



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Oporność na antybiotyki beta-laktamowe u bakterii bytujących w oczyszczalni ścieków w Żywcu i Jeziorze Żywieckim

Author: Kinga Bondarczuk

Citation style: Bondarczuk Kinga. (2017). Oporność na antybiotyki beta-laktamowe u bakterii bytujących w oczyszczalni ścieków w Żywcu i Jeziorze Żywieckim. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.





Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski w Katowicach

KINGA BONDARCZUK

PRACA DOKTORSKA

**Oporność na antybiotyki beta-laktamowe u bakterii bytujących
w oczyszczalni ścieków w Żywcu i Jeziorze Żywieckim**

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Mikrobiologii
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Promotor:
Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM 2014/13/N/NZ9/03915
Pracę wykonywano przy wsparciu stypendialnym w ramach projektu UPGOW – Uniwersytet Partnerem Gospodarki
Opartej na Wiedzy oraz *DoktorIS – Programu stypendialnego na rzecz innowacyjnego Śląska* współfinansowanego
przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Katowice 2017

Serdeczne podziękowania składam:

Pani prof. dr hab. Zofii Piotrowskiej-Seget,

Promotorowi tej rozprawy,

*za opiekę naukową, inspirację, wiarę we mnie, życzliwość
i wyrozumiałość.*

***Pracownikom i Doktorantom Katedry Mikrobiologii
Uniwersytetu Śląskiego,***

za stworzenie Zespołu Marzeń.

Rodzinie,

za domowe ciepło i wyrozumiałość.

Mężowi Mateuszowi,

*za wielowymiarowe wsparcie i rozwiązywanie problemów,
które istniały tylko w mojej głowie.*

Niniejszą pracę dedykuję mojemu Mężowi Mateuszowi

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów:	1
I. WSTĘP	2
II. PRZEGLĄD LITERATURY	3
II.1. Antybiotykooporność wśród bakterii	3
II.2. Antybiotyki β-laktamowe i ich mechanizm działania	6
II.2.1. Charakterystyka ampicyliny	8
II.3. Mechanizmy oporności na antybiotyki β-laktamowe.....	9
II.3.1. Enzymatyczna inaktywacja β -laktamów.....	10
II.3.2. Zmniejszenie powinowactwa PBPs do antybiotyków β -laktamowych	11
II.3.3. Usuwanie antybiotyków β -laktamowych z komórki	12
II.3.4. Modyfikacja przepuszczalności osłon komórkowych	13
II.4. Rola oczyszczalni ścieków w rozprzestrzenianiu antybiotykooporności	13
II.5. Metody wykorzystywane do badania antybiotykooporności w oczyszczalniach ścieków i środowisku.....	17
II.5.1. Metody hodowlane	17
II.5.2. Metody niehodowlane.....	18
III. CEL PRACY	20
IV. MATERIAŁY I METODY	21
IV.1. Materiały	21
IV.2. Metody	24
IV.2.1. Oznaczanie liczebności hodowlanych frakcji mikroorganizmów metodą płytkową w badanych próbkach i izolacja szczepów opornych na ampicylinę	24
IV.2.2. Oznaczanie liczby kopii genu 16S rRNA w badanych próbkach.....	25
IV.2.3. Amplifikacja fragmentu genu 16S rRNA	25
IV.2.4. Detekcja genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe metodą PCR-DGGE ..	26
IV.2.5. Analiza elektroforetyczna DNA	28
IV.2.6. Izolacja metagenomowego DNA do sekwencjonowania nowej generacji	28
IV.2.7. Sekwencjonowanie nowej generacji	29
IV.2.8. Obróbka bioinformatyczna plików z odczytami sekwencji	29
IV.2.9. Oznaczenie bioróżnorodności mikroorganizmów w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wodach jeziora i rzeki na podstawie sekwencji 16S rRNA.....	30
IV.2.10. Oznaczenie genów warunkujących oporność na antybiotyki w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wodach jeziora i rzeki	31
IV.2.11. Izolacja plazmidowego DNA	31
IV.2.11.1. Izolacja plazmidowego DNA na małą skalę	31

IV.2.11.2.	Egzogenna izolacja plazmidowego DNA na drodze koniugacji.....	32
IV.2.11.3.	Egzogenna izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej	32
IV.2.12.	Transformacja komórek E. coli plazmidowym DNA	33
IV.2.12.1.	Przygotowanie komórek kompetentnych z użyciem chlorku rubidu	33
IV.2.12.2.	Przygotowanie komórek kompetentnych z użyciem chlorku wapnia	33
IV.2.12.3.	Transformacja komórek kompetentnych E. coli DH5 α /S17-1 metodą szoku cieplnego ...	34
IV.2.12.4.	Przygotowane komórek elektrokompetentnych.....	34
IV.2.12.5.	Elektroporacja	34
IV.2.13.	Charakterystyka wyizolowanych plazmidów.....	35
IV.2.13.1.	Analiza restrykcyjna plazmidów.....	35
IV.2.13.2.	Oznaczanie replikonów metodą multipleks PCR.....	35
IV.2.13.3.	Oznaczanie profili lekooporności kodowanych przez plazmidy	36
IV.2.13.4.	Oznaczenie zdolności plazmidów do transferu koniugacyjnego	36
IV.2.13.5.	Ocena mobilizowalności plazmidów.....	36
IV.2.13.6.	Oznaczanie zakresu gospodarzy plazmidów koniugacyjnych	37
IV.2.13.7.	Identyfikacja elementów transpozycyjnych niosących oporność na ampicylinę za pomocą wektora pułapkowego.....	37
IV.2.14.	Analiza statystyczna wyników	37
V.	WYNIKI	39
V.1.	Liczebność hodowlanych frakcji bakterii w próbkach z oczyszczalni ścieków, a także wód i osadów jeziora i rzeki.....	39
V.2.	Izolacja ampicylinoopornych szczepów	42
V.3.	Oznaczenie liczby kopii genu 16S rRNA w metagenomach wody, ścieków i osadów	42
V.4.	Detekcja genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe w metagenomach ścieków surowych i osadu czynnego	43
V.5.	Wyniki sekwencjonowania nowej generacji.....	46
V.5.1.	Oznaczenie bioróżnorodności w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód jeziora i rzeki	46
V.5.2.	Udział genów warunkujących antybiotykooporność oraz genów kodujących integrazy 1 klasy w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód jeziora i rzeki.....	51
V.6.	Kolekcja plazmidów	55
V.6.1.	Egzogenna izolacja plazmidowego DNA z próbek ścieków, wody i osadów	55
V.6.2.	Przygotowanie kolekcji plazmidów	56
V.6.3.	Oznaczanie replikonów metodą multipleks PCR	60
V.6.4.	Oznaczenie zdolności plazmidów do transferu koniugacyjnego.....	64
V.6.5.	Ocena mobilizowalności plazmidów	65
V.6.6.	Oznaczanie zakresu gospodarzy plazmidów koniugacyjnych	65
V.6.7.	Oznaczanie profili lekooporności kodowanych przez plazmidy	67
V.6.8.	Wychwytywanie elementów transpozycyjnych	69
VI.	DYSKUSJA	70
VI.1.	Liczebność mikroorganizmów w badanych środowiskach	70

VI.2.	Kolekcja ampicylioopornych szczepów	73
VI.3.	Bioróżnorodność mikroorganizmów w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód Soli i Jeziora Żywieckiego	73
VI.4.	Udział genów warunkujących antybiotykooporność oraz genów kodujących integrazy 1 klasy w metagenomach badanych środowisk	75
VI.5.	Kolekcja plazmidów opornościowych w komórkach <i>E. coli</i> DH5α	79
VI.6.	Podsumowanie i perspektywy dalszych badań.....	82
VII.	WNIOSKI	84
VIII.	STRESZCZENIE	85
IX.	SUMMARY	87
X.	LITERATURA	89
XI.	ANEKSY	100

Wykaz skrótów:

AR	antibiotic resistance, antybiotykooporność
ARB	antibiotic-resistant bacteria, antybiotykooporne bakterie
ARG(s)	antibiotic resistance gene(s), gen(y) warunkujący(/e) antybiotykooporność
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis, elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego
dNTPs	trifosforany deoksyrybonukleotydów
GBS	Group B <i>Streptococcus</i> , paciorkowiec grupy B
HACEK	<i>Haemophilus</i> , <i>Aggregatibacter</i> (wcześniej <i>Actinobacillus</i>), <i>Cardiobacterium</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Kingella</i> , bakterie należące do naturalnej mikroflory jamy ustnej, które mogą wywoływać infekcyjne zapalenie wsierdzia
HGT	Horizontal Gene Transfer, horyzontalny transfer genów
jtk	jednostki tworzące kolonie
MFP	Membrane Fusion Protein, rodzina białek
MGE(s)	Mobile Genetic Elements, ruchomy(/e) element(y) genetyczny(/e)
MIC	Minimal Inhibitory Concentration, najmniejsze stężenie antybiotyku hamujące wzrost drobnoustroju
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , odporny na metycylinę <i>Staphylococcus aureus</i>
OMF	Outer Membrane Factor, rodzina białek
PBP(s)	Penicillin Binding Protein(s), białko(/a) wiążące penicylinę
PCR	polymerase chain reaction, łańcuchowa reakcja polimerazy
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy
RLM	równoważna liczba mieszkańców
RND	Resistance Nodulation Cell Division, nadrodzina białek
SSU	Small Subunit, mała podjednostka rybosomu

I. WSTĘP

Nadużywanie antybiotyków w medycynie, weterynarii i hodowli zwierząt przyspieszyło rozprzestrzenianie się oporności na te związki wśród mikroorganizmów. Obecnie antybiotykooporność stanowi problem globalny, co powoduje konieczność podejmowania odpowiednich działań o zasięgu międzynarodowym. Łatwe i szybkie rozprzestrzenianie się bakterii antybiotykoopornych jest m. in. związane z dużą mobilnością społeczeństw, ale także z genetyczną plastycznością bakterii. Pojawianie się tzw. szczepów wielolekoopornych, niewrażliwych na leki ostatniej szansy stawia pod znakiem zapytania rozwój medycyny. Istnieje zagrożenie, że przeprowadzanie rutynowych operacji chirurgicznych, stosowanie chemioterapii, czy transplantacje organów wskutek powszechnego występowania patogenów opornych na wiele antybiotyków staną się zabiegami dużego ryzyka. Antybiotykooporność nie tylko zwiększa koszty leczenia, ale przede wszystkim przyczynia się do większej śmiertelności.

Intensyfikacja badań nad omawianym zjawiskiem przyczyniła się do ujawnienia istotnej roli bakterii środowiskowych w rozwoju i rozprzestrzenianiu antybiotykooporności. Stwierdzono m. in., że geny ją warunkujące istniały w genomach mikroorganizmów środowiskowych na długo przed wprowadzeniem pierwszych antybiotyków, a białka kodowane przez te geny pełnią funkcje w innych procesach metabolicznych. Udokumentowano także kluczową rolę ruchomych elementów genetycznych w nabywaniu przez patogeny nowych genów kodujących antybiotykooporność od szczepów środowiskowych. W ostatnich latach w literaturze światowej podjęto również ożywioną dyskusję na temat roli oczyszczalni ścieków w rozprzestrzenianiu zjawiska antybiotykooporności. Ze względu na bogactwo ruchomych elementów genetycznych niosących antybiotykooporność odkrywanych w genomach bakterii zasiedlających oczyszczalnie ścieków, zakłady te uważa się za rezerwuary genów warunkujących antybiotykooporność.

II. PRZEGLĄD LITERATURY

II.1. Antybiotykooporność wśród bakterii

„Nie jest trudno uzyskać mikroby odporne na penicylinę w laboratorium poprzez ekspozycję bakterii na stężenia antybiotyku, które jej nie zabijają i to samo może mieć miejsce wewnątrz organizmu.”

sir Alexander Fleming, Nobel Lecture, 1945

Oporność bakterii na antybiotyki (= antybiotykooporność) określa się jako zdolność mikroorganizmów do przeciwstawienia się toksycznym właściwościom tych leków. Wyróżnia się oporność wrodzoną (naturalną niewrażliwość bakterii spowodowaną np. brakiem miejsca uchwytu antybiotyku w komórce) oraz nabytą (wskutek mutacji lub na drodze horyzontalnego transferu genów) (HGT, ang. Horizontal Gene Transfer) (Davies i Davies, 2010; www.who.int/antimicrobial-resistance/en).

O pojawianiu się opornych na antybiotyki szczepów bakterii ostrzegał już sir Alexander Fleming. Co więcej, wyniki badań ostatnich lat jednoznacznie wskazują, że antybiotykooporne szczepy nie wyewoluowały dopiero w tzw. „erze antybiotyków”, ale funkcjonowały już w czasach prehistorycznych (Aminov i Mackie, 2007). Obecność genów warunkujących oporność na antybiotyki (ARGs, ang. antibiotic resistance genes) stwierdzono m. in. w pochodzącej sprzed 30 000 lat wiecznej zmarzlinie. Z wykorzystaniem technik metagenomiki funkcjonalnej uzyskano ekspresję ARG liczącego 5 000 lat. ARGs izolowano także z mikrobiomu andyjskiej mumii (datowanej na 980-1170 n.e.), czy ze szkieletów znalezionych w średniowiecznym klasztorze (950-200 n.e.). Te fragmenty antycznego DNA często wykazywały homologię z obserwowanymi u współczesnych szczepów patogennych genami warunkującymi antybiotykooporność (Perry i in., 2016). Uważa się, że obecność wielu ARGs w środowisku może być ściśle związana z mikroorganizmami produkującymi antybiotyki. Funkcją tych genów jest ochrona producentów antybiotyków przed ich własnymi metabolitami. Następnie te właśnie ARGs drogą horyzontalnego transferu mogły zostać rozprzestrzenione wśród

szczepów środowiskowych. O ile obecność ARGs u drobnoustrojów wytwarzających antybiotyki i bakterii narażonych na ich bezpośredni wpływ wydaje się być uzasadniona, zaskakuje znaczący udział ARGs w genotypach mikroorganizmów zasiedlających nisze o niewielkim narażeniu na interakcje z producentami antybiotyków. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest pełnienie przez ARGs innych funkcji metabolicznych niż tylko ochrona przed szkodliwym działaniem związków przeciwdrobnoustrojowych (Aminov i Mackie, 2007). Za przykład takiego genu może posłużyć *aac(2')-Ia* kodujący u *Providencia stuartii* acetylotransferazę aminoglizydową, która uczestniczy w modyfikowaniu peptydoglikanu. Ze względu na podobieństwo struktury chemicznej gentamycyny do substratu tego enzymu, dochodzi do rozpoznania cząsteczki aminoglikozydu i jego inaktywacji na drodze acetylacji (Martinez i in., 2009). Co więcej wykazano hormetyczne właściwości związków przeciwdrobnoustrojowych. W niskich stężeniach antybiotyki nie tylko nie wykazują toksyczności, ale przyczyniają się do wzrostu poziomu transkrypcji genów nie związanych ze stresem, co może korzystnie wpływać na mikroorganizmy. Dopiero wyższe koncentracje leków wywołują odpowiedź na stres, a także uruchamiają procesy związane z utratą żywotności bakterii (Martínez, 2008). Powyższe fakty pozwalają zobaczyć rolę antybiotyków i ARGs w zupełnie nowej perspektywie. Dotąd antybiotyki i antybiotykooporność (AR, ang. antibiotic resistance) były pojmowane w kategoriach „broń” i „tarcza”. Choć ta perspektywa jest nadal aktualna dla medycyny, stanowi ona jedynie wycinek zdecydowanie bardziej złożonych zależności, jakie mają miejsce w środowisku naturalnym, gdzie antybiotyki występują w stężeniach znacznie niższych od dawek terapeutycznych. Zrozumienie tych zależności może pomóc w prognozowaniu rozwoju i rozprzestrzeniania AR wśród patogenów.

Zaproponowano, że genomy bakterii środowiskowych stanowią swoisty rezerwuar genów warunkujących oporność na antybiotyki (ang. environmental antibiotic resistance), który może być dostępny również dla patogenów (Wright, 2007). Z dotychczasowych badań wynika, że środowiskowy rezerwuar ARGs jest znacznie bogatszy od puli tych genów obserwowanej u szczepów patogennych (Rahube i Yost, 2010). Tego, jak istotną rolę w nabywaniu AR przez bakterie chorobotwórcze odgrywają szczepy środowiskowe, dowiodły analizy filogenetyczne. Wykazały one horyzontalny transfer wielu ARGs od bakterii środowiskowych do szczepów o znaczeniu klinicznym. Co ciekawe źródłem tych genów nie były genomy bakterii produkujących antybiotyki,

a zdarzenia transferu genów miały miejsce stosunkowo niedawno (Aminov i Mackie, 2007). Ten obecnie obserwowany przyspieszony proces rozprzestrzeniania AR wśród patogenów jest przypisywany masowej konsumpcji antybiotyków i wszystkim związanym z nią konsekwencjom. Nadużywanie oraz niewłaściwe wykorzystanie związków przeciwdrobnoustrojowych w medycynie, rolnictwie i weterynarii doprowadziło do powstania silnej presji selekcyjnej faworyzującej antybiotykooporne szczepy. Ponadto nieprzestrzeganie środków bezpieczeństwa w wielu zakładach produkujących antybiotyki przyczyniło się do uwalniania znacznych ich ilości do środowiska. Wciąż rosnące stężenia antybiotyków w środowisku wynikają również z faktu, że większość przyjmowanych leków zostaje wydalona z organizmów ludzi i zwierząt w formie niezmienionej (Bondarczuk i in., 2016). Udokumentowano, że w obecności subletalnych stężeń antybiotyków zwiększa się u bakterii częstość HGT (Aminov i Mackie, 2007).

Podsumowując oporność na antybiotyki jest cechą, która funkcjonuje u mikroorganizmów od milionów lat. Geny ją warunkujące ewoluowały nie tylko u bakterii wytwarzających antybiotyki, a ich produkty mogły spełniać inne funkcje w metabolizmie komórkowym. Jednakże nastanie tzw. „ery antybiotyków” doprowadziło do przyspieszenia procesu przenoszenia ARGs z genomów bakterii środowiskowych do szczepów chorobotwórczych oraz nabywania oporności przez patogeny na drodze mutacji. I to właśnie w tym antropologicznym kontekście zjawisko AR stanowi jedno z największych zagrożeń XXI wieku. Zatem poznanie środowiskowego rezerwuaru ARGs jawi się jako szansa na przewidzenie nowych mechanizmów oporności, jakie w przyszłości mogą nabyć patogeny.

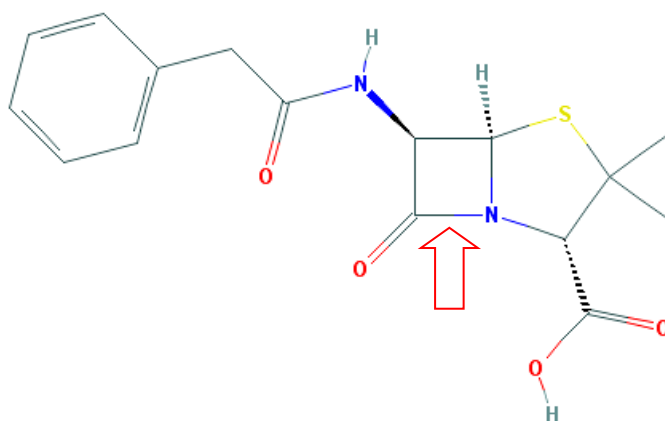
Zidentyfikowane do tej pory mechanizmy warunkujące AR zdumiewają różnorodnością i złożonością. Oporność na dany antybiotyk może być warunkowana poprzez kilka odrębnych procesów, a jeden mechanizm może nadawać oporność na wiele leków (tzw. wielolekooporność). Do omawianych mechanizmów można zaliczyć m. in.: modyfikację składników komórki, które stanowią cel działania antybiotyków, enzymatyczną inaktywację antybiotyków, zmniejszenie przepuszczalności osłon komórkowych, usuwanie leków z komórki, nadekspresję enzymu inhibowanego przez antybiotyk, wytworzenie alternatywnego szlaku metabolicznego. Wiele z tych procesów zostało szczegółowo opisanych na poziomie molekularnym (Krysta i in., 2011). Ze względu na to, iż w niniejszej pracy badania skupiały się przede wszystkim

na oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe w kolejnych rozdziałach zostanie przedstawiona charakterystyka tej grupy leków oraz mechanizmy warunkujące na nie oporność.

II.2. Antybiotyki β -laktamowe i ich mechanizm działania

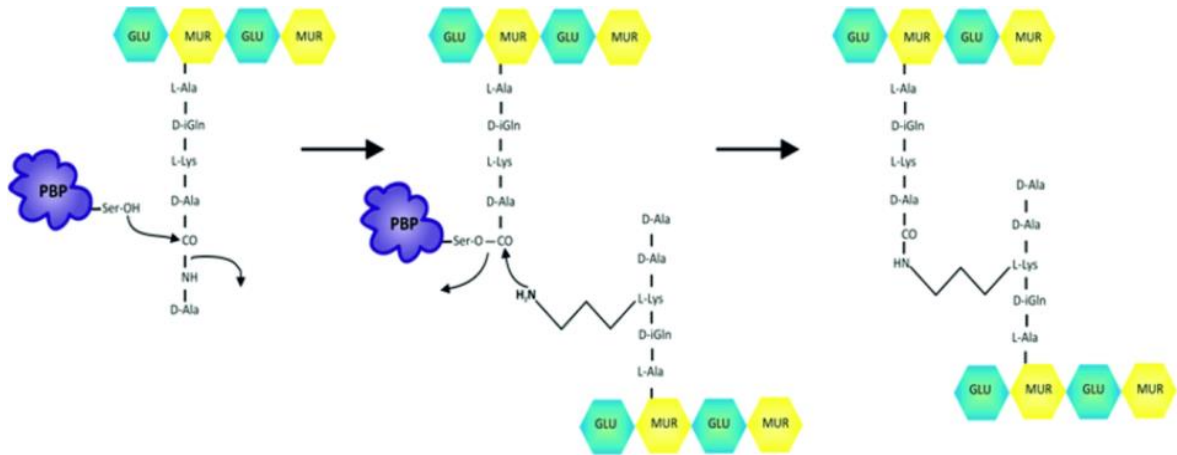
„Kiedy obudziłem się tuż po świcie 28 września 1928 roku, na pewno nie planowałem zrewolucjonizować całej medycyny poprzez odkrycie pierwszego antybiotyku (...), ale przypuszczam, że to właśnie uczyniłem” sir Alexander Fleming (Kendall, 1994).

Odkrycie penicyliny G przez sir Alexandra Fleminga w 1928 roku można śmiało uznać za punkt zwrotny w historii ludzkości, a odkryta przez niego grupa antybiotyków – β -laktamy – to wciąż najpowszechniej stosowana klasa związków przeciwdrobnoustrojowych (Bush i Bradford, 2016). Swoją popularność zawdzięczają przede wszystkim niskiej toksyczności względem ludzi i zwierząt oraz (w przypadku β -laktamów chemicznie modyfikowanych) szerokiemu spektrum działania (Carlier i in., 2015). Antybiotyki β -laktamowe stanowią liczną grupę leków, podzieloną na cztery podgrupy: penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy i monobaktamy. Cechą wspólną tych wszystkich związków jest zawartość pierścienia β -laktamowego (Rys. 1), który decyduje o ich aktywności przeciwbakteryjnej. Struktura przestrzenna wspomnianego pierścienia przypomina sekwencję D-Ala-D-Ala w peptydzie łączącym łańcuchy mureiny. Ze względu na to podobieństwo, β -laktamy są mylnie rozpoznawane przez białka wiążące penicylinę (PBPs, ang. Penicillin Binding Proteins), które biorą udział w ostatnich etapach tworzenia mureiny. Związanie cząsteczki antybiotyku w centrum aktywnym PBPs zaburza syntezę ściany komórkowej (Mainardi i in., 2008; Drawz i Bonomo, 2010).



Rys. 1. Struktura penicyliny G z zaznaczonym strzałką pierścieniem β -laktamowym (źródło: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=5904&width=500&height=500>)

W obrębie wspomnianych enzymów PBP wyodrębniono trzy klasy: A, B i C. Do klasy A zaliczono enzymy uczestniczące w polimeryzacji peptydoglikanu poprzez reakcje transpeptydacji oraz transglikozylacji. Białka wykazujące aktywność transpeptydazy i katalizujące tworzenie wiązań między peptydami sąsiadujących łańcuchów cukrowych w mureinie zgrupowano w klasie B. Klasa C charakteryzuje się aktywnością karboksypeptydazy (czasami również endopeptydazy) i może brać udział w zmianie stopnia usieciowania mureiny (Powell i in., 2009). W obrębie domen transpeptydazy oraz karboksypeptydazy znajdują się konserwatywne sekwencje: (K/H)(S/T)G, SXXK oraz SXN współtworzące centrum aktywne. Kluczowym elementem mechanizmu katalicznego tych enzymów jest, wchodząca w skład motywu SXXK, seryna. Atakuje ona grupę karbonylową przedostatniej D-alaniny w pentapeptydzie połączonym z łańcuchem cukrowym mureiny, powodując odłączenie ostatniej D-alaniny. W wyniku reakcji acylacji powstaje związany kowalencyjnie kompleks (produkt pośredni) z wiązaniem estrowym łączącym serynę i przedostatnią D-alaninę. W przypadku transpeptydaz wiązanie estrowe jest następnie atakowane przez grupę aminową trzeciej reszty aminokwasowej w kolejnym pentapeptydzie, związanym z sąsiadującym łańcuchem cukrowym. W ten sposób powstaje wiązanie sieciujące mureinę (Rys. 2). Natomiast w przypadku DD-karboksypeptydaz dochodzi do hydrolizy produktu pośredniego (Bondarczuk i in., 2014).

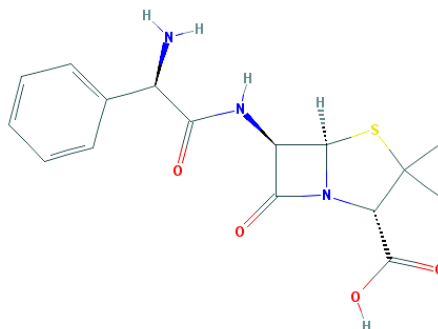


Rys. 2. Sieciowanie mureiny przez białka wiążące penicylinę (opis w tekście).
Skróty: GLU- N-acetylglikozaamina; MUR – kwas N-acetylmuraminowy (Bondarczuk i in., 2014)

W sytuacji, gdy w środowisku życia bakterii pojawia się β -laktam, znajdująca się w centrum aktywnym PBP seryna, atakuje grupę karbonylową w pierścieniu β -laktamowym antybiotyku. Otwarcie pierścienia prowadzi do utworzenia kompleksu z acylowanym enzymem, którego hydroliza przebiega na tyle wolno, że dochodzi do efektywnego zablokowania aktywności enzymu. Jednoczesne zahamowanie syntezy peptydoglikanu oraz konstytutywne procesy związane z jego degradacją doprowadzają do uszkodzenia ściany komórkowej, zwiększenia jej przepuszczalności, a w ostateczności do lizy komórki (Bondarczuk i in., 2014).

II.2.1. Charakterystyka ampicyliny

Jednym z antybiotyków β -laktamowych jest ampicylina (Rys. 3).



Rys. 3. Struktura ampicyliny (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=6249&width=500&height=500>)

Ampicylina została zatwierdzona do użytku w 1963 roku (Bush i Bradford, 2016). Należy do penicylin półsyntetycznych, jest przedstawicielem aminopenicylin. Wykazuje aktywność względem *Streptococcus spp.*, wielu szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym z rodzaju *Shigella*. Podaje się ją doustnie lub dożylnie. Najwyższe stężenie w osoczu osiąga po 2 godzinach od podania. Często stosowana w kombinacji z innymi lekami, np. inhibitorami β -laktamaz lub przedstawicielami innych grup antybiotyków.

Wskazania stosowania ampicyliny to zapalenie wyrostka sutkowego; dur brzuszny i dur rzekomy u dzieci będących przewlekłymi nosicielami; ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego; zapalenie wsierdza wywołane przez enterokoki lub α -hemolizujące streptokoki, a także bakterie z grupy HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter* (wcześniej *Actinobacillus*), *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*); ostre zapalenie otrzewnej; odmiedniczkowe zapalenie nerek; zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wywołane przez *Haemophilus influenzae* lub *Listeria monocytogenes*; okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa w przypadku stwierdzenia u ciężarnej nosicielstwa paciorkowców z grupy B (GBS – ang. Group B *Streptococcus*); zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i sepsa u noworodków (<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5406e/16.3.html#Js5406e.16.3>; monografia AHFS w: <https://www.drugs.com/monograph/ampicillin-sodium.html>; 31.01.2017).

II.3. Mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe

„Mogą nadejść czasy, kiedy każdy będzie mógł kupić penicylinę w sklepie. Wtedy istnieje niebezpieczeństwo, że nieświadomy człowiek może przyjmować niedostateczne dawki antybiotyku i ekspozując bakterie na subletalne stężenia leku, doprowadzi do ich oporności.” sir Alexander Fleming, Nobel Lecture, 1945

Obecnie znane są cztery grupy mechanizmów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe: (1) produkcja β -laktamaz, (2) obniżenie powinowactwa PBPs, (3) aktywne usuwanie leku z komórki oraz (4) modyfikacje przepuszczalności osłon

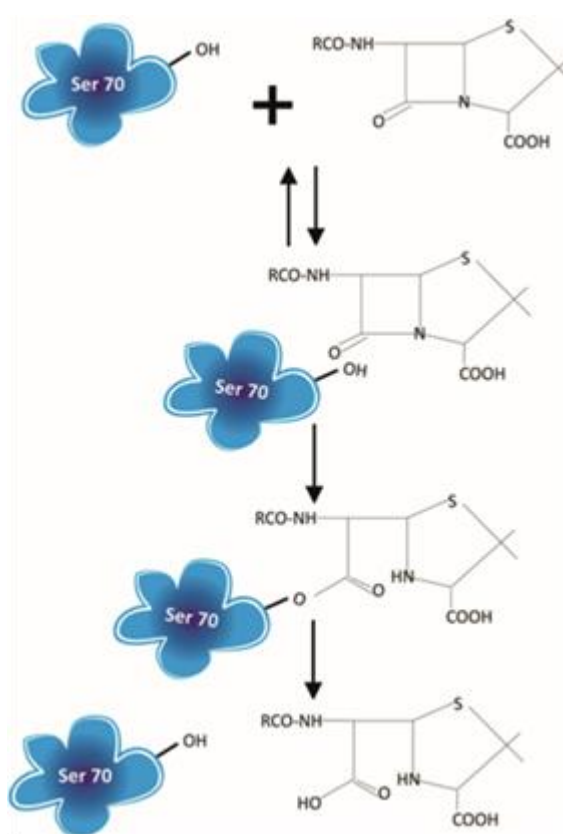
komórkowych. Spośród tych czterech, największe znaczenie kliniczne ma produkcja β -laktamaz – enzymów inaktywujących omawiane leki.

II.3.1. Enzymatyczna inaktywacja β -laktamów

Najważniejszą rolę w oporności bakterii na omawianą grupę antybiotyków odgrywają β -laktamazy – enzymy, które katalizują hydrolizę pierścienia β -laktamowego. Enzymy te były znane jeszcze przed leczniczym zastosowaniem penicyliny. Wprowadzaniu kolejnych generacji β -laktamów towarzyszyło szybkie pojawianie się opornych na nowe leki szczepów produkujących dotąd nieznanne β -laktamazy. Obecnie zidentyfikowano ponad 2000 unikalnych sekwencji aminokwasowych tych białek. Ogromna różnorodność β -laktamaz w połączeniu z ich częstą lokalizacją na ruchomych elementach genetycznych sprawia, że stanowią one jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla współczesnej antybiotykoterapii, która jak wspomniano, jest w dużej mierze oprata na β -laktamach (Bonomo, 2016).

Obecnie funkcjonują dwa systemy klasyfikacji β -laktamaz, które dzielą te białka na cztery grupy. Jeden z nich został oparty na homologii sekwencji aminokwasowych (klasy A-D, system Amblera), natomiast drugi na profilach substratów i inhibitorów (grupy 1-4, system Jacoby-Bush). W klasach/grupach A, C, D/1, 2, 4 zebrano enzymy z seryną w centrum aktywnym (tzw. β -laktamazy serynowe), natomiast klasa/grupa B/3 zawiera zależne od cynku metalo- β -laktamazy (Drawz i Bonomo, 2010).

β -laktamazy to bakteryjne hydrolazy, które najprawdopodobniej wyewoluowały z PBPs. Podobnie jak PBPs, rozpoznają cząsteczkę β -laktamu, a następnie znajdująca się w centrum katalitycznym seryna atakuje grupę karbonylową w pierścieniu β -laktamowym, skutkując otwarciem pierścienia i acylacją enzymu. Jednakże dzięki udziałowi cząsteczki wody, dochodzi do szybkiej deacylacji enzymu. W ten sposób zostaje uwolniony nieaktywny antybiotyk z otwartym pierścieniem β -laktamowym oraz enzym, który może wiązać kolejne cząsteczki leku (Rys. 4). Opisany wyżej ogólny mechanizm dotyczy serynowych β -laktamaz, a etapy pośrednie oraz reszty aminokwasowe pośredniczące w procesie różnią się pomiędzy poszczególnymi klasami enzymów. Natomiast odmienny mechanizm obserwuje się u metalo- β -laktamaz. W reakcji hydrolizy bierze udział grupa hydroksylowa z cząsteczki wody koordynowanej przez cynk (Drawz i Bonomo, 2010).



