GTTACCTT GCTCTTCGC CATGTT	ACAGGTTGC GGATGAAGG AGA TCA	56	Bouskill ir kt., 2007
<i>czcD</i>	TTTAGATCTTT TACCACCATG GGCGCAGGTC ACTCACACGA CC	TTTCAGCTGAA CATCATACCCT AGTTTCCTCTGC AGCAAGCGACT TC	57	Abou-Shanab ir kt., 2007
<i>nccA</i>	ACGCCGGACA TCACGAACAA G	CCAGCGCACCG AGACTCATCA	57	Abou-Shanab ir kt., 2007
<i>pcuD</i>	GATATCTGA CTCCCTGGC	CCGTAAAAT CAAAGG GCT	60	Chen ir kt., 2019
<i>pbrT</i>	AGCGCGCCC AGGAGCGCA GCGTCTT	GGCTCGAAG CCGTCGAGRTA	55	Chen ir kt., 2019
<i>pbrA</i>	ATGAGCGAAT GTGGCTCGAA G	TCATCGACGCA ACAGCCTCAA	60	Ayangbenro ir kt., 2019
<i>arsB</i>	GGTCTATGC GCTGGAGCA ATTGAA	TGCTGGGCA TGTTGTTCA TTA CCG	46	Chen ir kt., 2019
<i>arsC</i>	GCAGCATTC TTCCGAAG CCATGT	TCGCAAACG GTGATGACG ATGT	46	Pitondo-Silva ir kt., 2016

**2.3 lentelė.** Pradmenys skirti identifikuoti atsparumo antibiotikams genus

Geno pavadinimas	Forward pradmuo	Reverse pradmuo	Prisilydymo t, °C	Šaltinis
<i>tet(32)</i>	AACCGAAGC ATACCGCTC	CTCTTTCATAGC CACGCC	60	Piotrowska ir kt., 2017
<i>tet(W)</i>	GGAGGAAAA TACCGACAT A	AATCTTACAGT CCGTTACG	51	Patterson ir kt., 2007

<i>Tet(X)</i>	CAATAATTG GTGGTGGAC CC	TTCTTACCTTGG ACATCCCCG	55	Cattoir ir kt., 2015
	TTAGCCTTAC CAATGGGTG T	CAAATCTGCTG TTTCATTCG	55	Tehrani ir Gilbride, 2018
<i>Tet(M)</i>	GTAAATAGT GTTCTTGGAG	CTAAGATATGG CTCTAACAA	53	Kim ir kt., 2004
	ACAGAAAGC TTATTATATA AC	TGGCGTGTCTA TGATGTTTAC	55	Kobayashi r kt, 2007
	AGTGGAGCG ATTACAGAA	CATATGTCCTG GCGTGTCTA	50	Fri ir kt., 2020
<i>Tet(H)</i>	CAGTGAAAA TTCCTGGCA AC	ATCCAAAGTGT GGTTGAGAAT	61	Kang ir kt., 2018
	GTGATGTGA CTCCCGCTA AAAAT	CCAGAACCGCC AAAGACATACC	60	Fan ir kt., 2007
	TTTGGGTCAT CTTACCAGC ATTAA	TTGCGCATTAT CATCGACAGA	60	Zhao ir kt., 2019
<i>ermF</i>	TCGTTTTACG GGTCAGCAC TT	CAACCAAAGCT GTGTCGTTT	60	Piotrowska ir kt., 2017
	CAGCTTTGGT TGAACATTTA CGAA	AAATTCCTAAA ATCACAACCGA CAA	60	Ouyang ir kt., 2015
<i>msrA</i>	GCAAATGGT GTAGGTAAG ACAACCT	ATCATGTGATG TAAACAAAAT	50	Molale ir kt., 2016
	TCCAATCATT GCACAAAAT C	AATTCCTCTAT TTGGTGGT	55	Faria ir kt., 2016
	GGCACAATA AGAGTGTTTA AAGG	AAGTTATATCA TGAATAGATTG TCCTGTT	50	de Sousa ir kt., 2017
<i>strA</i>	CCAATCGCA GATAGAAGG C	CTTGGTGATAA CGGCAATTC	58	Srinivasan ir kt., 2008



<i>strB</i>	GCTCGGTCG TGAGAACAA TC	AGAATGCGTCC GCCATCTGT	54	Baron ir kt., 2017
-------------	------------------------------	--------------------------	----	--------------------

PGR reakcijoms buvo naudotas DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, JAV). PGR reakcijos atliekamos T100<sup>TM</sup> Thermal Cyclers (Bio-Rad Laboratories, JAV).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Genominės DNR išskyrimas

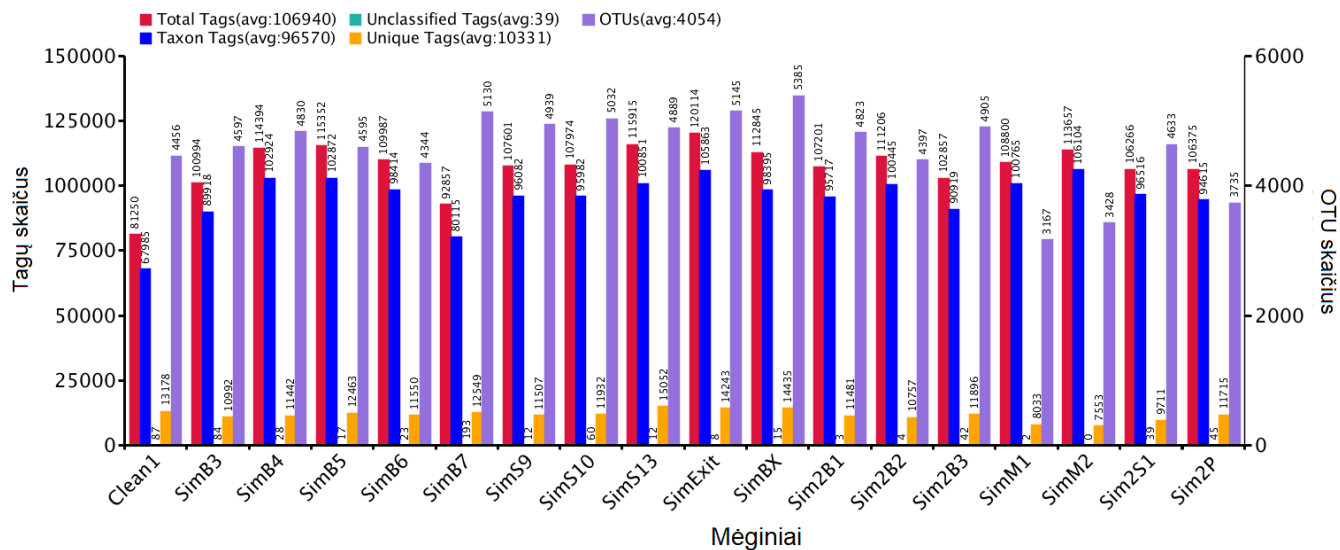
Metagenominei analizei atlikti, genomine DNR buvo išskirta iš 18 nuosėdų mėginių. DNR koncentracijos pateiktos 3.1 lentelėje.

**3.1 lentelė.** DNR koncentracijos

Mėginys	Koncentracija, ng/ $\mu$ L
Clean1	4
SimB3	10
SimB4	40
SimB5	50
SimB6	100
SimB7	20
SimS9	40
SimS10	40
SimS13	100
SimExit	50
SimBX	10
Sim2B1	20
Sim2B2	60
Sim2B3	60
SimM1	60
Vid2	40
Sim2S1	50
Sim2P	10

