

ВЛИЯНИЕ СТОКОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ.

© 2024 г. Т. Ю. Измалкова^а, *, О. И. Сазонова^а, И. А. Кошелева^а

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Московская область, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: tatiz@pbcras.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 26.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

В работе исследовано влияние очистных сооружений г. Пушкино на содержание в воде и седиментах реки Ока антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант множественной лекарственной устойчивости. Обнаружен вклад сточных вод, прошедших очистку, в загрязнение поверхностных вод реки Ока штаммами, устойчивыми к аминогликозидам. Продемонстрирована роль очистных сооружений г. Пушкино в распространении в водной среде мультирезистентных штаммов, а также плазмид группы несовместимости A/C (IncA/C). Показано, что стоки очистных сооружений влияют как на общее содержание эубактерий в донных отложениях, так и увеличивают процентное содержание псевдомонад в них, изменяя, тем самым, состав микробного сообщества.

Ключевые слова: антибиотики, очистные сооружения, множественная лекарственная устойчивость, псевдомонады, плазмиды, интегроны, группы несовместимости плазмид

DOI: 10.31857/S0026365624020194

Микроорганизмы играют решающую роль в экосистемах пресных водоемов. Однако структура водных микробных сообществ весьма лабильна и подвержена как естественным природным, так и антропогенным факторам. Постоянно повышающийся уровень антимикробных препаратов в окружающей среде в настоящее время является глобальной экологической проблемой, поскольку приводит к селекции резистентных к ним бактерий и появлению новых детерминант устойчивости. Реки являются важным связующим звеном между городскими и сельскими экосистемами. Антимикробные препараты и антибиотикоустойчивые микроорганизмы попадают в водную среду путем сброса сточных вод очистных сооружений в поверхностные или грунтовые воды, ливневых стоков с сельскохозяйственных угодий, а также в результате применения антибиотиков в аквакультуре (Carvalho, Santos, 2016). В России работы по изучению загрязнения водной среды фармацевтическими препаратами начаты в 2009 году исследованиями Института водных проблем РАН. В ходе исследований 2009–2013 годов на водных объектах-источниках питьевого водоснабжения и водозаборах водоочистных сооружений г. Москва были выявлены соединения, проявляющие бактерицидную активность (например, ампициллин, тетрациклин,

ципрофлоксацин и другие) (Barenboim, Kozlova, 2018).

Река Ока с площадью водосбора 245 тыс. км² и общей длиной 1500 км является рыбохозяйственным водным объектом высшей категории. Ниже г. Серпухов р. Ока, в соответствии с удельным комбинаторным индексом загрязненности воды (УКИЗВ), относится к 4 классу качества, разряда “А” (грязная). Загрязнение поверхностных вод бассейна Оки связано с повышенным содержанием соединений азота, фосфора и органических веществ, что обычно обусловлено естественными условиями формирования речного стока и антропогенной нагрузкой промышленных и сельскохозяйственных предприятий (Джамалов и соавт., 2017). Город Пушкино Московской области (около 20 тысяч населения) не содержит на своей территории крупных производств, поэтому основным источником попадания в водную среду антибиотиков и антибиотикорезистентных штаммов служат коммунально-бытовые сточные воды.

Целью работы являлось изучение влияния сточных вод очистных сооружений г. Пушкино на изменение состава микробного сообщества на примере бактерий рода *Pseudomonas*, а также на содержание в воде и седиментах реки Ока

антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант множественной лекарственной устойчивости.