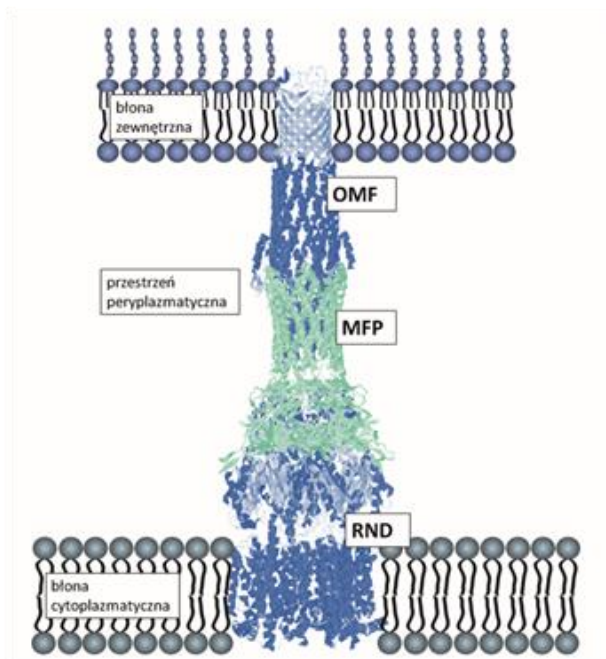
Rys. 4. Inaktywacja antybiotyku β -laktamowego katalizowana przez β -laktamazę serynową (Bondarczuk i in., 2014)

II.3.2. Zmniejszenie powinowactwa PBPs do antybiotyków β -laktamowych

Podczas gdy β -laktamazy stanowią największy problem w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie Gram-ujemne, w oporności obserwowanej u Gram-dodatnich patogenów duże znacznie kliniczne mają modyfikacje struktury PBPs, które prowadzą do obniżenia powinowactwa tych białek do cząsteczek antybiotyków. Przykładowo u opornych szczepów *S. pneumoniae* obserwuje się zmienione PBP1a, PBP2b, PBP2x i rzadziej PBP2a, natomiast *S. sanguis*, *S. oralis* oraz *S. mitis* posiadają wariant PBP2b nabyty na drodze horyzontalnego transferu genu *pbp2b* od *S. pneumoniae*. Choć obecnie wiadomo, że oporność na metycylinę wśród *Staphylococcus* spp. w tym MRSA (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) może mieć bardziej złożone podłoże, jest ona często nabywana horyzontalnie wraz z genem *mecA*, który koduje PBP2a (również oznaczane jako PBP2'). Ta transpeptydaza katalizuje sieciowanie mureiny w obecności wysokich stężeń penicylin i cefalosporyn (Zapun i in., 2008; Bonomo, 2016).

II.3.3. Usuwanie antybiotyków β -laktamowych z komórki

Kolejnym mechanizmem oporności na β -laktamy jest eksport tych antybiotyków przez białka należące do systemu efflux. Dobrze poznane systemy odpowiedzialne za oporność wielolekową (w tym na β -laktamy) u bakterii Gram-ujemnych to imponujące, trójskładnikowe kompleksy MexAB-OprM u *P. aeruginosa* oraz AcrAB-TolC u *E. coli* (Rys. 5). Funkcjonalny kompleks sięga od błony komórkowej, poprzez peryplazmę aż po błonę zewnętrzną. W błonie komórkowej zakotwiczony jest antyporter (MexB/AcrB) należący do nadrodziny RND (ang. Resistance Nodulation Cell Division), kanał w błonie zewnętrznej tworzy białko OprM/TolC z rodziny OMF (ang. Outer Membrane Factor), sięgające w głąb peryplazmy. Trzeci składnik kompleksu MexA/AcrA, przedstawiciel rodziny MFP (ang. Membrane Fusion Protein), scala oba wcześniej wymienione komponenty i uszczelnia ich połączenie. Nie wykluczono aktywnego udziału tego białka w eksporcie substratu (Murakami i Nakashima, 2002; Symmons i in., 2009). Omówione kompleksy usuwają szkodliwe substancje z peryplazmy do środowiska zewnętrznego. W ten sposób ograniczają interakcje toksyn ze składnikami komórkowymi wrażliwymi na ich działanie (tj. miejscami uchwytu antybiotyków takimi, jak PBPs).



Rys. 5. Model trójskładnikowego systemu u bakterii Gram-ujemnych (objaśnienie w tekście) (Bondarczuk i in., 2014)

II.3.4. Modyfikacja przepuszczalności osłon komórkowych

Aby antybiotyki β -laktamowe mogły wykazywać toksyczność względem bakterii, muszą pokonać barierę ściany komórkowej i zostać rozpoznane przez zakotwiczone w błonie komórkowej PBPs (Sauvage i in., 2008). Ze względu na ich hydrofilowy charakter, leki te mogą przenikać przez błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych poprzez poryny. Modyfikacja tych transbłonowych białek lub represja/obniżenie poziomu ich ekspresji to kolejny mechanizm odpowiedzialny za obniżenie wrażliwości bakterii na antybiotyki, w tym β -laktamy. Zaobserwowano go u takich patogenów, jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus rettgeri* (*Providencia rettgeri*), *Shigella dysenteriae*, i *Salmonella enterica*. Przykładowo poryna OprD to główna droga wnikania karbapenemów do komórek *P. aeruginosa*, a jej utrata skutkuje opornością tej bakterii na imipenem (Papp-Wallace i in., 2011).

II.4. Rola oczyszczalni ścieków w rozprzestrzenianiu antybiotykooporności

W ostatniej dekadzie podjęto żywą dyskusję na temat roli oczyszczalni ścieków w rozwoju i rozprzestrzenianiu oporności bakterii na antybiotyki (Bouki i in., 2013; Michael i in., 2013; Rizzo i in., 2013). Do oczyszczalni wraz z pochodzącymi z różnych źródeł ściekami (komunalnymi, szpitalnymi, przemysłowymi) dostają się antybiotyki i antybiotykooporne bakterie (ARB, ang. antibiotic-resistant bacteria). Znaczne zagęszczenie bakterii w osadzie czynnym sprzyja procesom horyzontalnego transferu genów. Z powodu obecności farmaceutyków, metali ciężkich i innych związków umożliwiających koselekcję w komorze osadu czynnego może panować presja selekcyjna faworyzująca oporność na antybiotyki (Sørensen i in., 2005; Zhang i in., 2009; Mao i in., 2015). Pomimo intensyfikacji badań, kwestia potencjalnego rozprzestrzeniania antybiotykooporności poprzez oczyszczalnie ścieków nadal pozostaje nierozwiązana. Wyniki prowadzonych w tym zakresie badań są rozbieżne, co może wynikać ze specyfiki oraz ogromnej złożoności procesów zachodzących w poszczególnych oczyszczalniach, odmiennych źródeł i charakteru ścieków, a także różnic w zastosowanych technikach

badawczych oraz w wybranych do analiz genów i grup mikroorganizmów (Christgen i in., 2015; Zhang i in., 2015). Analiza wyników uzyskanych na przełomie ostatnich lat pozwala jednak na wyłonienie pewnych ogólnych trendów, które mogą wskazać kierunek dalszych badań.

W 2015 roku ukazała się praca Mao i in. (2015), którzy monitorowali obecność ponad 20 ARGs na poszczególnych etapach procesu technologicznego oczyszczania ścieków w dwóch zakładach. Badania wykazały, że o ile porównanie ilości ARGs (qPCR, ang. quantitative polymerase chain reaction, ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy) pomiędzy oczyszczonymi a surowymi ściekami wskazuje na ich istotną redukcję, to zawartość niektórych genów w ściekach oczyszczonych oraz osadzie ściekowym łącznie przewyższa wartość początkową wprowadzoną wraz ze ściekami surowymi. Analiza liczby kopii genów na poszczególnych etapach oczyszczania ścieków wykazała, że w komorze osadu czynnego podczas napowietrzania zdecydowanie wzrasta liczba bakterii (>16S rRNA), w tym ARB oraz ARGs, natomiast największą redukcję mikroorganizmów z fazy wodnej przypisuje się sedymentacji komórek, które trafiają do osadów ściekowych w osadniku wtórnym (Li i in., 2015b; Mao i in., 2015). Mimo że najwięcej kopii ARGs (aż do 10^{11} w 1 g s. m.) obserwowano w próbach suszonego osadu ściekowego, w odprowadzanych do zbiorników wodnych ściekach oczyszczonych wartość ta była wciąż wysoka i wynosiła do 10^6 kopii w 1 ml (Mao i in., 2015). W innej pracy porównywano zawartość ARGs w ściekach oczyszczonych z zastosowaniem bioreaktorów pracujących w różnych warunkach: tlenowych, beztlenowych i ich kombinacji (Christgen i in., 2015). Choć redukcję ogólnej zawartości ARGs w ściekach obserwowano w każdych warunkach, to najmniejszy ubytek (62,6%) uzyskano podczas procesu beztlenowego. Warunki tlenowe i mieszane dawały lepsze, zbliżone efekty (82,8-85,3%), jednakże w ściekach oczyszczonych zwiększał się procentowy udział genów warunkujących oporność wielolekową (Christgen i in., 2015). Podobnie porównanie stopnia usuwania ARB i ARGs w dwóch zakładach oczyszczania ścieków w Chinach wykazało, że komora napowietrzania dawała najlepsze efekty w usuwaniu ARGs, a główną rolę w redukcji ARB odgrywały procesy fizyczne w osadnikach (Li i in., 2015b).

Analiza zjawiska antybiotykooporności w środowisku oczyszczalni, jak i w ściekach oczyszczonych, które są następnie odprowadzane do wód powierzchniowych jest niezwykle ważna, ale nie mniej istotne jest określenie losu uwalnianych ARGs i ARB

w naturalnych ekosystemach. Pozwala ono bowiem ustalić realny wpływ oczyszczalni na rozprzestrzenianie AR w środowisku.

Przeprowadzone dotąd badania nad utrzymywaniem się ARGs oraz ARB w środowiskach wodnych nie przynoszą prostej odpowiedzi. Przykładowo analiza wód Missisipi nie wykazała istotnego wpływu odprowadzania ścieków oczyszczonych na zawartość ARGs, mimo iż na badanym odcinku znajdowało się aż 14 oczyszczalni ścieków. Zaproponowany przez autorów matematyczny model przepływu wód Missisipi wyjaśnia, że główną przyczyną znikomego oddziaływania ścieków oczyszczonych na wzrost udziału ARGs w rzece jest niski udział tych ścieków w ogólnej masie wody. Ponadto model sugeruje istnienie niezdefiniowanych, innych niż rozcieńczenie, mechanizmów, które powodują znaczne obniżenie (od 75 do 831 krotne) zawartości ARGs w wodzie w porównaniu do wprowadzanych ścieków oczyszczonych (LaPara i in., 2015). Podobnie analiza wód jeziora przeprowadzona przez Li i in. (2015b) wykazała, że efekt uwalniania ARGs wraz ze ściekami oczyszczonymi maleje wraz z odległością od rur spustowych, co może być związane z rozcieńczeniem genów w zbiorniku. Natomiast analiza biofilmu tworzącego się w mniejszych ciekach wodnych w północno-wschodniej części Hiszpanii potwierdziła zwiększony udział ARGs poniżej miejsca zrzutu ścieków oczyszczonych. Ponadto wykazano, że obserwowane efekty były tym większe, im większy był udział ścieków oczyszczonych w przepływie badanych strumieni (Proia i in., 2015). Podobnie, wzrost zawartości ARGs oraz ARB w wyniku odprowadzania ścieków oczyszczonych udokumentowano w osadach rzecznych w Wielkiej Brytanii (Amos i in., 2014a; Amos i in., 2014b) oraz w wodach rzeki Huron w Stanach Zjednoczonych (Zhang i in., 2009). Co istotne, w tych ostatnich pracach badano zjawisko antybiotykooporności u bakterii z grupy coli oraz z rodzaju *Acinetobacter*. Wyniki mogą zatem wskazywać na tendencję do kumulowania ARGs w komórkach bakterii potencjalnie chorobotwórczych, które są narażone na kontakt z wyższymi stężeniami antybiotyków (Zhang i in., 2009; Amos i in., 2014a).

Liczba bakterii w tym ARB jest znacznie zredukowana w procesie oczyszczania ścieków (Li i in., 2015b). Przepuszczalnie duża część bakterii patogennych w naturalnym środowisku odbierającym ścieki oczyszczone traci swoją żywotność. Wykazano, że rozprzestrzenianie podstawowego rezystomu (ang. core resistome) obserwowanego w środowisku oczyszczalni do naturalnych środowisk wydaje się być ograniczone i w

dużej mierze jest zależne od mobilności poszczególnych genów (Munck i in., 2015). Zatem istotny problem z punktu widzenia zdrowia publicznego związany z rozprzestrzenianiem antybiotykooporności wydaje się leżeć w jednorazowym transferze nowego ARG do patogennych szczepów z puli genów bakterii środowiskowych. Raz nabyty ARG/bakteria go niosąca może się rozprzestrześć na globalną skalę, jak to miało miejsce w przypadku β -laktamazy New Delhi (Ashbolt i in., 2013). Szczególną zdolność do propagacji pomiędzy nieraz filogenetycznie odległymi bakteriami mają geny zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych (MGEs, ang. Mobile Genetic Elements).

Różnorodne ruchome elementy genetyczne niosące oporność na antybiotyki są izolowane z oczyszczalni ścieków na całym świecie. Stąd też coraz częściej o oczyszczalniach ścieków mówi się jako o kolejnych rezerwuarach genów warunkujących antybiotykooporność (Szczepanowski i in., 2009; Mao i in., 2015). Do najczęściej identyfikowanych w oczyszczalniach ścieków MGEs niosących oporność na antybiotyki należą plazmidy, integrony i transpozony. Wyniki badań wskazują, że ruchome elementy genetyczne są w znacznym stopniu eliminowane podczas procesu oczyszczania ścieków, jednakże może dochodzić do zwiększania częstości występowania MGEs w poszczególnych komórkach bakterii (Ma i in., 2013; Makowska i in., 2016).

W próbkach pochodzących z różnych etapów oczyszczania ścieków zidentyfikowano plazmidy należące do różnych grup niezgodności. Co interesujące, sekwencje plazmidów występujących w mikroflorze oczyszczalni z różnych krajów są często bardzo zbliżone lub prawie identyczne, lub też wskazują na reorganizację poznanych już plazmidów opornościowych. To wskazuje na dominację pewnych wektorów w niesieniu AR wśród bakterii związanych z tym specyficznym środowiskiem (Schlüter i in., 2007; Szczepanowski i in., 2008; Smalla i in., 2015; Bengtsson-Palme i in., 2016). Ustalono również, że spośród trzech klas integronów zaangażowanych w rozprzestrzenianie ARGs, to integrony klasy 1 są najczęściej identyfikowane u opornych bakterii. Obserwowano również większą częstość występowania tej klasy integronów w odbiornikach ścieków oczyszczonych (Aubertheau i in., 2016; Makowska i in., 2016).

W obliczu globalnego problemu szerzenia się AR wśród patogenów oraz ze świadomością, że oczyszczalnie ścieków stanowią rezerwuar ARB i ARGs, badania nad

losem ARBs i MGEs kodujących ARGs na poszczególnych etapach oczyszczania ścieków, a także w odbiornikach ścieków oczyszczonych wydają się zasadne i naglące.

II.5. Metody wykorzystywane do badania antybiotykooporności w oczyszczalniach ścieków i środowisku

II.5.1. Metody hodowlane

Techniki wykorzystywane w badaniach nad antybiotykoopornością u mikroorganizmów bytujących w oczyszczalniach ścieków i środowisku można podzielić na klasyczne metody wymagające hodowli tych drobnoustrojów (hodowlane) oraz metody niehodowlane.

Posiew mikroorganizmów na podłoża zawierające antybiotyki pozwala na szybką ocenę udziału antybiotykoopornych szczepów w danej populacji. Obecnie dostępne są selekcyjne podłoża, które ułatwiają hodowlę ściśle określonej grupy bakterii. Takie podłoża usprawniają identyfikację gatunków chorobotwórczych. Potwierdzenie fenotypu antybiotykooporności na podłożu mikrobiologicznym daje pewność, że ARGs występujące w genomach izolatów ulegają ekspresji. Możliwe jest wykrycie nieznanymi jeszcze ARGs i nie ma wątpliwości co do gospodarza genu. Ponadto uzyskanie czystych kultur szczepów opornych na antybiotyki pozwala na ich dalszą charakterystykę. Między innymi można oznaczyć profile oporności izolatów oraz najmniejsze stężenie antybiotyku hamujące wzrost drobnoustroju (ang. MIC, minimal inhibitory concentration). Do tego celu wykorzystuje się jedną z wymienionych technik: krążkowo-dyfuzyjną, seryjnych rozcieńczeń (w podłożu płynnym lub stałym), E-test lub techniki zautomatyzowane. Metoda krążkowo-dyfuzyjna polega na nanoszeniu bibułowych krążków nasączonych antybiotykiem na płytkę z podłożem, na które uprzednio posiano badany szczep. Miarą wrażliwości szczepu jest strefa zahamowania wzrostu wokół krążka obserwowana po okresie inkubacji (wielkość strefy zahamowania wzrostu koreluje z wartością MIC). W kolejnej technice seryjnych rozcieńczeń stosuje się zestaw podłoży płynnych lub stałych, które zawierają określone stężenia antybiotyków. W przeciwieństwie do tej metody, E-test umożliwia określenie wartości MIC na pojedynczej płytce. Jest to możliwe, gdyż na szalce z posianym szczepem umieszcza się pasek nasączony gradientem stężeń danego antybiotyku. Linia strefy zahamowania wzrostu sygnalizuje wartość MIC.

Dostępne są również automatyczne systemy do oznaczania lekowrażliwości takie, jak Vitek2 czy MicroScan® WalkAway (Bouki i in., 2013; Rizzo i in., 2013; Bajaj i in., 2016). Określenie profilu antybiotykooporności szczepu pozwala na wytypowanie potencjalnych ARGs warunkujących obserwowaną cechę, które następnie mogą być wykrywane techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction) czy Southern blot.

II.5.2. Metody niehodowlane

Podstawowym ograniczeniem metod hodowlanych jest fakt, że zdolność do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych wykazuje tylko 1% mikroorganizmów środowiskowych. Rozwiązaniem tego problemu może być ominięcie etapu hodowli mikroorganizmów i analiza materiału genetycznego izolowanego bezpośrednio z pobranych próbek. Dlatego aby uzyskać pełniejszy obraz danego środowiska, konieczne jest zastosowanie także metod niehodowlanych.

Etapem, który w tego typu metodach przysparza sporo trudności jest uzyskanie odpowiedniej koncentracji i czystości kwasów nukleinowych. Wyizolowany metagenomowy DNA jest najczęściej wykorzystywany jako matryca w różnych odmianach metody PCR. Stosuje się startery flankujące znane ARGs lub sondy hybrydujące do znanych ARGs i wykrywa jakościowo lub ilościowo w analizowanym materiale. Często stosowana technika qPCR dostarcza wartościowych danych na temat zmian liczby kopii ARGs na poszczególnych etapach oczyszczania ścieków (Rizzo i in., 2013).

Od kilku lat coraz większym zainteresowaniem cieszy się sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. next generation sequencing). Sekwencjonowaniu poddaje się całe metagenomy lub plazmidowe metagenomy izolowane z różnych etapów oczyszczania ścieków i odbiorników ścieków oczyszczonych. W ten sposób można monitorować ARGs i MGEs w procesie oczyszczania ścieków oraz śledzić ich los w środowisku. Ograniczeniem NGS jest uzyskiwanie krótkich odczytów sekwencji, zależność tej metody od PCR (powielanie ograniczeń tej metody, łącznie ze zwielokrotnionym namnażaniem bardziej popularnych w środowisku sekwencji), możliwość identyfikacji tylko znanych genów, a także problem z przypisaniem genów do organizmów, z których pochodzą (Bengtsson-Palme i in., 2014; Li i in., 2015a; Bengtsson-Palme i in., 2016; Ellington i in., 2016).

Metodą, która pozwala na badanie MGEs niosących ARGs jest egzogenna izolacja plazmidów. Można ją przeprowadzić na drodze koniugacji dwu- lub trójskładnikowej pomiędzy aktywną, badaną mikroflorą (dawcy) a odpowiednio dobranym biorcą plazmidów. Innym sposobem jest izolacja plazmidów z badanej próbki, a następnie wprowadzenie ich do biorcy za pomocą transformacji. Zaletą tej metody jest pozyskanie funkcjonalnych plazmidów opornościowych, na których można zidentyfikować nowe ARGs. Posiadanie naturalnych plazmidów R pozwala na poznanie ich rzeczywistej biologii i ekologii. Jednakże i w tym wypadku, nie uzyskuje się informacji o mikroorganizmie, z którego pochodzi wektor. Dużym ograniczeniem jest konieczność wyboru biorcy plazmidów – w zależności od zastosowanego szczepu wyizolujemy tylko te wektory, które mogą się replikować i ulegać ekspresji w komórce gospodarza (Schlüter i in., 2007; Riber i in., 2014; Adamczuk i in., 2015; Smalla i in., 2015).

III. CEL PRACY

Szerząca się antybiotykooporność stawia pod znakiem zapytania przyszłość wielu terapii. Wyniki badań ostatnich lat wskazują, że oczyszczalnie ścieków mogą przyczyniać się do rozprzestrzeniania mikroorganizmów opornych na antybiotyki, a także ułatwiają kontakt bakterii patogennych i środowiskowych. Wciąż niejasny pozostaje los antybiotykoopornych bakterii oraz genów warunkujących antybiotykooporność w środowiskach otrzymujących ścieki oczyszczone. Dlatego celem badań było określenie losu tych genów i bakterii na poszczególnych etapach oczyszczania ścieków w oczyszczalni ścieków w Żywcu oraz w odbiorniku pochodzących z tego zakładu ścieków oczyszczonych – Jeziorze Żywieckim. W pracy w sposób szczególny skupiono się na oporności bakterii na β -laktamy, które są obecnie najczęściej wykorzystywaną grupą substancji przeciwdrobnoustrojowych, a z drugiej strony oporność na tę klasę antybiotyków stanowi poważny problem w leczeniu infekcji.

Badania obejmowały:

1. Oznaczenie liczebności hodowlanych frakcji mikroorganizmów w badanych środowiskach
2. Izolację i wstępną charakterystykę plazmidów niosących oporność na β -laktamy
3. Oznaczenie bioróżnorodności zespołów bakterii oraz genów warunkujących antybiotykooporność w metagenomach badanych środowisk.

IV. MATERIAŁY I METODY

IV.1. Materiały

Jeziro Żywieckie (Zbiornik Tresna) to największy (10 km²) i najwyżej położony zbiornik zaporowy utworzony w kaskadzie rzeki Soły. Jego najważniejsze funkcje są związane z magazynowaniem wody, przejmowaniem fali powodziowej i wyrównywaniem poziomu wód w rzece poniżej zapory. Ponadto w okresie letnim jezioro jest intensywnie wykorzystywane w celach rekreacyjnych, jako kąpielisko oraz do sportów wodnych. Występowanie w zbiorniku ryb przyczyniło się również do popularyzacji indywidualnego wędkarstwa. Położony najniżej w kaskadzie Soły zbiornik w Czańcu stanowi rezerwar wody pitnej dla mieszkańców Bielska-Białej i Górnego Śląska (Chylak i Kulikowski, 2009).

Podstawowe znaczenie dla ochrony Jeziora Żywieckiego ma oczyszczalnia ścieków w Żywcu, należąca do Miejskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów i Kanalizacji Sp. z o. o. Zakład odbiera ścieki z siedmiu gmin powiatu żywieckiego (Żywiec, Gilowice, Jeleśnia, Koszarawa, Lipowa, Łodygowice, Radziechowy-Wieprz). Dopuszczalne obciążenie oczyszczalni ładunkiem zanieczyszczeń wynosi 209 366 RLM (równoważna liczba mieszkańców), a maksymalny przepływ 42 tys. m³/dobę. Zastosowano w niej metodę mechaniczno-biologiczną z usuwaniem biogenów. Pierwszy etap procesu mechanicznego to usuwanie kamieni, żwiru i piasku oraz odfłuszczenie. Następnie ścieki odprowadza się do osadnika pierwotnego, skąd trafiają do reaktorów C-Tech i są oczyszczane biologicznie metodą osadu czynnego. Jednocześnie fosfor jest strącany siarczanem żelaza. Na ostatnim etapie w dekanterach pozostaje osad, a ścieki oczyszczone wpływają do Jeziora Żywieckiego (<http://www.mpwik-zywiec.pl/uslugi/ochrona-srodowiska/oczyszczalnia-sciekow.html>).

Materiał do badań stanowiły próbki ścieków surowych, osadu czynnego i ścieków oczyszczonych z oczyszczalni ścieków w Żywcu, a także próbki wód i osadów z Jeziora Żywieckiego. Kontrolę stanowiły próbki wód i osadów ze Soły pobrane na odcinku przy ujściu tej rzeki do jeziora.

Próbki z oczyszczalni ścieków dzięki uprzejmości Zarządu MPWiK otrzymywano przez 3 kolejne lata (2013-2015). Do wstępnego etapu badań (2013 rok) wykorzystano

próbki ścieków surowych oraz osadu czynnego. W kolejnych dwóch latach otrzymywano dodatkowo próbki ścieków oczyszczonych. W sezonie letnim 2014 i 2015 pobierano próbki wód i osadów z Soły i Jeziora Żywieckiego (Rys. 6). Próbki wody z głębokości do 20 cm czerpano za pomocą sterylnych butelek z gwintem; do pozostałych wykorzystano specjalnie do tego celu przygotowany czerpak otwierany na odpowiedniej głębokości i umożliwiający sterylne pobranie próbek. Próbki osadu pobierano do sterylnych probówek typu falcon. Schemat poboru próbek oraz ich skrótowe oznaczenia umieszczono w Tabeli 1. Próbki pobierano w trzech powtórzeniach.



Rys. 6. Jezioro Żywieckie. Miejsca poboru próbek zaznaczono gwiazdkami. Kolor czerwony – próbki osadów z jeziora, niebieski – wód z jeziora, żółty – osadów i wód z rzeki

Tabela 1. Schemat poboru próbek w latach 2013-2015. Skróty: nd – nie dotyczy

Rok poboru próbek	Rodzaj próby	Oznaczenie próby	Objętość pojedynczej próbki (l)	Głębokość poniżej lustra wody (m)
2013	ścieki surowe	SŚ	5	nd
	osad czynny	OCZ	5	nd
2014	ścieki surowe	SŚ	5	nd
	osad czynny	OCZ	5	nd
	ścieki oczyszczone	ŚO	5	nd
	jezioro woda	JW	1	0,2
	jezioro osad	JO	0,05	nd
	rzeka woda	SŁW	1	0,1
	rzeka osad	SŁO	0,05	nd
2015	ścieki surowe	SŚ	5	nd
	osad czynny	OCZ	5	nd
	ścieki oczyszczone	ŚO	5	nd
	jezioro woda	JW	1	1,5
	jezioro osad	JO	0,05	nd
	rzeka woda	SŁW	1	0,1
	rzeka osad	SŁO	0,05	nd

IV.2. Metody

IV.2.1. Oznaczanie liczebności hodowlanych frakcji mikroorganizmów metodą płytkową w badanych próbkach i izolacja szczepów opornych na ampicylinę

Liczebność hodowlanych frakcji bakterii oznaczono metodą płytek tartych. W celu oszacowania ogólnej liczebności bakterii heterotroficznych wykorzystano podłoże LA (1% NaCl, 1% pepton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 15% agar, BTL). Natomiast do określenia liczebności bakterii Gram-ujemnych użyto agaru MacConkeya (BTL). Liczebność hodowlanych frakcji antybiotykoopornych bakterii oznaczono na wyżej wymienionych podłożach z dodatkiem ampicyliny (100 µg/ml). W celu zahamowania wzrostu grzybów do pożywek dodawano nystatynę (50 µg/ml).

Po 10 g osadu z rzeki lub jeziora dodawano do 90 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej i wytrząsano (120 rpm) przez 30 min. Natomiast pozostałe próbki (wód Soły i jeziora, ścieków surowych i oczyszczonych oraz osadu czynnego) zagęszczano poprzez odwirowanie (1 litr), a otrzymane osady zawieszano w 10 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej. Ze względu na uzyskiwanie dużej objętości biomasy, osad czynny zawieszano w 50 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej. Przygotowane zawiesiny użyto do sporządzenia szeregów rozcieńczeń. Posiewy na odpowiednie podłoża wykonywano z 5 wybranych rozcieńczeń w 5 powtórzeniach. Płytki inkubowano w 28°C do 7 dni.

Wyniki z powtórzeń technicznych uśredniano, a uzyskane w ten sposób średnie dla powtórzeń biologicznych wykorzystywano do analiz statystycznych (n=3). Liczbę bakterii podawano w przeliczeniu na 1 ml wody lub 1 g suchej masy osadu, a końcowy wynik wyrażono jako $\log jtk\ ml^{-1}$ lub $\log jtk\ g\ s.\ m^{-1}$, gdzie jtk oznacza liczbę jednostek tworzących kolonie.

Uzyskane klasyczną metodą czyste kultury bakterii opornych na ampicylinę zostały zamrożone z dodatkiem 15% glicerolu i przechowywane do dalszych analiz w temperaturze -80°C.

IV.2.2. Oznaczanie liczby kopii genu 16S rRNA w badanych próbkach

Metagenomowy DNA z próbek osadów i wody (pobór próbek lato 2015) izolowano za pomocą zestawów PowerSoil[®] DNA Isolation Kit i PowerWater[®] DNA Isolation Kit (Mo Bio) według dołączonych protokołów. Jakość wyizolowanego DNA sprawdzano elektroforetycznie.

Liczbę kopii genu 16S rRNA oznaczano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR). Do tego celu użyto starterów zaprojektowanych przez Edwardsa i in. (1989) pE (5'-AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG-3') i pF' (5'-ACG AGC TGA CGA CAG CCA TG-3') (Edwards i in., 1989). Do kontroli negatywnych zamiast DNA dodawano ultraczystą wodę. Odpowiednie rozcieńczenia wyizolowanego DNA zostały użyte do reakcji qPCR (20 µl) o składzie: 2 µl matrycowego DNA, 10 µl 2x stężonego FastStart Essential DNA Green Master (Roche), 0,5 µM starterów pE i pF, 6 µl sterylnej, ultraczystej wody. Program uwzględniał wstępną denaturację (95°C, 10 min) i 28 cykli obejmujących denaturację (95°C, 10 s), przyłączanie starterów (57°C, 20 s) i elongację (72°C, 30 s). Zastosowany FastStart Essential DNA Green Master (oprócz polimerazy Taq i koniecznych do jej aktywności składników) zawiera również barwnik SYBR Green I, specyficznie łączący się z dwuniciowym DNA. Sygnał emisji fluorescencji wzrasta ze wzrostem stężenia produktu PCR i jest zbierany przez urządzenie (Light Cycler[®]96, Roche).

Liczbę kopii genu 16S rRNA wyznaczono metodą względną na podstawie krzywej przygotowanej ze standardu (produkt reakcji PCR wklonowany w wektor pTZ57R/T), którą analizowano jednocześnie z próbkami. Uzyskane wyniki przeliczano za pomocą narzędzia Light Cycler[®]96 Software oraz arkuszy kalkulacyjnych Microsoft[®] Excel 2013.

IV.2.3. Amplifikacja fragmentu genu 16S rRNA

W celu sprawdzenia, czy preparat DNA zawiera inhibitory reakcji PCR przeprowadzono wstępną amplifikację zmiennego fragmentu (V3-V5) genu 16S rRNA z użyciem pary starterów MF341 (5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') (Muyzer i in., 1993; Muyzer i Smalla, 1998) i MR907 (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') (Ishii i in., 2000), której długość produktu wynosi 570 pz.

W objętości 25 μ l przeprowadzano reakcje o składzie: 1 μ l matrycowego DNA, 2,5 μ l 10 x stężonego buforu, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M każdego ze starterów, 1 U polimerazy DNA Taq, 17,8 μ l ultraczystej wody. Program uwzględniał wstępną denaturację (94°C, 5 min) i 35 cykli obejmujących denaturację (94°C, 20 s), przyłączanie starterów (56°C, 20 s) i elongację (72°C, 30 s). Końcową elongację (72°C) prowadzono przez 5 min (Pacwa-Płociniczak i in., 2016). W kontroli negatywnej zamiast matrycowego DNA stosowano ultraczystą wodę. Kontrola pozytywna zawierała genomowy DNA *E. coli* DH5 α . Produkty reakcji PCR analizowano elektroforetycznie w obecności odpowiedniego markera wielkości (2% żele agarozowe).

IV.2.4. Detekcja genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe metodą PCR-DGGE

Detekcji genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe dokonano za pomocą metody opartej na PCR, opracowanej przez Szczepanowskiego i współpracowników (2009).

Odwirowano 500 ml próbek ścieków surowych oraz osadu czynnego (4 700 rpm, 15 min). Z uzyskanej biomasy za pomocą zestawu Zymo Research Soil Microbe DNA MiniPrepTM izolowano metagenomowy DNA według dołączonego protokołu. Jakość DNA sprawdzano elektroforetycznie. Uzyskany DNA wykorzystano w reakcji PCR o składzie: 2-4 μ l matrycowego DNA, 2,5 μ l 10 x stężonego buforu, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μ M każdego ze starterów, 1 U polimerazy DNA Taq, 13,3-15,3 μ l ultraczystej wody. Program uwzględniał wstępną denaturację (94°C, 4 min) i 35 cykli obejmujących denaturację (94°C, 1 min), przyłączanie starterów (58°C, 1 min) i elongację (72°C, 45 s). Końcową elongację (72°C) prowadzono przez 10 min (Szczepanowski i in., 2009). Zestaw badanych genów i sekwencje wykorzystanych starterów zebrano w Tabeli 2. Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie (4% żele agarozowe). Jako kontrolę pozytywną reakcji prowadzono ampifikację genu *bla_{TEM-1}* na matrycy plazmidu pBR322. Do kontroli negatywnej zamiast matrycowego DNA dodawano sterylnej, ultraczystej wody.