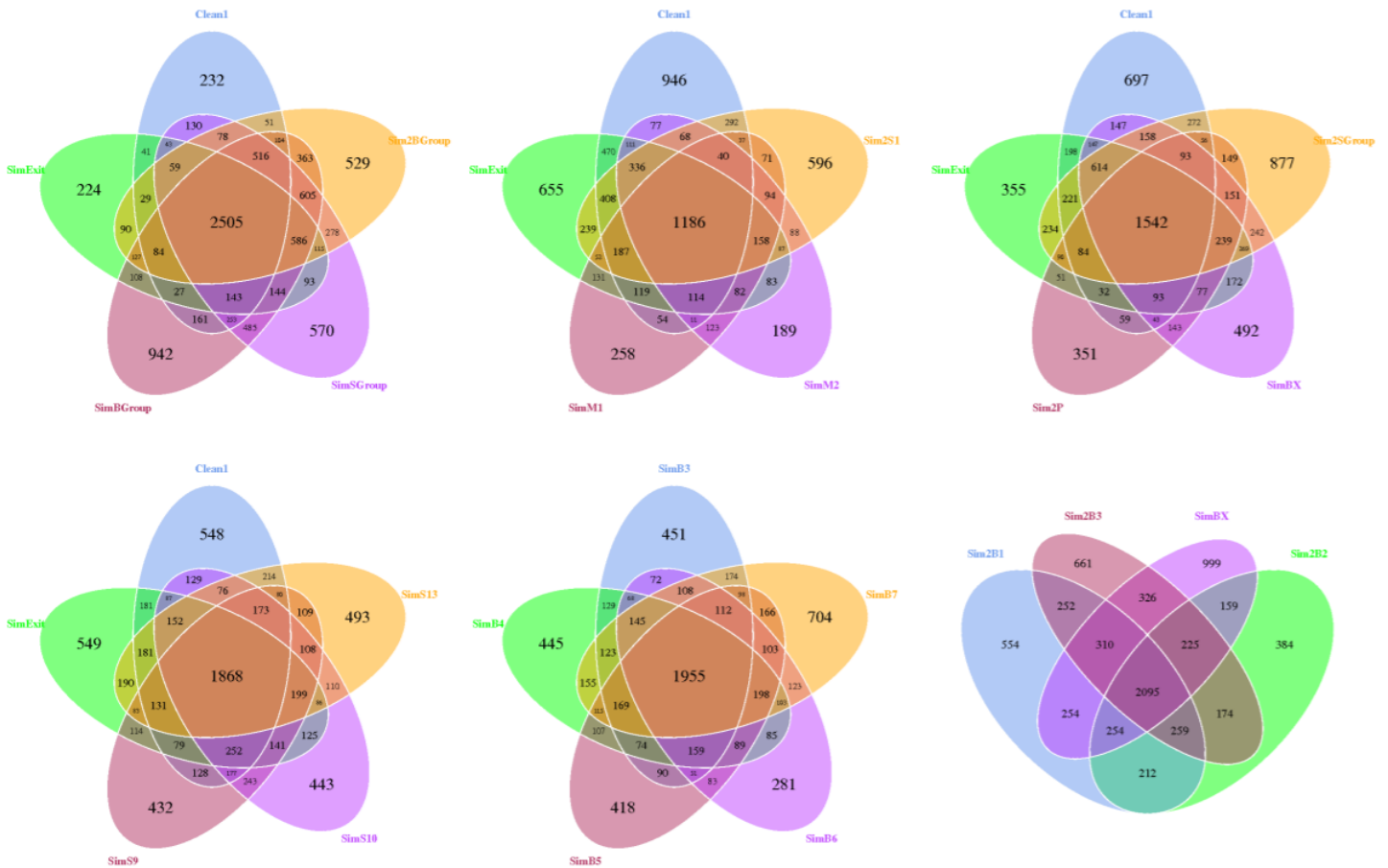
#### 3.2 Sekų analizė

Siekiant nustatyti kiekvieno mėginio bakterijų bendrijų sudėtį, fragmentai buvo suskirstyti į operacinius taksonominius vienetus (ang. operational taxonomic units – OTU) pagal 97% sekų panašumą (3.1 pav.). Stebima OTU skaičiaus variacija tarp skirtingų nuosėdų mėginių. Mažiausias OTU skaičius buvo stebimas SimM2 mėginyje (3428), o didžiausias – Sim2B1 mėginyje (5385).



**3.1 pav.** Pradinių duomenų statistinė informacija

OTU pasiskirstymas skirtinguose mėginiuose bei jų grupėse pavaizduoti Venno diagramose (3.2 pav.). Remiantis 97% sekų panašumu, didžiųjų tvenkinių grupėse (Sim2B, SimS, SimB), referentiniame taške Clean1 bei vandens išleistuvo taške SimExit identifiukuoti 2505 bendri OTU. Tuo tarpu Clean1, SimExit bei mažųjų tvenkinių mėginiuose (Sim2S1, SimM1, SimM2) nustatyti 1186 bendri operaciniai taksonominiai vienetai. 1542 bendrais OTU pasižymi referentinis, išleistuvo, SimBX, Sim2P bei mažųjų tvenkinių mėginiai. Taip pat buvo palygintos ir kitos grupės: Clean1, SimExit bei SimS grupė – 1868 bendrų OTU; didžiojo tvenkinio grupė (SimB3-7) – 1955 OTU; Sim2B1, Sim2B2, Sim2B3, SimBX – 2095 OTU.



**3.2 pav.** OTU pasiskirstymas skirtinguose mėginiuose bei jų grupėse

### 3.3 Mikroorganizmų bendrijų alfa įvairovė

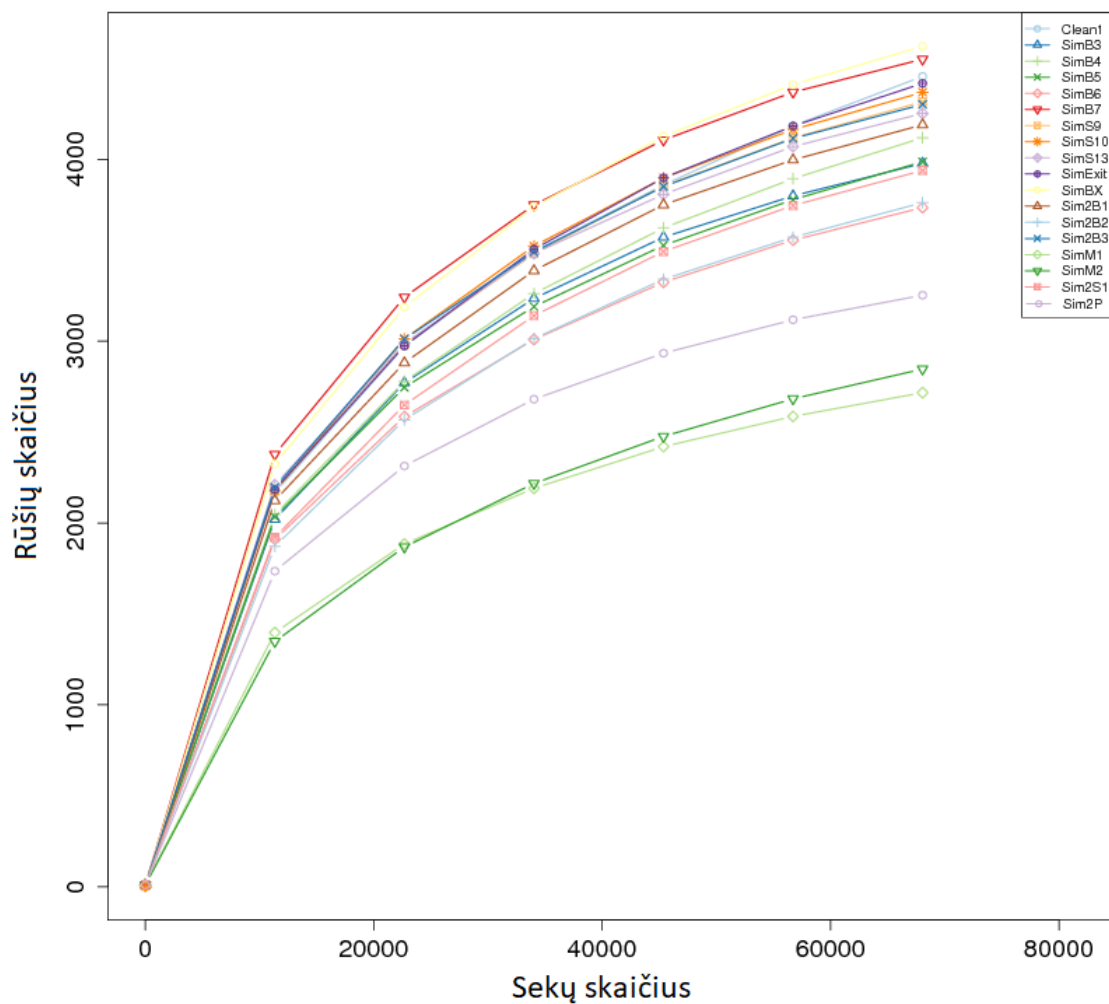
Mikroorganizmų bendrijų alfa įvairovė buvo vertinama pagal Simpson, Chao1, ACE bei Shannon indeksus (3.2 lentelė). Visi šie indeksai atspindi atskirų mėginių bendrijų įvairovę.

Stebimų rūšių kiekiai mėginiuose varijuoja nuo 2717 SimM1 mėginyje iki 4622 SimBX mėginyje. Simpson indeksas, kuris visose mėginiuose yra >0,9 nurodo, kad visi mėginiai pasižymi didele mikroorganizmų įvairove. Tuo tarpu Chao1 bei ACE indeksai pasižymi didele variacija. Chao1 bei ACE indeksai didžiausias reikšmes įgyja referentiniame taške Clean1 (9140030 ir 6142167 atitinkamai), o mažiausias SimM1 mėginyje (3087679 ir 3298711 atitinkamai). Pagal šiuos du indeksus, didžiausia ir mažiausia mikroorganizmų įvairovė stebima Clean1 bei SimM1 mėginiuose. Pagal Shannon indeksą mažiausia mikrobiologine įvairove pasižymi SimM2 mėginys (7615), o didžiausia SimB7 (9.986).