Три пляжа в окрестностях г. Пушкино были выбраны для отбора проб воды и седиментов: городской пляж г. Пушкино (№ 2), пляж отеля Царьград (№ 1), расположенный в 3 км вверх по течению, и малопосещаемый пляж в 1.8 км вниз по течению (№ 3), расположенный приблизительно в 250 м вниз от стока очистных сооружений г. Пушкино в Оку. Пляж отеля Царьград, который на момент отбора проб был больше года закрыт для посещения, выбран в качестве контрольной точки минимального антропогенного воздействия. Пробы воды на глубине 0.5 м и донных отложений у береговой линии под слоем воды 5 см были взяты из трех точек с каждого исследуемого сайта. Температура воды всех трех сайтов была 24°C, температура воздуха – от 24 до 26.2°C. Штаммы выращивали при 28°C на агаризованной среде LB (Sambrook et al., 1989), как без антибиотика, так и с добавлением одного из следующих антибиотиков: меропенем (40 мкг/мл), цефтазидим (40 мкг/мл), цефепим (40 мкг/мл), тетрациклин (30 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл). Концентрации антибиотиков подбирали в соответствии с работой (Кошелева и соавт., 2021). Общую численность культивируемых микроорганизмов, культивируемых антибиотикоустойчивых микроорганизмов и псевдомонад определяли методом прямого высева серии разведений в трех повторах для каждой пробы, как было описано ранее (Кошелева и соавт., 2021). Общая численность культивируемых микроорганизмов (ОЧМ) на LB-агаре без антибиотика была одного порядка и составила $1.59 \times 10^3 \pm 30$ КОЕ/мл для пляжа № 1, $1.35 \times 10^3 \pm 10$ и $2.69 \times 10^3 \pm 30$ для пляжей № 2 и № 3, соответственно. ОЧМ в пробах седиментов также была схожа между собой и составила $1.16 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^3$ КОЕ/мл для пляжа № 1, $2.75 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^3$ и $4.45 \times 10^5 \pm 10^3$ для пляжей № 2 и № 3, соответственно. Таким

образом, стоки очистных сооружений практически не влияют на общую численность культивируемых микроорганизмов.

Численность культивируемых антибиотикоустойчивых микроорганизмов представлена на рис. 1.

Обнаружено почти десятикратное увеличение содержания микроорганизмов, устойчивых к аминогликозидам (канамицину, стрептомицину и гентамицину) в пробах воды, отобранных ниже сброса сточных вод очистных сооружений. Микроорганизмы, устойчивые к цефалоспорином III и IV поколения, были обнаружены во всех пробах, однако их концентрация также была выше в воде зоны пляжа № 3. Крайне низкая численность микроорганизмов, устойчивых к тетрациклину (1–2 КОЕ/мл) в образцах воды и седиментов всех трех зон может свидетельствовать об отсутствии загрязнения исследуемого участка р. Оки отходами животноводства (рис. 1). Ранее нами было показано, что, в то время как обработка сточных вод очистными сооружениями г. Пушкино приводила к значительному снижению численности микроорганизмов, устойчивых к тетрациклину, то для микроорганизмов, устойчивых к канамицину, стрептомицину и хлорамфениколу, общая численность была сходной и не изменялась на всех стадиях очистки (Кошелева и соавт., 2021). В случае гентамицина численность в процессе очистки даже слегка возрастала, что, вероятно, связано с участием мобильных генетических элементов в распространении GmR⁻фенотипа. Таким образом, наблюдается корреляция между всплеском численности микроорганизмов, устойчивых к аминогликозидам, в воде пляжа № 3 и поступающими в реку очищенными сточными водами.

Пресноводные псевдомонады могут быть постоянными или эфемерными членами различных микробных консорциумов в городском водном цикле. Ранее нами было показано, что одними из наиболее часто встречающихся культивируемых

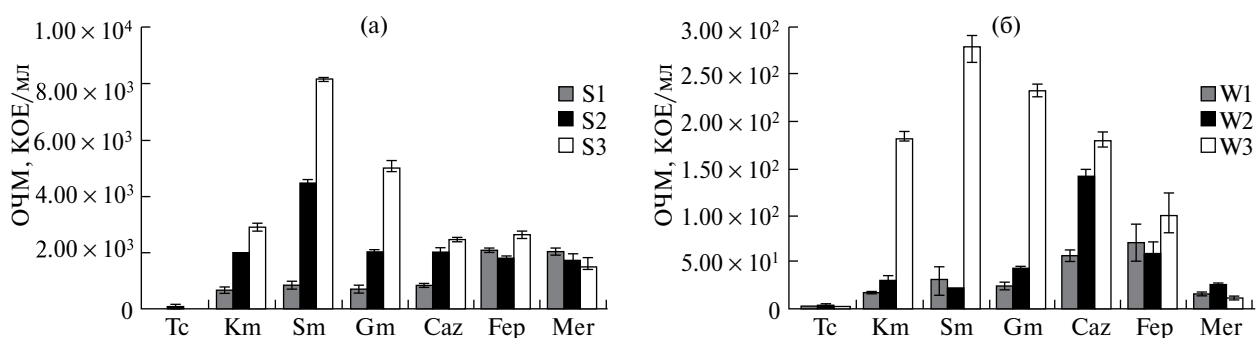


Рис. 1. Общая численность антибиотикоустойчивых микроорганизмов (КОЕ/мл образца), изолированных методом прямого высева из проб седиментов (а) и воды (б) реки Ока. Тс – тетрациклин, Km – канамицин, Sm – стрептомицин, Gm – гентамицин, Caz – цефтазидим, Fep – цефепим, Mer – меропенем.