Tabela 2. Geny warunkujące oporność na antybiotyki β -laktamowe identyfikowane metodą PCR. Skrót: Amp – ampicylina, Atm – aztreonam, Car – karbenicylina, Caz – ceftazydym, Cro – ceftriakson, Ctx – cefotaksym, Cxm – cefuroksym, Fep – cefepim, Kf – cefalotyna, Mez – mezlocylina, Pen-G – penicylina G, Prl – piperacylina, Tic – tykarcylina (za: Szczepanowski i in., 2009)

Nazwa genu	Sekwencje starterów (F, R)	Długość produktu	Klasyfikacja kodowanej β -laktamazy	Spektrum substratów rozpoznawanych przez enzym
<i>ctx-m-4</i>	GGAGAAAAGTTCGGGAGGTC GCTTATCGCTCTCGCTCTGT	155	Klasa A	Amp, Ctx, Cxm, Atm
<i>bla_{TEM-1}</i>	CATTTTCGTGTCGCCCTTAT GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT	167	Klasa A	Amp, Pen-G
<i>imp-2</i>	CGGTTTGGTGGTTCTTGTA ATTCAGATGCATACGTGGGA	200	Klasa B	Amp, Ctx, Fep
<i>imp-5</i>	GTGGAACGCGGCTATAAAAT TAGCCAATAGCTAGCTCCGC	186	Klasa B	Amp, Ctx, Fep
<i>imp-13</i>	AGGAGCGGCTTTACCTGATT CGCTCCACAAACCAATTGAC	198	Klasa B	Cxm, Caz, Ctx, Cro, Fep, Amp
<i>amp^C</i>	CCTCTTGCTCCACATTTGCT ACAACGTTTGCTGTGTGACG	189	Klasa C (cefalosporynaza)	Pen-G, Amp, cefalosporyny
<i>bla_{nps-2}</i>	GGACCATCGTCATCGAGTCT ATTCGCAATCGAATACTGGG	192	Klasa D	Amp
<i>oxa-46</i>	ATGGCAATCCGATTCTTCAC ACGTTTCGTCTGCAATAACGA	150	Klasa D	Amp, Car, Mez, Kf
<i>oxa-50</i>	CGAACGTACCGGTCTACCA GGAATGGCAATTCTCCCTG	198	Klasa D	Amp, Tic, Ctx, Prl, Kf, Cxm
<i>oxa-75</i>	CGCTTCCATTTAGCCAAAAA AAGTTAAGGGAGAACGCTACAA	181	Klasa D	Amp, Prl

Reakcje PCR, dla których uzyskano specyficzne produkty powtórzono w objętości 50 μ l, tym razem startery F zawierały klamrę GC (5'CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCCG sekwencja startera F 3'). Zawartość poszczególnych składników reakcji proporcjonalnie zwiększono, a amplifikację prowadzono w warunkach jak uprzednio. Uzyskane produkty analizowano elektroforetycznie w żelach agarozowych, a następnie użyto do przeprowadzenia elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE, ang. denaturing gradient gel electrophoresis). W tym celu przygotowano 10% żel poliakrylamidowy zawierający mieszaninę mocznika i formamidu stanowiącą czynnik denaturujący o gradiencie stężenia wynoszącym od 35% do 65%. Elektroforezę prowadzono w buforze 1 \times TAE w temperaturze 60°C przez 30 minut przy napięciu 200 V, a następnie przy napięciu 80 V przez 17 godzin (DCode Universal Mutation Detection System, Bio-Rad). Po zakończonej elektroforezie, żel barwiono SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain zgodnie z zaleceniami producenta i analizowano w transilluminatorze Gel Doc[™] XR+ (Bio-Rad).

IV.2.5. Analiza elektroforetyczna DNA

Żele agarozowe (Prona) wybarwiano Midori Green (Nippon Genetics). Przy nakładaniu próbek DNA korzystano z barwnika obciążającego firmy Thermo Scientific. Wykorzystywano następujące markery wielkości: Lambda DNA/HindIII Marker 2 (λ /HindIII), GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder, O'GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder, O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific). Rozdział elektroforetyczny DNA przeprowadzano w aparatach Mini-Sub[®] Cell GT Cell, Wide Mini-Sub Cell GT Cell, Sub-Cell[®] GT Cell (Bio-Rad). DNA wizualizowano w transilluminatorze Gel Doc[™] XR+ (Bio-Rad), a wyniki dokumentowano za pomocą programu Image Lab.

IV.2.6. Izolacja metagenomowego DNA do sekwencjonowania nowej generacji

Próbki ścieków oczyszczonych oraz wód z rzeki i jeziora pobierano w trzech powtórzeniach. Następnie powtórzenia dla danego środowiska mieszano w równych proporcjach, tworząc reprezentatywne próbki. Natychmiast po przetransportowaniu do laboratorium próbki zwirowano w celu oddzielenia większych cząstek (1 000 x g, 5 min, 4°C). Następnie przefiltrowano po 100, 250 i 500 ml tych próbek (Sartorius, 0,45 μ m),

po czym filtry zamrożono w -80°C . Filtry wykorzystano do izolacji metagenomowego DNA za pomocą zestawów Metagenomic DNA Isolation Kit for Water (Epicentre[®]) oraz PowerWater[®] DNA Isolation Kit (Mo Bio) według protokołów dostarczonych przez producentów.

Jakość wyizolowanego metagenomowego DNA sprawdzano za pomocą elektroforezy agarozowej oraz poprzez przeprowadzenie amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA z metagenomowym DNA jako matcowym DNA. Czystość uzyskanych preparatów DNA oznaczano spektrofotometrycznie (NanoDrop, Thermo Scientific), szacując stosunek absorbancji mierzonej przy długościach fali 260 i 280 nm.

Stężenie metagenomowego dsDNA mierzono fluorymetrycznie (QuantiFlour[™], Promega) w obecności barwnika Quant-It[™] PicoGreen[®] dsDNA (Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Kit, Invitrogen) według załączonego protokołu.

IV.2.7. Sekwencjonowanie nowej generacji

Dobrej jakości próbki metagenomowego DNA zostały wysłane do sekwencjonowania nowej generacji (Genomed, Warszawa). DNA pofragmentowano przy pomocy urządzenia Covaris E210. Do przygotowania bibliotek wykorzystano zestaw NEBNext[®] DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina[®], zgodnie z protokołem producenta. Trzy próbki (SŁW, JW, ŚÓ) zsekwencjonowano na jednej ścieżce urządzenia Illumina HiSeq 4000 w technologii parowanych końców (ang.: paired-end; PE), 2x101nt. Jakość uzyskanych odczytów analizowano oprogramowaniem FastQC, natomiast sekwencje adaptorowe usunięto w programie Trimmomatic (wersja 0.32).

IV.2.8. Obróbka bioinformatyczna plików z odczytami sekwencji

Oba odczyty sekwencji z danej próby uzyskano w postaci dwóch odrębnych plików w formacie .fastq. Jakościowe filtrowanie sekwencji przeprowadzono za pomocą skryptu w języku PERL PE_READ_PREPARE.pl według domyślnych ustawień (Manojkumar Sumathiselvaraju) dostępnego w pakiecie Velvet (wersja 1.2.10, Zerbino i Birney, 2008). Z użyciem tego samego skryptu przygotowano pliki w formacie Multi-FASTA, które posłużyły do dalszych analiz.

IV.2.9. Oznaczenie bioróżnorodności mikroorganizmów w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wodach jeziora i rzeki na podstawie sekwencji 16S rRNA

Do oznaczenia bioróżnorodności w badanych metagenomach wykorzystano pakiet Metaxa2 (wersja 2.1.3; Bengtsson-Palme i in., 2015b). Za pomocą Metaxa2 wyodrębniono sekwencje odpowiadające sekwencjom małej podjednostki rybosomowej, a następnie wyłonione sekwencje klasyfikowano do odpowiednich jednostek taksonomicznych. Poszczególne taksony zliczono przy użyciu Metaxa2 Taxonomic Traversal Tool, a pliki wynikowe z tego narzędzia posłużyły do utworzenia wspólnych matryc z danymi dla wszystkich analizowanych metagenomów z wykorzystaniem Metaxa2 Data Collector. Krzywe rarefakcji dla 7 kategorii taksonomicznych (1 = domena, 2 = typ, 3 = klasa, 4 = rząd, 5 = rodzina, 6 = rodzaj, 7 = gatunek) otrzymano w programie Metaxa2 Rarefaction Analysis. Porównania składu populacji między poszczególnymi próbkami dokonano za pomocą Metaxa2 Uniqueness of Community Analyzer. Do tego celu wykorzystano metodę ilościową Bray-Curtisa (Bray-Curtis dissimilarity). Wymienione programy do tworzenia krzywych rarefakcji oraz do porównania składu populacji stosują repróbkiowanie.

Do porównania udziału poszczególnych taksonów między metagenomami liczbę sekwencji genu 16S rRNA w danej próbce przeliczano na liczbę wszystkich sekwencji dobrej jakości uzyskanych dla tej próbki i mnożono razy 1 000 000 (16S rRNA/1 mln odczytów).

W celu oceny bioróżnorodności zespołów bakterii zasiedlających badane środowiska w analizowanych metagenomach wyznaczono: indeks Shannona (H'), maksymalną wartość indeksu Shannona ($H' \max$), niedostatek równocенności – wyrażona w procentach wartość wypełnienia strukturalnych możliwości zbiorowiska (Vd), indeks MacArthura – liczba taksonów w zbiorowisku, dla którego dany indeks przyjąłby wartość maksymalną (E), a także wyrażony w procentach niedostatek bogactwa taksonów (Ps) (Chomczyńska i in., 2011).

IV.2.10. Oznaczenie genów warunkujących oporność na antybiotyki w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wodach jeziora i rzeki

Uzyskane sekwencje tłumaczono na sekwencje aminokwasowe i porównywano z sekwencjami białek warunkujących oporność na antybiotyki zebranymi w bazie danych CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database, wersja 1.1.5; Jia i in., 2016). Dodatkowo z danych dostępnych w bazie Protein NCBI przygotowano bazę sekwencji aminokwasowych integraz 1 klasy zidentyfikowanych w genomach plazmidowych (*intI1*).

Porównań dokonywano za pomocą pakietu Vmatch (Kurtz, 2016; <http://www.vmatch.de/>; wersja 2.2.5). Bazy sekwencji w formacie multi-FASTA indeksowano programem Mkvtree, a następnie porównywano z sekwencjami (query) badanych metagenomów. Program Vmatch najpierw tłumaczył sekwencje metagenomowego DNA na sekwencje białkowe, używając kodonów bakteryjnych (funkcja -dnasprot 11), a następnie porównywał je z sekwencjami aminokwasowymi w zindeksowanych bazach sekwencji CARD lub *intI1*. Minimalną długość dopasowania sekwencji wyznaczono na 20 aminokwasów przy minimum 90% identyczności, zezwalając na maksymalnie 2 niesparowane aminokwasy (opcje -l 20 -identity 90 -h 2).

Aby móc porównywać udział ARGs pomiędzy próbkami, liczbę uzyskanych ARGs dla danej próbki przeliczano na liczbę genów 16S rRNA zidentyfikowanych w tej próbce.

IV.2.11. Izolacja plazmidowego DNA

IV.2.11.1. Izolacja plazmidowego DNA na małą skalę

Odwirowywano 4 ml nocnej hodowli bakterii (12 000 rpm, 22°C, 30 s), a komórki zawieszano w 100 µl roztworu I (50 mM Tris/HCl o pH 8,0, 10 mM EDTA). Następnie dodawano 200 µl roztworu II (1% SDS, 0,2 M NaOH) i prowadzono lizę przez 5 min. Mieszaninę neutralizowano 150 µl 3M octanu potasu (pH 5,3), po czym odwirowywano (12 000 rpm, 4°C, 15 min). Pobrany supernatant ekstrahowano 1 objętością mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (ROTI®-Phenol, Carl Roth). DNA wytrącano 0,6 objętości izopropanolu, a po zwirowaniu (12 000 rpm, 22°C, 5 min) osad przepłukiwano 70% etanolem. Po osuszeniu osad zawieszano w 50 µl buforu TE z RNazą (2 µl RNazy A

(10 mg/ml) na 1 ml TE) i inkubowano przez 15 min w 37°C. RNazę inaktywowano w temp. 80°C przez 20 min.

IV.2.11.2. Egzogenna izolacja plazmidowego DNA na drodze koniugacji

W przeprowadzanej koniugacji bakterie obecne w pobranych próbkach wód, ścieków i osadów stanowiły dawców plazmidów. Hodowlę komórek biorcy (*E. coli* Rif^R) w fazie logarytmicznego wzrostu mieszano z równą objętością świeżo pobranych próbek wody, ścieków lub osadów. Biomasę odwirowywano, zawieszano w pożywce LB i inkubowano przez noc bez wytrząsania. Następnie odpowiednie rozcieńczenia mieszaniny koniugacyjnej wysiewano na podłoże zawierające odpowiednie czynniki selekcyjne (50 µg/ml rifampicyny, 100 µg/ml ampicyliny). Dodatkowo w celu zahamowania wzrostu grzybów do podłoża dodawano nystatynę (50 µg/ml).

IV.2.11.3. Egzogenna izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

Izolację plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej przeprowadzano bezpośrednio z próbek środowiskowych oraz z hodowli wzbogaconych (podłoże LB z dodatkiem ampicyliny i nystatyny zaszczipiano badaną próbą). Po 25 ml próby lub hodowli wzbogaconej odwirowywano (12 000 rpm, 4°C, 10 min), a komórki zawieszano w 1,8 ml roztworu I (50 mM Tris/HCl o pH 8,0, 10 mM EDTA, lizozym 5 mg/ml) i inkubowano przez 60 min w 30°C. Następnie po dodaniu 3,6 ml roztworu II (1% SDS, 0,2 M NaOH) prowadzono lizę w łaźni lodowej przez 5 min. Mieszaninę neutralizowano 2,7 ml 3M zimnego octanu potasu (pH 5,3), po czym kontynuowano inkubację w łaźni lodowej przez kolejne 5 minut. Po odwirowaniu (12 000 rpm, 4°C, 10 min) supernatant przenoszono do świeżych gilz i próbki ekstrahowano najpierw 1 objętością mieszaniny fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (ROTI[®]-Phenol, Carl Roth), a następnie 1 objętością chloroformu. DNA wytrącano 2 objętościami 96% etanolu, a po zwirowaniu (12 000 rpm, 22°C, 10 min) osad przepłukiwano 70% etanolem. Po osuszeniu osad zawieszano w 500 µl buforu TE z RNazą (2 µl RNazy A (10 mg/ml) na 1 ml TE) i inkubowano w temperaturze 37°C przez noc. Próbki ekstrahowano 1 objętością ROTI[®]-Phenol, a następnie wytrącano DNA 1/10 objętości 3M octanu potasu i 3 objętościami 96% etanolu. Próbki inkubowano w -20°C przez godzinę i wirowano przez 30 min (12 000 rpm, 4°C). Uzyskany osad przepłukiwano 70% etanolem, suszono i zawieszano w 30-50 µl

buforu TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Wyizolowany tą metodą plazmidowy DNA wprowadzano do komórek *E. coli* DH5 α .

IV.2.12. Transformacja komórek *E. coli* plazmidowym DNA

IV.2.12.1. Przygotowanie komórek kompetentnych z użyciem chlorku rubidu

Założono płynną hodowlę biorcy poprzez zaszczepienie 50 ml podłoża LB pojedynczą kolonią *E. coli* DH5 α . Po nocnej inkubacji (130 rpm, 37°C) przeniesiono 5 ml hodowli do 100 ml pożywki SOB (20 g/l pepton, 5 g /l ekstrakt drożdżowy, 0,6 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7). Hodowlę prowadzono (160 rpm, 37°C) do momentu uzyskania gęstości optycznej mieszczącej się w zakresie 0,6-0,8 (spektrofotometr Genesys 20 Thermo Spectronic). Następnie rozdzielono ją do dwóch schłodzonych probówek typu falcon i inkubowano w łaźni lodowej przez 15 min. Probówki wirowano (2000 rpm, 15 min, 4°C, wirówka Sigma 4-16K), a uzyskaną biomasę zawieszono w 16,66 ml zimnego, sterylnego roztworu RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ x 4H₂O, 30 mM CH₃COOK, 10 mM CaCl₂x2H₂O, 15% (w/v) glicerol, ultraczysta woda do 1000 ml, pH 5,8) i inkubowano w łaźni lodowej przez 30 min. Po inkubacji komórki odwirowano jak uprzednio, a następnie każdy osad zawieszono w 4 ml zimnego roztworu RF2 (10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 73 mM CaCl₂x2H₂O, 15% (w/v) glicerol, ultraczysta woda do 1000 ml, pH 6,8), po czym kontynuowano inkubację w łaźni lodowej przez kolejne 15 min. Uzyskane w ten sposób komórki kompetentne porcjowano po 100 μ l do schłodzonych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C.

IV.2.12.2. Przygotowanie komórek kompetentnych z użyciem chlorku wapnia

Hodowlę komórek *E. coli* DH5 α lub S17-1 o odpowiedniej gęstości optycznej przygotowywano tak, jak w metodzie z chlorkiem rubidu. Następnie inkubowano ją w łaźni lodowej przez 10 min i odwirowywano (4 000 rpm, 10 min, 4°C). Biomasę zawieszano w 20 ml zimnego, sterylnego 0,1 M roztworu CaCl₂, chłodzono przez kolejne 10 min i odwirowywano jak uprzednio. Komórki zawieszano w 2 ml zimnego roztworu chlorku wapnia i porcjowano po 100 μ l do schłodzonych probówek typu Eppendorf. Kompetentne komórki natychmiast wykorzystywano do transformacji.

IV.2.12.3. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α /S17-1 metodą szoku cieplnego

Do 100 μ l kompetentnych komórek dodawano po 5 μ l próbki z wyizolowanym DNA. Po 30-minutowej inkubacji w łaźni lodowej, przeprowadzano szok cieplny (42°C, 2 min). Po tym czasie próbki ponownie umieszczano w łaźni lodowej na 2 min, a następnie do każdej z nich dodawano po 500 μ l pożywki LB lub SOC (podłoże SOB, 20 mM glukozy). Komórki namnażano (37°C, 120 rpm, 60 min), po czym odwirowywano przez 15 s przy 12 000 rpm, a osad zawieszano w 100 μ l sterylnej soli fizjologicznej. Tak przygotowaną zawiesinę wysiewano na podłoża z odpowiednimi czynnikami selekcyjnymi i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C. Jako kontrolę biocy przygotowywano dodatkową próbkę zawierającą 100 μ l komórek kompetentnych i 20 μ l sterylnej, ultraczystej wody. Jakość komórek kompetentnych sprawdzano poprzez transformację plazmidem pBR322.

IV.2.12.4. Przygotowane komórek elektrokompetentnych

500 ml podłoża LB inokulowano 5 ml nocnej hodowli *E. coli* i wytrząsano (160 rpm, 37°C) aż do uzyskania gęstości optycznej 0,5-0,7 przy długości fali 600 nm. Hodowlę chłodzono w łaźni lodowej przez 20 min i od tej pory wszystkie etapy były prowadzone w temperaturze ok. 0°C. Komórki na przemian, czterokrotnie odwirowywano (4 000 x g, 15 min) i zawieszano w malejących objętościach zimnego 10% roztworu glicerolu (odpowiednio 500 ml, 250 ml, 20 ml, 1-2 ml). Przygotowane w ten sposób komórki elektrokompetentne porcjowano po 40 μ l do probówek typu Eppendorf, zamrażano w suchym lodzie i przechowywano w -80°C.

IV.2.12.5. Elektroporacja

Do rozmrożonych w łaźni lodowej elektrokompetentnych komórek dodawano 1-2 μ l plazmidowego DNA i inkubowano 1 min, a następnie przenoszono do schłodzonych kuwet 0,2 cm. Elektroporację przeprowadzano w aparacie MicroPulser (BIO-RAD) z użyciem zdefiniowanych programów (Ec2 lub Ec3). Traktowanymi pulsem elektrycznym komórkami natychmiast inokulowano 1 ml podłoża SOC, po czym całość przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf. Komórki namnażano przez 60 min (300 rpm, 37°C),

odwirowywano i zawieszano w 100 µl sterylnego roztworu soli fizjologicznej, a następnie wysiewano na podłoże z odpowiednimi czynnikami selekcyjnymi.

IV.2.13. Charakterystyka wyizolowanych plazmidów

IV.2.13.1. Analiza restrykcyjna plazmidów

Do analizy restrykcyjnej wykorzystywano plazmidowy DNA izolowany metodą na małą skalę oraz następujące enzymy: DraI, EcoRI, HindIII, PstI, PvuI, ScaI, XbaI, XhoI (ThermoFisher Scientific). Przygotowywano mieszaniny restrykcyjne o składzie:

plazmidowy DNA	10 µl
enzym	0,5 µl
bufor	2 µl
H ₂ O	7,5 µl.

Cięcie enzymatyczne przeprowadzano w łaźni wodnej (37°C, 90 min), po czym produkty analizowano elektroforetycznie (1,5% agarozowe żele).

IV.2.13.2. Oznaczanie replikonów metodą multipleks PCR

Replikony typowano za pomocą serii reakcji PCR zaproponowanych przez Carattoli i in. (2005). Metoda ta pozwala na identyfikację replikonów występujących na plazmidach należących do najważniejszych grup niezgodności plazmidów obserwowanych u *Enterobacteriaceae*. Carattoli i in. (2005) opracowali pięć reakcji typu multipleks i trzy pojedyncze reakcje, które umożliwiają identyfikację 18 grup niezgodności: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Ig, L/M, N, P,W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F i FIIA.

W trakcie wykonywania pracy doktorskiej nie dysponowano kolekcją plazmidów należących do wszystkich badanych grup niezgodności, które służyłyby jako matrycowy DNA w kontrolach pozytywnych reakcji. W celu wykluczenia ewentualnego wpływu zanieczyszczeń w matrycowym DNA na brak produktu PCR, preparat plazmidowego DNA był najpierw wykorzystywany jako matrycowy DNA w amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA. Następnie wyniki metody PCR analizowano elektroforetycznie. Dodatkowo wybrane produkty amplifikacji fragmentów replikonów wysłano do sekwencjonowania w celu sprawdzenia specyficzności reakcji.

Jakość otrzymanych chromatogramów analizowano w programie Chromas, po czym dobrej jakości sekwencje porównano z sekwencjami w bazach danych NCBI za pomocą narzędzia BLAST.

IV.2.13.3. Oznaczenie profili lekooporności kodowanych przez plazmidy

Do oznaczenia profili lekooporności niesionych przez badane plazmidy wykorzystano paski gradientowe firmy Liofilchem®. Test przeprowadzono zgodnie z załączonym protokołem w dwóch powtórzeniach. Profile AR niesione przez plazmidy porównywano z profilem uzyskanym dla nietransformowanych komórek *E. coli* DH5 α . Sprawdzone oporność transformantów na następujące antybiotyki: amikacyna (AK), ampicylina (AMP), ceftazydym (CAZ), ciprofloksacyna (CIP), gentamycyna (CN), meropenem (MRP), kolistyna (CS).

IV.2.13.4. Oznaczenie zdolności plazmidów do transferu koniugacyjnego

Hodowle dawców (transformantów *E. coli* DH5 α niosących plazmidy opornościowe) i biorców (*E. coli* RFP Km^RRif^R) mieszano w stosunku 1:1 i wysiewano na płytki z podłożem LA. Po nocnej inkubacji komórki splukiwano i odpowiednie rozcieńczenia wysiewano na płytki z podłożem LA z dodatkiem ampicyliny (100 μ g/ml), kanamycyny (50 μ g/ml) i rifampicyny (50 μ g/ml). Dodatkowo określano miano biorcy poprzez wysianie mieszaniny koniugacyjnej na podłoże z kanamycyną i rifampicyną. Doświadczenie przeprowadzano w trzech powtórzeniach. Częstość koniugacji obliczano jako stosunek liczby wyrosłych transkoniugantów do miana biorcy. Podczas trwania doświadczenia nie zaobserwowano spontanicznych mutantów biorcy. W celu potwierdzenia przeniesienia plazmidów, z wybranych transkoniugantów izolowano plazmidowy DNA (metodą na małą skalę), który analizowano elektroforetycznie.

IV.2.13.5. Ocena mobilizowalności plazmidów

Plazmidy, które nie były zdolne do własnego transferu zostały przeniesione do komórek *E. coli* S17-1 (Tra⁺, Str^R) za pomocą szoku termicznego. Następnie przeprowadzano koniugację tych komórek z biorcą *E. coli* RFP Km^RRif^R według protokołu opisanego powyżej. Podczas trwania doświadczenia nie zaobserwowano spontanicznych mutantów biorcy.

IV.2.13.6. Oznaczanie zakresu gospodarzy plazmidów koniugacyjnych

Przeprowadzono koniugację komórek *E. coli* DH5 α niosących plazmidy zdolne do własnego transferu z *Agrobacterium tumefaciens* (RFP Km^RRif^R) według protokołu opisanego wyżej. Podczas trwania doświadczenia nie zaobserwowano spontanicznych mutantów biorcy.

IV.2.13.7. Identyfikacja elementów transpozycyjnych niosących oporność na ampicylinę za pomocą wektora pułapkowego

Do identyfikacji funkcjonalnych elementów transpozycyjnych zastosowano wektor pułapkowy pMAT1 (Km^R, kasetka selekcyjna *sacB*) (Szuplewska i Bartosik, 2009). Zlokalizowana na nim kasetka selekcyjna *sacB* koduje enzym katalizujący rozkład sacharozy do toksycznych dla bakterii lewanów. Wzrost gospodarza tego wektora na podłożu z sacharozą jest możliwy tylko w przypadku inaktywacji genu *sacB*, do której może dojść wskutek włączenia elementu transpozycyjnego lub mutacji.

Plazmid pMAT1 wprowadzono metodą z szokiem cieplnym do komórek *E. coli* DH5 α niosących badane plazmidy. Zdolne do wzrostu w obecności ampicyliny i sacharozy transformanty zmywano z podłoża i używano do izolacji plazmidów metodą na małą skalę. Tymi plazmidami transformowano kompetentne komórki *E. coli* DH5 α (komórki przygotowano metodą z chlorkiem wapnia), które następnie wysiewano na podłoże LA z ampicyliną i kanamycyną.

IV.2.14. Analiza statystyczna wyników

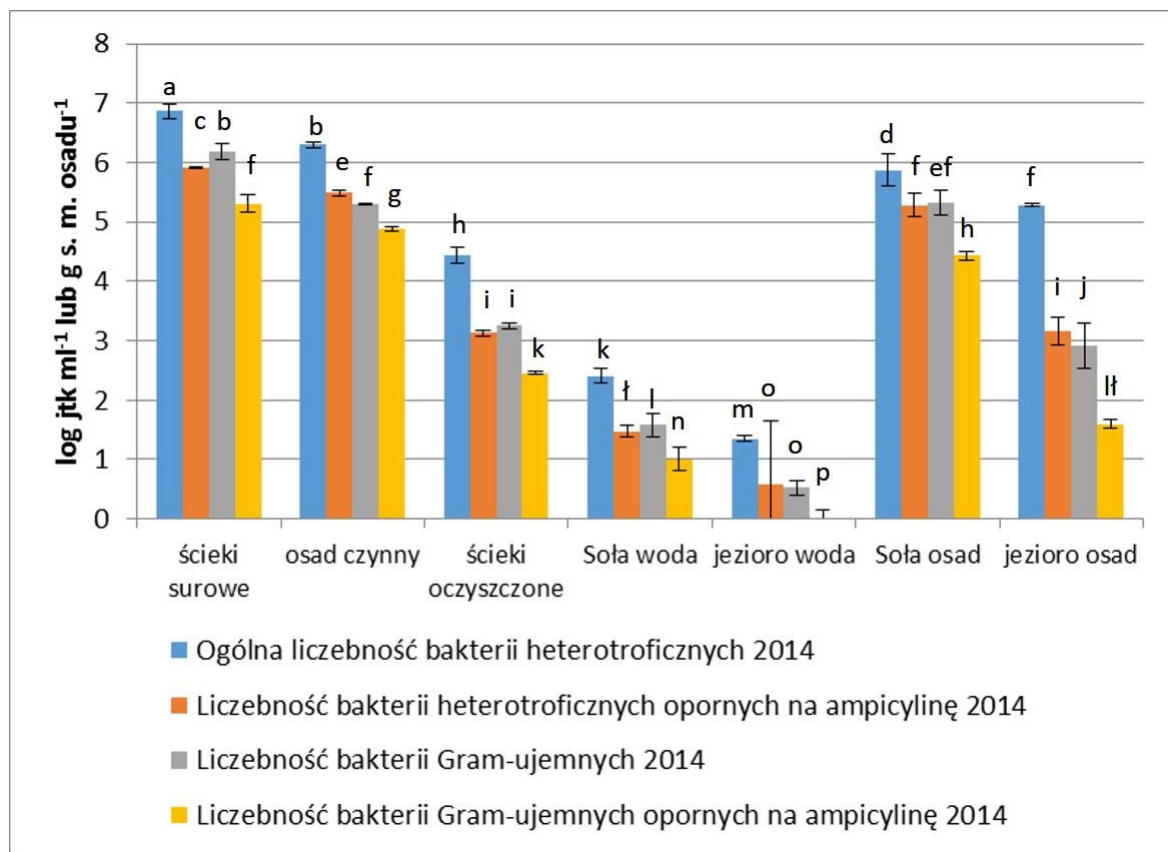
Do porównania liczby kopii genu 16S rRNA w poszczególnych próbkach (qPCR) oraz oceny liczebności hodowlanych frakcji mikroorganizmów w danym roku (metoda płytkowa), wykorzystano odpowiednio jednoczynnikową oraz dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA. Natomiast do porównania liczebności mikroorganizmów obserwowanej w latach 2014 i 2015 zastosowano trójczynnikową analizę wariancji ANOVA. Istotne statystyczne różnice ($p < 0,05$) oceniano w oparciu o test post-hoc, dokonując obliczeń najmniejszych istotnych różnic (NIR) z zastosowaniem programu STATISTICA[®] w wersji 12.0 PL. Wartości na wykresach są średnimi z trzech powtórzeń \pm odchylenie standardowe (nie dotyczy wyników sekwencjonowania nowej generacji).

Wykresy i pozostałe obliczenia wykonano z zastosowaniem arkuszy kalkulacyjnych Microsoft®Excel 2013.

V. WYNIKI

V.1. Liczebność hodowlanych frakcji bakterii w próbkach z oczyszczalni ścieków, a także wód i osadów jeziora i rzeki

Liczebność hodowlanych frakcji bakterii oznaczoną w 2014 roku przedstawiono na Rys. 7. Analiza wariancji wykazała, że za 87% zmienności pomiędzy liczebnością poszczególnych frakcji mikroorganizmów w próbkach odpowiadało środowisko. Rodzaj zastosowanego podłoża oraz dodatek antybiotyku wyjaśniają odpowiednio 5% oraz 5,5% obserwowanej zmienności. Najwyższą liczebność poszczególnych frakcji bakterii obserwowano w próbkach pochodzących z oczyszczalni ścieków, natomiast najniższą w próbkach wody z rzeki i jeziora. Stwierdzono, że zarówno ogólna liczebność bakterii, liczebność bakterii Gram-ujemnych, jak i frakcji opornych na ampicylinę były istotnie zredukowane ($p < 0,001$) w procesie oczyszczania ścieków. Ogólna liczebność bakterii heterotroficznych w ściekach oczyszczonych była mniejsza o dwa rzędy wielkości od liczebności obserwowanej w ściekach surowych i wynosiła $2,8 \times 10^4 \pm 8,6 \times 10^3$ jtk ml⁻¹. Liczebność wszystkich badanych hodowlanych frakcji bakterii była istotnie statystycznie wyższa w osadach Soły niż w osadach jeziora. Podobną sytuację obserwowano w przypadku próbek wody Soły i jeziora.

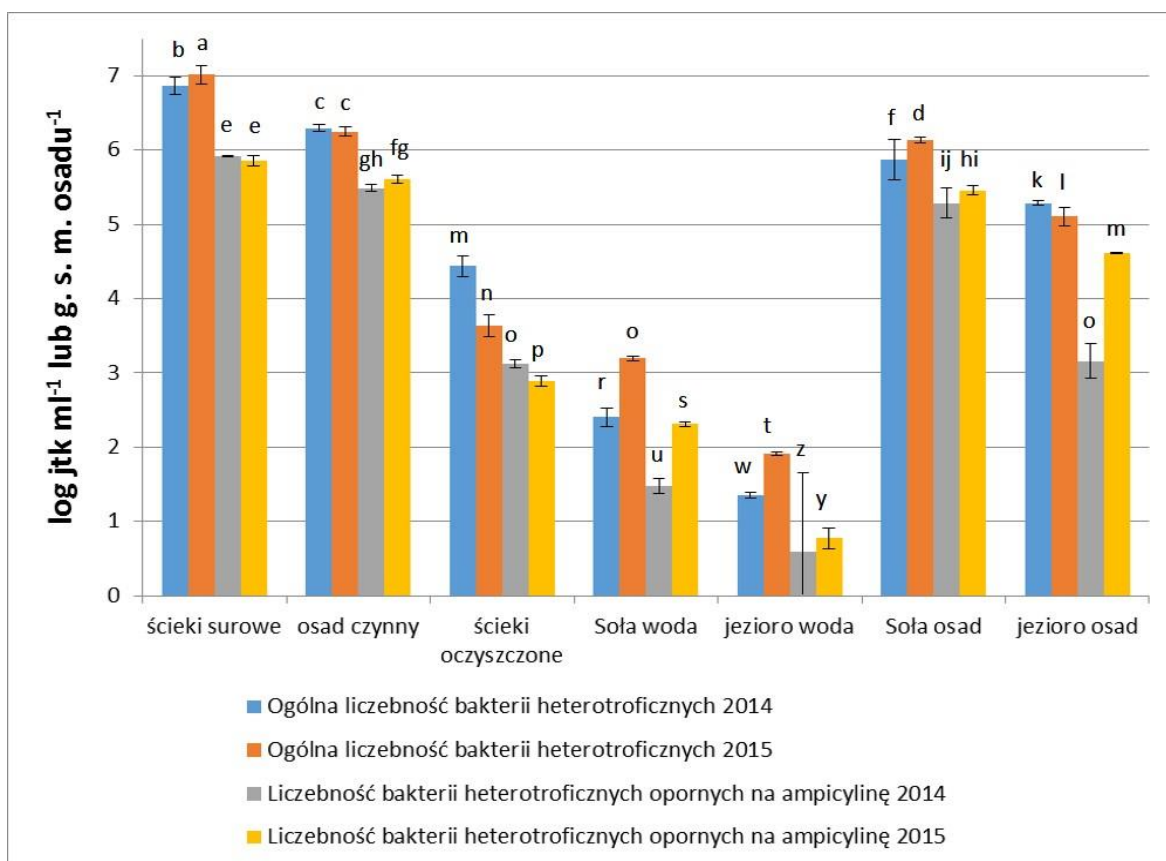


Rys. 7. Liczebność hodowlanych frakcji bakterii w badanych próbkach w 2014 roku. Kolumny w obrębie frakcji mikroorganizmów oznaczone różnymi literami wykazują istotne statystycznie różnice (ANOVA $n=3$, $p<0,001$)

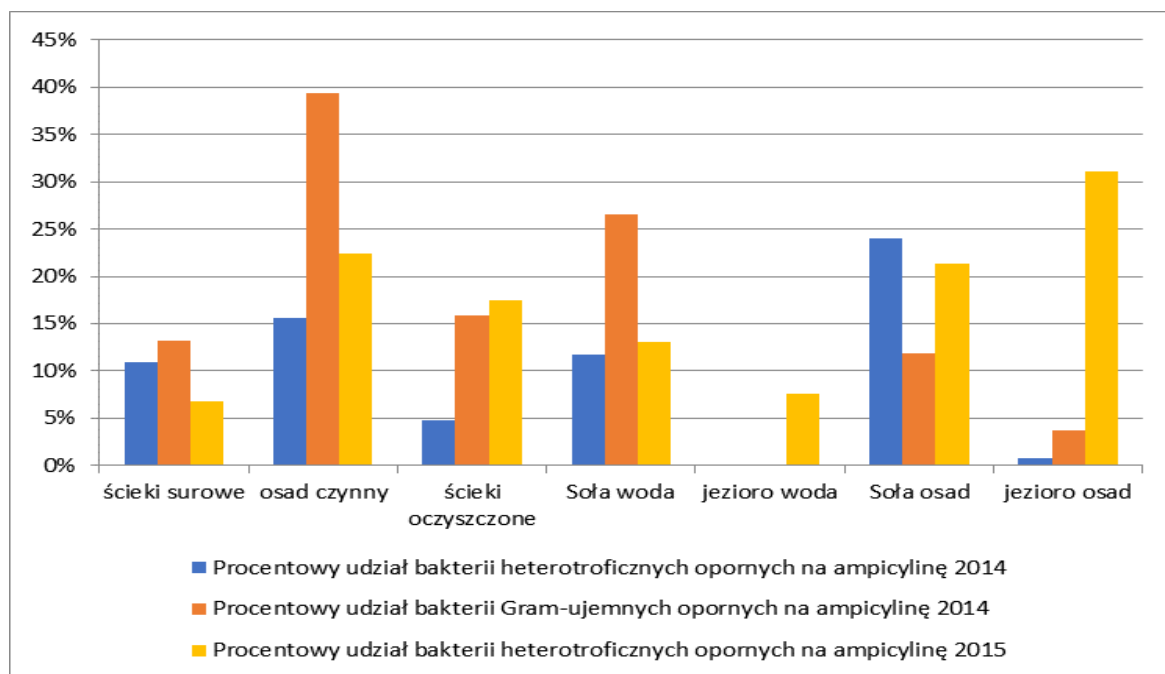
W 2015 roku określono ogólną liczebność bakterii heterotroficznych, w tym opornych na ampicylinę, używając odpowiednio podłoża LA bez ampicyliny oraz z tym antybiotykiem (100 $\mu\text{g/ml}$) (Rys. 8).