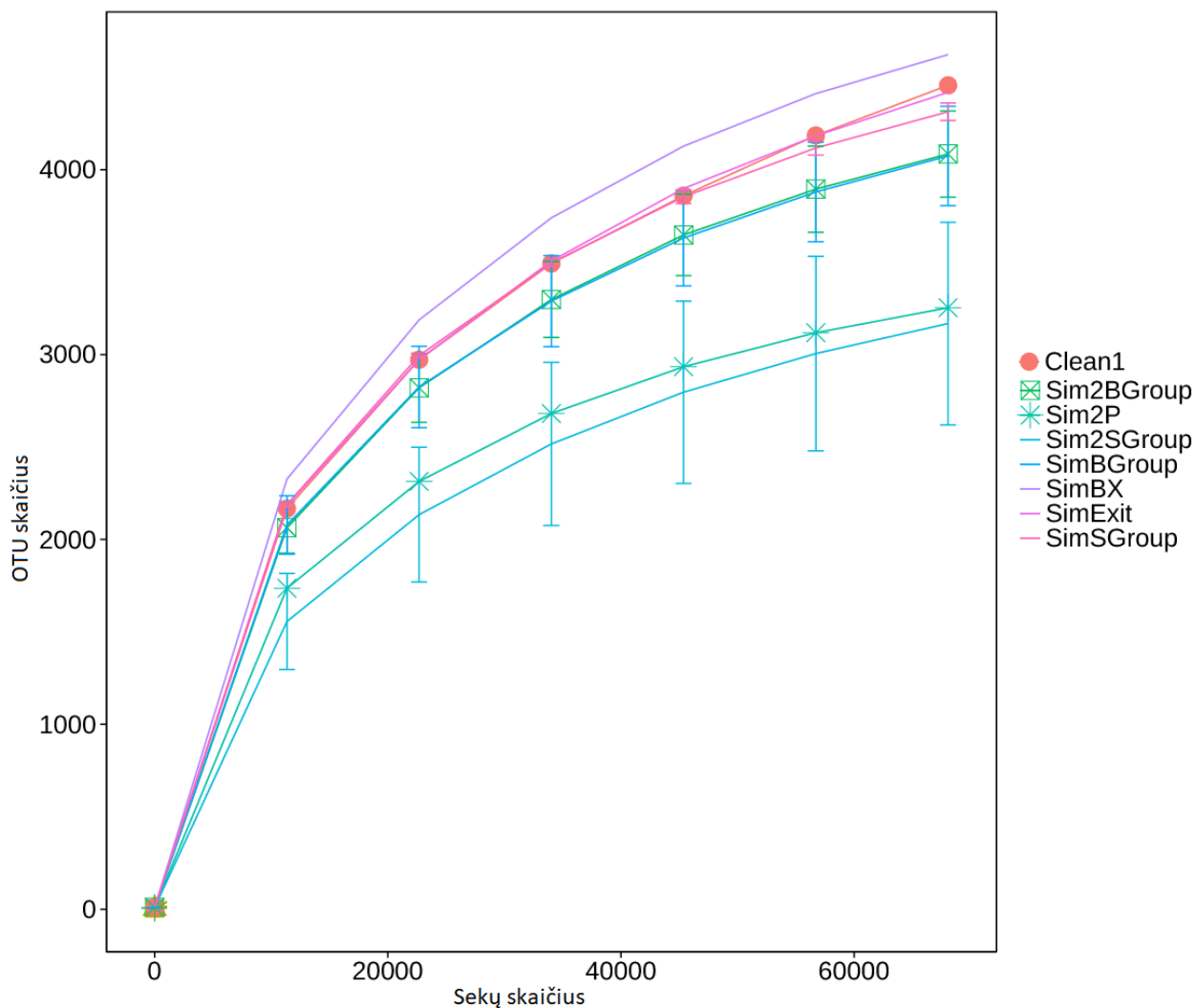
**3.2 lentelė.** Tirtų mėginių Simpson, Chao1, ACE bei Shannon indeksai

Mėginys	Rūšių skaičius	Shannon	Simpson	Chao1	ACE
Clean1	4456	9,618	0,995	9140030	6142167
SimB3	3978	9,414	0,995	4554094	4673553
SimB4	4119	9,479	0,995	5324478	5292999
SimB5	3987	9,651	0,996	5073760	5035709
SimB6	3735	9,331	0,995	4232864	4465926
SimB7	4551	9,986	0,997	5089900	5212722
SimS9	4317	9,671	0,996	4805604	5092126
SimS10	4369	9,648	0,996	4920644	5192573
SimS13	4253	9,892	0,997	4729559	4990363
SimExit	4418	9,642	0,996	5619326	5612718
SimBX	4622	9,565	0,992	5186593	5469658
Sim2B1	4190	9,503	0,995	4735611	4987141
Sim2B2	3762	8,930	0,987	4295413	4603199
Sim2B3	4302	9,680	0,996	4829490	5050590
SimM1	2717	8,319	0,987	3087679	3298711
SimM2	2847	7,615	0,972	3703087	3758340
Sim2S1	3939	9,048	0,992	4421003	4697940
Sim2P	3253	8,862	0,991	3604135	3770708

Mėginių biologinei įvairovei nustatyti dažnai taip pat naudojamos sekvenavimo gylio kreivės. Šios kreivės sudaromos atsitiktine tvarka parinkus tam tikrą nusekvenuotų fragmentų kiekį bei suskaičiuojant kokį kiekį OTU šios sekos reprezentuoja. Sekvenavimo gylio kreivės tiesiogiai atspindi sekvenavimo gylį ir tolygumą bei netiesiogiai atspindi mikroorganizmų bendrijų struktūrą. Šiame tyrime šios kreivės pasiekė plato fazę, o tai reiškia, kad sekvenavimo gylis yra pakankamas rūšių aptikimui (3.3 pav.). 3.4 paveiksle vaizduojamos biologinės įvairovės kreivės pagal mėginių grupes.



**3.3 paveikslas.** Mėginių sekvenavimo gylio kreivės



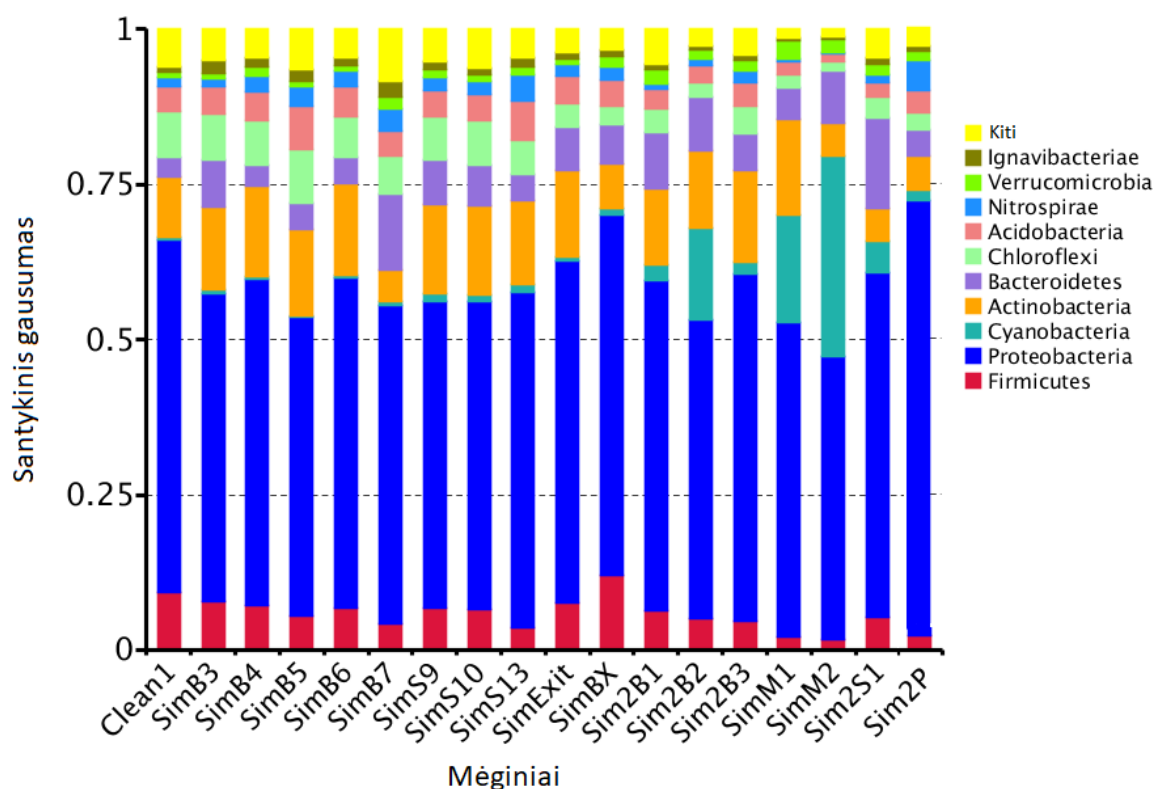
3.4 pav. Tiriamųjų grupių biologinės įvairovės kreivės.