Таблица 1. Количественное определение двух групп микроорганизмов методом qPCR в пробах воды и седиментов реки Оки

Пробы		Численность копий микробных генов 16S рРНК на 1 г образца, оцененная с помощью количественной ПЦР		Соотношение численности <i>Pseudomonas</i> к общему числу <i>Eubacteria</i> (%)
		<i>Eubacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	
Пляж отеля Царьград (№ 1)	Вода	2.60×10^6	2.40×10^4	0.92
	Седименты	1.87×10^6	3.71×10^4	1.99
Городской пляж (№ 2)	Вода	2.43×10^6	2.12×10^4	0.87
	Седименты	2.14×10^6	5.38×10^4	2.52
Пляж за очистными сооружениями (№ 3)	Вода	2.60×10^6	2.25×10^4	0.87
	Седименты	4.83×10^6	2.23×10^5	4.62

антибиотикоустойчивых микроорганизмов в очистных сооружениях г. Пушкино являются бактерии рода *Pseudomonas* (Кошелева и соавт., 2021). Из проб воды и седиментов с трех исследуемых пляжей на среде для выделения псевдомонад (PIA) были изолированы микроорганизмы, которые дополнительно проверяли на способность к флуоресценции на среде King B и устойчивость к используемому антибиотикам. Анализ антибиотикорезистентности исследуемых штаммов показал, что только 16% культивируемых штаммов псевдомонад, изолированных из проб пляжа отеля Царьград, устойчивы к трем и более используемым антибиотикам, а 18% — чувствительны ко всем используемым. Для городского пляжа и пляжа за очистными сооружениями эти доли достигали 47 и 17%, и 75 и 1.5%, соответственно. Очевидно влияние стоков очистных сооружений на распространение мультирезистентных штаммов.

Для выявления в пробах эубактерий и псевдомонад проводили количественную ПЦР (qPCR) с парами праймеров к фрагменту гена 16S рРНК бактерий — S-D-Bact-0907-a-S-20 и S-D-Bact-1054-a-A-20 (Leser et al., 2002) и к гипервариабельной области V3–V4 гена 16S рРНК *Pseudomonas* spp. — Pse435F и Pse686R (Bergmark et al., 2012). ДНК из образцов воды и седиментов выделяли с использованием ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (“Zymo Research”, США) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. ПЦР в реальном времени осуществляли в циклере ДТлайт 4 (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием 2.5-кратной реакционной смеси (“Синтол”, Россия), согласно инструкции производителя. Значения порогового цикла (Ct) рассчитывали, как среднее из 3-х повторов для каждого образца. Для построения стандартной кривой использовали серии 10-кратных разведений фрагментов гена 16S рРНК *Pseudomonas putida* и *Citrobacter freundii*. Эффективность ПЦР составила 86–99%, коэффициент детерминации $R^2 > 0.99$. После пересчета с использованием стандартов

результаты выражали как число рибосомальных оперонов на 1 г образца. Результаты qPCR демонстрируют схожее содержание как эубактерий, так и псевдомонад в пробах воды исследованных участков (табл. 1).

Однако в пробах седиментов пляжа № 3, испытывающего влияние стоков очистных сооружений г. Пушкино, обнаружено повышенное содержание как эубактерий (в 2.5 раза по сравнению с контрольным пляжем), так и бактерий рода *Pseudomonas* (в 6 раз). Процентное содержание псевдомонад от общего количества эубактерий было также самое большое в пробах седиментов пляжа № 3. Таким образом, стоки очистных сооружений влияют как на общее содержание эубактерий в донных отложениях, так и увеличивают процентное содержание псевдомонад в них (в том числе культивируемых мультирезистентных штаммов), изменяя, тем самым, состав микробного сообщества.