Analiza wariancji wykazała, że za 91% zmienności pomiędzy liczebnością poszczególnych frakcji mikroorganizmów w próbkach odpowiadało środowisko. Natomiast termin poboru próbek odpowiadał za 0,3% obserwowanej zmienności. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wyznaczoną w obu latach liczebnością bakterii opornych na ampicylinę w ściekach surowych oraz ogólną liczebnością bakterii heterotroficznych w osadzie czynnym. W roku 2015 zaobserwowano znaczny wzrost liczebności bakterii opornych na ampicylinę w osadach jeziora, co przełożyło się na wzrost wartości udziału procentowego tych bakterii w ogólnej liczebności bakterii heterotroficznych do 31% (Rys. 9). Podobnie udział heterotroficznych

bakterii opornych na ampicylinę wzrósł w ciągu roku z 4,7% do 17,5% w próbkach ścieków oczyszczonych. Największy udział (39%) bakterii Gram-ujemnych opornych na ampicylinę zaobserwowano w osadzie czynnym. Co interesujące udział tej frakcji bakterii był wyższy w wodach rzeki i jeziora niż w ściekach surowych.



Rys. 8. Ogólna liczebność bakterii heterotroficznych, w tym opornych na ampicylinę w latach 2014 i 2015. Kolumny w obrębie frakcji mikroorganizmów oznaczone różnymi literami wykazują istotne statystycznie różnice (ANOVA $n=3$, $p<0,001$)



Rys. 9. Procentowy udział poszczególnych frakcji bakterii opornych na ampicylinę w sezonach 2014 i 2015

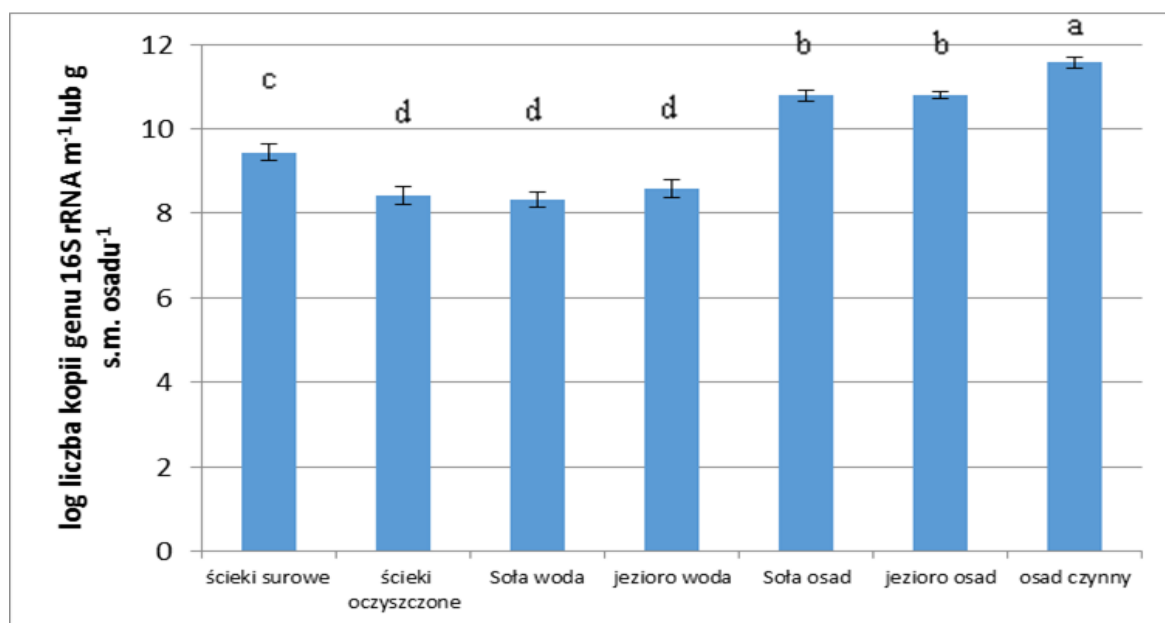
V.2. Izolacja ampicylioopornych szczepów

Ze wszystkich badanych środowisk wyizolowano łącznie 490 szczepów opornych na ampicylinę, które są przechowywane w temperaturze -80°C , stanowiąc katedralną kolekcję antybiotykoopornych szczepów środowiskowych.

V.3. Oznaczenie liczby kopii genu 16S rRNA w metagenomach wody, ścieków i osadów

Liczbę kopii genu 16S rRNA w badanych próbkach oznaczono techniką qPCR (Rys. 10). Analiza wariancji wykazała, że podczas procesu oczyszczania ścieków dochodzi do istotnej statystycznie redukcji liczby kopii badanego genu (ANOVA, $n=3$, $p<0,001$). Liczba kopii genu 16S rRNA została obniżona o rząd wielkości z $2,97 \times 10^9 \pm 1,21 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ w ściekach surowych do $2,94 \times 10^8 \pm 1,28 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ w ściekach oczyszczonych. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy zawartością kopii badanego genu w próbkach ścieków oczyszczonych oraz wód jeziora i rzeki. Wśród próbek osadu najwięcej kopii badanego genu zaobserwowano w osadzie czynnym ($3,82 \times 10^{11} \pm 1,1 \times 10^{11} \text{ g s. m.}^{-1}$).

Pozostałe dwie próbki osadu z rzeki i jeziora nie różniły się istotnie od siebie pod względem analizowanego parametru.



Rys. 10. Liczba kopii genu 16S rRNA w metagenomach badanych środowisk oznaczona metodą qPCR. Kolumny oznaczone różnymi literami wykazują istotne statystycznie różnice (ANOVA n=3, p<0,001)

V.4. Detekcja genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe w metagenomach ścieków surowych i osadu czynnego

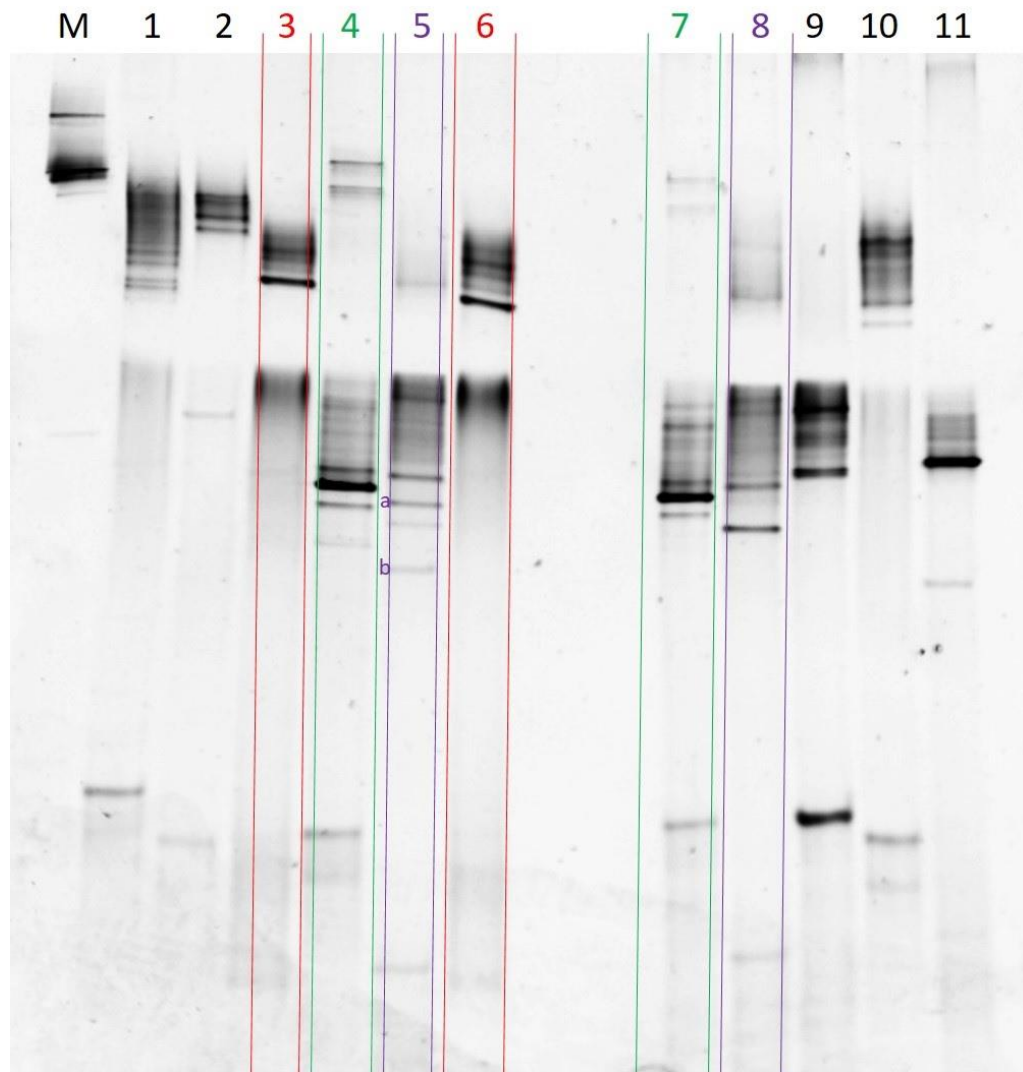
W 2013 roku dokonano detekcji genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe w metagenomach izolowanych ze ścieków surowych i osadu czynnego. Do tego celu zastosowano metodę opracowaną przez Szczepanowskiego i in (2009). Wyniki przeprowadzonych reakcji PCR zebrano w Tabeli 3. Stwierdzono obecność genów kodujących 3 z 4 klas β -laktamaz. Łącznie wykryto 7 spośród 10 badanych ARGs. Pięć ARGs występowało w obu próbkach, natomiast 2 były unikalne dla poszczególnych próbek. Gen *imp-5* występował tylko w osadzie czynnym, natomiast gen *oxa-75* zidentyfikowano tylko w ściekach surowych. Wykryte w próbkach z oczyszczalni ścieków geny warunkują oporność na co najmniej 11 antybiotyków β -laktamowych, w tym ampicylinę.

Tabela 3. Zestawienie wyników reakcji PCR. Skróty: Amp – ampicylina, Atm – aztreonam, Car – karbenicylina, Caz – ceftazydym, Cro – ceftriakson, Ctx – cefotaksym, Cxm – cefuroksym, Fep – cefepim, Kf – cefalotyna, Mez – mezlocylina, Pen-G – penicylina G, Prl – piperacylina, Tic – tykarcylina, SŚ – ścieki surowe, OCZ – osad czynny

Nazwa genu	Klasyfikacja kodowanej β -laktamazy	Spektrum substratów	SŚ	OCZ
<i>ctx-m-4</i>	Klasa A	Amp, Ctx, Cxm, Atm	-	-
<i>bla_{TEM-1}</i>	Klasa A	Amp, Pen-G	-	-
<i>imp-2</i>	Klasa B	Amp, Ctx, Fep	+	+
<i>imp-5</i>	Klasa B	Amp, Ctx, Fep	-	+
<i>imp-13</i>	Klasa B	Cxm, Caz, Ctx, Cro, Fep, Amp	+	+
<i>ampC</i>	Klasa C (cefalosporynaza)	Pen-G, cefalosporyny	+	+
<i>bla_{nps-2}</i>	Klasa D	Amp	+	+
<i>oxa-46</i>	Klasa D	Amp, Car, Mez, Kf	+	+
<i>oxa-50</i>	Klasa D	Amp, Tic, Ctx, Prl, Kf, Cxm	-	-
<i>oxa-75</i>	Klasa D	Amp, Prl	+	-

Ponieważ jako matrycę w reakcji PCR stosowano metagenomowy DNA wyizolowany z badanych próbek, za pomocą techniki PCR-DGGE sprawdzono, czy w otrzymanych produktach reakcji PCR znajdowała się jedna, dominująca w populacji

bakterii sekwencja danego genu, czy też znajdowała się mieszanina różnych wersji genów pochodzących z różnych bakterii.



Rys. 6. Produkty amplifikacji rozdzielone elektroforetycznie w gradiencie czynnika denaturującego. M – marker 1kb, 1 – OCZ *imp-2*, 2 – OCZ *imp-5*, 3 – OCZ *imp-13*, 4 – OCZ *bla_{nps2}*, 5 – OCZ *oxa-46*, 6 – SŚ *imp-13*, 7 – SŚ *bla_{nps2}*, 8 – SŚ *oxa-46*, 9 – SŚ *ampC*, 10 – SŚ *oxa-75*, 11 – K. poz.; a,b sekwencje unikalne dla osadu czynnego. Skróty: SŚ – ścieki surowe, OCZ – osad czynny

Wyniki tej metody potwierdziły obecność wielu różnych sekwencji tego samego genu w badanych metagenomach. Intensywność i umiejscowienie prążków wskazują, że w obu próbkach dominowały te same sekwencje. Ponadto w przypadku genu *oxa-46*

stwierdzono obecność dodatkowych wariantów sekwencji w osadzie czynnym (zaznaczone na Rys. 6 literami a, b), których nie zaobserwowano w ściekach surowych.

V.5. Wyniki sekwencjonowania nowej generacji

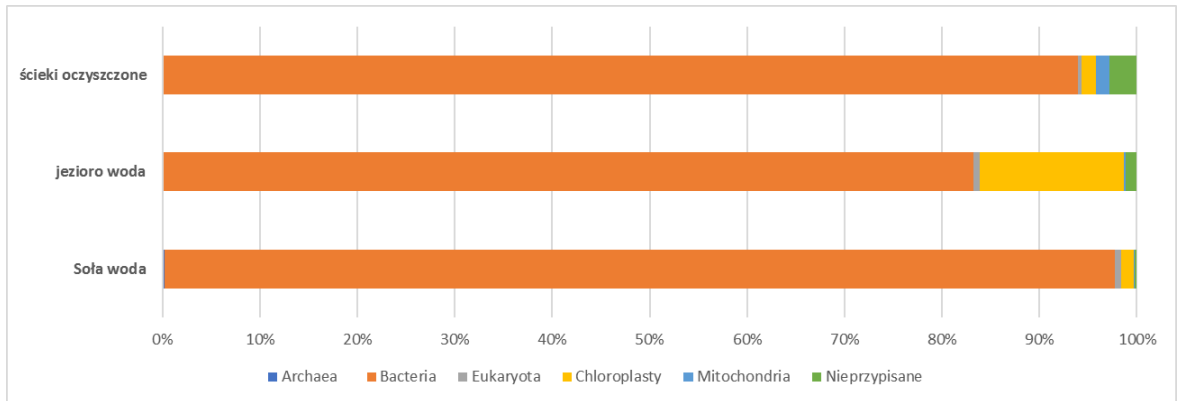
W wyniku sekwencjonowania trzech badanych metagenomów na jednej ścieżce urządzenia HiSeq 4000 uzyskano łącznie 62 Gpz, co odpowiadało 615 547 568 odczytom, z czego 70% (432 407 090) stanowiły sekwencje dobrej jakości (Tabela 4).

Tabela 4. Podsumowanie wyników sekwencjonowania próbek ścieków oczyszczonych oraz wód rzeki i jeziora

Próbka	Liczba uzyskanych odczytów	Liczba odczytów dobrej jakości	% odczytów dobrej jakości	SSU rRNA	% SSU rRNA	16S rRNA	16S rRNA/1 mln odczytów	ARGs	%ARGs	ARGs/16S rRNA
Soła woda	196 262 972	137 365 782	69,99	58996	0,04	57 568	419	74 584	0,05	1,30
jezioro woda	212 636 438	147 692 032	69,46	26062	0,02	21 688	147	40 329	0,03	1,86
ścieki oczyszczone	206 648 158	147 349 276	71,30	19455	0,01	18 248	124	42 542	0,03	2,33

V.5.1. Oznaczenie bioróżnorodności w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód jeziora i rzeki

Za pomocą programu Metaxa2 z sekwencji uzyskanych dla ścieków oczyszczonych oraz wód rzeki i jeziora wyodrębniono odpowiednio 19 455, 58 996 i 26 062 odczytów/y odpowiadających/e fragmentom genów rRNA małej podjednostki rybosomu (SSU, Small Subunit) (Tabela 4). 83-98% tych odczytów zostało zidentyfikowanych jako fragmenty bakteryjnego genu 16S rRNA (Rys. 11). Łączny udział sekwencji SSU archeonów, eukariotów i genomów mitochondrialnych w poszczególnych metagenomach wynosił poniżej 2%. Najwyższy udział sekwencji SSU pochodzących z genomów chloroplastowych obserwowano w wodzie jeziora i sięgał on 14,7%.

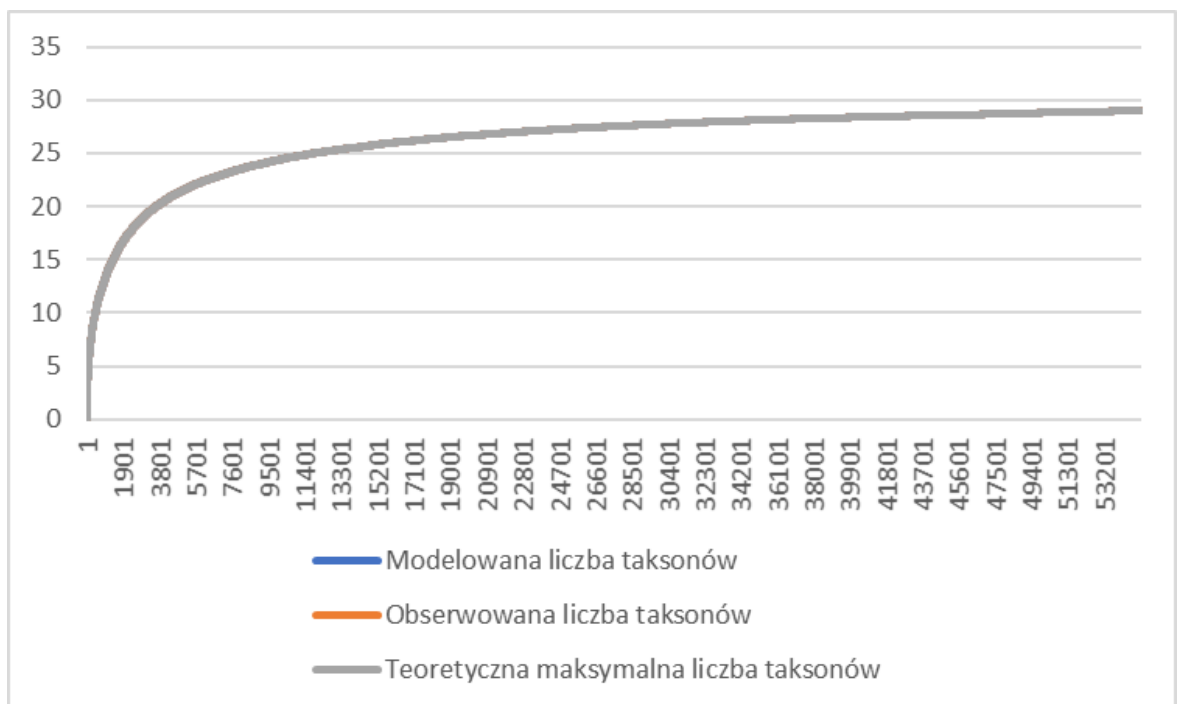


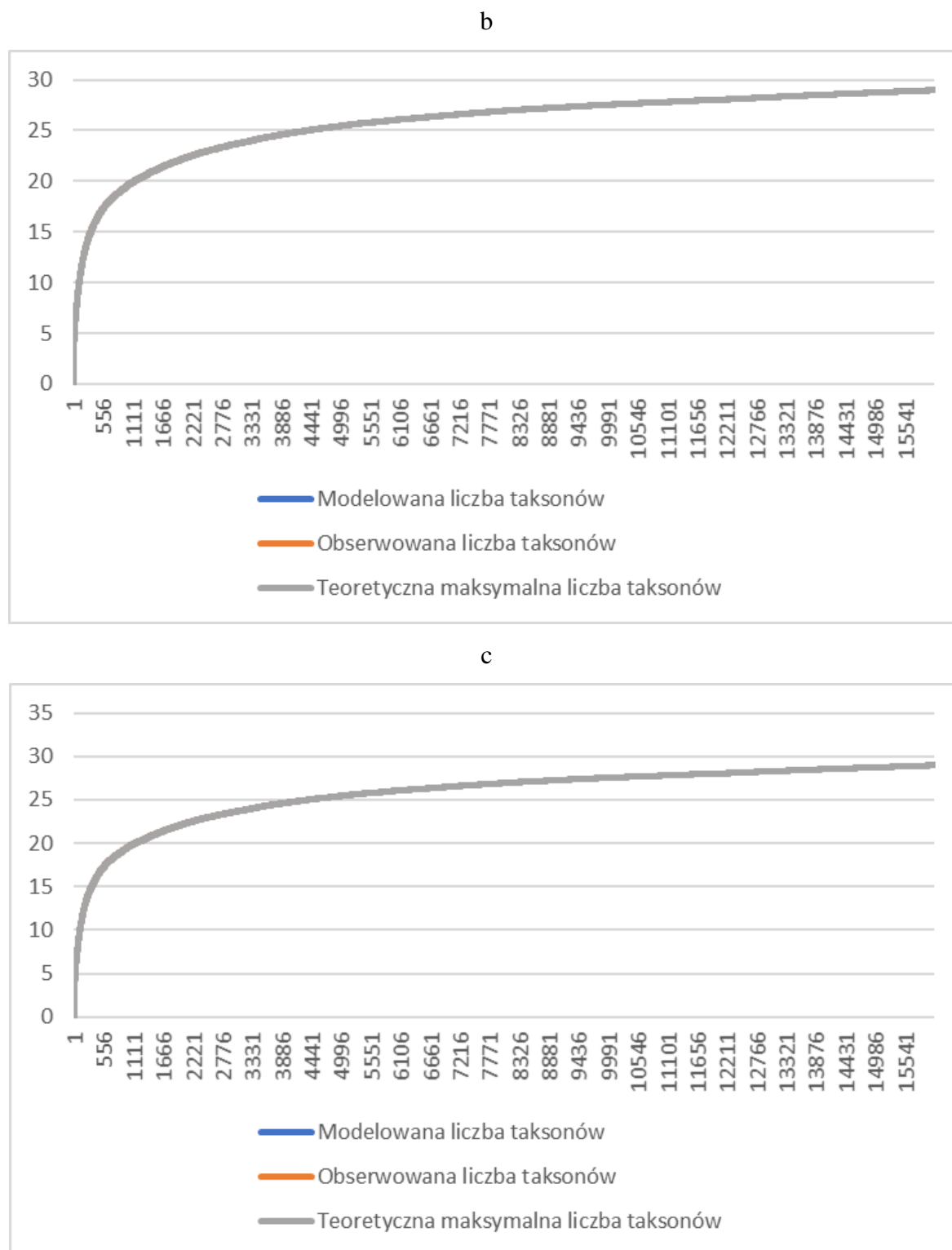
Rys. 11. Udział zidentyfikowanych sekwencji SSU rRNA w badanych metagenomach

Liczba sekwencji odpowiadających genowi 16S rRNA w przeliczeniu na 1 mln odczytów (16S rRNA/1 mln odczytów) w metagenomie wód Soły była średnio 3 razy wyższa niż w dwóch pozostałych próbkach (Tabela 4).

Na podstawie otrzymanych krzywych rarefakcji (Rys. 12) do porównania bioróżnorodności między badanymi próbkami wybrano rangę typów mikroorganizmów. Wysycenie krzywych rarefakcji w pozostałych kategoriach taksonomicznych zebrano w Tabeli 5.

a





Rys. 12. Krzywe rarefakcji. a – Soła woda, b – jezioro woda, c – ścieki oczyszczone. (Krzywe obserwowanej liczby taksonów pokrywają się z krzywymi dla modelowanej i teoretycznej maksymalnej liczby taksonów)

Tabela 5. Stopień wysycenia krzywych rarefakcji (obserwowana vs modelowana liczba taksonów) w poszczególnych rangach taksonomicznych

próbka	ranga taksonomiczna						
	domena	typ	klasa	rząd	rodzina	rodzaj	gatunek
Soła woda	100%	100%	100%	98%	98%	90%	62%
jezioro woda	100%	100%	98%	92%	87%	87%	79%
ścieki oczyszczone	100%	100%	98%	96%	92%	80%	79%

Na Rys. 13 przedstawiono wyniki metody Bray-Curtisa opisujące podobieństwo pomiędzy badanymi metagenomami w obrębie typów mikroorganizmów. Na poziomie tej rangi systematycznej wszystkie badane próbki różniły się istotnie statystycznie od siebie ($p < 0,001$). Pod względem analizowanych grup taksonomicznych najbardziej różnił się mikrobiom wód jeziora od mikrobiomu wód Soły.

	grupy			próbki
	jezioro woda	Soła woda	ścieki oczyszczone	
	0,34	0,63 ***	0,54 ***	jezioro woda
	0,54 ***	0,34	0,57 ***	Soła woda
	0,46 ***	0,55 ***	0,34	ścieki oczyszczone

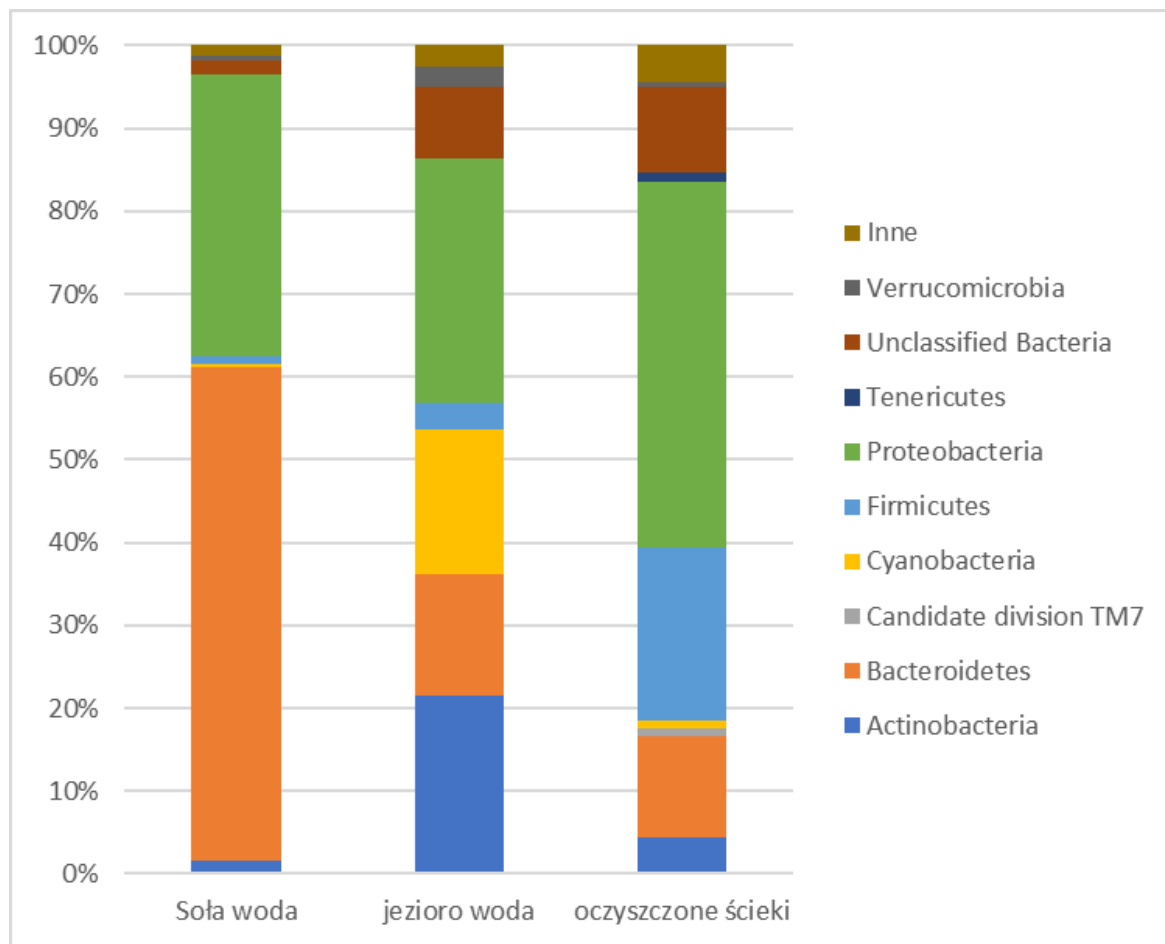
Rys. 13. Średnie wartości metryki Bray-Curtisa (im niższa wartość, tym bardziej podobne próbki) dla typów bakterii. Gwiazdkami oznaczono statystycznie istotne różnice między porównywanymi metagenomami ($p < 0,001$)

Zgodnie z wynikami metryki Bray-Curtisa najbardziej skrajne wartości wskaźników bioróżnorodności oznaczono dla wód jeziora i rzeki (Tabela 6). Na podstawie wyznaczonych indeksów w wodach Soły stwierdzono najniższą, natomiast w wodach jeziora najwyższą wśród badanych metagenomów bioróżnorodność.

Tabela 6. Indeksy bioróżnorodności wyznaczone dla badanych metagenomów w randze typów bakterii. Oznaczenia: H' – indeks Shannona, $H' \max$ – maksymalna wartość indeksu Shannona, Vd – niedostatek równocенności, E – indeks MacArthura, Ps – niedostatek bogactwa taksonów

Indeks	Soła woda	jezioro woda	ścieki oczyszczone
H'	0,99	1,84	1,72
$H' \max$	3,40	3,22	3,40
Vd (%)	70,79	42,87	49,39
E	1,99	3,58	3,30
Ps (%)	93,36	85,69	89,01

W wodach Soły i jeziora dominowały odpowiednio 2 (*Bacteroidetes*, *Proteobacteria*) i 4 (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* oraz *Bacteroidetes*), natomiast w ściekach oczyszczonych 3 (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*) typy bakterii, łącznie stanowiąc 77-93% wszystkich zidentyfikowanych w danej próbce typów (Rys. 14). Liczne w jeziorze sinice (18%) i *Actinobacteria* (22%) nie przekraczały 2% w pozostałych dwóch mikrobiomach. Natomiast *Proteobacteria* oraz *Bacteroidetes* miały istotny (12-59%) udział we wszystkich badanych zespołach mikroorganizmów. Uderzająco wysoki, bo sięgający 60% był udział *Bacteroidetes* w populacjach zasiedlających wody Soły.