### 3.4 Mikroorganizmų bendrijų struktūra nuosėdų mėginiuose

Mikroorganizmų bendrijų struktūra buvo įvertinta pagal tipų, klasių bei genčių pasiskirstymą skirtinguose mėginiuose bei jų grupėse.

Identifikuoti mikroorganizmai nuosėdų mėginiuose buvo priskirti *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Verrucomicroba* bei *Ignavibacteriae* tipams (3.5 pav.). Visose mėginiuose dominuoja *Proteobacteria* tipo mikroorganizmai. Daugiausiai proteobakterijų buvo identifikuota Sim2P mėginyje (69,8%), o mažiausiai SimM2 mėginyje (45,7%). Taip pat didelę

mikroorganizmų bendrijų dalį sudaro *Actinobacteria* tipo mikroorganizmai. Daugiausiai šių mikroorganizmų aptikta SimM1 taške (15,6%), o mažiausiai SimB7 taške (5,2%). *Firmicutes* (1,7-12,1%), *Bacteroidetes* (3,3-14,6%), *Chloroflexi* (1,5-8,5%), *Acidobacteria* (1,1-7%) tipų mikroorganizmai taip pat sudaro ženklią bakterijų bendrijų dalį. Rečiau buvo aptinkami *Ignavibacteriae*, *Verrucomicrobia* bei *Nitrospirae* tipų bakterijos, bendras jų kiekis neviršijo 8%. Svarbu pabrėžti, kad melsvabakterės (*Cyanobacteria*) yra ypatingai būdingos Sim2B2 (14,7%), SimM1(17,3%) bei SimM2(32,2%) mėginiams. Likusiuose taškuose melsvabakterių kiekis neviršijo 5%.

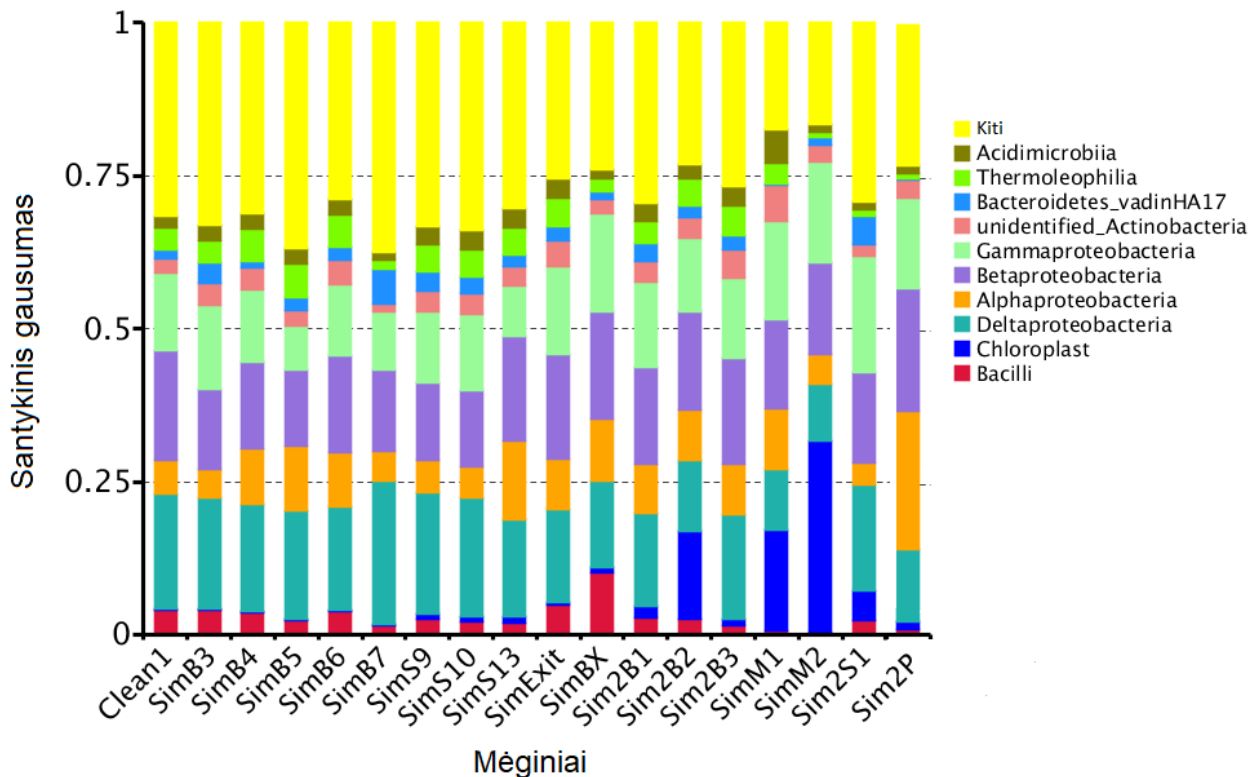


**3.5 pav.** Santykinis mikroorganizmų tipų gausumas nuosėdų mėginiuose

Išanalizavus klasių santykinį gausumą paaiškėjo, kad visose mėginiuose dominuoja alfa proteobakterijos (3,5-22,6%), beta proteobakterijos (12,4-20%), gamma proteobakterijos (7,1-18,8%) bei delta proteobakterijos (9,4-23,4) (3.6 pav.). *Acidimicrobiia* klasės gausumas varijuoja nuo 1,1% (SimB7) iki 5,4% (SimM1). Identifikuoti *Bacteroidetes* mikroorganizmai priklausė

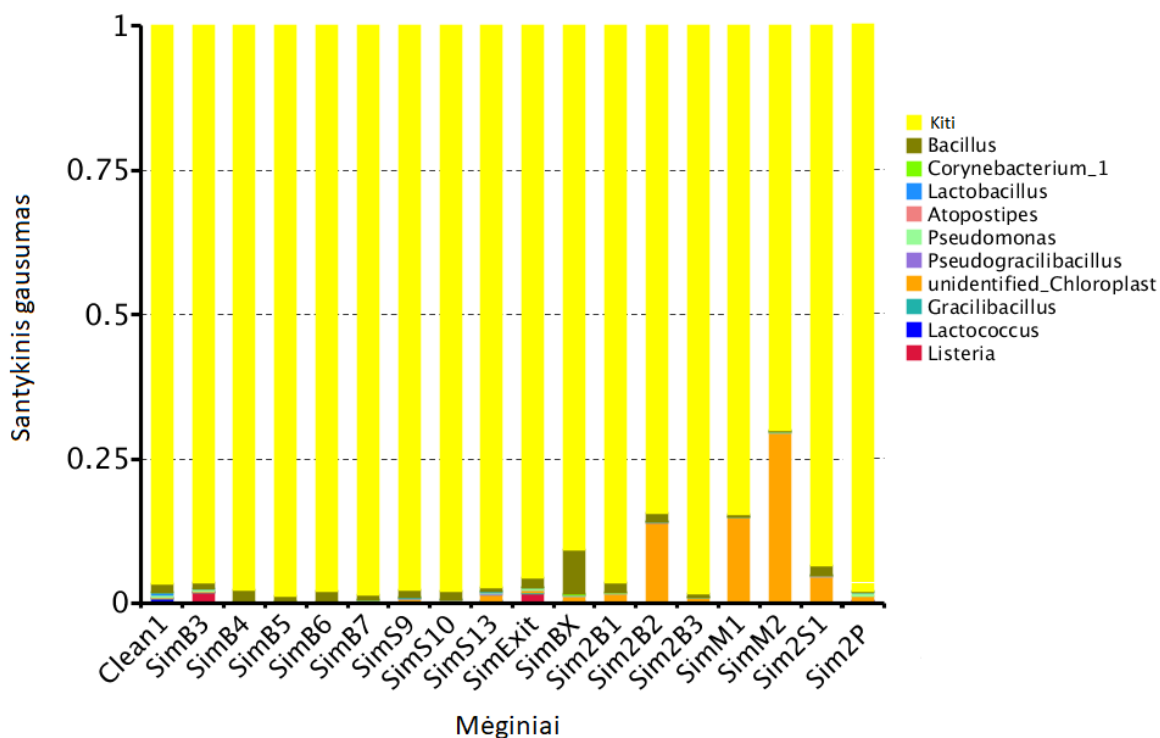


VadinHA17 grupei. Visiems mėginiams taip pat buvo būdingi *Thermoleophilia* klasės bakterijos (0,8-5,4%). *Bacilli* klasės mikroorganizmų taip pat esama visuose mėginiuose (0,5-10,1%).