Rys. 14. Udział poszczególnych typów w badanych metagenomach (16S rRNA/1 mln odczytów). Zidentyfikowane typy bakterii, których udział we wszystkich metagenomach wynosił poniżej 1% zebrano w kategorii „Inne”

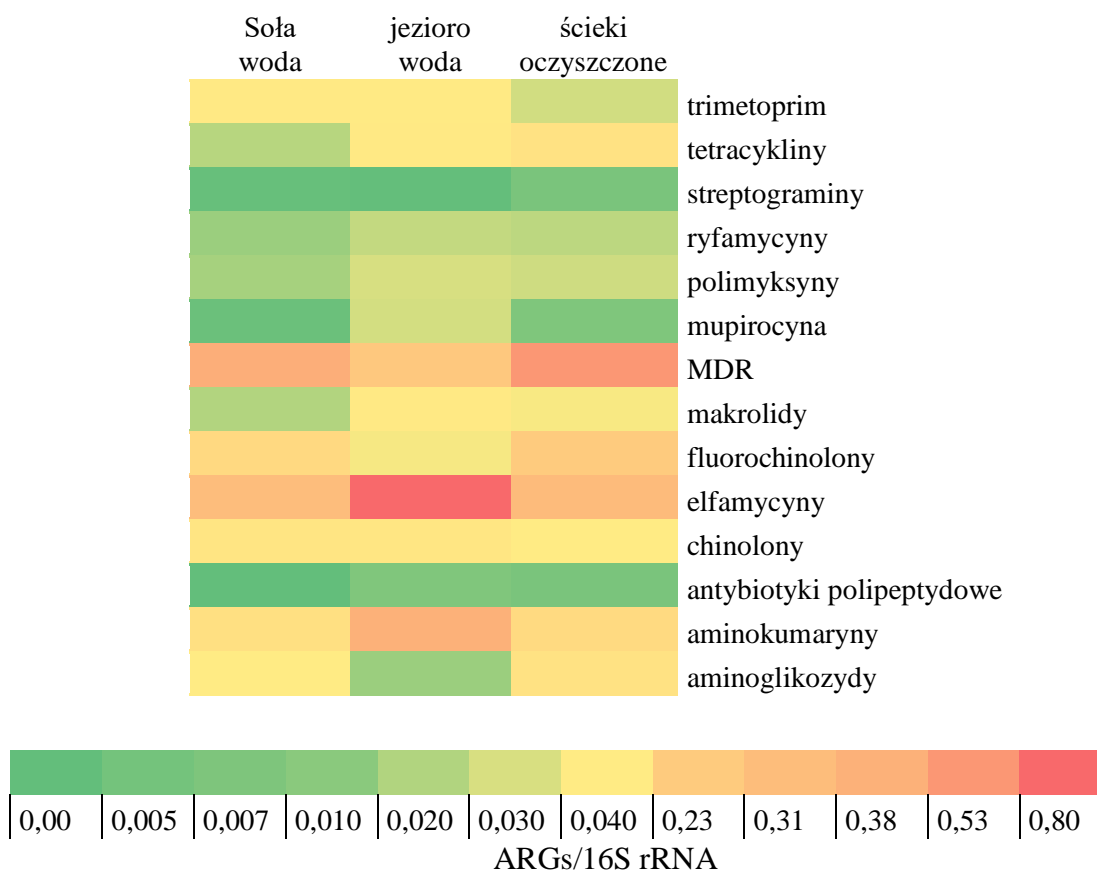
V.5.2. Udział genów warunkujących antybiotykooporność oraz genów kodujących integrazy 1 klasy w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód jeziora i rzeki

Analiza metagenomiczna ścieków oczyszczonych oraz wód rzeki i jeziora pozwoliła na wyłonienie odpowiednio 42 542, 74 584, 40 329 odczytów odpowiadających ARGs. Z kolei liczba sekwencji oznaczonych jako ARGs w przeliczeniu na liczbę sekwencji 16S rRNA (ARGs/16S rRNA) w danej próbie wynosiła 2,33 dla ścieków oczyszczonych i odpowiednio 1,3 oraz 1,86 dla wód Soły i jeziora.

Łącznie we wszystkich próbkach oznaczono 1 714 różnych genów warunkujących antybiotykooporność. Jakościowa analiza porównawcza wszystkich ARGs oznaczonych w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód Soły i jeziora wykazała obecność

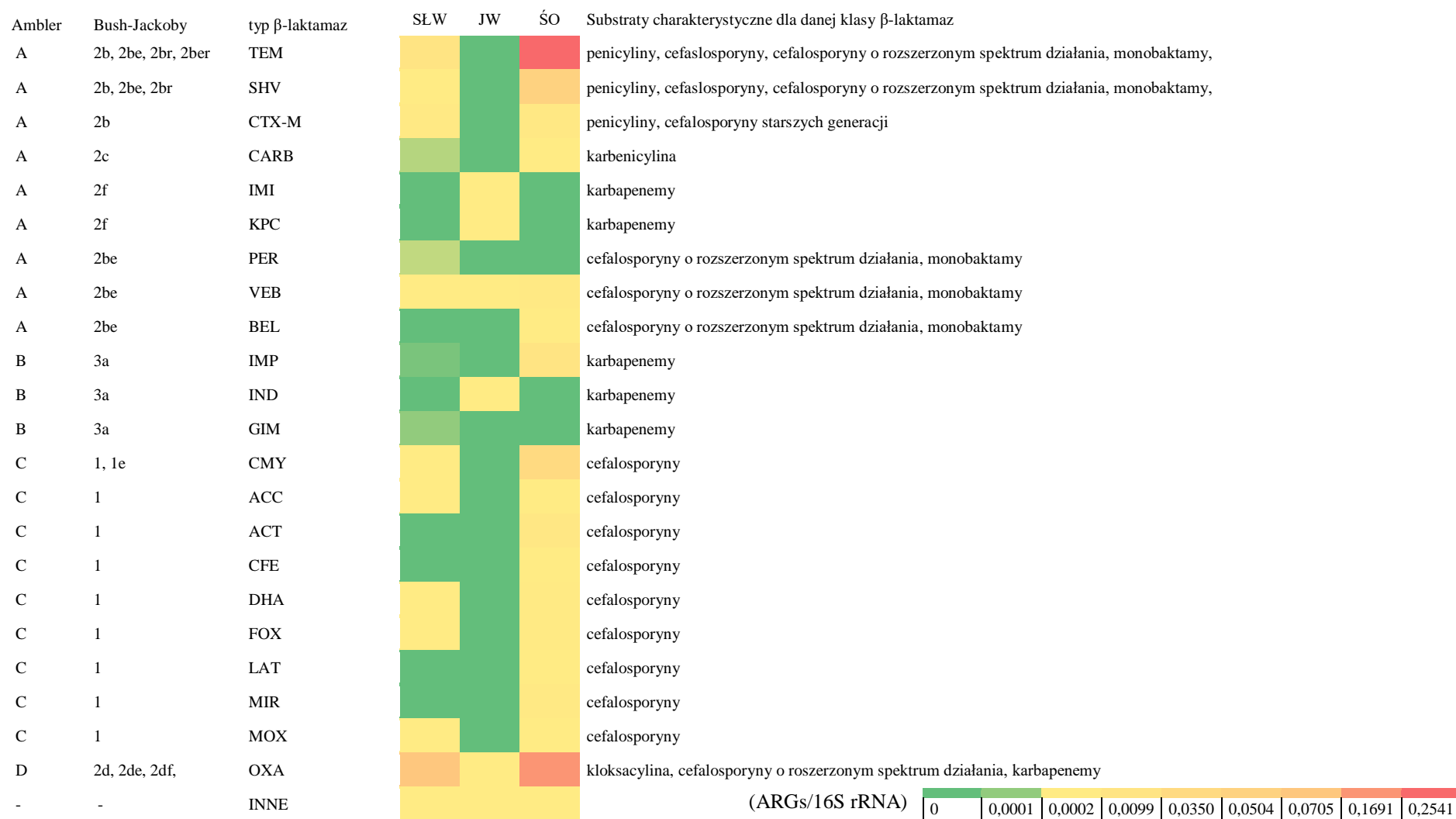
odpowiednio 422, 125 i 58 unikalnych dla danej próbki genów. 175 ARGs oznaczono w trzech, a 934 ARGs w dwóch z trzech badanych metagenomów. Trzy geny (*oxa-50*, *vatA*, *tetH*) występowały w ściekach oczyszczonych i wodach jeziora, a nie stwierdzono ich obecności w wodach Soły. Zaobserwowano 11 genów (*vatI*, *otrC*, *vanO*, *vanM*, *bla_{FEZ-1}*, *bla_{THIN-B}*, *smeS*, *oxa-29*, *fosA2*, *facT*, *aac(6')-IIb*) wspólnych tylko dla próbek wód jeziora i rzeki, co oznacza, że aż 920 ARGs było wspólnych wyłącznie dla ścieków oczyszczonych i wód Soły.

Największą różnorodność genów warunkujących oporność na antybiotyki zaobserwowano w metagenomach ścieków oczyszczonych (1 520 genów) i wód Soły (1 231 genów), natomiast najniższą w wodach jeziora (247 genów). Do porównania metagenomów wybrano 50 najliczniej reprezentowanych w próbkach ARGs (0,002-0,79 ARGs/16S rRNA), a otrzymane wyniki zgrupowano względem klas antybiotyków, na które oporność jest niesiona przez te geny (Rys. 15). Jedną z najliczniejszych grup we wszystkich trzech metagenomach stanowiły geny kodujące oporność na elfamycyny (0,31-0,79 ARG/16S rRNA). Geny warunkujące oporność wielolekową (MDR) w ściekach oczyszczonych i wodach Soły były reprezentowane przez blisko 2 razy więcej sekwencji (0,4-0,53) niż w wodach jeziora (0,25). Podobnie w tych dwóch pierwszych metagenomach obserwowano więcej genów warunkujących oporność na fluorochinolony (0,15-0,23) w stosunku do metagenomu jeziora (0,04). Natomiast w wodach jeziora stwierdzono odpowiednio 3,6 i 2,7 krotnie więcej niż w ściekach oczyszczonych i wodach Soły genów warunkujących oporność na aminokumaryny. Ponadto liczniej niż w pozostałych próbkach w ściekach oczyszczonych reprezentowane były geny kodujące oporność na tetracykliny i aminoglikozydy.



Rys. 15. Geny warunkujące oporność na poszczególne klasy antybiotyków w badanych metagenomach (na podstawie 50 najliczniej występujących w próbkach genów)

W badanych metagenomach stwierdzono także obecność genów kodujących β -laktamazy (Rys. 16). Udział poszczególnych genów warunkujących oporność na β -laktamy (*bla*/16S rRNA) był niski. Jednak łączny udział wszystkich zidentyfikowanych genów kodujących β -laktamazy wynosił dla ŚO aż 0,56, co w stosunku do wszystkich ARGs dla tej próbki dało 24% wszystkich ARGs. Ten wskaźnik dla wód rzeki oraz jeziora był znacznie niższy i wynosił odpowiednio 7% i 0,2%. W ściekach oczyszczonych i wodach Soły zidentyfikowano łącznie 17 i 14 typów β -laktamaz, wśród których dominowały enzymy TEM i oksacylinazy. Największą różnorodność omawianych enzymów dla tych próbek obserwowano wśród typów OXA (255 i 258 różnych genów), TEM (167 i 167), SHV (155 i 104) i CTX-M (124 i 137). W wodach jeziora zidentyfikowano łącznie 67 różnych genów kodujących 5 typów β -laktamaz. Najliczniej reprezentowane były typy KPC (18 genów), IND (15) i VEB (11).



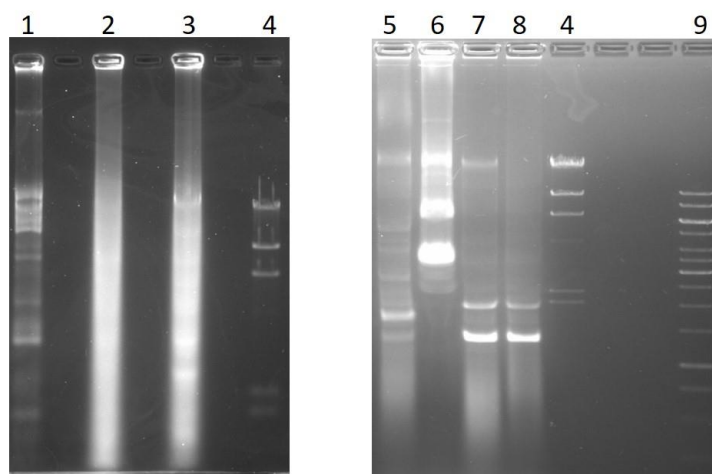
Rys. 16. Występowanie poszczególnych klas β -laktamaz w badanych metagenomach. Klasyfikacja β -laktamaz i ich substratów za Bush i Jacoby (2010)

Odczyty uzyskane dla badanych metagenomów porównywano także z aminokwasowymi sekwencjami integraz niesionych przez integrony 1 klasy. W ściekach oczyszczonych, wodach Soły i jeziora zidentyfikowano odpowiednio 576, 574 i 569 różnych genów *intI1*. Łączny udział wszystkich sekwencji rozpoznanych jako *intI1* w przeliczeniu na liczbę genu 16S rRNA (*intI1*/16S rRNA) był najwyższy w próbce ścieków oczyszczonych i wynosił 21,14. W wodach Soły i jeziora ta wartość była odpowiednio 6 razy (3,56) i 37 razy niższa (0,57).

V.6. Kolekcja plazmidów

V.6.1. Egzogenna izolacja plazmidowego DNA z próbek ścieków, wody i osadów

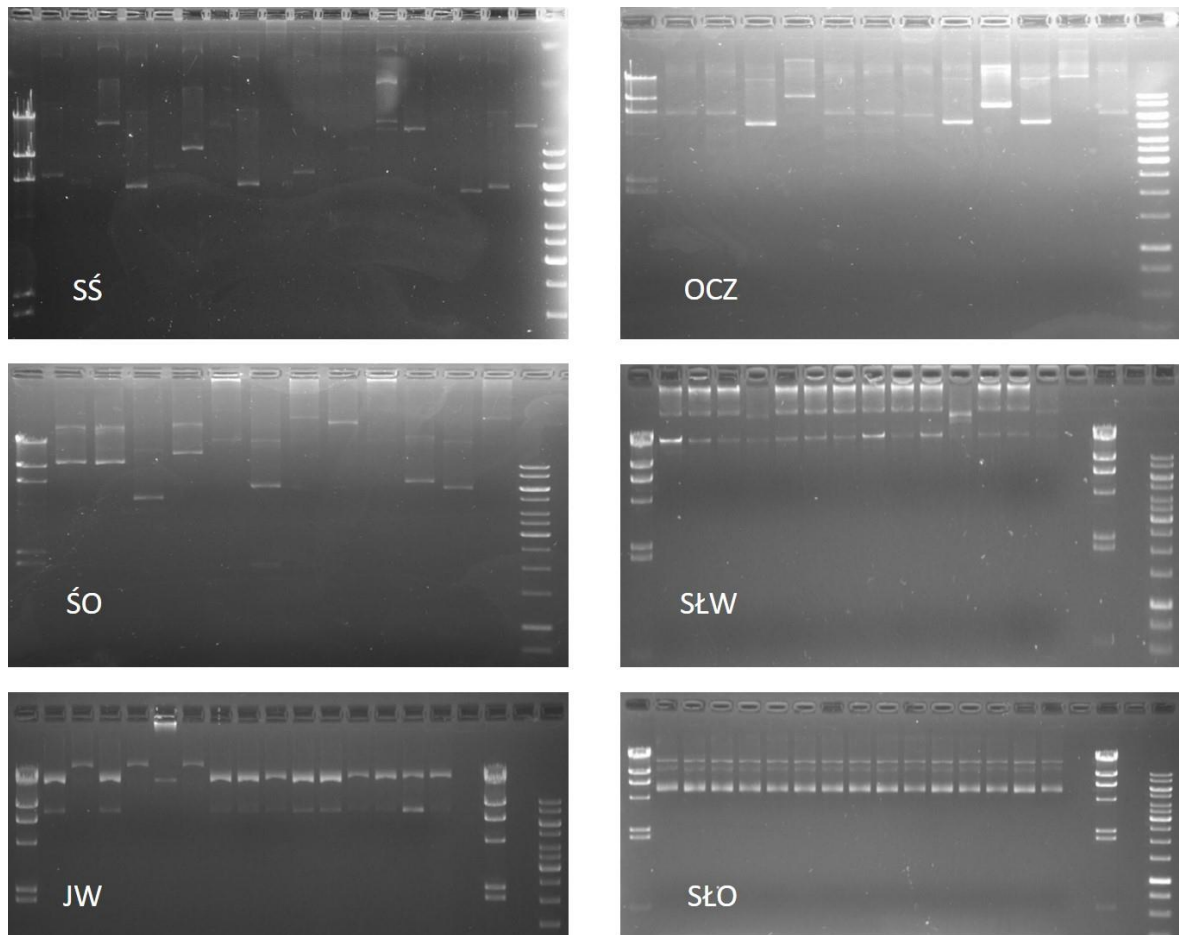
Egzogenna izolacja plazmidowego DNA poprzez bezpośrednią koniugację mikroflory próbek z komórkami *E. coli* Rif^R nie pozwoliła na uzyskanie plazmidów opornościowych. Podobnie nie powiodła się transformacja preparatami plazmidowego DNA uzyskanych metodą lizy alkalicznej bezpośrednio z próbek. Dopiero zastosowanie wzbogaconych hodowli do izolacji plazmidów oraz elektroporacja otrzymanych wektorów (Rys. 17) do *E. coli* DH5 α umożliwiły uzyskanie pierwszych transformantów. Pomimo licznych prób, nie powiódł się transfer plazmidów z wód jeziora. Natomiast dla wszystkich pozostałych próbek uzyskano transformanty, które wykorzystano do przygotowania kolekcji plazmidów.



Rys. 17. Preparaty plazmidowego DNA izolowane ze wzbogaconych hodowli. 1 – ścieki oczyszczone, 2 – osad czynny, 3 – ścieki surowe, 4 – marker λ /HindIII, 5 – wody Soły, 6 – osady Soły, 7 – wody jeziora, 8 – osady jeziora, 9 – marker 1kb

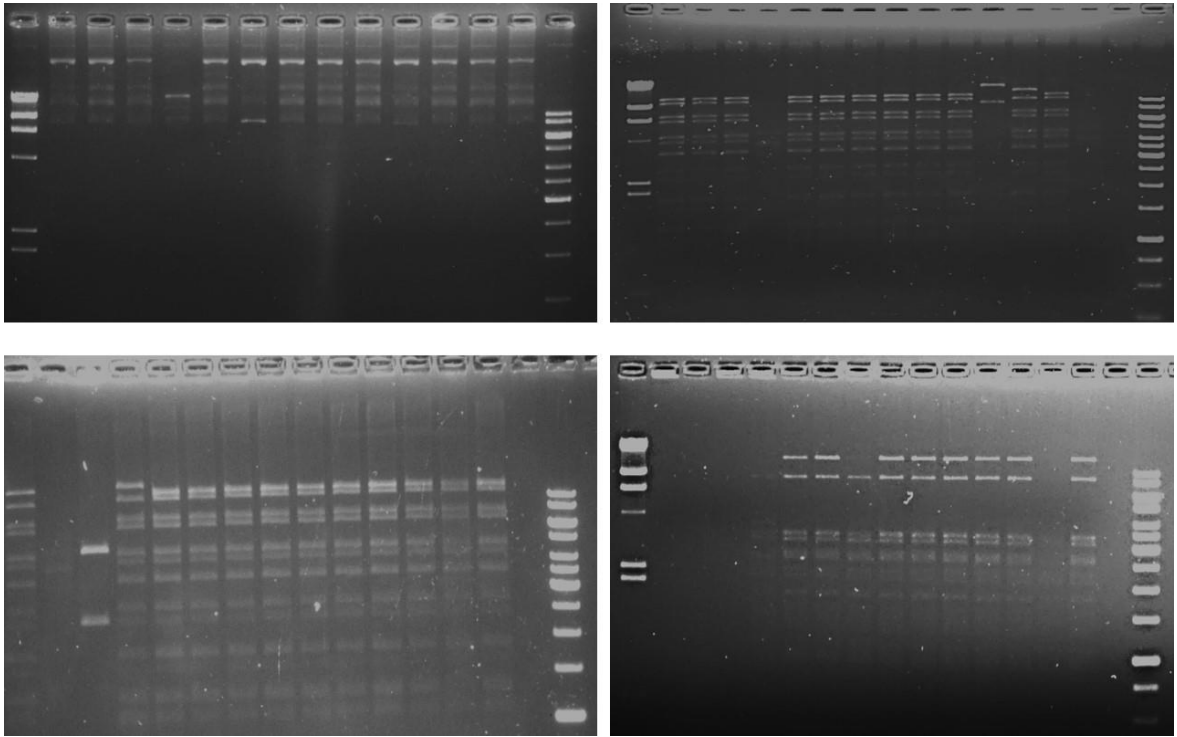
V.6.2. Przygotowanie kolekcji plazmidów

Do dalszych analiz pobrano łącznie 270 kolonii transformantów. Koloniami inokulowano świeżą pożywkę LB, a następnie, aby potwierdzić obecność plazmidów u transformantów, przygotowane hodowle użyto do izolacji DNA na małą skalę. Otrzymane preparaty plazmidowego DNA analizowano elektroforetycznie (Rys. 18). W komórkach *E. coli* DH5 α transformowanych plazmidowym DNA z próbek z oczyszczalni ścieków występowało wiele plazmidów. Aby rozdzielić te plazmidy i uzyskać transformanty z pojedynczymi wektorami, wykorzystano preparaty plazmidowego DNA otrzymane z tych komórek do kolejnej elektroporacji *E. coli* DH5 α . U uzyskanych w ten sposób transformantów ponownie weryfikowano obecność plazmidów. Tym razem na podstawie analizy elektroforetycznej preparatów plazmidowego DNA wyselekcjonowano łącznie 30 transformantów niosących pojedyncze plazmidy (po 10 transformantów na próbkę z oczyszczalni ścieków).



Rys. 18. Przykładowe elektroforogramy z rozdziału preparatów plazmidowego DNA izolowanego z transformantów

Ponowna transformacja nie była konieczna w przypadku próbek z rzeki i jeziora. Jednak, po rozdziale elektroforetycznym, plazmidy wyizolowane z tej samej próby obserwowano na zbliżonej pozycji w żelu (Rys. 18). Aby wyodrębnić poszczególne wektory przeprowadzono analizę restrykcyjną łącznie 89 plazmidów (Rys. 19). Na podstawie uzyskanych profili wyodrębniono: 12 wektorów z wód Soły, 6 z osadów Soły oraz 8 z osadów jeziora.



Rys. 19. Przykładowe elektroforogramy uzyskane w wyniku rozdziału produktów cięcia enzymatycznego badanych plazmidów

Zastosowane metody pozwoliły na wyselekcjonowanie łącznie 56 wektorów niosących oporność na ampicylinę. Nazwy plazmidów utworzono od skrótów próbek, z których je wyizolowano i oznaczono kolejnymi literami alfabetu (Tabela 7).

Tabela 7. Sposób oznaczenia badanych plazmidów

Próbka	Plazmidy											
ŚŚ	pŚŚa	pŚŚb	pŚŚc	pŚŚd	pŚŚe	pŚŚf	pŚŚg	pŚŚh	pŚŚi	pŚŚj		
OCZ	pOCZa	pOCZb	pOCZc	pOCZd	pOCZe	pOCZf	pOCZg	pOCZh	pOCZi	pOCZj		
ŚO	pŚOa	pŚOb	pŚOc	pŚOd	pŚOe	pŚOf	pŚOg	pŚOh	pŚOi	pŚOj		
SŁW	pSŁWa	pSŁWb	pSŁWc	pSŁWd	pSŁWe	pSŁWf	pSŁWg	pSŁWh	pSŁWi	pSŁWj	pSŁWk	pSŁWł
SŁO	pSŁOa	pSŁOb	pSŁOc	pSŁOd	pSŁOe	pSŁOf						
JO	pJOa	pJOb	pJOc	pJOd	pJOe	pJOf	pJOg	pJOh				

V.6.3. Oznaczanie replikonów metodą multipleks PCR

Wyniki typowania replikonów zebrano w Tabeli 8. Zastosowana metoda pozwoliła na przypisanie do grupy niezgodności 10 spośród 56 badanych plazmidów. Z tego osiem pochodziło z wód Soły i należało do grupy IncF, a dwa plazmidy (jeden z osadów jeziora i jeden ze ścieków oczyszczonych) przypisano do grupy IncN. Nie udało się zidentyfikować żadnych plazmidów ze ścieków surowych, osadu czynnego i osadów Soły.

Aby potwierdzić specyficzność otrzymanych amplikonów, 5 wybranych produktów reakcji PCR wysłano do sekwencjonowania. Uzyskane sekwencje porównywano za pomocą narzędzia BLAST z genomami plazmidów zebranych w bazach NCBI. Wyniki porównania potwierdziły specyficzność reakcji PCR (Tabela 9).

Tabela 8. Wyniki typowania replikonów

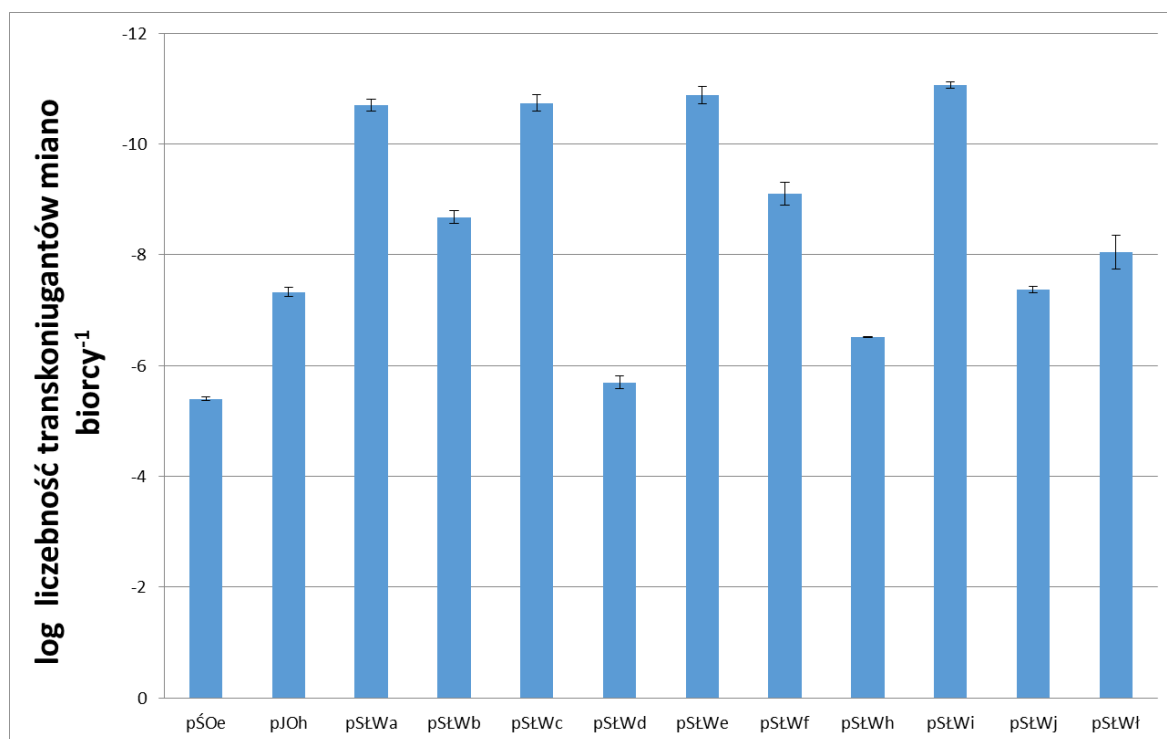
Plazmidy	Grupy niezgodności																	
	HI1	HI2	II-I γ	X	L/M	N	FIA	FIB	W	Y	P	FIC	A/C	T	FIIAs	F	K	B/O
pSŚa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSŚj	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pOCZj	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pŚOg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 9. Wyniki przypisania sekwencji produktów reakcji PCR do sekwencji w bazie danych NCBI. Przedstawiono pierwszy przypisany wynik posiadający najniższą wartość oczekiwaną (E-value)

Badany plazmid	Zidentyfikowany gen	Stopień identyczności	Funkcja	Plazmid	Mikroorganizm	Źródło plazmidu
pSŁWa	NZ_CP019014	221/222	białko inicjacji replikacji	pECAZ162_KPC	<i>Escherichia coli</i> szczep Ecol_AZ162	człowiek (USA)
pSŁWc	NZ_CP019014	221/222	białko inicjacji replikacji	pECAZ162_KPC	<i>Escherichia coli</i> szczep Ecol_AZ163	człowiek (USA)
pSŁWi	NZ_CP019014	221/222	białko inicjacji replikacji	pECAZ162_KPC	<i>Escherichia coli</i> szczep Ecol_AZ164	człowiek (USA)
pŚOe	NZ_CP019214	496/496	białko inicjacji replikacji	pMCR_WCHEC1613	<i>Escherichia coli</i> szczep WCHEC1613	ścieki (Chiny)
pJOh	NZ_CP019214	503/503	białko inicjacji replikacji	pMCR_WCHEC1613	<i>Escherichia coli</i> szczep WCHEC1613	ścieki (Chiny)

V.6.4. Oznaczenie zdolności plazmidów do transferu koniugacyjnego

Transformanty *E. coli* DH5 α niosące badane plazmidy koniugowano z komórkami *E. coli* RFP Km^R Rif^R bez plazmidu. 12 spośród 56 badanych wektorów wykazało zdolność do samodzielnego transferu. Transformant niosący plazmid pSŁWc rósł w obecności kanamycyny i rifampicyny, dlatego został wyłączony z tego doświadczenia. Większość (10) plazmidów koniugacyjnych wyizolowano z wód Soły, dwa pozostałe pochodziły ze ścieków oczyszczonych i osadów jeziora (Tabela 10). Częstość koniugacji plazmidów wyizolowanych z wód Soły wynosiła od $8,68 \times 10^{-12} \pm 1,14 \times 10^{-12}$ do $2,07 \times 10^{-6} \pm 5,68 \times 10^{-7}$ (Rys. 20). Najwyższą częstością koniugacji charakteryzował się wyizolowany ze ścieków oczyszczonych plazmid pŚOe ($4,05 \times 10^{-6} \pm 3,07 \times 10^{-7}$), natomiast częstość transferu plazmidu pJOh była niższa od tej wartości o dwa rzędy wielkości i wynosiła $4,75 \times 10^{-8} \pm 8,22 \times 10^{-9}$.



Rys. 20. Częstość transferu koniugacyjnego badanych plazmidów

V.6.5. Ocena mobilizowalności plazmidów

43 plazmidy, które nie wykazały zdolności do koniugacji transformowano do komórek *E. coli* S17-1 (Str^R). Ten szczep posiada wbudowany w chromosom region *tra*, co umożliwia mobilizację do transferu plazmidów posiadających sekwencję *oriT* (ang. origin of conjugal transfer). Następnie przeprowadzano koniugację uzyskanych transformantów z biorcą *E. coli* RFP Km^R Rif^R bez plazmidu. Tylko trzy z badanych plazmidów (pŚO_h, pSŁW_k i pJOb) nie były mobilizowalne (Tabela 10).

V.6.6. Oznaczanie zakresu gospodarzy plazmidów koniugacyjnych

Transformanty *E. coli* DH5 α niosące plazmidy zdolne do własnego transferu koniugowano z biorcą *A. tumefaciens* RFP Km^R Rif^R bez plazmidu (*Alphaproteobacteria*). Po okresie inkubacji nie zaobserwowano żadnych transkoniugantów.

V.6.7. Oznaczanie profili lekooporności kodowanych przez plazmidy

Profile lekooporności niesione przez badane plazmidy oraz oporność szczepu *E. coli* DH5 α określono za pomocą pasków gradientowych na podłożu Mueller-Hinton. Do testu oprócz ampicyliny, wybrano nowsze generacje antybiotyków β -laktamowych: ceftazydym (cefalosporyna III generacji) i meropenem (karbapenem). Ponadto zastosowano leki, na które oporność jest często sprzężona z opornością na β -laktamy: amikacynę i gentamycynę (aminoglikozydy), ciprofloksacynę (fluorochinolon), a także kolistynę (polimyksyna).

Do określenia profili opornościowych wybrano 18 plazmidów (Tabela 11). 16 spośród badanych wektorów warunkowało oporność na stężenie ampicyliny powyżej 256 $\mu\text{g/ml}$, które jest najwyższą wartością dla komercyjnie dostępnych pasków. Natomiast najniższą wartość MIC dla ampicyliny (80 $\mu\text{g/ml}$) zaobserwowano u transformanta niosącego plazmid pJOa. Łącznie 5 plazmidów warunkowało oporność na ceftazydym, z czego 3 pochodziły z wód Soły. Jeden z nich, pSŁWc, kodował oporność na tę cefalosporynę w stężeniu 8 $\mu\text{g/ml}$, co stanowi ponad 85 krotność wartości MIC obserwowanej dla komórek *E. coli* DH5 α . Niewrażliwość na wyższe stężenia ciprofloksacyny występowała u transformantów niosących plazmidy pJOh i pŚOe. Żaden z badanych wektorów nie warunkował oporności na amikacynę, gentamycynę, meropenem i kolistynę.

Tabela 11. Profile oporności na antybiotyki niesione przez badane plazmidy w odniesieniu do szczepu gospodarza plazmidów – *E. coli* DH5 α . Antybiotyki: amikacyna (AK), ampicylina (AMP), ceftazydym (CAZ), ciprofloksacyna (CIP), gentamycyna (CN), kolistyna (CS), meropenem (MRP)

Badane plazmidy	AK (0,016- 256)	AMP (0,006- 256)	CAZ (0,016- 256)	CIP (0,002- 32)	CN (0,016- 256)	CS (0,064- 1024)	MRP (0,002- 32)
<i>E. coli</i> DH5 α (bez plazmidu)	1,5	1,5	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚŚe	1,5	128	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pOCZc	1,5	> 256	0,25	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚOa	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚOd	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚOe	1,5	> 256	0,094	0,094	0,38	1,5	0,023
pŚOj	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pJOa	1,5	80	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pJOb	1,5	> 256	0,19	0,002	0,38	1,5	0,023
pJOd	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pJOe	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pJOg	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pJOh	1,5	> 256	0,094	0,19	0,38	1,5	0,023
pŚŁWc	1,5	> 256	8	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚŁWd	1,5	> 256	0,19	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚŁWh	1,5	> 256	3	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚŁWk	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚŁOe	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023
pŚŁOf	1,5	> 256	0,094	0,002	0,38	1,5	0,023

V.6.8. Wychwytywanie elementów transpozycyjnych

Wychwytywanie elementów transpozycyjnych przeprowadzono z zastosowaniem wektora pułapkowego pMAT1 posiadającego kasetę selekcyjną *sacB* i gen warunkujący oporność na kanamycynę. Za pomocą tej metody nie uzyskano żadnych elementów transpozycyjnych.

VI. DYSKUSJA

VI.1. Liczebność mikroorganizmów w badanych środowiskach

W dobie analiz metagenomicznych metody hodowlane wciąż dostarczają cennych informacji na temat poszczególnych grup drobnoustrojów zasiedlających badane środowiska. Wykorzystane w niniejszych badaniach techniki klasycznej mikrobiologii pozwoliły m. in. na porównanie liczebności hodowlanych frakcji bakterii pomiędzy badanymi środowiskami.

W 2014 i 2015 roku w sezonie letnim za pomocą metody płytek tartych oznaczono liczebność hodowlanych frakcji mikroorganizmów w próbkach pochodzących z oczyszczalni ścieków w Żywcu (ścieki surowe, osad czynny, ścieki oczyszczone), Jeziora Żywieckiego (wody i osady) i rzeki Soły (wody i osady). Analiza wariancji wykazała, że wyniki otrzymane z dwóch poborów różniły się od siebie statystycznie ($p < 0,001$), ale termin poboru próbek odpowiadał jedynie za 0,3% obserwowanej zmienności. Brak statystycznie istotnych różnic ($p < 0,001$) między wyznaczoną w obu latach ogólną liczebnością bakterii heterotroficznych wskazuje na stabilność osadu czynnego. Podobnie brak istotnych statystycznie różnic ($p < 0,001$) w obserwowanej liczebności bakterii heterotroficznych opornych na ampicylinę w ściekach surowych sugeruje, że w sezonie letnim liczebność tej frakcji bakterii jest dostarczana do oczyszczalni na zbliżonym poziomie. W obu latach zaobserwowano istotną redukcję ogólnej liczebności mikroorganizmów w procesie oczyszczania. W 2014 roku redukcja ta była o rząd wielkości niższa (10^6 jtk ml^{-1}) niż rok później (10^7 jtk ml^{-1}). Natomiast usuwanie heterotroficznych bakterii opornych na ampicylinę utrzymywało się w obu latach na tym samym poziomie (10^5 jtk ml^{-1}).

W Centralnej Oczyszczalni w Koziegłowach oznaczono ogólną liczebność hodowlanej frakcji bakterii (nie podano podłoża) w ściekach surowych, osadzie czynnym oraz ściekach oczyszczonych i wynosiła ona odpowiednio $3,1 \times 10^6$ - $1,9 \times 10^7$, $2,3 \times 10^5$ - $3,0 \times 10^6$ oraz $3,5 \times 10^4$ - $3,3 \times 10^6$ jtk ml^{-1} , co w przybliżeniu daje redukcję 10^6 jtk ml^{-1} (Mokracka i in., 2012). Liczebność bakterii heterotroficznych w surowych i oczyszczonych ściekach z zakładu w Arabii Saudyjskiej (oznaczona na agarze odżywczym) była średnio o 2 rzędy wielkości niższa w porównaniu z wynikami uzyskanymi z Żywca. Liczebność tych bakterii wynosiła 10^5 - 10^6 jtk ml^{-1} ścieków

surowych i była redukowana w procesie oczyszczania średnio ok. 30 razy, co daje redukcję zbliżoną do obserwowanej na Żywiecczyźnie – 10^5 - 10^6 jtk ml⁻¹ (Al-Jassim i in., 2015). Liczebność wszystkich badanych frakcji mikroorganizmów w obu latach była znacznie wyższa w próbkach z oczyszczalni ścieków w porównaniu do próbek wody z jeziora i rzeki. Ponadto liczebność wszystkich badanych frakcji mikroorganizmów w próbkach pochodzących z Soły w obu latach była statystycznie istotnie wyższa ($p < 0,001$) niż w próbkach z jeziora. W 2015 roku zaobserwowano 6-krotny wzrost ogólnej liczebności bakterii heterotroficznych oraz 6,6-krotny wzrost bakterii opornych na ampicylinę w wodach Soły. Podobnie zwiększyła się liczebność tych frakcji drobnoustrojów w wodach jeziora. Jednak uzyskane w 2014 roku duże odchylenie standardowe i niska liczebność bakterii opornych na ampicylinę w wodzie jeziora świadczą o tym, że liczebność tej frakcji mikroorganizmów była na granicy wykrywalności dla zastosowanej metody. Stąd można jedynie stwierdzić, że bakterie te znajdowały się w wodach jeziora, ale określenie ich liczebności byłoby obarczone zbyt dużym błędem. W 2015 roku liczebność bakterii opornych na ampicylinę w próbkach z wody jeziora była już wyższa i wynosiła $6,2 \times 10^0$ jtk ml⁻¹. To najniższa wartość liczebności, jaką odnotowano dla którejkolwiek z próbek, czy frakcji mikroorganizmów. Wzrost udziału poszczególnych frakcji bakterii w wodzie z jeziora w 2015 roku mógł być związany z poborem próbek z większej głębokości (z 0,2 m w 2014 do 1,5 m w 2015 roku). Pobór próbek wód jeziora z innej głębokości był związany z ich równoczesnym wykorzystaniem do analiz metagenomicznych. Jednak, w porównaniu z wcześniejszym rokiem, w 2015 roku w osadzie jeziora również zaobserwowano wyższą aż o 4 rzędy wielkości liczebność ampicylioopornych bakterii. Dla porównania ta frakcja bakterii w osadach Soły wzrosła w ciągu roku tylko nieznacznie z $2,08 \times 10^5 \pm 8,68 \times 10^4$ do $2,9 \times 10^5 \pm 4,32 \times 10^4$ jtk ml⁻¹. Podsumowując, obserwowany wzrost liczebności ampicylioopornych bakterii w jeziorze mógł być związany z nie tylko ze zmianą głębokości poboru próbek, ale także z napływem większej liczebności mikroorganizmów wraz z wodami Soły. Liczebność wszystkich analizowanych frakcji bakterii była statystycznie istotnie wyższa w próbkach osadów (jtk g s. m.⁻¹) z rzeki i jeziora niż w próbkach wód (jtk ml⁻¹). Podobne relacje obserwowali Czekański i współpracownicy (2012).

W 2014 roku do zakładanej kolekcji ampicylioopornych mikroorganizmów izolowano bakterie Gram-ujemne. W tym roku dodatkowo oznaczono liczebność hodowlanej frakcji wspomnianej grupy drobnoustrojów, aby ocenić jej udział

w populacjach badanych środowisk. Najwyższą liczebność bakterii Gram-ujemnych w tym opornych na ampicylinę zaobserwowano w ściekach surowych. Liczebność bakterii Gram-ujemnych w tym opornych na ampicylinę była zredukowana w procesie oczyszczania ścieków o 3 rzędy wielkości. Bakterie Gram-ujemne miały największy udział wśród heterotrofów zasiedlających osady Soły (26%) i ścieki surowe (21%). Natomiast ich ampicyliooporna frakcja stanowiła 36% opornych na ten antybiotyk heterotrofów w osadzie Soły i ok. 25% opornych heterotrofów bytujących w ściekach surowych, osadzie czynnym i wodzie jeziora.

Analiza frakcji antybiotykoopornych mikroorganizmów dostarcza cennej informacji na temat udziału tych drobnoustrojów w populacjach zasiedlających poszczególne środowiska. Przykładowo udział ampicylioopornych frakcji bakterii był wyższy w osadzie czynnym niż w ściekach surowych, co wskazuje na wybiórczą proliferację tej grupy mikroorganizmów. Mogła być ona wywołana presją selekcyjną związaną z obecnością w komorze osadu czynnego antybiotyków i/lub innych związków sprzyjających koselekcji ARGs (Sørensen i in., 2005; Zhang i in., 2009; Mao i in., 2015). Udział ampicylioopornych frakcji bakterii był wyższy w próbkach osadów rzeki i jeziora niż w próbkach wody. Może to świadczyć o kumulowaniu się ARGs w populacjach bakterii zasiedlających osady denne, co również odnotowali Czekalski i in. (2012).

Metoda płytkowa pozwala na określenie liczebności jedynie niewielkiej frakcji populacji mikroorganizmów środowiskowych, stąd dla uzyskania pełniejszego obrazu badanych populacji w 2015 roku w próbkach oznaczono również liczbę kopii genu 16S rRNA. Należy przy tym zaznaczyć, że liczba kopii analizowanego genu nie oznacza bezpośrednio liczebności niehodowlanej frakcji bakterii. Jest to związane ze zróżnicowaną zawartością kopii tego genu w komórkach bakterii, a także namnażaniem produktu PCR na matrycy DNA pochodzącej z martwych komórek (Czekalski i in., 2012; Stoddard i in., 2015). Liczba kopii genu 16S rRNA ml⁻¹ lub g s.m. osadu⁻¹ była o 2-7 rzędów wielkości wyższa niż ogólna liczebność bakterii heterotroficznych, co także w swoich badaniach zaobserwowali Czekalski i współpracownicy (2012). Najmniejszą różnicę pomiędzy tymi parametrami zaobserwowano dla próby ścieków surowych. Większy niż w pozostałych próbkach udział bakterii heterotroficznych był najpewniej związany z wysoką zawartością materii organicznej w ściekach surowych. Analiza wariancji wyników uzyskanych metodą qPCR również potwierdziła istotną statystycznie różnicę (p<0,001) między surowymi i oczyszczonymi ściekami, wskazując na znaczną redukcję bakterii w procesie

oczyszczania ścieków. Inaczej niż wskazywały na to wyniki dotyczące frakcji hodowlanych mikroorganizmów, nie wykazano istotnej statystycznie różnicy ($p < 0,001$) w liczbie kopii genu 16S rRNA między próbkami wód oraz między próbkami osadów jeziora i rzeki. Natomiast liczba sekwencji odpowiadających genowi 16S rRNA/1 mln odczytów w wodach Soły była blisko 3 razy wyższa niż w wodach jeziora. Te różnice mogą wynikać przede wszystkim z różnic w zastosowanych metodach. Między innymi istotną rolę mogło odegrać samo podejście do uzyskania produktów PCR. W metodzie qPCR amplifikowano wybiórczo sekwencje badanego genu. Natomiast w sekwencjonowaniu nowej generacji przyjęto podejście „shotgun”, co oznacza, że amplikony zawierające fragmenty genu 16S rRNA trafiały do bibliotek losowo.

VI.2. Kolekcja ampicylioopornych szczepów

Ze wszystkich badanych środowisk wyizolowano łącznie 490 szczepów opornych na ampicylinę, w tym frakcję bakterii Gram-ujemnych rosnących na agarze MacConkeya. Ta kolekcja ma posłużyć w przyszłości do znalezienia powiązań gospodarz-plazmid opornościowy, których określenie nie było możliwe na podstawie zastosowanych w projekcie metod.

VI.3. Bioróżnorodność mikroorganizmów w metagenomach ścieków oczyszczonych oraz wód Soły i Jeziora Żywieckiego

Analiza krzywych rarefakcji wykazała, że najniższą rangą, dla jakiej uzyskano pełne pokrycie był typ. Stąd bioróżnorodność badanych metagenomów porównywano w tej kategorii systematycznej. Na podstawie metody Bray-Curtisa stwierdzono, że pod względem składu populacji wszystkie badane próbki różniły się od siebie statystycznie ($p < 0,001$), a najbardziej skrajne wartości tej metryki uzyskano dla wód Soły i jeziora. Wyznaczenie indeksów bioróżnorodności pozwoliło na wskazanie próbki, w której ten parametr był najwyższy. Najwyższą wartość wskaźnika różnorodności H' oraz najniższą wartość niedostatku równocенności zaobserwowano dla wód jeziora i (zgodnie z metryką Bray-Curtisa) odwrotnie dla wód Soły. Na uwagę zasługuje fakt, że udział 16S rRNA/1 mln odczytów w wodach Soły był blisko 3 razy wyższy niż w wodach jeziora. Na podstawie wartości wskaźnika niedostatku równocенności oraz niedostatku bogactwa

taksonów można przypuszczać, że niska bioróżnorodność obserwowana w wodach Soły jest związana z występowaniem dominujących typów. Natomiast większa bioróżnorodność w wodach Jeziora Żywieckiego – z większą równocześnie poszczególnych taksonów. Istotnie, analiza udziału poszczególnych typów bakterii potwierdziła dominację *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* (łącznie 93%) w metagenomie wód Soły. Zespoły bakterii zasiedlające rzeki są najczęściej zdominowane przez przedstawicieli *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* i *Verrucomicrobia*. Wyniki sekwencjonowania nowej generacji niektórych metagenomów rzecznych wskazują wręcz na przewagę dwóch głównych typów *Proteobacteria* oraz *Actinobacteria* lub *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*. Na podstawie analiz metagenomicznych wód Tamizy stwierdzono także, że dominacja typów bakterii zmieniała się na korzyść *Actinobacteria* wraz z odległością od źródła tej rzeki (Ghai i in., 2011; Staley i in., 2013; Kolmakova i in., 2014; Read i in., 2015; Savio i in., 2015). Za dominację *Bacteroidetes* w wodach Soły odpowiadają przedstawiciele *Flavobacteria* (Tabela A1), a ich intensywny rozwój został powiązany ze zwiększoną w wodach dostępnością materii organicznej (Parulekar i in., 2017). Wyniki państwowego monitoringu środowiska potwierdziły okresowy, znaczący udział zawiesin w wodzie Soły (Jaguś, 2017).

We wszystkich badanych metagenomach udział bakteryjnego genu 16S rRNA na tle pozostałych genów SSU był bardzo wysoki i wynosił od 83 do 96%. Najwyższy odsetek (14,7%) chloroplastowych SSU zaobserwowano w wodach jeziora. Może to być związane z eutrofizacją zbiornika w okresie letnim, którą wykazały Jachniak i Suchanek (2015). Co interesujące na podstawie obserwacji mikroskopowych wody z Jeziora Żywieckiego podczas eutrofizacji w 2012 roku stwierdzono silny rozwój zielenic i brak obecności sinic (Jachniak i Suchanek, 2015). Tymczasem wyniki analiz metagenomicznych 3 lata później wykazały 18% udział *Cyanobacteria* w zespołach mikroorganizmów bytujących w wodach tego zbiornika. Typy bakterii dominujące w jeziorze Żywieckim odpowiadały dominującym typom w norweskim jeziorze eutroficznym Akersvannet i są charakterystyczne dla tego rodzaju zbiorników wodnych. Przedstawiciele *Proteobacteria* i *Actinobacteria* to powszechnie spotykane mikroorganizmy wód słodkich. Bakterie należące do *Bacteroidetes* często występują w okresie eutrofizacji zbiorników i potrafią degradować toksyny sinic, a także złożone cząsteczki pochodzące z komórek glonów (Parulekar i in., 2017).

W ściekach oczyszczonych z oczyszczalni ścieków w Żywcu dominowały typy *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Najczęściej reprezentowane taksony w badanym zakładzie pokrywają się z dominującymi typami oznaczonymi w ściekach oczyszczonych z zakładów z różnych rejonów świata (Szwecja, Chiny, Arabia Saudyjska) (Ye i Zhang, 2013; Al-Jassim i in., 2015; Bengtsson-Palme i in., 2016). Przy czym bakterie należące do *Firmicutes* nigdzie nie osiągały tak wysokiego udziału jak w oczyszczalni w Żywcu. Ten wysoki udział *Firmicutes* był przede wszystkim związany z obecnością przedstawicieli rodzin *Lachnospiraceae* oraz *Veillonellaceae*, które są związane z układem pokarmowym zwierząt i człowieka (Tabela A1) (Ye i Zhang, 2013; Al-Jassim i in., 2015; Bengtsson-Palme i in., 2016).

VI.4. Udział genów warunkujących antybiotykooporność oraz genów kodujących integrazy 1 klasy w metagenomach badanych środowisk

Porównanie badanych metagenomów wykazało istnienie największego bogactwa genów warunkujących oporność na antybiotyki wśród mikroorganizmów bytujących w ściekach oczyszczonych. Wartość stosunku liczby różnych zidentyfikowanych ARGs do liczby sekwencji odpowiadającej 16S rRNA dla danej próbki w ściekach oczyszczonych była odpowiednio 3,9 i 7,3 razy wyższa niż w wodach Soły i jeziora. Tak wysoki udział ARGs w populacjach bytujących w ściekach oczyszczonych nie jest zaskoczeniem. Trafiające do oczyszczalni ścieków związane z organizmem człowieka bakterie są często narażone na kontakt z terapeutycznymi dawkami antybiotyków i wykazano, że ich genomy zawierają znaczną pulę genów warunkujących antybiotykooporność (Sommer i in., 2010; Bengtsson-Palme, i in., 2015a; Schaik, 2015). Ponadto stwierdzono, że usuwanie ARGs podczas procesu oczyszczania ścieków jest przede wszystkim związane z redukcją mikroorganizmów, a nie z selektywną redukcją ARGs z komórek bakterii (Czekalski i in., 2012; Bengtsson-Palme i in., 2016).

We wszystkich trzech analizowanych metagenomach wysoki udział stanowiły geny kodujące oporność na elfamycyny. Niewrażliwość na elfamycyny w badanych mikrobiomach była związana z obecnością w komórkach zmodyfikowanego czynnika elongacyjnego EF-Tu, który pozostaje niewrażliwy na działanie tych leków. Ten typ oporności uważa się za naturalną niewrażliwość występującą wśród przedstawicieli

promieniowców, które produkują antybiotyki należące do omawianej klasy (Cappellano i in., 1997). Najwyższy udział zmutowanych genów kodujących EF-Tu (0,8 EF-Tu/16S rRNA) stwierdzono w wodach jeziora, co może być wynikiem obserwowanej w tej próbie dominacji *Actinobacteria*, do których należą promieniowce. Bardzo wysoki udział sekwencji EF-Tu w wodach jeziora przyczynił się do wzrostu ogólnej liczby sekwencji kodujących ARGs, a to z kolei wpłynęło na podwyższenie wartości udziału wszystkich ARGs/16S rRNA. Gdyby w obliczaniu tego współczynnika dla wszystkich prób nie brać pod uwagę sekwencji genów EF-Tu, to jego wartość dla wód Soły i jeziora byłaby jednakowa i wynosiła 1, natomiast dla ścieków oczyszczonych wyniosłaby 2. Takie podejście wydaje się być słuszniejsze, gdyż usuwa zakłócenie związane z dominacją jednego taksonu (i naturalnie występujących w nim ARGs), a odsłania realne zależności w udziale ARGs w poszczególnych metagenomach. Ponadto udział identyfikowanego u rodzaju *Streptomyces* genu *parY* kodującego niewrażliwą na aminokumaryny gyrazę DNA również był najwyższy w wodach jeziora. Oporność na aminokumaryny – antybiotyki inhibujące gyrazę DNA – występuje często u promieniowców produkujących te antybiotyki (Schmutz i in., 2004).

Geny warunkujące wielolekooporność (MDR) najczęściej kodują białkowe systemy efflux. Wszystkie spośród 50 najliczniej reprezentowanych w metagenomach ARGs niosących MDR miały związek z aktywnym usuwaniem antybiotyków z komórki. Najczęściej były to geny kodujące białka budujące trójskładnikowe kompleksy RND, takie jak *mex* czy *acr* identyfikowane odpowiednio u *P. aeruginosa* i *E. coli*. Dwukrotnie większy udział tych genów niż w wodach jeziora obserwowano w wodach Soły i ściekach oczyszczonych. Przeciwnie, Tang i in. (2016) obserwowali najwyższy udział genów kodujących białkowe systemy efflux w rzece otrzymującej ścieki oczyszczone poniżej miejsca ich zrzutu. Natomiast Christgen i in. (2015) wykazali zwiększony udział genów MDR w ściekach oczyszczonych metodą tlenową.

Jakościowa analiza porównawcza obecności różnych ARGs w badanych metagenomach wykazała występowanie odpowiednio 3 i 11 genów wspólnych wyłącznie dla ścieków oczyszczonych i wód jeziora oraz dla wód Soły i jeziora. Taki wynik sugeruje, że większość ARGs dostarczanych do jeziora wraz ze ściekami oczyszczonymi lub wodami Soły nie jest utrzymywana w populacjach mikroorganizmów zasiedlających wody jeziora. Podobnie liczba kopii ARGs/16S rRNA oznaczona metodą qPCR w chińskiej rzece (okolice Pekinu) była znacznie niższa niż ta w ściekach oczyszczonych, które do niej

odprowadzono, co tłumaczono efektem rozcieńczenia (Xu i in., 2015). Co więcej, występowanie 920 z 1 713 zidentyfikowanych genów tylko w próbkach z wód Soły i ścieków oczyszczonych może wskazywać na fekalne zanieczyszczenie wód Soły, jako przyczynę tak dużego bogactwa ARGs. Świadczy o tym najwyższy w porównaniu do pozostałych metagenomów udział sekwencji 16S rRNA odpowiadających przedstawicielom rodziny *Enterobacteriaceae* w wodach tej rzeki (Tabela A1). W raporcie o stanie środowiska z 2016 roku Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Katowicach ocenia stan wód w Sole (przy wpływie do jeziora) i Kaskadzie Soły na zły ze względu na zanieczyszczenia chemiczne – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Jednakże do oceny klasy czystości nie brano pod uwagę obecności bakterii kałowych (WIOŚ w Katowicach, 2016). Jednostki odpowiedzialne za monitoring czystości wód powierzchniowych rutynowo oznaczają bakterie kałowe tylko w punktach ujęcia wody przeznaczonej do spożycia lub w figurujących w ewidencji kąpieliskach (Jezioro Żywieckie nie figurowało w 2016 roku jako kąpielisko w ewidencji PSSE w Żywcu). Ujęcie wody pitnej dla Browaru Żywieckiego znajdujące się w Jeziorze Żywieckim zostało zaklasyfikowane przez Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Katowicach w 2015 roku do kategorii A1 (WSSE w Katowicach, 2015). Wyniki badań przeprowadzonych przez WIOŚ wskazują, że pod względem parametrów fizykochemicznych wody Soły na odcinku przy ujściu do jeziora w 2012 miały klasę I. Natomiast obecność bakterii kałowych świadczy o ich ówczesnym złym stanie sanitarnym (Jaguś, 2017).

Poszczególne geny warunkujące oporność na β -laktamy (*bla*) w badanych metagenomach miały niski udział w ogólnej liczbie ARGs i nie znalazły się w grupie 50 najliczniej reprezentowanych ARGs. Jednakże analiza łącznego udziału wszystkich zidentyfikowanych genów kodujących β -laktamazy (*Totalbla*) wykazała, że z powodu dużej różnorodności tych genów, ich udział w ściekach oczyszczonych sięgał aż 24% wszystkich ARGs. Natomiast udział *Totalbla*/16S rRNA w tej próbce wynosił 0,56. Tak wysoka wartość współczynnika *Totalbla*/16S rRNA wskazuje na duże rozprzestrzenienie genów warunkujących oporność na β -laktamy wśród bakterii uwalnianych wraz z oczyszczonymi ściekami z oczyszczalni ścieków w Żywcu. Jednakże niższa o 2 rzędy wielkości wartość tego współczynnika (0,005) i zdecydowanie mniejsza różnorodność genów *bla* w wodach jeziora wskazują na brak znaczącej kumulacji bądź utrzymywania się tych genów w genomach bakterii zasiedlających wody badanego jeziora.

Co więcej w wodach Soły dla wspomnianych wyżej parametrów obserwuje się wartości bliższe wartościom otrzymanym dla ścieków oczyszczonych. Również dominujące typy β -laktamaz są wspólne dla obu próbek. W tych próbkach dominują geny kodujące enzymy klasy A (2): TEM, SHV, CTX-M i klasy D: OXA. Chociaż OXA jest również jednym z najliczniejszych wśród typów β -laktamaz w wodach jeziora, to jego udział jest 70-167 razy mniejszy w porównaniu do dwóch pozostałych metagenomów. Ponadto w wodach jeziora dominują również typy KPC (klasa A/2) oraz IND (klasa B/3), dla których charakterystycznymi substratami są karbapenemy, a także typ VEB (klasa A/2), dla którego charakterystycznymi substratami są cefalosporyny o rozszerzonym spektrum działania i monobaktamy (Bush i Jacoby, 2010). Warto zaznaczyć, że w pozostałych dwóch metagenomach nie stwierdzono obecności genów kodujących β -laktamazy typu IND i KPC, co oznacza, że geny te mogły się dostać do wód jeziora z innych źródeł. Zidentyfikowane w badanych metagenomach typy β -laktamaz były już spotykane w podobnych środowiskach. Przykładowo 78% izolatów ze ścieków oczyszczonych z zakładu w Wixu (Chiny) niesło przynajmniej 1 gen kodujący β -laktamazę typu TEM, SHV lub CTX-M. Przy czym najczęściej identyfikowano geny kodujące enzymy typu TEM. Ponadto udokumentowano zwiększony udział genów kodujących β -laktamazy typu CTX-M w metagenomach ścieków oczyszczonych w porównaniu do ścieków surowych w kilku zakładach w Szwecji. Natomiast znaczny wzrost częstości występowania β -laktamaz typu CTX-M wykazano w izolatach z osadów angielskiej rzeki poniżej miejsca zrzutu ścieków oczyszczonych. Enzymy typu CTX-M, VEB, KPC, czy OXA są spotykane w populacjach mikroorganizmów zasiedlających różne ekosystemy słodkowodne (Girlich i in., 2011; Lupo i in., 2012; Amos i in., 2014a; Zhang i in., 2015; Bengtsson-Palme i in., 2016).

W 2014 roku za pomocą metody PCR identyfikowano geny kodujące β -laktamazy w ściekach surowych i osadzie czynnym. Większość (7/10) spośród badanych genów była obecna w obu metagenomach. Dodatkowo zastosowanie techniki PCR-DGGE pozwoliło na detekcję w poszczególnych próbkach wielu różnych sekwencji tych samych genów, co wskazywało, że geny te występują u różnych mikroorganizmów. Ponadto stwierdzono, że dominujące sekwencje zidentyfikowanych genów *bla* były wspólne dla obu próbek. Obecność w osadzie czynnym genu *imp-5* oraz dodatkowych sekwencji genu *oxa-46*, których nie zaobserwowano w ściekach surowych, świadczy o możliwości utrzymywania się pewnych genów *bla* w genomach bakterii z osadu czynnego (Zhang i in., 2009).

Wszystkie wybrane do oznaczenia metodą PCR geny wykryto w osadzie czynnym i ściekach oczyszczonych z oczyszczalni ścieków w Bielefeld (Niemcy) (Szczepanowski i in., 2009). Porównanie wyników metody PCR z osadu czynnego (2014) oraz sekwencjonowania nowej generacji próbek ścieków oczyszczonych (2015) wykazało, że geny *ampC* i *bla_{mps-2}* zostały wyeliminowane w ściekach oczyszczonych. Natomiast w ściekach oczyszczonych oznaczono geny (*bla_{TEM-1}*, *oxa-50*, *oxa-75*), których nie wykryto rok wcześniej w osadzie czynnym. Obecności genu *ctxm-4* nie stwierdzono w żadnej z omawianych próbek. Zaobserwowane różnice w uzyskanych danych mogą jednak wynikać z zastosowania dwóch odmiennych technik, a także z różnych terminów poboru próbek.

Istotną rolę w rozprzestrzenianiu genów warunkujących oporność na antybiotyki odgrywa ich lokalizacja na ruchomych elementach genetycznych takich, jak integrony 1 klasy. Największy udział (*intI1/16S* rRNA) genów kodujących integrazy niesione przez tę klasę integronów zaobserwowano w ściekach oczyszczonych. Podobnie Ma i in. (2013) oraz Makowska i in. (2016) obserwowali zwiększoną częstość występowania integronów w komórkach bakterii bytujących w ściekach oczyszczonych (Ma i in., 2013; Makowska i in., 2016). Ponadto odnotowywano również zwiększoną częstość występowania integronów 1 klasy w odbiornikach ścieków oczyszczonych (Aubertreau i in., 2016; Makowska i in., 2016). Jednak wartość *intI1/16S* rRNA w próbce wód z jeziora Żywieckiego była najniższa.

VI.5. Kolekcja plazmidów opornościowych w komórkach *E. coli* DH5 α

Kolekcję plazmidów opornościowych pochodzących z badanych środowisk próbowano założyć na trzy sposoby. Dwa pierwsze miały pozwolić na uzyskanie plazmidów R z metaplazmidomów (bez etapu namnażania mikroorganizmów) poprzez: (1) bezpośrednią koniugację mikroflory badanych środowisk z wybranym biorcą oraz (2) transformację plazmidowego DNA izolowanego bezpośrednio z próbek do wybranego biorcy. Jednak żadna z wymienionych metod nie pozwoliła na uzyskanie pożądanego celu. Kolekcję plazmidów opornościowych założono dopiero po elektroporacji komórek *E. coli* DH5 α uprzednio wyizolowanym ze wzbogaconych kultur plazmidowym DNA. Należy zaznaczyć, że zastosowanie jednego konkretnego gospodarza (*E. coli*) jest dużym ograniczeniem puli pozyskiwanych plazmidów (Smalla i in., 2015). Wychwycono tylko te

wektory, które replikują się i ulegają ekspresji w *E. coli*. Można zatem stwierdzić, że w badanych metagenomach udział plazmidów zdolnych do replikacji i ekspresji w komórkach *E. coli* był na tyle niski, że zastosowanie metod bez hodowli wzbogaconych nie pozwoliło na wychwycenie tych wektorów. Natomiast wprowadzenie etapu hodowli badanej mikroflory w bogatym podłożu, jakim jest LB i w obecności ampicyliny przyczyniło się do proliferacji heterotroficznych mikroorganizmów opornych na ten antybiotyk (w tym posiadających plazmidy opornościowe).

Pomyślnie przeniesiono plazmidy opornościowe z próbek ścieków surowych, osadu czynnego, ścieków oczyszczonych, wód Soły oraz osadów Soły i jeziora. Natomiast (pomimo zastosowania metody z hodowlą wzbogaconą) nie powiódł się transfer plazmidów izolowanych z próbek wody jeziora. To niepowodzenie mogło być spowodowane najniższym wśród badanych metagenomów środowiskowych udziałem genów warunkujących oporność na β -laktamy w wodach jeziora, co wykazała analiza metagenomiczna. Natomiast wyizolowanie plazmidów opornościowych z osadu jeziora może świadczyć o kumulowaniu się ARGs w populacjach bakterii zasiedlających osady denne. Na co również wskazują wyniki metody płytkowej.

W kolekcji plazmidów niosących oporność na ampicylinę znalazło się łącznie 56 wektorów. Na podstawie typowania replikonów 10 spośród nich przypisano do grup niezgodności. 8 plazmidów pochodzących z wód Soły (pSŁWa/b/c/e/f/h/i/l) należało do grupy IncF, natomiast 1 wyizolowany ze ścieków oczyszczonych (pŚOe) i 1 z osadu jeziora (pJOh) przypisano do grupy IncN. Podobnie typowanie replikonów niesionych przez odporne na β -laktamy bakterie izolowane z angielskiej rzeki wykazało największy udział plazmidów z grupy IncF (Amos i in., 2014a). Co więcej tę grupę plazmidów powiązano z rozprzestrzenianiem β -laktamaz CTX-M, których różnorodność w wodzie Soły była wysoka. Plazmidy należące do grupy IncF mają wąski, bo ograniczony do rodziny *Enterobacteriaceae*, zakres gospodarza i są powszechnie spotykane zarówno u szczepów pochodzących od ludzi, jak i od zwierząt. Wąski zakres gospodarzy tłumaczy brak zaobserwowanych transkoniugantów po przeprowadzonej koniugacji z *A. tumefaciens*. Wektory pSŁWc i pSŁWh warunkowały oporność na ceftazydym (cefalosporynę III generacji), ale nie na meropenem (karbapenem). Wrażliwość na karbapenemy i jednoczesna oporność na cefalosporynę III generacji może wskazywać na aktywność β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (Bush i Jacoby, 2010). Oprócz warunkowania antybiotykooporności, plazmidy IncF często odpowiadają za

wirulencję mikroorganizmów (Carattoli, 2009; Marcadé i in., 2009; Wibberg i in., 2013; Woerther i in., 2013).

Choć w przeszłości wektory z grupy IncN częściej występowały u bakterii kałowych izolowanych od zwierząt, obecnie odgrywają one coraz większą rolę w rozprzestrzenianiu antybiotykooporności wśród izolatów klinicznych (Eikmeyer i in., 2012). Z tymi wektorami powiązano m.in. geny kodujące β -laktamazy KPC, które dominowały w wodzie jeziora (Carattoli, 2009, 2013). Z największą częstością z oczyszczalni ścieków izolowano plazmidy należące do IncP. Te zdolne do własnego transferu plazmidy zostały już dobrze opisane (Schlüter i in., 2007). Natomiast plazmidy z grupy IncN w oczyszczalniach obserwowano znacznie rzadziej. 4 wektory należące do grupy IncN wyizolowano ze ścieków oczyszczonych z oczyszczalni w Bielefeld (Niemcy). Charakteryzowały się one wąskim zakresem gospodarzy oraz bardzo wysoką częstością koniugacji (0,3-0,5), a także niosły oporność na wiele antybiotyków (Eikmeyer i in., 2012). Należący do tej samej grupy plazmid p^{SOe} również wykazywał najwyższą obserwowaną częstość koniugacji. Jednak była ona aż o 6 rzędów wielkości niższa niż w przypadku wektorów pochodzących z Bielefeld. Plazmidy p^{SOe} i p^{JOh} nie niosły oporności na karbapenem, co oznacza, że nie kodowały β -laktamaz typu KPC. Omawiane wektory warunkowały także oporność na ciprofloksacynę (fluorochinolon). Geny warunkujące oporność na ten antybiotyk obserwowano również u innych plazmidów należących do tej grupy niezgodności (Eikmeyer i in., 2012).

Dwa inne pochodzące z wód Soły replikony (p^{SŁWd}, p^{SŁWj}), których przynależności nie udało się ustalić, wykazywały zdolność do koniugacyjnego transferu. U p^{SŁWd} stwierdzono najwyższą częstość koniugacji wśród plazmidów izolowanych z tego środowiska ($2,07 \times 10^{-6} \pm 5,68 \times 10^{-7}$). Ponadto oprócz oporności na ampicylinę warunkował on również niewrażliwość na ceftazydim, co może świadczyć o aktywności β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym. Podobną sytuację zaobserwowano u transformanta niosącego mobilizowalny plazmid p^{OCZc}.

Plazmidy niezdolne do własnego transferu mogą zostać zmobilizowane do przeniesienia przez współistniejące z nimi w komórce plazmidy koniugacyjne. Wyniki doświadczenia z zastosowaniem szczepu *E. coli* S17-1 jako dawcy badanych plazmidów wykazały, że aż 40 spośród 43 niezdolnych do własnego przeniesienia plazmidów zostało zmobilizowanych do transferu. Co interesujące najwyższy udział plazmidów mobilizowalnych obserwowano wśród wektorów wyizolowanych z próbek z oczyszczalni

ścieków oraz osadów rzeki i jeziora. Natomiast przeważająca liczba plazmidów uzyskanych z wód Soły to plazmidy koniugacyjne.