**3.6 pav.** Santykinis mikroorganizmų klasių gausumas nuosėdų mėginiuose

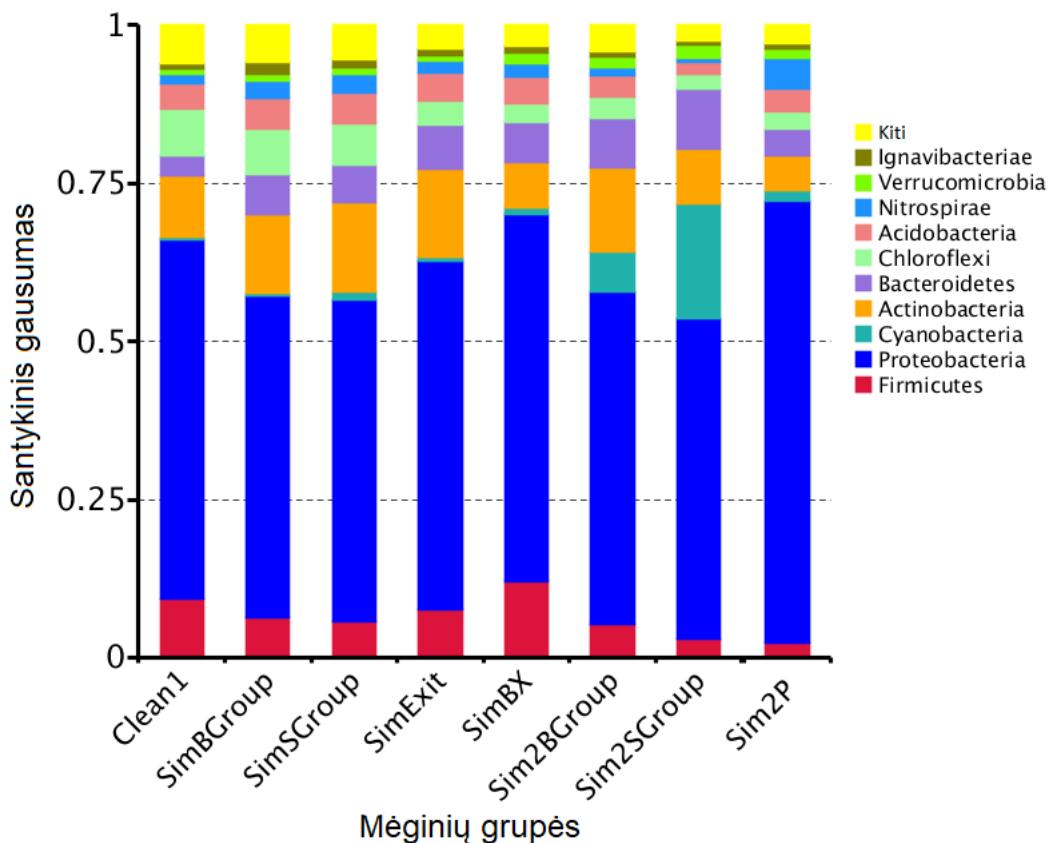
Analizuoti mėginiai nepasižymėjo dideliu genčių gausumu (3.7 pav.). Dažniausiai buvo identifikuojami chloroplastai, tačiau tik Sim2B2 (14%), SimM1 (14,9%), SimM2 (29,5%) bei Sim2S1 (4,6%) mėginiuose. Taip pat mėginiams buvo būdingi *Bacillus* genties bakterijos, daugiausiai jų stebima SimBX mėginyje (7,7%), o mažiausiai Sim2P mėginyje (0,3%). SimB3 bei SimExit mėginiai pasižymėjo palyginus dideliu *Listeria* genties bakterijų gausumu (1,9% ir 1,7% atitinkamai). Likusių genčių (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Atopostipes*, *Pseudomonas*, *Pseudogracilibacillus*, *Gracilibacillus* bei *Lactococcus*) santykinis gausumas kartu sudėjus neviršijo 0,7%.



3.7 pav. Santykinis genčių gausumas nuosėdų mėginiuose

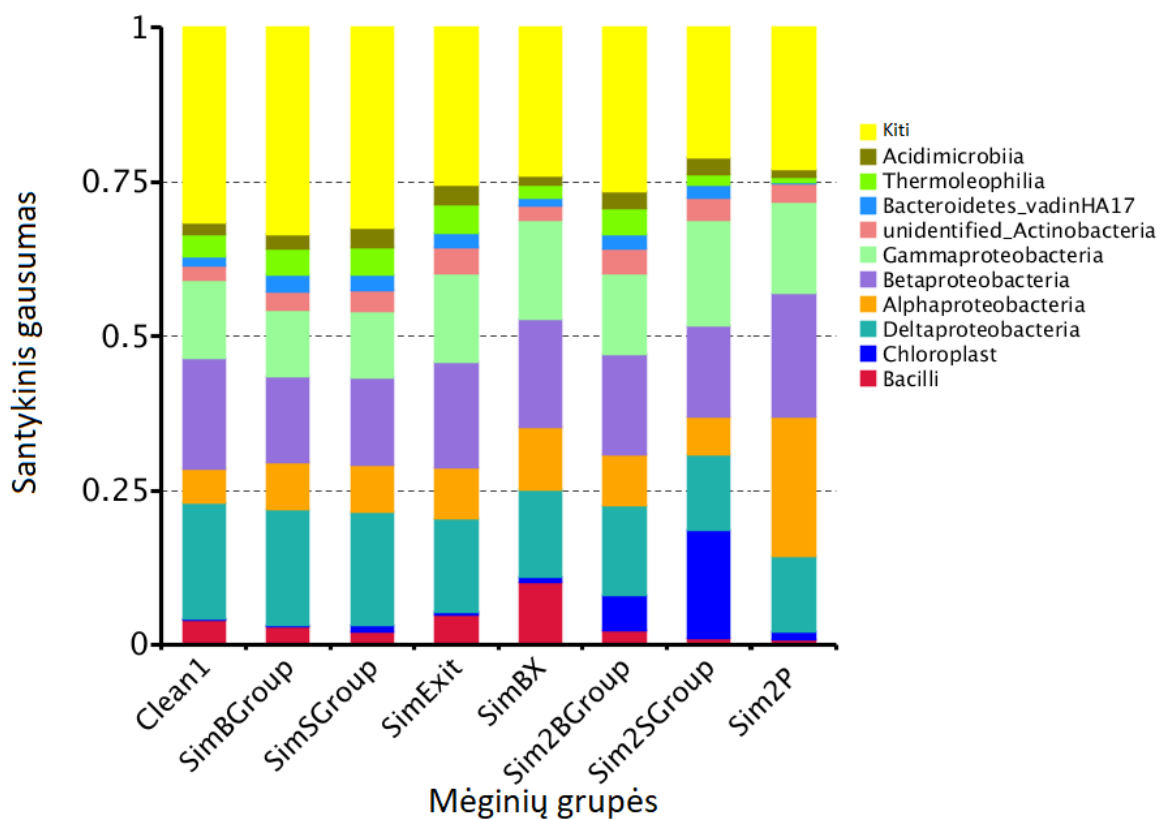
Mikroorganizmų bendrijų sandaros analizė taip pat buvo atlikta mėginių grupėms (3.8 pav.). Kaip ir atskiruose mėginiuose, taip ir grupėse, dominuojantis bakterijų tipas yra *Proteobacteria*. Didžiausia proteobakterijų gausa pasižymėjo Sim2P taškas, nepriskirtas jokiai mėginių grupei. Net ir Sim2S grupėje, kurioje proteobakterijų gausa buvo mažiausia, ju kiekis viršijo 50%. Remiantis literatūros šaltiniais, proteobakterijos yra dažnai aptinkamos vandens telkiniuose bei paprastai yra dominuojantis tipas žuvininkystės tvenkiniuose. Proteobakterijos akvakultūroje žinomos kaip organines medžiagas skaidantys mikroorganizmai (Shen ir kt., 2020). Taip pat proteobakterijos pasižymi gan stabiliu bendrijos dydžiu žuvininkystės tvenkiniuose. Pavyzdžiui, Liu ir kt. nustatė, kad proteobakterijos dominuoja tiek vandens, tiek nuosėdų mėginiuose, nepriklausomai nuo tvenkiniuose veisiamų žuvų rūšių bei akvakultūros modelio. Tuo tarpu Quin ir kt. nustatė, kad naudojami skirtingi žuvų pašarai taip pat neturi įtakos proteobakterijų dominavimui. Antras bakterijų tipas pagal didžiausią gausą yra aktinobakterijos (5,5-14,1%). Šios bakterijos taip pat dažnai aptinkamos vandens telkiniuose (Wei ir kt., 2015). Be to, yra žinoma, kad *Actinobacteria* bei *Firmicutes* gausumas teigiamai koreliuoja su nuosėdų pH