Zakres gospodarzy plazmidów koniugacyjnych sprawdzono jedynie z zastosowaniem *A. tumefaciens* (*Alphaproteobacteria*). Było to związane z trudnościami w pozyskaniu odpowiednich szczepów biorców, które z jednej strony posiadałyby właściwy marker umożliwiający selekcję, a z drugiej byłyby niewrażliwe na ampicylinę. Powszechna oporność na ampicylinę wśród bakterii środowiskowych wykluczyła także możliwość zastosowania środowiskowych izolatów znajdujących się w kolekcji Katedry Mikrobiologii. Określenie potencjalnego zakresu gospodarzy było możliwe w przypadku tych wektorów, które udało się zaklasyfikować do grup niezgodności.

Zastosowanie wektorów pułpkowych umożliwia identyfikację funkcjonalnych elementów transpozycyjnych. Wykorzystany w badaniach pMAT1 został skonstruowany z użyciem mobilizowalnego plazmidu pBBR1MCS-2 o szerokim zakresie gospodarzy. Umożliwia on wychwycenie wszystkich typów elementów transpozycyjnych. Za pomocą pMAT1 uzyskiwano elementy transpozycyjne z takich rodzajów, jak *Halomonas*, czy *Paracoccus* (Sołyga i Bartosik, 2004; Szuplewska i Bartosik, 2009; Dziewit i in., 2012; Dziewit i in., 2013;). Z wykorzystaniem wektora pułpkowego pMAT1 nie uzyskano niosących oporność na ampicylinę elementów transpozycyjnych z żadnego z badanych plazmidów. Plazmidowo kodowane geny warunkujące oporność na wspomniany antybiotyk mogą być ulokowane poza elementami transpozycyjnymi, bądź też te elementy nie są aktywne np. z powodu mutacji.

VI.6. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań

Na podstawie wyników uzyskanych metodami hodowlanymi oraz analiz metagenomicznych nie stwierdzono wyraźnego wpływu uwalniania ścieków oczyszczonych z oczyszczalni w Żywcu na rozprzestrzenienie genów warunkujących antybiotykooporność wśród populacji bakterii zasiedlających wody Jeziora Żywieckiego. Co więcej liczebność antybiotykoopornych bakterii oraz różnorodność i udział genów warunkujących antybiotykooporność w wodach i osadach Soły były wyższe niż w badanym jeziorze. Jeszcze dziesięć lat temu bardzo poważny problem w badanej zlewni stanowiła niezorganizowana gospodarka ściekowa. Dopiero realizacja współfinansowanego przez Unię Europejską projektu *Oczyszczanie ścieków*

na *Żywiecczyźnie*, związana z modernizacją oczyszczalni oraz budową sieci kanalizacyjnej przyniosła znaczną poprawę jakości wód w Sole i Jeziorze Żywieckim. Jednakże, na co wskazują także niniejsze badania, gospodarka ściekowa w zlewni Soły wciąż nie jest jeszcze w pełni kontrolowana i do rzeki dostają się zanieczyszczenia komunalne. Lepsza jakość wód w jeziorze niż w rzece świadczy o tym, jak ważną, ochronną rolę dla całego ekosystemu pełni oczyszczalnia ścieków w Żywcu.

W związku z otrzymanymi w ramach niniejszej pracy wynikami, pojawiły się kolejne pytania, na które warto szukać odpowiedzi w perspektywie dalszych badań:

1. Wyniki metody płytkowej zasugerowały możliwą akumulację antybiotykoopornych bakterii i genów kodujących antybiotykooporność w osadach dennych, dlatego niezmiernie interesujące byłoby przeprowadzenie w tym kierunku analiz metagenomicznych w próbkach osadów z Soły i Jeziora Żywieckiego.
2. Wielu plazmidów nie udało się przypisać do grupy niezgodności. Być może te wektory to zupełnie nowe replikony. Warto byłoby wykorzystać te plazmidy do konstrukcji minireplikonów w celu dokonania ich identyfikacji i charakterystyki (np. sprawdzić zakres gospodarzy).
3. Warto również przeanalizować założoną kolekcję szczepów środowiskowych. Można wyodrębnić szczepy niosące plazmidy opornościowe (wykorzystując także inne niż ampicylina antybiotyki) i dokonać ich identyfikacji, co pozwoli znaleźć zależność plazmid-gospodarz.
4. W pracy dokonano ogólnej charakterystyki plazmidów, natomiast warto byłoby zsekwencjonować wybrane replikony.

VII. WNIOSKI

1. Podczas procesu oczyszczania ścieków w oczyszczalni ścieków w Żywcu dochodzi do istotnego statystycznie spadku liczebności ogólnej hodowlanej frakcji bakterii heterotroficznych. A także bakterii opornych na ampicylinę.
2. W komorze osadu czynnego może dochodzić do wybiórczej proliferacji bakterii opornych na ampicylinę, na co wskazują wyniki uzyskane metodą płytkową.
3. Geny warunkujące antybiotykooporność mogą kumulować się w populacjach bakterii zasiedlających osady denne jeziora i rzeki.
4. Geny warunkujące oporność na antybiotyki oraz integrony 1 klasy miały najwyższy udział w metagenomie ścieków oczyszczonych.
5. Ścieki oczyszczone oraz wody Soły i Jeziora Żywieckiego cechowały się odmienną bioróżnorodnością. Największą bioróżnorodność zaobserwowano w wodach Jeziora Żywieckiego, a najmniejszą w wodach Soły.
6. Na wyizolowanych plazmidach nie wykryto funkcjonalnych elementów transpozycyjnych niosących oporność na ampicylinę. Większość plazmidów pochodzących z wód Soły ma zdolność do własnego transferu.
7. Prawdopodobnie do Soły wciąż odprowadzane są komunalne ścieki, co przyczynia się do dużego udziału genów warunkujących antybiotykooporność w metagenomie jej wód.
8. Nie stwierdzono wyraźnego wpływu uwalniania ścieków oczyszczonych z oczyszczalni ścieków w Żywcu na rozprzestrzenienie genów warunkujących antybiotykooporność w wodach Jeziora Żywieckiego.

VIII. STRESZCZENIE

Oporność bakterii na antybiotyki stanowi zagrożenie dla współczesnej medycyny. Za globalne rozprzestrzenianie się tego zjawiska odpowiadają przede wszystkim ruchome elementy genetyczne niosące geny warunkujące antybiotykooporność. Udokumentowano, że bakterie środowiskowe odgrywają kluczową rolę w nabywaniu tych genów przez szczepy patogenne. Ponadto stwierdzono, że oczyszczalnie ścieków stanowią swoiste rezerwuary antybiotykoopornych bakterii i genetycznych determinant oporności, które są uwalniane do ekosystemów wodnych. Jednakże wciąż niewiele wiadomo na temat utrzymywania się tych bakterii i genów w odbiornikach ścieków oczyszczonych. Stąd celem badań było określenie losu antybiotykoopornych bakterii i genetycznych determinant oporności w otrzymującym ścieki oczyszczone Jeziorze Żywieckim. Do analiz pobrano próbki ścieków surowych, osadu czynnego i ścieków oczyszczonych z oczyszczalni ścieków w Żywcu oraz próbki wód i osadów z jeziora. Próbki wód i osadów z rzeki Soła pobrane powyżej miejsca utworzenia jeziora stanowiły kontrolę.

Za pomocą metody płytek tartych oznaczono ogólną liczebność bakterii heterotroficznych, w tym ampicyliinoopornych. Wyniki metody płytkowej wykazały istotną statystycznie redukcję wszystkich analizowanych frakcji bakterii w procesie oczyszczania ścieków. Liczebność poszczególnych frakcji bakterii w próbkach z Soły i jeziora była istotnie mniejsza niż w próbkach pobranych z oczyszczalni ścieków. Udział ampicyliinoopornych bakterii był wyższy w osadach niż w wodach rzeki i jeziora, co może świadczyć o kumulowaniu się genów warunkujących antybiotykooporność w populacjach mikroorganizmów zasiedlających osady denne.

Różnorodność zespołów bakterii oraz udział genów warunkujących antybiotykooporność w ściekach oczyszczonych, a także wodach Soły i jeziora została oznaczona poprzez sekwencjonowanie nowej generacji na platformie Illumina[®]. Analiza metagenomiczna wykazała największą bioróżnorodność mikroorganizmów w wodach jeziora. Natomiast najniższą bioróżnorodność stwierdzono w wodach Soły, co było spowodowane wyraźną dominacją w badanej populacji dwóch typów bakterii. Zidentyfikowane w próbkach typy bakterii były charakterystyczne dla odpowiadających im środowisk. Najwyższy udział genów warunkujących antybiotykooporność oznaczono w ściekach oczyszczonych, co wskazuje na uwalnianie z badanej oczyszczalni znaczących ilości tych genów. Jednakże zdecydowanie mniejsza różnorodność i niższy udział tych

genów w wodach jeziora w porównaniu do wód rzeki nie wskazuje na istotny wpływ uwalniania ścieków oczyszczonych na rozprzestrzenienie antybiotykooporności wśród zespołów bakterii zasiedlających wody jeziora.

Za pomocą metody egzogennej założono kolekcję 56 plazmidów opornościowych w komórkach *E. coli*. Wykorzystanie opartej na PCR techniki typowania replikonów nie pozwoliło na określenie grup niezgodności większości wektorów. Zidentyfikowane replikony należały do grup IncF i IncN. Wszystkie plazmidy należące do grupy IncF zostały wyizolowane z wód Soły, natomiast wektory należące do grupy IncN pochodziły z osadów jeziora i ścieków oczyszczonych. Testy mobilności plazmidów wykazały, że większość wektorów uzyskanych z wód Soły była zdolna do własnego transferu, podczas gdy wśród replikonów wyizolowanych z pozostałych próbek przeważały wektory mobilizowalne. Tylko trzy plazmidy opornościowe nie były ani koniugacyjne, ani mobilizowalne. Na podstawie profili lekooporności niesionych przez badane plazmidy stwierdzono, że część plazmidów warunkowała niewrażliwość na cefalosporyny III generacji oraz fluorochinolony. Nie zaobserwowano natomiast oporności na karbapenemy, aminoglikozydy oraz polimyksyny.

Wyniki przeprowadzonych badań nie wykazały wpływu uwalniania ścieków oczyszczonych na rozprzestrzenienie antybiotykooporności wśród bakterii zasiedlających wody Jeziora Żywieckiego. Biorąc pod uwagę (1) odprowadzanie dużych ilości ścieków komunalnych do jeziora i rzeki przed podłączeniem zlewni Soły do oczyszczalni ścieków w Żywcu oraz (2) stan sanitarny Soły na odcinku przy wlocie do jeziora należy zwrócić uwagę na ochronną rolę tej oczyszczalni dla całego badanego ekosystemu wodnego.

IX. SUMMARY

Antibiotic resistance has become a global problem that threatens contemporary medicine. The global spread of this phenomenon is mainly driven by mobile genetic elements bearing antibiotic resistance genes. It has been already established that environmental bacteria play a crucial role in the acquisition of the genes among pathogens. Wastewater treatment plants has been recognised as hotspots for antibiotic-resistant bacteria and mobile genetic elements conferring antibiotic resistance. However, the fate of the bacteria, the genes and the mobile genetic elements in the environment remains uncertain. Therefore the aim of the project was to evaluate the fate of the bacteria and the genes in final effluent receiving Żywieckie Lake (Poland). For this purpose samples of raw sewage, activated sludge and treated sewage were obtained from the wastewater treatment plant in Żywiec and samples of water and sediments from Żywieckie Lake were collected. Additional samples of water and sediments were collected from The Soła River upstream the lake and they served as control.

Plate counts were performed and culturable fraction of total heterotrophic bacteria and ampicillin-resistant bacteria were determined. The results confirmed statistically significant reduction of all studied bacterial fractions during the wastewater treatment process. The number of bacteria observed in the samples of The Soła River and Żywieckie Lake were considerably lower than in the samples collected from the wastewater treatment plant. The number of ampicillin-resistant bacteria was higher in sediment when compared to water samples what may suggest a possible accumulation of ampicillin-resistant bacteria in freshwater sediments.

The biodiversity of microbial communities and antibiotic resistance genes relative abundance in treated sewage, water of the lake and the river were assessed by next generation sequencing on Illumina® platform. The metagenomic analysis revealed the highest microbial diversity in the water sample of Żywieckie Lake. On the other hand, the lowest diversity was observed in the water sample of The Soła, what was probably due to the dominance of two bacterial phyla. The microbial phyla represented in the studied metagenomes were typical of corresponding environments. The highest relative abundance of antibiotic resistance genes (ARGs/16S rRNA) was observed in treated sewage suggesting a considerable amount of the genes being released from the wastewater treatment plant. However, the lowest relative abundance as well as the lowest diversity

of the genes in the lake water, when compared to the other studied metagenomes, suggest rather negligible effect of the treated sewage release on antibiotic resistance spread within water microbial communities of the lake.

The exogenous isolation method allowed to capture 56 resistance plasmids in *E. coli* cells. Using PCR-based replicon typing the majority of plasmids could not be classified to any incompatibility group. The classified replicons belonged to IncF and IncN groups. All IncF plasmids were isolated from water samples of The Soła the latter group was represented by vectors captured from lake sediments and treated sewage. Mobility testing revealed that the majority of plasmids isolated from the water samples of The Soła were conjugative, whereas among plasmids captured from other samples mobilizable vectors prevailed. Only 3 resistance vectors from the plasmid library were neither conjugative nor mobilizable. Susceptibility testing revealed that some of the plasmids conferred resistance to third generation cephalosporins and fluoroquinolones, whereas resistance to carbapenems, aminoglycosides and polymyxins was not observed. The isolation of resistance plasmids from the water samples of Żywieckie Lake failed suggesting lower resistance plasmid abundance in this environment.

The results of the presented study revealed no obvious impact of the treated sewage release on the spread of antibiotic resistance among bacteria residing in water of the receiving lake. Furthermore, uncontrolled sewage dumping to the Soła River and Żywieckie Lake in the past as well as lower quality of water upstream the lake indicate rather protective role of the wastewater treatment plant in the studied ecosystem.

X. LITERATURA

1. Adamczuk, M., Zaleski, P., Dziewit, L., Wolinowska, R., Nieckarz, M., Wawrzyniak, P., Kieryl, P., Plucienniczak, A., Bartosik, D. (2015). Diversity and global distribution of IncL/M plasmids enabling horizontal dissemination of β -lactam resistance genes among the *Enterobacteriaceae*. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–12. doi:10.1155/2015/414681.
2. Al-Jassim, N., Ansari, M. I., Harb, M., Hong, P. Y. (2015). Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation? *Water Res.* 73, 277–290. doi:10.1016/j.watres.2015.01.036.
3. Aminov, R. I., Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 147–161. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x.
4. Amos, G. C. A., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., Wellington, E. M. (2014a). Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1785–1791. doi:10.1093/jac/dku079.
5. Amos, G. C. A., Zhang, L., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., Wellington, E. M. (2014b). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet. Microbiol.* 171, 441–447. doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.017.
6. Ashbolt, N. J., Amézquita, A., Backhaus, T., Borriello, P., Brandt, K. K., Collignon, P., Coors, A., Finley, R., Gaze, W. H., Heberer, T., Lawrence, J. R., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Ryan, J. J., Schönfeld, J., Silley, P., Snape, J. R., Van den Eede, C., Topp, E. (2013). Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ. Health Perspect.* 121, 993–1001. doi:10.1289/ehp.1206316.
7. Aubertreau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., Labanowski, J. (2016). Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* 579, 1387–1398. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.136.
8. Bajaj, P., Singh, N. S., Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* beta-lactamases: What really matters. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.00417.

9. Bengtsson-Palme, J., Boulund, F., Fick, J., Kristiansson, E., Larsson, D. G. J. (2014). Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Front. Microbiol.* 5, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2014.00648.
10. Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Huss, M., Kjellqvist, S., Kristiansson, E., Palmgren, H., Larsson, D. G. J., Johansson, A. (2015a). The human gut microbiome as a transporter of antibiotic resistance genes between continents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6551–6560. doi:10.1128/AAC.00933-15.
11. Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G. J., Nilsson, R. H. (2015b). METAXA2: Improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1403–1414. doi:10.1111/1755-0998.12399.
12. Bengtsson-Palme, J., Hammarén, R., Pal, C., Östman, M., Björlenius, B., Flach, C. F., Fick, J., Kristiansson, E., Tysklind, M., Larsson, D. G. J. (2016). Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Sci. Total Environ.* 572, 697–712. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.228.
13. Bondarczuk, K., Sułowicz, S., Piotrowska-Seget, Z. (2014). Molekularne podstawy bakteryjnej oporności na ampicylinę. *Post. Mikrobiol.* 53, 360–365.
14. Bondarczuk, K., Markowicz, A., Piotrowska-Seget, Z. (2016). The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environ. Int.* 87, 49–55. doi:10.1016/j.envint.2015.11.011.
15. Bonomo, R. A. (2016). β -Lactamases: a focus on current challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 1–16. doi:10.1101/cshperspect.a025239.
16. Bouki, C., Venieri, D., Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 91, 1–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.016.
17. Bush, K., Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09.
18. Bush, K., Bradford, P. A. (2016). β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6. doi:10.1101/cshperspect.a025247.
19. Cappellano, C., Monti, F., Sosio, M., Donadio, S., Sarubbi, E. (1997). Natural kirromycin resistance of elongation factor Tu from the kirrothricin producer

- Streptomyces cinnamoneus*. Microbiology 143, 617–624. doi:10.1099/00221287-143-2-617.
20. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J. Microbiol. Methods. 63 (3), 219–228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018.
 21. Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2227–2238. doi:10.1128/AAC.01707-08.
 22. Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. Int. J. Med. Microbiol. 303, 298–304. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
 23. Carlier, M., Stove, V., Wallis, S. C., De Waele, J. J., Verstraete, A. G., Lipman, J., Roberts, J. A. (2015). Assays for therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics: A structured review. Int. J. Antimicrob. Agents 46, 367–375. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.06.016.
 24. Chomczyńska, M., Łagód, G., Montusiewicz, A., Malicki, J. (2011). Methods for visualization of changes in biodiversity. Proceedings of ECOpole, 29–34.
 25. Christgen, B., Yang, Y., Ahammad, S. Z., Li, B., Rodriguez, D. C., Zhang, T., Graham, D. W. (2015). Metagenomics shows that low-energy anaerobic–aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene levels from domestic wastewater. Environ. Sci. Technol. 49, 2577–2584. doi:10.1021/es505521w.
 26. Chylak, A., Kulikowski, S. (2009). Prognoza oddziaływania na środowisko aktualizacji programu ochrony środowiska dla powiatu żywieckiego na lata 2010–2017.
 27. Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. Front. Microbiol. 3, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2012.00106.
 28. Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 417–433. doi:10.1128/mmbr.00016-10.
 29. Drawz, S. M., Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. Clin. Microbiol. Rev. 23, 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09.
 30. Dziewit, L., Baj, J., Szuplewska, M., Maj, A., Tabin, M., Czyzkowska, A., Skrzypczyk, G., Adamczuk, M., Sitarek, T., Stawinski, P., Tudek, A., Wanasz, K., Wardal, E., Piechucka, E., Bartosik, D. (2012). Insights into the transposable

- mobilome of *Paracoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*). PLoS One 7 (2) e32277. doi:10.1371/journal.pone.0032277.
31. Dziewit, L., Pyzik, A., Matlakowska, R., Baj, J., Szuplewska, M., Bartosik, D. (2013). Characterization of *Halomonas* sp. ZM3 isolated from the Zelazny Most post-flotation waste reservoir, with a special focus on its mobile DNA. BMC Microbiol. 13, 59. doi:10.1186/1471-2180-13-59.
 32. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17, 7843–7853. doi:10.1093/nar/17.19.7843.
 33. Eikmeyer, F., Hadiati, A., Szczepanowski, R., Wibberg, D., Schneiker-Bekel, S., Rogers, L. M., Brown, C. J., Top, E. M., Pühler, A. (2012). The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. Plasmid 68, 13–24. doi:10.1016/j.plasmid.2012.01.011.
 34. Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., Giske, C., Grundman, H., Hasman, H., Holden, M., Hopkins, K. L., Iredell, J., Kahlmeter, G., Köser, C. U., MacGowan, A., Mevius, D., Mulvey, M., Naas, T., Peto, T., Rolain, J. M., Samuelsen, Ø., Woodford, N. (2016). The role of Whole Genome Sequencing (WGS) in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: Report from the EUCAST Subcommittee. Clin. Microbiol. Infect. 23, 2–22. doi:10.1016/j.cmi.2016.11.012.
 35. Ghai, R., Rodríguez-Valera, F., McMahon, K. D., Toyama, D., Rinke, R., de Oliveira, T. C. S., Garcia, J. W., de Miranda, F. P., Henrique-Silva, F. (2011). Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. PLoS One 6 (8) e23785. doi:10.1371/journal.pone.0023785.
 36. Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. (2011). Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 1256–1261. doi:10.1128/AAC.00921-10.
 37. Ishii, K., Fukui, M., Takii, S. (2000). Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. J. Appl. Microbiol. 89, 768–777. doi:jam1177.

38. Jachniak, E., Suchanek, I. (2015). The eutrophication of the Tresna Dam Reservoir in terms of its recreational use. *Inżynieria Ekol.* 44, 170–177. doi:10.12912/23920629/60042.
39. Jaguś, A. (2017). Assessment of the effectiveness of Tresna Reservoir protection based on the Soła River waters contamination. *Inżynieria Ekol.* 18, 55–60. doi:10.12912/23920629/68320.
40. Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., Lago, B. A., Dave, B. M., Pereira, S., Sharma, A. N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L. E., Frye, J. G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E. L., Pawlowski, A. C., Johnson, T. A., Brinkman, F. S. L., Wright, G. D., McArthur, A. G. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45, 566-573. doi:10.1093/nar/gkw1004.
41. Kendall, H. (1994). *Marvels of Science 50 Fascinating 5-Minute Reads*. Libraries Unlimited.
42. Kolmakova, O. V., Gladyshev, M. I., Rozanov, A. S., Peltek, S. E., Trusova, M. Y. (2014). Spatial biodiversity of bacteria along the largest Arctic river determined by next-generation sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 89, 442–450. doi:10.1111/1574-6941.12355.
43. Krysta, K., Sułowicz, S., Piotrowska-Seget, Z. (2011). Białkowe systemy eksportu warunkujące oporność bakterii na antybiotyki. *Post. Biol. Kom.* 2, 297–312.
44. LaPara, T. M., Madson, M., Borchardt, S., Lang, K. S., Johnson, T. J. (2015). Multiple discharges of treated municipal wastewater have a small effect on the quantities of numerous antibiotic resistance determinants in the Upper Mississippi River. *Environ. Sci. Technol.*, 150910082453007. doi:10.1021/acs.est.5b02803.
45. Li, A. D., Li, L. G., Zhang, T. (2015a). Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. *Front. Microbiol.* 6, 1025. doi:10.3389/fmicb.2015.01025.
46. Li, J., Cheng, W., Xu, L., Jiao, Y., Baig, S. A., Chen, H. (2015b). Occurrence and removal of antibiotics and the corresponding resistance genes in wastewater treatment plants: effluents' influence to downstream water environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1–10. doi:10.1007/s11356-015-5916-2.
47. Lupo, A., Coyne, S., Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies.

- Front. Microbiol. 3, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2012.00018.
48. Ma, L., Zhang, X.-X., Zhao, F., Wu, B., Cheng, S., Yang, L. (2013). Sewage treatment plant serves as a hot-spot reservoir of integrons and gene cassettes. *J. Environ. Biol.* 34, 391–399.
49. Mainardi, J. L., Villet, R., Bugg, T. D., Mayer, C., Arthur, M. (2008). Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 386–408. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00097.x.
50. Makowska, N., Koczura, R., Mokracka, J. (2016). Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere* 144, 1665–1673. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.044.
51. Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* 85, 458–466. doi:10.1016/j.watres.2015.09.010.
52. Marcadé, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., Arlet, G. (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 67–71. doi:10.1093/jac/dkn428.
53. Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 365–367. doi:10.1126/science.1159483.
54. Martínez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., Sánchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 44–65. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x.
55. Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Res.* 47, 957–995. doi:10.1016/j.watres.2012.11.027.
56. Mokracka, J., Koczura, R., Kaznowski, A. (2012). Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 46, 3353–3363. doi:10.1016/j.watres.2012.03.037.
57. Munck, C., Albertsen, M., Telke, A., Ellabaan, M., Nielsen, P. H., Sommer, M. O. (2015). Limited dissemination of the wastewater treatment plant core resistome.

- Nat. Commun. 6, 8452. doi:10.1038/ncomms9452.
58. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587–593.
59. Muyzer, G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700. doi:0099-2240/93/030695-06\$02.00/0.
60. Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141.
61. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. (2016). Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. *Appl. Soil Ecol.* 105, 76–85. doi:10.1016/j.apsoil.2016.04.005.
62. Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4943–4960. doi:10.1128/AAC.00296-11.
63. Parulekar, N. N., Kolekar, P., Jenkins, A., Kleiven, S., Utkilen, H., Johansen, A., Sawant, S., Kulkarni-Kale, U., Kale, M., Sæbø, M. (2017). Characterization of bacterial community associated with phytoplankton bloom in a eutrophic lake in South Norway using 16S rRNA gene amplicon sequence analysis. *PLoS One* 12, e0173408. doi:10.1371/journal.pone.0173408.
64. Perry, J., Waglechner, N., Wright, G. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6. doi:10.1101/cshperspect.a025197.
65. Powell, A. J., Tomberg, J., Deacon, A. M., Nicholas, R. A., Davies, C. (2009). Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J. Biol. Chem.* 284, 1202–1212. doi:10.1074/jbc.M805761200.
66. Proia, L., von Schiller, D., Sánchez-Melsió, A., Sabater, S., Borrego, C. M., Rodríguez-Mozaz, S., Balcázar, J. L. (2015). Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. *Environ. Pollut.* 210, 121–128. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.035.

67. Rahube, T. O., Yost, C. K. (2010). Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *African J. Biotechnol.* 9, 9183–9190.
68. Read, D. S., Gweon, H. S., Bowes, M. J., Newbold, L. K., Field, D., Bailey, M. J., Griffiths, R. I. (2015). Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *ISME J.* 9, 516–26. doi:10.1038/ismej.2014.166.
69. Riber, L., Poulsen, P. H. B., Al-Soud, W. A., Skov Hansen, L. B., Bergmark, L., Brejnrod, A., Norman, A., Hansen, L. H., Magid, J., Sørensen, S. J. (2014). Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 206–224. doi:10.1111/1574-6941.12403.
70. Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
71. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 234–258. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
72. Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U. Z., Parajka, J., Reischer, G. H., Stadler, P., Blaschke, Alfred P., Blöschl, G., Mach, R. L., Kirschner, A. K. T., Farnleitner, A. H., Eiler, A. (2015). Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. *Environ. Microbiol.* 17, 4994–5007. doi:10.1111/1462-2920.12886.
73. Schaik, W. Van (2015). The human gut resistome. *R. Soc. Publ.* 370, 1–9. doi:10.1098/rstb.2014.0087.
74. Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 449–477. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00074.x.
75. Schmutz, E., Hennig, S., Li, S. M., Heide, L. (2004). Identification of a topoisomerase IV in actinobacteria: Purification and characterization of ParYR and GyrBR from the coumermycin A1 producer *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Microbiology* 150, 641–647. doi:10.1099/mic.0.26867-0.

76. Smalla, K., Jechalke, S., Top, E. M. (2015). Plasmid detection, characterization, and ecology. *Microbiol. Spectr.* 3, 1–14.
77. Sołyga, A., Bartosik, D. (2004). Entrapment vectors - how to capture a functional transposable element. *Polish J. Microbiol.* 53, 139–144.
78. Sommer, M. O., Church, G. M., Dantas, G. (2010). The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 299–303. doi:10.1126/science.1176950.he.
79. Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 700–710. doi:10.1038/nrmicro1232.
80. Staley, C., Unno, T., Gould, T. J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J. B., Sadowsky, M. J. (2013). Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1147–1158. doi:10.1111/jam.12323.
81. Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43, D593–D598. doi:10.1093/nar/gku1201.
82. Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 7173–7178. doi:10.1073/pnas.0900693106.
83. Szczepanowski, R., Bekel, T., Goesmann, A., Krause, L., Krömeke, H., Kaiser, O., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A. (2008). Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136, 54–64. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.03.020.
84. Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K. H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319. doi:10.1099/mic.0.028233-0.
85. Szuplewska, M., Bartosik, D. (2009). Identification of a mosaic transposable element of *Paracoccus marcusii* composed of insertion sequence *ISPmar4* (*ISAs1*

- family) and an IS1247a-driven transposable module (TMO). *FEMS Microbiol. Lett.* 292, 216–221. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01495.x.
86. Tang, J., Bu, Y., Zhang, X.-X., Huang, K., He, X., Ye, L., Shan, Z., Ren, H. (2016). Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its receiving surface water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 260–269. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.06.016.
87. Wibberg, D., Szczepanowski, R., Eikmeyer, F., Pühler, A., Schlüter, A. (2013). The IncF plasmid pRSB225 isolated from a municipal wastewater treatment plant's on-site prefloder combining antibiotic resistance and putative virulence functions is highly related to virulence plasmids identified in pathogenic *E. coli* isolates. *Plasmid* 69, 127–137. doi:10.1016/j.plasmid.2012.11.001.
88. Woerther, P. L., Burdet, C., Chachaty, E., Andremont, A. (2013). Trends in human fecal carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 744–758. doi:10.1128/CMR.00023-13.
89. Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna (WSSE) w Katowicach (2015). Raport o jakości wód powierzchniowych wykorzystywanych do zaopatrzenia ludności w wodę przeznaczoną do spożycia, w województwie śląskim w 2015 roku.
90. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska (WIOŚ) w Katowicach (2016). Stan środowiska w województwie śląskim w 2015 roku.
91. Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186. doi:10.1038/nrmicro1614.
92. Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere* 119, 1379–1385. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.040.
93. Ye, L., Zhang, T. (2013). Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2681–2690. doi:10.1007/s00253-012-4082-4.
94. Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 361–385. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.

95. Zerbino, D. R., Birney, E. (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829. doi:10.1101/gr.074492.107.
96. Zhang, Y., Marrs, C. F., Simon, C., Xi, C. (2009). Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci. Total Environ.* 407, 3702–3706. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.02.013.
97. Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., Ma, Y., Cao, J., He, Z. (2015). Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere* 135, 138–145. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.001.

ŹRÓDŁA INTERNETOWE:

www.who.int/antimicrobial-resistance/en

<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5406e/16.3.html#Js5406e.16.3>

<http://www.mpwik-zywiec.pl/uslugi/ochrona-srodowiska/oczyszczalnia-sciekow.html>

<http://www.vmatch.de/>; wersja 2.2.5

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=5904&width=500&height=500>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imagefly.cgi?cid=6249&width=500&height=500>

<https://www.drugs.com/monograph/ampicillin-sodium.html>; 31.01.2017

https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf

XI. ANEKSY

Tabela A1. Udział poszczególnych rodzin bakterii (16S rRNA/1 mln odczytów) w metagenomach wód Jeziora Żywieckiego i Soły oraz ścieków oczyszczonych

RODZINY	JW	SŁW	ŚO
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Acidobacteriales;Acidobacteriaceae</i>	0,183	0,058	0,122
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Acidobacteriales;Unclassified Acidobacteriales</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Chloracidobacterium;Acidobacteria bacterium IGE-018</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Chloracidobacterium;Candidatus Chloracidobacterium thermophilum</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Chloracidobacterium;Candidatus Chloracidobacterium thermophilum B</i>	0,000	0,000	0,020
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Solibacter;Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Solibacter;Unclassified Candidatus Solibacter</i>	0,000	0,044	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Solibacter;bacterium Ellin6505</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Candidatus Solibacter;bacterium Ellin7504</i>	0,000	0,022	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;DA023;Acidobacteria bacterium IGE-010</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;DA023;Acidobacteria bacterium IGE-011</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;DA023;Unclassified DA023</i>	0,007	0,131	0,027
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;DA052;Unclassified DA052</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis</i>	0,027	0,036	0,014
<i>Acidobacteria;Acidobacteria;Unclassified Acidobacteria;</i>	0,061	0,087	0,054
<i>Acidobacteria;Holophagae;Holophagales;Holophagaceae</i>	0,000	0,036	0,041
<i>Acidobacteria;Holophagae;Unclassified Holophagae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Acidobacteria;Unclassified Acidobacteria</i>	0,020	0,022	0,041
<i>Actinobacteria;Acidimicrobiia;Acidimicrobiales;Acidimicrobiaceae</i>	1,144	0,087	0,034
<i>Actinobacteria;Acidimicrobiia;Acidimicrobiales;Candidatus Microthrix</i>	0,345	0,029	0,081
<i>Actinobacteria;Acidimicrobiia;Acidimicrobiales;Iamiaceae</i>	0,088	0,058	0,081
<i>Actinobacteria;Acidimicrobiia;Acidimicrobiales;TM214</i>	0,034	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Acidimicrobiia;Acidimicrobiales;Unclassified Acidimicrobiales</i>	1,503	0,277	0,115
<i>Actinobacteria;Acidimicrobiia;Unclassified Acidimicrobiia</i>	0,149	0,029	0,020
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Actinomycetales;Actinomycetaceae</i>	0,582	0,073	0,068
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Actinopolysporales;Actinopolysporaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Bifidobacteriales;Bifidobacteriaceae</i>	0,298	0,015	0,149
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Catenulesporales;Actinospicaceae</i>	0,047	0,015	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Catenulesporales;Catenulesporaceae</i>	0,047	0,000	0,014
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Corynebacteriales;Corynebacteriaceae</i>	0,251	0,022	0,034
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Corynebacteriales;Mycobacteriaceae</i>	0,014	0,182	0,075
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Corynebacteriales;Nocardiaceae</i>	0,095	0,044	0,088
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Corynebacteriales;Unclassified Corynebacteriales</i>	0,054	0,073	0,075
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Acidothermaceae</i>	0,027	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Cryptosporangiaceae</i>	0,054	0,022	0,014
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Frankiaceae</i>	0,230	0,029	0,014
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Geodermatophilaceae</i>	0,440	0,036	0,020
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Nakamurellaceae</i>	0,095	0,036	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Sporichthyaceae</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Frankiales;Unclassified Frankiales</i>	0,345	0,007	0,081

<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Kineosporiales;Kineosporiaceae</i>	0,379	0,015	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Kineosporiales;Unclassified Kineosporiales</i>	0,007	0,000	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Bogoriellaceae</i>	0,007	0,000	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Brevibacteriaceae</i>	0,034	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Cellulomonadaceae</i>	0,806	0,051	0,034
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Dermabacteraceae</i>	0,014	0,029	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Dermacoccaceae</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Intrasporangiaceae</i>	1,490	0,116	0,271
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Jonesiaceae</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Microbacteriaceae</i>	4,252	2,504	0,353
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Micrococcaceae</i>	0,345	0,029	0,075
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Promicromonosporaceae</i>	0,014	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Sanguibacteraceae</i>	0,135	0,029	0,020
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micrococcales;Unclassified Micrococcales</i>	2,234	0,480	0,285
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micromonosporales;Micromonosporaceae</i>	0,284	0,204	0,061
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Micromonosporales;Unclassified Micromonosporales</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;PeM15;Unclassified PeM15</i>	0,041	0,116	0,054
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Propionibacteriales;Nocardiodiaceae</i>	0,332	0,146	0,204
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Propionibacteriales;Propionibacteriaceae</i>	0,399	0,051	0,095
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Propionibacteriales;Unclassified Propionibacteriales</i>	0,027	0,036	0,041
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Pseudonocardiales;Pseudonocardiaceae</i>	0,548	0,029	0,054
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Pseudonocardiales;Unclassified Pseudonocardiales</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Streptomycetales;Streptomycetaceae</i>	1,408	0,124	0,299
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Streptomycetales;Unclassified Streptomycetales</i>	0,020	0,007	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Streptosporangiales;Nocardiosporeae</i>	0,108	0,022	0,014
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Streptosporangiales;Streptosporangiaceae</i>	0,034	0,015	0,007
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Streptosporangiales;Thermomonosporaceae</i>	0,481	0,007	0,075
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Streptosporangiales;Unclassified Streptosporangiales</i>	0,034	0,000	0,000
<i>Actinobacteria;Actinobacteria;Unclassified Actinobacteria;</i>	7,780	0,852	1,249
<i>Actinobacteria;Coriobacteriia;Coriobacteriales;Coriobacteriaceae</i>	0,217	0,109	0,170
<i>Actinobacteria;Nitriliruptoria;Euzebyales;Euzebyaceae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Actinobacteria;Rubrobacteria;Rubrobacterales;Rubrobacteriaceae</i>	0,007	0,007	0,000
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Gaiellales;Gaiellaceae</i>	0,000	0,029	0,000
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Solirubrobacterales;480-2</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Solirubrobacterales;Conexibacteraceae</i>	0,014	0,007	0,014
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Solirubrobacterales;Patulibacteraceae</i>	0,000	0,015	0,007
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Solirubrobacterales;Solirubrobacteraceae</i>	0,000	0,015	0,034
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Solirubrobacterales;Unclassified Solirubrobacterales</i>	0,007	0,051	0,122
<i>Actinobacteria;Thermoleophilia;Unclassified Thermoleophilia</i>	0,034	0,029	0,020
<i>Actinobacteria;Unclassified Actinobacteria</i>	2,065	0,248	0,183
<i>Aquificae;Aquificae;Aquificales;Aquificaceae</i>	0,176	0,007	0,007
<i>Aquificae;Aquificae;Aquificales;Hydrogenothermaceae</i>	0,000	0,029	0,007
<i>Armatimonadetes;Armatimonadia;Armatimonadales;Armatimonadaceae</i>	0,047	0,051	0,007
<i>Armatimonadetes;Fimbriimonas ginsengisoli Gsoil 348;Unclassified Fimbriimonas ginsengisoli Gsoil 348</i>	0,000	0,051	0,014
<i>BD1-5;GN02 bacterium canine oral taxon 291;Unclassified GN02 bacterium canine oral taxon 291</i>	0,000	0,044	0,034
<i>BD1-5;GN02 bacterium canine oral taxon 323;Unclassified GN02 bacterium canine oral taxon 323</i>	0,007	0,007	0,041
<i>BD1-5;GN02 bacterium canine oral taxon 364;Unclassified GN02 bacterium canine oral taxon 364</i>	0,000	0,000	0,034

<i>BD1-5;GN02 bacterium canine oral taxon 394;Unclassified GN02 bacterium canine oral taxon 394</i>	0,000	0,015	0,054
<i>BD1-5;Unclassified BD1-5</i>	0,000	0,124	0,217
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae</i>	0,115	0,735	1,948
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Marinilabiaceae</i>	0,047	0,029	0,000
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Porphyromonadaceae</i>	0,122	2,424	2,891
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae</i>	0,034	0,058	2,762
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae</i>	0,176	0,073	0,170
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Unclassified Bacteroidales</i>	0,095	0,808	0,597
<i>Bacteroidetes;Bacteroidia;Unclassified Bacteroidia</i>	0,047	0,102	0,048
<i>Bacteroidetes;Class Incertae Sedis;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis</i>	0,000	0,036	0,000
<i>Bacteroidetes;Class Incertae Sedis;Unclassified Class Incertae Sedis</i>	0,014	0,022	0,000
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cyclobacteriaceae</i>	0,582	0,262	0,034
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Cytophagaceae</i>	1,002	25,225	0,339
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;DUNssu136</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Flammeovirgaceae</i>	0,163	0,218	0,088
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Cytophagales;Unclassified Cytophagales</i>	0,372	0,735	0,129
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Order II Incertae Sedis;Rhodothermaceae</i>	0,027	0,029	0,000
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Order IV Incertae Sedis;Family Incertae Sedis</i>	0,007	0,000	0,007
<i>Bacteroidetes;Cytophagia;Unclassified Cytophagia</i>	0,115	0,670	0,014
<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Blattabacteriaceae</i>	0,027	0,022	0,102
<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Cryomorphaceae</i>	0,934	2,679	0,129
<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae</i>	6,466	197,953	2,396
<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Flavobacteriales;Unclassified Flavobacteriales</i>	0,569	0,590	0,034
<i>Bacteroidetes;Flavobacteria;Unclassified Flavobacteria</i>	0,047	0,095	0,014
<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae</i>	5,085	2,512	0,421
<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Saprospiraceae</i>	0,758	0,459	0,312
<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Sphingobacteriaceae</i>	0,833	0,757	0,224
<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Unclassified Sphingobacteriales</i>	0,108	0,066	0,034
<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;WCHB1-69</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Unclassified Sphingobacteriia</i>	0,081	0,036	0,048
<i>Bacteroidetes;Unclassified Bacteroidetes</i>	2,038	1,936	0,550
<i>Candidate division SRI;SRI bacterium canine oral taxon 380;Unclassified SRI bacterium canine oral taxon 380</i>	0,000	0,000	0,048
<i>Candidate division SRI;SRI bacterium canine oral taxon 382;Unclassified SRI bacterium canine oral taxon 382</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Candidate division SRI;Unclassified Candidate division SRI</i>	0,000	0,015	0,007
<i>Candidate division TM7;TM7 phylum sp. canine oral taxon 237;Unclassified TM7 phylum sp. canine oral taxon 237</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Candidate division TM7;TM7 phylum sp. canine oral taxon 250;Unclassified TM7 phylum sp. canine oral taxon 250</i>	0,000	0,000	0,020
<i>Candidate division TM7;TM7 phylum sp. canine oral taxon 251;Unclassified TM7 phylum sp. canine oral taxon 251</i>	0,000	0,007	0,014
<i>Candidate division TM7;TM7 phylum sp. canine oral taxon 308;Unclassified TM7 phylum sp. canine oral taxon 308</i>	0,000	0,000	0,068
<i>Candidate division TM7;TM7 phylum sp. canine oral taxon 322;Unclassified TM7 phylum sp. canine oral taxon 322</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Candidate division TM7;TM7 phylum sp. canine oral taxon 363;Unclassified TM7 phylum sp. canine oral taxon 363</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Candidate division TM7;Unclassified Candidate division TM7</i>	0,000	0,182	1,004
<i>Candidate division TM7;candidate division TM7 genomsp. GTL1;Unclassified candidate division TM7 genomsp. GTL1</i>	0,000	0,007	0,054
<i>Candidate division WS6;toluene-degrading methanogenic consortium bacterium;Unclassified toluene-degrading methanogenic consortium bacterium</i>	0,000	0,000	0,020

<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;Candidatus Piscichlamydia salmonis</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;Chlamydiaceae</i>	0,007	0,051	0,088
<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;Parachlamydiaceae</i>	0,020	0,102	0,081
<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;Simkaniaceae</i>	0,007	0,087	0,075
<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;Unclassified Chlamydiales</i>	0,027	0,116	0,326
<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;Waddliaceae</i>	0,000	0,007	0,014
<i>Chlamydiae;Chlamydiae;Chlamydiales;cvE6</i>	0,007	0,036	0,183
<i>Chlamydiae;Unclassified Chlamydiae</i>	0,000	0,036	0,020
<i>Chlorobi;Chlorobia;Chlorobiales;Chlorobiaceae</i>	0,108	0,015	0,007
<i>Chlorobi;Chlorobia;Chlorobiales;Unclassified Chlorobiales</i>	0,135	0,015	0,000
<i>Chlorobi;Unclassified Chlorobi</i>	0,014	0,007	0,014
<i>Chloroflexi;Anaerolineae;Anaerolineales;Anaerolineaceae</i>	0,074	0,087	0,190
<i>Chloroflexi;Anaerolineae;Anaerolineales;Unclassified Anaerolineales</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Chloroflexi;Anaerolineae;Unclassified Anaerolineae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Chloroflexi;Caldilineae;Caldilineales;Caldilineaceae</i>	0,020	0,000	0,014
<i>Chloroflexi;Chloroflexi;Chloroflexales;Chloroflexaceae</i>	0,393	0,029	0,204
<i>Chloroflexi;Chloroflexi;Chloroflexales;Unclassified Chloroflexales</i>	0,027	0,015	0,000
<i>Chloroflexi;Chloroflexi;Herpetosiphonales;Herpetosiphonaceae</i>	0,007	0,007	0,007
<i>Chloroflexi;Chloroflexi;Unclassified Chloroflexi</i>	0,020	0,007	0,007
<i>Chloroflexi;Dehalococcoidetes;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis</i>	0,000	0,044	0,041
<i>Chloroflexi;KD4-96;bacterium Ellin6529;Unclassified bacterium Ellin6529</i>	0,068	0,015	0,000
<i>Chloroflexi;Ktedonobacteria;Ktedonobacterales;Ktedonobacteraceae</i>	0,007	0,000	0,034
<i>Chloroflexi;Ktedonobacteria;Ktedonobacterales;Unclassified Ktedonobacterales</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Chloroflexi;Ktedonobacteria;Thermogemmatisporales;Thermogemmatisporaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Chloroflexi;Thermomicrobia;JG30-KF-CM45;bacterium Ellin6537</i>	0,000	0,000	0,020
<i>Chloroflexi;Unclassified Chloroflexi</i>	0,210	0,087	0,149
<i>Chrysiogenetes;Chrysiogenetes;Chrysiogenales;Chrysiogenaceae</i>	0,095	0,000	0,000
<i>Cyanobacteria;4C0d-2;rumen bacterium YS2;Unclassified rumen bacterium YS2</i>	0,000	0,007	0,081
	22,50		
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionI;FamilyI</i>	0	0,502	0,163
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionI;Unclassified SubsectionI</i>	0,000	0,007	0,027
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionII;FamilyI</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionII;FamilyII</i>	0,000	0,153	0,000
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionII;Unclassified SubsectionII</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionIII;FamilyI</i>	0,142	0,328	0,204
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionIII;Unclassified SubsectionIII</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionIV;FamilyI</i>	0,311	0,080	0,007
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionIV;FamilyII</i>	0,000	0,029	0,034
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionIV;Unclassified SubsectionIV</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;SubsectionV;FamilyI</i>	0,034	0,007	0,014
<i>Cyanobacteria;Cyanobacteria;Unclassified Cyanobacteria</i>	0,961	0,393	0,170
<i>Cyanobacteria;SM1D11;Vampirovibrio chlorellavorus;Unclassified Vampirovibrio chlorellavorus</i>	0,000	0,022	0,041
<i>Cyanobacteria;Unclassified Cyanobacteria</i>	0,007	0,015	0,115
<i>Deferribacteres;Deferribacteres;Deferribacterales;Deferribacteraceae</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Deinococcus-Thermus;Deinococci;Deinococcales;Deinococcaceae</i>	0,000	0,051	0,068
<i>Deinococcus-Thermus;Deinococci;Thermales;Thermaceae</i>	0,041	0,022	0,034
<i>Deinococcus-Thermus;Deinococci;Unclassified Deinococci</i>	0,000	0,022	0,014
<i>Deinococcus-Thermus;Unclassified Deinococcus-Thermus</i>	0,007	0,015	0,000

<i>Dictyoglomi;Dictyoglomia;Dictyoglomales;Dictyoglomaceae</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Fibrobacteres;Fibrobacteria;Fibrobacterales;Fibrobacteraceae</i>	0,000	0,015	0,014
<i>Fibrobacteres;Fibrobacteria;Fibrobacterales;termite gut group</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Fibrobacteres;Fibrobacteria;Unclassified Fibrobacteria</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Alicyclobacillaceae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae</i>	0,054	0,167	0,129
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Family XI Incertae Sedis</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Family XII Incertae Sedis</i>	0,007	0,022	0,014
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Listeriaceae</i>	0,102	0,007	0,027
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Paenibacillaceae</i>	0,372	0,073	0,149
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Pasteuriaceae</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Planococcaceae</i>	0,000	0,015	0,081
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Sporolactobacillaceae</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcaceae</i>	0,190	0,022	0,068
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Thermoactinomycetaceae</i>	0,000	0,029	0,007
<i>Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Unclassified Bacillales</i>	0,135	0,095	0,244
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Aerococcaceae</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Carnobacteriaceae</i>	0,014	0,015	0,156
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Enterococcaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae</i>	0,135	0,146	0,170
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Leuconostocaceae</i>	0,000	0,036	0,020
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae</i>	0,020	0,051	1,079
<i>Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Unclassified Lactobacillales</i>	0,081	0,036	0,143
<i>Firmicutes;Bacilli;Unclassified Bacilli</i>	0,142	0,095	0,075
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Caldicoproductaceae</i>	0,000	0,007	0,020
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Christensenellaceae</i>	0,000	0,015	0,014
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae</i>	1,876	0,328	0,787
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Eubacteriaceae</i>	0,000	0,007	0,054
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XI Incertae Sedis</i>	0,054	0,000	0,075
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XII Incertae Sedis</i>	0,000	0,036	0,007
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XIII Incertae Sedis</i>	0,000	0,000	0,041
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XVIII Incertae Sedis</i>	0,027	0,102	0,095
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Gracilibacteraceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae</i>	0,041	0,211	7,302
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptococcaceae</i>	0,027	0,044	0,204
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Peptostreptococcaceae</i>	0,000	0,080	0,170
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae</i>	0,095	0,197	0,740
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Syntrophomonadaceae</i>	0,014	0,007	0,048
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Unclassified Clostridiales</i>	0,217	0,364	1,099
<i>Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Veillonellaceae</i>	0,088	0,473	8,246
<i>Firmicutes;Clostridia;Halanaerobiales;64K2</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Firmicutes;Clostridia;Halanaerobiales;Halanaerobiaceae</i>	0,000	0,015	0,034
<i>Firmicutes;Clostridia;Halanaerobiales;Halobacteroidaceae</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Firmicutes;Clostridia;Natranaerobiales;Natranaerobiaceae</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Firmicutes;Clostridia;Thermoanaerobacteriales;Family III Incertae Sedis</i>	0,034	0,007	0,020
<i>Firmicutes;Clostridia;Thermoanaerobacteriales;Family IV Incertae Sedis</i>	0,000	0,000	0,020
<i>Firmicutes;Clostridia;Thermoanaerobacteriales;Thermoanaerobacteraceae</i>	0,020	0,044	0,014

<i>Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacterales; Thermodesulfobiaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacterales; Unclassified Thermoanaerobacterales</i>	0,000	0,007	0,014
<i>Firmicutes; Clostridia; Thermolithobacterales; Thermolithobacteraceae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Firmicutes; Clostridia; Unclassified Clostridia</i>	0,034	0,102	0,570
<i>Firmicutes; Erysipelotrichi; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae</i>	0,000	0,073	0,136
<i>Firmicutes; Unclassified Firmicutes</i>	0,393	0,422	0,780
<i>Fusobacteria; Fusobacteria; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae</i>	0,020	0,218	0,129
<i>Fusobacteria; Fusobacteria; Fusobacteriales; Leptotrichiaceae</i>	0,007	0,058	0,143
<i>Fusobacteria; Fusobacteria; Fusobacteriales; Unclassified Fusobacteriales</i>	0,000	0,015	0,054
<i>Fusobacteria; Fusobacteria; Unclassified Fusobacteria</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Fusobacteria; Unclassified Fusobacteria</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Gemmatimonadetes; Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Gemmatimonadaceae</i>	0,386	0,204	0,041
<i>Gemmatimonadetes; Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Unclassified Gemmatimonadales</i>	0,000	0,022	0,000
<i>Gemmatimonadetes; Unclassified Gemmatimonadetes</i>	0,027	0,000	0,000
<i>Lentisphaerae; Lentisphaeria; Lentisphaerales; Lentisphaeraceae</i>	0,000	0,102	0,027
<i>Lentisphaerae; Lentisphaeria; Victivallales; Victivallaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; 0319-6A21</i>	0,007	0,022	0,000
<i>Nitrospirae; Nitrospira; Nitrospirales; Nitrospiraceae</i>	0,047	0,182	0,088
<i>Planctomycetes; OM190; planctomycete A-2; Unclassified planctomycete A-2</i>	0,007	0,007	0,000
<i>Planctomycetes; Phycisphaerae; Phycisphaerales; Phycisphaeraceae</i>	0,020	0,007	0,020
<i>Planctomycetes; Phycisphaerae; Unclassified Phycisphaerae</i>	0,054	0,015	0,000
<i>Planctomycetes; Planctomycetacia; Brocadiales; Brocadaceae</i>	0,007	0,015	0,027
<i>Planctomycetes; Planctomycetacia; Planctomycetales; Planctomycetaceae</i>	0,765	1,281	0,794
<i>Planctomycetes; Planctomycetacia; Planctomycetales; Unclassified Planctomycetales</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Planctomycetes; Planctomycetacia; Unclassified Planctomycetacia</i>	0,007	0,000	0,041
<i>Planctomycetes; Unclassified Planctomycetes</i>	0,115	0,051	0,068
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>	0,074	0,408	0,081
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae</i>	0,102	0,131	0,061
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Unclassified Caulobacterales</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; DB1-14; Micavibrio aeruginosavorus ARL-13</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Kordiimonadales; Kordiimonadaceae</i>	0,000	0,000	0,034
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Kordiimonadales; Unclassified Kordiimonadales</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; OCS116 clade; Unclassified OCS116 clade</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Aurantimonadaceae</i>	0,014	0,022	0,007
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bartonellaceae</i>	0,007	0,022	0,007
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae</i>	0,047	0,036	0,000
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae</i>	0,203	0,364	0,149
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae</i>	0,047	0,080	0,014
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Candidatus Liberibacter</i>	0,054	0,015	0,000
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; F0723</i>	0,014	0,000	0,000
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Family Incertae Sedis</i>	0,068	0,138	0,034
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>	0,061	0,459	0,156
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae</i>	0,081	0,116	0,034
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylocystaceae</i>	0,156	0,153	0,007
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Phyllobacteriaceae</i>	0,074	0,102	0,007
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Prosthecomicrobium pneumaticum</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae</i>	0,027	0,379	0,061

<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhodobiaceae</i>	0,014	0,022	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Unclassified Rhizobiales</i>	1,205	1,536	0,224
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Xanthobacteraceae</i>	0,034	0,138	0,068
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;alphaI cluster</i>	0,007	0,007	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Rhodobacteraceae</i>	0,941	3,363	0,414
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodobacterales;Unclassified Rhodobacterales</i>	0,000	0,044	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae</i>	0,989	0,619	0,129
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;I-10</i>	0,014	0,007	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Rhodospirillaceae</i>	0,488	0,466	0,088
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Unclassified Rhodospirillales</i>	0,203	0,058	0,081
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;wr0007</i>	0,081	0,204	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Anaplasmataceae</i>	0,163	0,073	0,041
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Candidatus Captivus</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Candidatus Cyrtobacter</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Candidatus Hepatincola</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Candidatus Midichloria</i>	0,014	0,007	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Candidatus Odysella</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Family Incertae Sedis</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Holosporaceae</i>	0,000	0,000	0,027
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Rickettsiaceae</i>	0,217	0,226	0,068
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;TK34</i>	0,034	0,000	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Unclassified Rickettsiales</i>	0,156	0,066	0,034
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SAR11 clade;Chesapeake-Delaware Bay</i>	2,194	0,015	0,020
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SAR11 clade;Surface 1</i>	0,697	0,007	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;SAR11 clade;Unclassified SAR11 clade</i>	0,379	0,000	0,000
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Erythrobacteraceae</i>	0,102	0,160	0,020
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;GOBB3-C201</i>	0,108	0,240	0,027
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae</i>	0,630	2,621	0,305
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Unclassified Sphingomonadales</i>	0,257	1,099	0,102
<i>Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Unclassified Alphaproteobacteria;</i>	4,042	1,543	0,529
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Alcaligenaceae</i>	0,217	1,019	0,346
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Burkholderiaceae</i>	2,627	2,148	0,835
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae</i>	8,389	68,015	8,592
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Family Incertae Sedis</i>	0,102	0,044	0,000
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Oxalobacteraceae</i>	1,273	1,208	1,873
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Unclassified Burkholderiales</i>	1,334	4,055	0,909
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Hydrogenophilales;Hydrogenophilaceae</i>	0,142	0,240	0,041
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Hydrogenophilales;Unclassified Hydrogenophilales</i>	0,027	0,000	0,000
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Methylophilales;Methylophilaceae</i>	0,880	0,400	0,048
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Methylophilales;Unclassified Methylophilales</i>	0,027	0,066	0,007
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Neisseriales;Neisseriaceae</i>	0,068	1,208	1,900
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Neisseriales;Unclassified Neisseriales</i>	0,014	0,044	0,095
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Gallionellaceae</i>	0,007	0,029	0,075
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Nitrosomonadaceae</i>	0,088	0,160	0,238
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Unclassified Nitrosomonadales</i>	0,007	0,007	0,014
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Rhodocyclales;Rhodocyclaceae</i>	0,271	15,812	11,849
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Rhodocyclales;Unclassified Rhodocyclales</i>	0,014	0,160	0,719

<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;SC-I-84;Unclassified SC-I-84</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;TRA3-20;bacterium TG161</i>	0,007	0,015	0,000
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;UCT N117;bacterium ROME35Asa</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Proteobacteria;Betaproteobacteria;Unclassified Betaproteobacteria</i>	1,551	5,445	3,753
<i>Proteobacteria;CF2;Unclassified CF2</i>	0,020	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;CF2;magnetic coccus MP17;Unclassified magnetic coccus MP17</i>	0,230	0,007	0,020
<i>Proteobacteria;Class Incertae Sedis;Order Incertae Sedis;Family Incertae Sedis</i>	0,000	0,022	0,007
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Bdellovibrionales;Bacteriovoracaceae</i>	0,115	0,386	0,048
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Bdellovibrionales;Bdellovibrionaceae</i>	0,020	0,277	0,088
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Bdellovibrionales;Unclassified Bdellovibrionales</i>	0,020	0,015	0,007
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfobacterales;Desulfobacteraceae</i>	0,068	0,138	0,251
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfobacterales;Desulfobulbaceae</i>	0,000	0,167	0,000
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfobacterales;Unclassified Desulfobacterales</i>	0,020	0,022	0,007
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfohalobiaceae</i>	0,000	0,044	0,075
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfomicrobiaceae</i>	0,007	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae</i>	0,251	0,204	0,455
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Unclassified Desulfovibrionales</i>	0,041	0,022	0,034
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfurellales;Desulfurellaceae</i>	0,000	0,015	0,129
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfuromonadales;BVA18</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfuromonadales;Desulfuromonadaceae</i>	0,061	0,058	0,014
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfuromonadales;GR-WP33-58</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfuromonadales;Geobacteraceae</i>	0,196	0,218	0,061
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfuromonadales;Unclassified Desulfuromonadales</i>	0,095	0,248	0,020
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;0319-6G20</i>	0,521	0,109	0,068
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Cystobacteraceae</i>	0,291	0,182	0,061
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Haliangiaceae</i>	0,020	0,029	0,048
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Myxococcaceae</i>	0,061	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Nannocystaceae</i>	0,007	0,036	0,041
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Phaselicystidaceae</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Polyangiaceae</i>	0,081	0,189	0,149
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Sandaracinaceae</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Unclassified Myxococcales</i>	0,190	0,277	0,143
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Order Incertae Sedis;Syntrophorhabdaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Syntrophobacteriales;Syntrophaceae</i>	0,000	0,044	0,000
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Syntrophobacteriales;Syntrophobacteraceae</i>	0,014	0,007	0,041
<i>Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Unclassified Deltaproteobacteria</i>	0,691	0,597	0,258
<i>Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Campylobacteraceae</i>	0,047	1,143	4,432
<i>Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Helicobacteraceae</i>	0,061	0,153	0,400
<i>Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Campylobacterales;Unclassified Campylobacterales</i>	0,007	0,051	0,088
<i>Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Nautiliales;Nautiliaceae</i>	0,020	0,022	0,197
<i>Proteobacteria;Epsilonproteobacteria;Unclassified Epsilonproteobacteria;</i>	0,000	0,044	0,129
<i>Proteobacteria;Gammaproteobacteria;34P16;Unclassified 34P16</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Acidithiobacillales;Acidithiobacillaceae</i>	0,047	0,036	0,061
<i>Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Aeromonadales;Aeromonadaceae</i>	0,027	1,099	0,611
<i>Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Aeromonadales;Succinivibrionaceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonadaceae</i>	0,149	0,357	0,075
<i>Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Colwelliaceae</i>	0,000	0,015	0,000

<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Idiomarinaeae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Pseudoalteromonadaceae</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Psychromonadaceae</i>	0,000	0,022	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Shewanellaceae</i>	0,020	0,087	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Unclassified Alteromonadales</i>	0,014	0,102	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Cardiobacteriales; Cardiobacteriaceae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Chromatiaceae</i>	0,135	0,422	0,041
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae</i>	0,081	0,051	0,020
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Granulosicoccaceae</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Halothiobacillaceae</i>	0,014	0,007	0,027
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Unclassified Chromatiales</i>	0,034	0,036	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	0,169	0,786	0,550
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Unclassified Enterobacteriales</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Coxiellaceae</i>	0,014	0,160	0,095
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae</i>	0,000	0,269	0,122
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Unclassified Legionellales</i>	0,000	0,015	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae</i>	0,237	0,116	0,014
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Methylococcales; Unclassified Methylococcales</i>	0,074	0,015	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; NKB5; Trachelomonas scabra</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Alcanivoracaceae</i>	0,034	0,051	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Hahellaceae</i>	0,007	0,007	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae</i>	0,027	0,044	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Oceanospirillaceae</i>	0,081	0,051	0,014
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Unclassified Oceanospirillales</i>	0,047	0,073	0,061
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Order Incertae Sedis; Family Incertae Sedis</i>	0,014	0,000	0,048
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Order Incertae Sedis; Unclassified Order Incertae Sedis</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae</i>	0,027	0,058	0,020
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae</i>	0,081	4,805	1,194
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>	0,081	1,157	0,373
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Unclassified Pseudomonadales</i>	0,020	0,051	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Salinisphaerales; Salinisphaeraceae</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Thiotrichales; Francisellaceae</i>	0,020	0,044	0,014
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Thiotrichales; Piscirickettsiaceae</i>	0,095	0,029	0,007
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Thiotrichales; Thiotrichaceae</i>	0,102	0,058	0,373
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Thiotrichales; Unclassified Thiotrichales</i>	0,014	0,036	0,000
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Unclassified Gammaproteobacteria</i>	1,002	2,286	0,814
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae</i>	0,007	0,066	0,034
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Sinobacteraceae</i>	0,034	0,240	0,020
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Unclassified Xanthomonadales</i>	0,088	0,146	0,020
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae</i>	1,002	1,609	0,319
<i>Proteobacteria; Unclassified Proteobacteria;</i>	2,261	1,864	1,737
<i>Spirochaetes; Spirochaetes; Candidatus Cloacamonas; Candidatus Cloacamonas acidaminovorans str. Evry</i>	0,000	0,007	0,014
<i>Spirochaetes; Spirochaetes; Spirochaetales; Brachyspiraceae</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Spirochaetes; Spirochaetes; Spirochaetales; Leptospiraceae</i>	0,020	0,058	0,041
<i>Spirochaetes; Spirochaetes; Spirochaetales; Spirochaetaceae</i>	0,034	0,342	0,461
<i>Spirochaetes; Spirochaetes; Spirochaetales; Unclassified Spirochaetales</i>	0,020	0,015	0,027
<i>Spirochaetes; Spirochaetes; Unclassified Spirochaetes</i>	0,000	0,007	0,007

<i>Spirochaetes;Unclassified Spirochaetes</i>	0,007	0,000	0,007
<i>Synergistetes;Synergistia;Synergistales;Synergistaceae</i>	0,088	0,029	0,061
<i>Synergistetes;Synergistia;Synergistales;Unclassified Synergistales</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Synergistetes;Synergistia;Unclassified Synergistia</i>	0,000	0,000	0,014
<i>TM6;Verrucomicrobia bacterium YJF2-48;Unclassified Verrucomicrobia bacterium YJF2-48</i>	0,000	0,044	0,041
<i>Tenericutes;Mollicutes;Candidatus Phytoplasma;Phytoplasma sp.</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Tenericutes;Mollicutes;Candidatus Phytoplasma;Unclassified Candidatus Phytoplasma</i>	0,000	0,022	0,224
<i>Tenericutes;Mollicutes;Entomoplasmatales;Entomoplasmataceae</i>	0,000	0,007	0,007
<i>Tenericutes;Mollicutes;Entomoplasmatales;Spiroplasmataceae</i>	0,047	0,007	0,027
<i>Tenericutes;Mollicutes;Entomoplasmatales;Unclassified Entomoplasmatales</i>	0,014	0,000	0,027
<i>Tenericutes;Mollicutes;Haloplasmatales;Haloplasmataceae</i>	0,014	0,000	0,000
<i>Tenericutes;Mollicutes;Mycoplasmatales;Mycoplasmataceae</i>	0,014	0,146	0,672
<i>Tenericutes;Mollicutes;RF9;Acholeplasmatales bacterium canine oral taxon 316</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Tenericutes;Mollicutes;RF9;Acholeplasmatales bacterium canine oral taxon 375</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Tenericutes;Mollicutes;Unclassified Mollicutes</i>	0,014	0,058	0,095
<i>Tenericutes;Unclassified Tenericutes</i>	0,007	0,015	0,054
<i>Thermodesulfobacteria;Thermodesulfobacteria;Thermodesulfobacteriales;Thermodesulfobacteriaceae</i>	0,000	0,015	0,007
<i>Thermodesulfobacteria;Unclassified Thermodesulfobacteria</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Thermotogae;Thermotogae;Thermotogales;Thermotogaceae</i>	0,007	0,022	0,143
<i>Thermotogae;Unclassified Thermotogae</i>	0,000	0,000	0,014
<i>Unclassified</i>	11,74	6,603	11,354
<i>Verrucomicrobia;Candidatus Methylocidiphilum;Unclassified Candidatus Methylocidiphilum</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Verrucomicrobia;OPB35 soil group;Oikopleura dioica;Unclassified Oikopleura dioica</i>	0,007	0,007	0,007
<i>Verrucomicrobia;OPB35 soil group;Unclassified OPB35 soil group</i>	0,298	0,386	0,095
<i>Verrucomicrobia;OPB35 soil group;bacterium Ellin515;Unclassified bacterium Ellin515</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Verrucomicrobia;OPB35 soil group;bacterium Ellin516;Unclassified bacterium Ellin516</i>	0,020	0,015	0,007
<i>Verrucomicrobia;OPB35 soil group;bacterium RS28G;Unclassified bacterium RS28G</i>	0,007	0,007	0,000
<i>Verrucomicrobia;Opitutae;Opitiales;Opitutaceae</i>	1,374	0,619	0,095
<i>Verrucomicrobia;Opitutae;Opitiales;Unclassified Opitiales</i>	0,007	0,000	0,000
<i>Verrucomicrobia;Opitutae;Puniceococcales;Puniceococcaceae</i>	0,318	0,058	0,007
<i>Verrucomicrobia;Opitutae;Puniceococcales;Unclassified Puniceococcales</i>	0,041	0,015	0,000
<i>Verrucomicrobia;Opitutae;Unclassified Opitutae</i>	0,163	0,066	0,034
<i>Verrucomicrobia;Spartobacteria;Chthoniobacterales;Chthoniobacteraceae</i>	0,088	0,036	0,007
<i>Verrucomicrobia;Spartobacteria;Chthoniobacterales;FukuN18 freshwater group</i>	0,000	0,015	0,000
<i>Verrucomicrobia;Spartobacteria;Chthoniobacterales;Unclassified Chthoniobacterales</i>	0,047	0,073	0,020
<i>Verrucomicrobia;Spartobacteria;Chthoniobacterales;Xiphinematobacteraceae</i>	0,000	0,000	0,007
<i>Verrucomicrobia;Spartobacteria;Unclassified Spartobacteria</i>	0,027	0,015	0,020
<i>Verrucomicrobia;Unclassified Verrucomicrobia</i>	0,501	0,262	0,156
<i>Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Unclassified Verrucomicrobiae</i>	0,007	0,029	0,000
<i>Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Verrucomicrobiales;Rubritaleaceae</i>	0,000	0,007	0,000
<i>Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Verrucomicrobiales;Unclassified Verrucomicrobiales</i>	0,047	0,102	0,007
<i>Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae;Verrucomicrobiales;Verrucomicrobiaceae</i>	0,379	1,128	0,197