(Deng ir kt., 2019). *Firmicutes* tipo bakterijos būdingos visoms tirtoms grupėms, tačiau daugiausia jų buvo aptikta SimBX mėginyje (12,1%). Tuo tarpu visose grupėse esantys *Chloroflexi* mikroorganizmai atlieka svarbų vaidmenį nuosėdų anglies apykaitoje (2,3-7,3%) (Hug ir kt., 2013). Ne mažiau svarbus procesas yra žuvims toksiškų nitritų oksidacija iki mažiau toksiškų nitratų (Robinson ir kt., 2016). Yra žinoma, jog šias oksidacijos reakcijas geba katalizuoti *Nitrospirae* tipo mikroorganizmai, kurių gausumas visose grupėse svyruoja nuo 0,7% (Sim2B grupė) iki 4,8% (Sim2P). Grupių kontekste ypatingai išsiskiria Sim2B bei Sim2S grupė. Šios dvi grupės pasižymi ypač didele melsvabakterių gausa. Manoma, kad dėl maisto medžiagų pertekliaus žuvininkystės ūkiuose gali padidėti fitoplanktono kiekiai. Liu ir kt. sieja padidėjusią melsvabakterių gausą su vandens telkinių eutrofikacija.



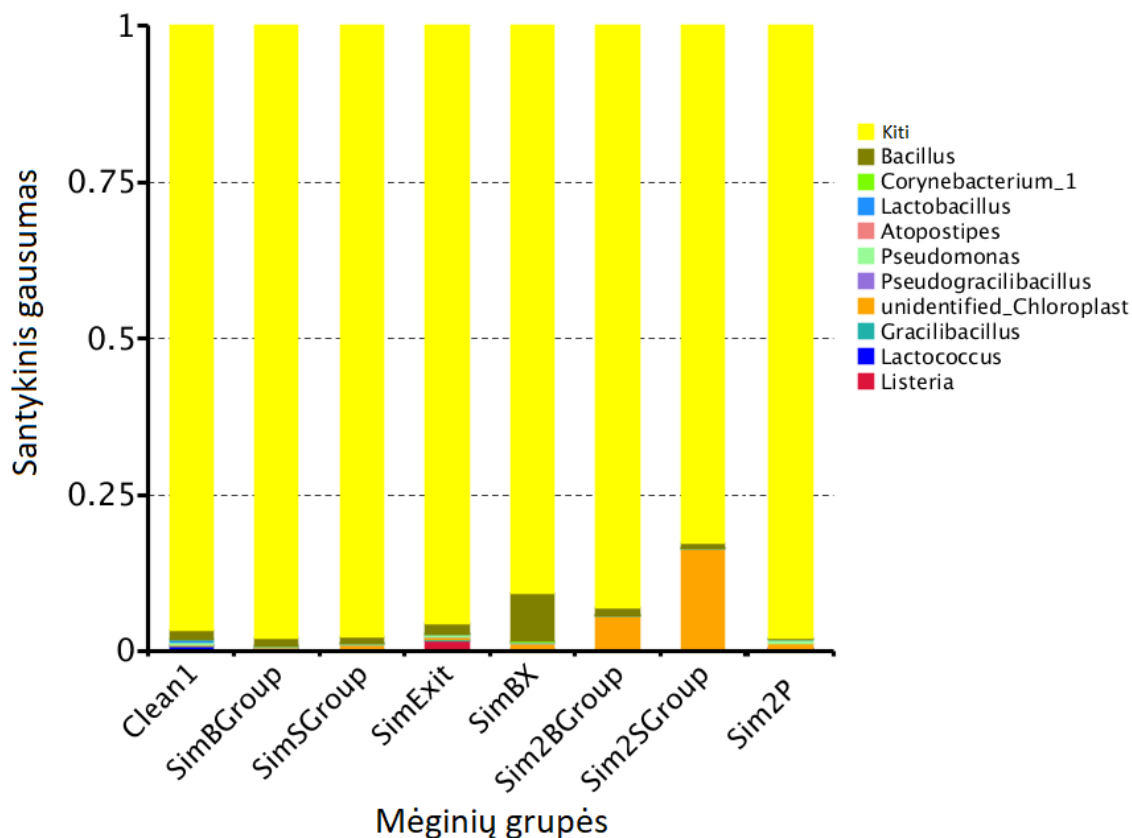
3.8 pav. Santykinis mikroorganizmų tipų gausumas nuosėdų mėginių grupėse

Išnagrinėjus klasių sandarą grupėse paaiškėjo, kad dominuojanti *Proteobacteria* tipą sudaro *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* bei *Deltaproteobacteria* klasių mikroorganizmai. Didelis gammaproteobakterijų gausumas (10,7-17,1%) siejamas su organinėmis medžiagomis praturtinta aplinka (Qin ir kt., 2016). Be to, Kawahara ir kt. siūlo naudoti deltaproteobakterijas kaip užterštumo organinėmis medžiagomis biorodiklį. *Deltaproteobacteria* klasės mikroorganizmai labiausiai yra paplitę SimB grupėje (18,8%). Tuo tarpu mažiausias gausumas buvo stebimas Sim2S grupėje (12,2%). *Betaproteobacteria*, kurių gausumas grupėse buvo 13,7-20%, įvardinamos kaip nitrifikuojančios bakterijos. Šios bakterijos oksiduoja potencialiai toksišką amoniaką iki netoksiškų nitratų. Šis procesas ypač svarbus akvakultūros tvenkiniuose, kur amoniakas gali pasiekti žuvims kenksmingą koncentraciją (Ma ir kt., 2018).



3.9 pav. Santykinis mikroorganizmų klasių gausumas nuosėdų mėginių grupėse

Kaip ir pavienių mėginių atveju, taip ir mėginių grupės nepasižymėjo didele genčių gausa. Grupėms, o ypač SimBX (7,7%), yra būdinga *Bacillus* gentis. *Bacillus* gentis gali būti naudinga akvakultūroje kaip probiotinės bakterijos, kurios yra veiksmingos skatindamos žuvų augimą bei slopina žuvų ligų protrūkius. Šie organizmai laikomi saugia alternatyva pavojingiems sintetiniams antibiotikams ir kitoms augimą skatinančioms medžiagoms, kurios šiuo metu naudojamos akvakultūroje (Rahman ir kt., 2019). Deja, tačiau šiame tyrime, remiantis sugeneruotais taksonominiais medžiais, iš šių *Bacillus* genties 7,7% gausumo net 75% procentų mikroorganizmų yra priskiriama patogenai *Bacillus anthracis*. Tuo tarpu SimExit taške yra stebimas palyginus didelis *Listeria* genties gausumas (1,7%). Yra žinoma, kad *Listeria* mikroorganizmai yra žmonių patogenai. Pranešama, kad *Listeria monocytogenes* dažniausiai yra būdinga nuosaikaus klimato akvakultūroms. Žuvies produktai, užkrėsti listerijomis bei prieš vartojimą tinkamai neapdoroti termiškai kelia potencialų pavojų žmonių sveikatai (Ababouch ir kt., 1999).



3.10 pav. Santykinis mikroorganizmų genčių gausumas nuosėdų mėginių grupėse

Labai svarbu pabrėžti, kad šiame tyrime buvo identifikuota labai mažai patogenų genčių. Daugelis autorių praneša identifikavę akvakultūros mikrobiome nemažai tiek žmonių, tiek žuvų patogeninių genčių. Pavyzdžiui, Tang it kt. praneša žuvininkystės tvenkiniuose identifikavę tokias patogenines gentis kaip *Aeromonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio* ir kt. Šiame tyrime identifikuotos tik *Listeria*, *Bacillus* bei *Pseudomonas* gentys, o jų santykinis gausumas nuosėdų mėginiuose yra itin mažas. Siekiant nustatyti mažo patogenų gausumo priežastis, būtina atlikti tolimesnius tyrimus bei identifikuoti atsparumo antibiotikams genus. Galimai mažas patogenų gausumas yra susijęs su pertekliniu antibiotikų naudojimu.

### **3.5 Atsparumo antibiotikams bei sunkiesiems metalams genų identifikavimas**

Buvo pradėta atsparumo antibiotikams bei sunkiesiems metalams genų paieška nuosėdų mikroorganizmų bendrijose. Parinkus pradmenis buvo atliekamos PGR reakcijos kaip matricą naudojant totalinę genominę DNR, išskirtą tiesiogiai iš nuosėdų mėginių bei DNR išskirtą iš atskirų kultivuojamų izoliatų. Darbai buvo pradėti nuo DNR išskyrimo bei PGR sąlygų optimizavimo, tačiau dėl susiklosčiusios padėties eksperimentų nepavyko pabaigti.

## IŠVADOS

1. Bakterijų įvairovė skirtinguose Simno žuvininkystės tvenkiniuose buvo panaši, tvenkinio dydis ir žuvų auginimo sąlygos nemažino pačios mikroorganizmų įvairovės.
2. *Proteobacteria* bakterijos yra dominuojantis tipas visuose Simno žuvininkystės tvenkinių nuosėdų mėginiuose (45,7-69,8%).
3. Sim2B bei Sim2S tvenkinių grupės pasižymėjo didele *Cyanobacteria* klasės atstovų gausa.
4. Sim2B bei Sim2S tvenkinių grupėse melsvabakterių gausa indikuoja šių tvenkinių eutrofikaciją.
5. Visose tvenkinių grupėse *Deltaproteobacteria* ir *Gammaproteobacteria* gausa rodo padidėjusį užterštumą organinėmis medžiagomis.
6. Simno žuvininkystės tvenkiniuose identifikuotos potencialiai patogeninės bakterijos, priklausančios *Listeria*, *Bacillus* bei *Pseudomonas* gentims.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

IEVA ŠČERBA

## **Intensyvios žuvininkystės įtaka vandens telkinių mikrobiomui ir rezistomui**

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

### **SANTRAUKA**

Šio darbo tikslas buvo nustatyti intensyvios žuvininkystės įtaką mikroorganizmų bendrijų sudėties kitimui. Simno žuvininkystės tvenkiniuose buvo surinkta 18 nuosėdų mėginių. Atlikus metagenominę analizę, buvo nustatytos didžiausios mikroorganizmų populiacijos, identifikuoti bakterijų bendrijų skirtumai tvenkinių grupėse bei įvertinta tvenkinių ekologinė būseną bakterijų bendrijų kontekste.

Nustatyta, kad bakterijų įvairovė skirtinguose Simno žuvininkystės tvenkiniuose buvo panaši. Nuosėdose dominuojantys mikroorganizmai priklausė *Proteobacteria* tipui (45,7-69,8%). Išnagrinėjus mikroorganizmų klasių sandarą paaiškėjo, kad dominuojantį *Proteobacteria* tipą visose mėginiuose sudarė *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* bei *Deltaproteobacteria* klasių mikroorganizmai. Tiek mėginiuose, tiek jų grupėse bakterijų bendrijų sandara buvo panaši, tačiau Sim2B bei Sim2S tvenkinių grupės pasižymėjo didele *Cyanobacteria* klasės atstovų gausa.

Nustatyta Simno žuvininkystės tvenkinių ekologinė būseną bakterijų sandaros kontekste. *Deltaproteobacteria* ir *Gammaproteobacteria* gausa indikavo Simno žuvininkystės tvenkinių užterštumą organinėmis medžiagomis, o Sim2B bei Sim2S tvenkinių grupėse padidėjęs melsvabakterių kiekis nurodė, kad šie tvenkiniai yra eutrofikuoti. Simno žuvininkystės tvenkiniuose taip pat identifikuotos potencialiai patogeninės bakterijos, priklausančios *Listeria*, *Bacillus* bei *Pseudomonas* gentims.



VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

IEVA ŠČERBA

**The Influence of Intensive Fish Farming on Aquatic Microbiome and Resistome**

Master thesis

**SUMMARY**

The aim of this work was to determine influence of intensive fish farming on the change in the composition of microorganism communities. 18 sediment samples were collected from Simnas fishing ponds. After metagenomic analysis, the largest populations of microorganisms and differences in bacterial communities in pond groups were identified. The ecological status of ponds in the context of bacterial communities was also assessed.

Bacterial diversity was found to be similar in different Simnas fishing ponds. The predominant microorganisms in the sediment belonged to *Proteobacteria* phylum (45.7–69.8%). Examination of the structure of the microorganism classes revealed that the dominant type of *Proteobacteria* in all samples consisted of *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria*. The structure of bacterial communities was similar in both samples and their groups, except Sim2B and Sim2S groups were characterized by a high *Cyanobacteria* abundance.

The ecological status of Simnas fishing ponds was determined. High abundance of *Deltaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* indicated organic matter contamination in Simnas fishing ponds, and increased levels of *Cyanobacteria* in the Sim2B and Sim2S pond groups indicated that these ponds are eutrophicated. Pathogenic bacteria belonging to the genera *Listeria*, *Bacillus* and *Pseudomonas* have also been identified in the Simnas fishing ponds.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ababouch, L., Alderman, D., Ashida, K., Boyd, C., Chimatiro, S., Cruz-Lacierda, E.R., Dalsgaard, A., Edwards, P., Garrett, E.S., Gopakumar, K., Hajime, T., Luu, L.T., Merino, E.G., Rim, H.G., Son, T.Q., Suwanrangi, S., Tonguthai, K., Yndestad, M., Yulin, J., Tacon, Al. (1999). Food safety issues associated with products from aquaculture - Report of a joint FAO/NACA/WHO Study Group. Technical Report Series 930. 883.
2. Abou-Shanab RA, van Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 2007;68(2):360-367.
3. Ayangbenro AS, Babalola OO, Aremu OS. Biofloculant production and heavy metal sorption by metal resistant bacterial isolates from gold mining soil. *Chemosphere*. 2019 Sep;231:113-120.
4. Aly S., Albutti S. Antimicrobials Use in Aquaculture and their Public Health Impact. *J Aquac Research Development*. 2014; 05. 10.4172/2155-9546.1000247.
5. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol*. 2006;14(4):176-182.
6. Banquero F., Martínez J.L., Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2008;19:260–265
7. Baron, S., Larvor, E., Chevalier, S., Jouy, E., Kempf, I., Granier, S. A., Lesne, J. Antimicrobial Susceptibility among Urban Wastewater and Wild Shellfish Isolates of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance Estuary (Brittany, France). *Frontiers in microbiology*. 2017, 8, 1637.
8. Bertolla F, Simonet P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res Microbiol*. 1999;150(6):375-384.
9. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(1):42-51
10. Blindauer CA. Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *J Biol Inorg Chem*. 2011;16(7):1011-1024.
11. Bouskill NJ, Barnhart EP, Galloway TS, Handy RD, Ford TE. Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* *sodA*, *htpX* and *mt* gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential in situ biomarker of environmental health. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;60(2):276-286.
12. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27(2-3):145-163.
13. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000;45(3):198-207.
14. Burrige L., Weis J.S., Cabello F., Pizarro J., Bostick K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*. 2010;306:7–23.

15. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(8):a025247.
16. Caruso G. Antibiotic Resistance in Fish Farming Environments: A Global Concern. *J Fisheries Sciences* [<https://www.fisheriessciences.com/>]. 2016 [cituota 2020-04-30] adresas: <https://www.fisheriessciences.com/fisheries-aqua/antibiotic-resistance-in-fish-farming-environments-a-globalconcern.php?aid=11240>
17. Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, et al. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):239-244.
18. Chen J, Li J, Zhang H, Shi W, Liu Y. Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China. *Front Microbiol.* 2019;10:1916.
19. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3675-3681.
20. Dahanayake PS, Hossain S, Wickramanayake MVKS, Heo GJ. Antibiotic and heavy metal resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from marketed Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) in Korea. *J Appl Microbiol.* 2019;127(3):941-952.
21. Dawood M.A.O., Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture.* 2016; 454:243–251
22. de Sousa VS, da-Silva APS, Sorenson L, et al. *Staphylococcus saprophyticus* Recovered from Humans, Food, and Recreational Waters in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Microbiol.* 2017;2017:4287547.
23. Deng, Y.; Zhou, F.; Ruan, Y.; Ma, B.; Ding, X.; Yue, X.; Ma, W.; Yin, X. Feed Types Driven Differentiation of Microbial Community and Functionality in Marine Integrated Multitrophic Aquaculture System. *Water* 2019, 12, 95.
24. Dickinson AW, Power A, Hansen MG, et al. Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environ Int.* 2019;132:105117.
25. Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., & Wilson, D. N. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012;109(42), 16900–16905.
26. Dzyubak E, Yap MN. The Expression of Antibiotic Resistance Methyltransferase Correlates with mRNA Stability Independently of Ribosome Stalling. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7178-7188.
27. Fan L, Barry K, Hu G, et al. Characterizing bacterial communities in tilapia pond surface sediment and their responses to pond differences and temporal variations. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(1):1.
28. Fan, W., Hamilton, T., Webster-Sesay, S., Nikolich, M.P., and Lindler, L.E., Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Probes*, 2007. 21(4): p. 245-256.
29. FAO. 2014. Aquaculture production of fish, crustaceans, molluscs, etc., by principal species in 2013, *FAO Yearbook of Fisheries Statistics 2014*
30. FAO. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.* Rome, Italy

31. Faria, A., Godoy I., Sanches, A., Iglesias, G., Candido, S., Paz, R., Nakazato, L., & Dutra, V. Detection of resistance genes and evaluation of water quality at zoo lakes in Brazil. *Ciência Rural*. 2016; 46. 860-866. 10.1590/0103-8478cr20150827.
32. Fri, N., Njom, H., Ateba, C., Ndip, R. Antibiotic Resistance and Virulence Gene Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Healthy Edible Marine Fish. *International Journal of Microbiology*. 2020. 1-9. 10.1155/2020/9803903.
33. Grosse, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Santos, A. N., Lawley, B., Brown, N. L., & Nies, D. H. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology*, 1999; 181(8), 2385–2393.
34. Gullberg E., Cao S., Berg O.G., Ilback C., Sandegren L., Hughes D., Andersson D.I. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002158.
35. Haenen O. (2017, April) Major bacterial diseases affecting aquaculture. Aquatic AMR Workshop, Mangalore, India, vol 1, 10–11 April 2017. Weblink: [http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07\\_Haenen.pdf](http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/WorkshopAMR/presentations/07_Haenen.pdf)
36. Hasman H, Aarestrup FM. *trb*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1410-1416.
37. Hug, L.A.; Castelle, C.J.; Wrighton, K.C.; Thomas, B.C.; Sharon, I.; Frischkorn, K.R.; Williams, K.H.; Tringe, S.G.; Banfield, J.F. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome* 2013, 1, 22.
38. Hussein K. (2015). Article review: Heavy metals and Pesticides in Aquaculture: Health problems. *European Journal of Academic Essays*. 2.
39. Ianieva O. [Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals]. *Mikrobiologichnyi zhurnal* (Kiev, Ukraine : 1993). 2009; 71. 54-65.
40. Irawati, W., Soraya, Y., Baskoro, A. A Study on Mercury-Resistant Bacteria Isolated from a Gold Mine in Pongkor Village, Bogor, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2012, 10. 197-200. 10.4308/hjb.19.4.197.
41. Ji, G., Silver, S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *Journal of Industrial Microbiology*. 1995, 14, 61–75.
42. Kamika, I., Momba, M.N. Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiol*. 2013, 13, 28.
43. Kang, Y., Li, Q., Yin, Z. et al. High diversity and abundance of cultivable tetracycline-resistant bacteria in soil following pig manure application. *Sci Rep* 8, 1489 (2018).
44. Kawahara, N., Shigematsu, K., Miyadai, T., Kondo, R. Comparison of bacterial communities in fish farm sediments along an organic enrichment gradient. *Aquaculture*. 2009, 287. 107-113.
45. Kim SR, Nonaka L, Suzuki S. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;237(1):147-156.

46. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999, 39:267-294.
47. Kobayashi T, Suehiro F, Cach Tuyen B, Suzuki S. Distribution and diversity of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins in Mekong river sediments in Vietnam. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;59(3):729-737.
48. Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev Sci Tech.* 2012 Apr;31(1):57-64
49. Leon, S.M., Nuñal, S.N., Wei, H., Yoshikawa, T., Maeda, H. Bacterial community composition shifts in sediments influenced by fish feeds. *Aquaculture Research.* 2017, 48, 4380-4389.
50. Liu J, Li Y, & Ma F, Su S, Yao W, Wu Z. Spatiotemporal variation of microbial community structure and physicochemical parameters in grass carp culture ponds. *Journal of Freshwater Ecology.* 2019, 34. 123-133.
51. Liu Z, Iqbal M, Zeng Z, Lian Y, Zheng A, Zhao M, Li Z, Wang G, Li Z, Xie J. Comparative analysis of microbial community structure in the ponds with different aquaculture model and fish by high-throughput sequencing. *Microb Pathog.* 2020, 142 104101.
52. Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermsillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN microbiology*, 2012, 916845.
53. Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez-Ortega, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS microbiology reviews.* 2009, 33(2), 430–449.
54. Mata MT, Baquero F, Pérez-Díaz JC. A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;187(2):185-188.
55. Mohammed A, Kapri A, Goel R. Heavy Metal Pollution: Source, Impact, and Remedies. 2011, 10.1007/978-94-007-1914-9\_1.
56. Molale L. G., Bezuidenhout C. C. Antibiotic resistance, efflux pump genes and virulence determinants in *Enterococcus* spp. from surface water systems. *Environmental Science and Pollution Research.* 2016;23(21):21501–21510.
57. Munita, J. M., Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum.* 2016, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
58. Nguyen, C.C., Hugie, C.N., Kile, M.L. et al. Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs: A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* 2019, 13, 46.
59. Nies DH. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles.* 2000;4(2):77-82.
60. Nies, D. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999, 51, 730–750.
61. Osman O, Tanguichi H, Ikeda K, Park P, Tanabe-Hosoi S, Nagata S. Copper-resistant halophilic bacterium isolated from the polluted Maruit Lake, Egypt. *J Appl Microbiol.* 2010;108(4):1459-1470.
62. Ouyang, W., Huang, F., Zhao, Y., Li, H., Su, J. Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2015, 99, 5697-5707.

63. Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connor, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R. M., Dowd, L., Barrell, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 2001, 413(6858), 848–852.
64. Patil, H. J., Benet-Perelberg, A., Naor, A., Smirnov, M., Ofek, T., Nasser, A., Minz, D., & Cytryn, E. Evidence of Increased Antibiotic Resistance in Phylogenetically-Diverse *Aeromonas* Isolates from Semi-Intensive Fish Ponds Treated with Antibiotics. *Frontiers in microbiology*. 2016, 7, 1875.
65. Patterson AJ, Rincon MT, Flint HJ, Scott KP. Mosaic tetracycline resistance genes are widespread in human and animal fecal samples. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(3):1115-1118.
66. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Köhler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2004;279(10):8761-8768.
67. Piotrowska M, Rzczycka M, Ostrowski R, Popowska MA. Diversity of Antibiotic Resistance Among Bacteria Isolated from Sediments and Water of Carp Farms Located in a Polish Nature Reserve. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2017;26(1):239-252.
68. Pitondo-Silva, A, Gonçalves, GB, Stehling, EG. Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. *APMIS* 2016; 124: 681–688
69. Pitondo-Silva, A, Gonçalves, GB, Stehling, EG. Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. *APMIS* 2016; 124: 681–688
70. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):20-51.
71. Preena, P.G., Swaminathan, T.R., Kumar, V.J.R. et al. Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*, 2020.
72. Qin, Y., Hou, J., Deng, M. et al. Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. *Sci Rep* 2016, 6, 35232.
73. Rahman, Md. Mahbubur, Kawser, R, Islam T. Probiotic Bacilli in Sustainable Aquaculture. 2019, 10.1007/978-3-030-15175-1\_16.
74. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):482-501. Published 2018 Jun 26. doi:10.3934/microbiol.2018.3.482
75. Robinson, G., Caldwell, G. S., Wade, M. J., Free, A., Jones, C., Stead S. M. Profiling bacterial communities associated with sediment-based aquaculture bioremediation systems under contrasting redox regimes. *Scientific reports*. 2016, 6, 38850.
76. Schlenk D., Gollon J.L., Griffin B.R. Efficacy of copper sulfate for the treatment of Ichthyophthiriasis in Channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*. 1998;10:390–396
77. Seiler, C., Berendonk, T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in microbiology*. 2012, 3, 399.

78. Shen X, Xu M, Li M, Zhao Y, Shao X, Response of sediment bacterial communities to the drainage of wastewater from aquaculture ponds in different seasons, *Science of The Total Environment*, Vol 717, 2020, 137180.
79. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(3):295-309.
80. Srinivasan, V., Nam, H.M., Sawant, A.A., Headrick, S.I., Nguyen, L.T., Oliver, S.P. Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microb. Ecol.* 2008, 55:184–193.
81. Tang Y, Tao P, Tan J, et al. Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *Int J Mol Sci.* 2014;15(8):13663-13680. Published 2014 Aug 7. doi:10.3390/ijms150813663
82. Tehrani AH, Gilbride KA. A closer look at the antibiotic-resistant bacterial community found in urban wastewater treatment systems. *Microbiologyopen.* 2018;7(4):e00589.
83. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019;431(18):3472-3500.
84. Valls M, de Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;26(4):327-338.
85. Watts JEM, Schreier HJ, Lanska L, Hale MS. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar Drugs.* 2017;15(6):158.
86. Wei YM, Wang JQ, Liu TT, et al. Bacterial communities of Beijing surface waters as revealed by 454 pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(16):12605-12614.
87. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(10):1451-1470.
88. Zhao Y, Cocerva T, Cox S, Tardif S, Su JQ, Zhu YG et al. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of the Total Environment.* 2019 Mar 15;656:512-520.