Сточные воды очистных сооружений, помимо влияния на состав микробных сообществ, могут являться источником антимикробных препаратов и микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам. Образцы ДНК из проб воды и седиментов исследуемых участков реки Оки тестировали методом ПЦР на наличие генов, ассоциированных с интегронами I-го типа: гена интегразы, *intI1*, гена устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям, *qacE/qacΔE1* (Кошелева и соавт., 2021), и R-плазмид группы несовместимости A/C (IncA/C) (Johnson et al., 2007). Считается, что интегронам класса I принадлежит ведущая роль в распространении множественной лекарственной устойчивости (Partridge et al., 2018). Плазмиды IncA/C преобладают среди патогенных штаммов *Enterobacteriaceae* и отвечают за распространение клинически значимых генов устойчивости: цефалоспорины, *blaCMY*, и карбапенемазы, *blaNDM*, а также несут детерминанты устойчивости к фторхинолонам, аминогликозидам и др. (Carattoli et al., 2012). Маркерные последовательности на наличие

интегронов I-го типа были обнаружены во всех исследованных образцах; причем методом количественной ПЦР в реальном времени не удалось выявить существенную разницу между “чистым” пляжем отеля Царьград и пляжем, испытывающим влияние очистных сооружений г. Пушкино. Напротив, ампликоны *repA* IncA/C плазмид были обнаружены только в пробах воды пляжа № 3, что свидетельствует в пользу вклада очистных сооружений в распространение плазмид резистентности этой группы в водной среде.

Таким образом, в работе продемонстрировано влияние очистных сооружений на микробное сообщество водного бассейна р. Ока, в том числе на культивируемую антибиотикоустойчивую часть микробного сообщества, а также на распространение IncA/C плазмид резистентности в водной среде.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FMRM-2022-0014).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Джамалов Р.Г., Никаноров А.М., Решетняк О.С., Сафронова Т.И. Воды бассейна Оки: химический состав и источники загрязнения // Вода и экология: проблемы и решения. 2017. Т. 71. № 3. С. 114–132.
- Кошелева И.А., Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Сиунова Т.В., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Боронин А.М. Антибиотикорезистентные микроорганизмы и детерминанты множественной лекарственной устойчивости у бактерий рода *Pseudomonas* в очистных сооружениях г. Пушкино // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 179–190.
- Kosheleva I.A., Izmailkova T.Y., Sazonova O.I., Siunova T.V., Gafarov A.B., Sokolov S.L., Boronin A.M. Antibiotic-resistant microorganisms and multiple drug resistance determinants in *Pseudomonas* bacteria from the Pushchino wastewater treatment facilities // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 187–197.
- Barenboim G.M., Kozlova M.A. Pollution of sources of drinking water supply of large cities with pharmaceuticals (the example of Moscow, Russia) // Water Resources. 2018. V. 45. P. 941–952.
- Bergmark L., Poulsen P.H.B., Abu Al-Soud W., Norman A., Hansen L.H., Sørensen S.J. Assessment of the specificity of *Burkholderia* and *Pseudomonas* qPCR assays for detection of these genera in soil using 454 pyrosequencing // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 333. P. 77–84.
- Carattoli A., Villa L., Poirel L., Bonnin R.A., Nordmann P. Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. P. 783–786.
- Carvalho I.T., Santos L. Antibiotics in the aquatic environment: a review of the European scenario // Environ. Int. 2016. V. 94. P. 736–757.
- Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 4117–4120.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Johnson S.J., Logue C.M., White D.G., Doetkott C., Nolan L.K. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 1976–1983.
- Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrone R.H., Boye M., Møller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 673–690.
- Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance // Clin. Microbiol. Rev. 2018. V. 31. P. 1–61.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHORT COMMUNICATIONS

Effect of Treated Wastewater on the Distribution of Antibiotic-Resistant Microorganisms in the Aquatic Environment**T. Yu. Izmalkova^{1, *}, O. I. Sazonova¹, and I. A. Kosheleva¹**

¹*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, 142290 Russia*

**e-mail: tatiz@pbcras.ru*

Received October 14, 2023; revised October 26, 2023; accepted November 1, 2023

Abstract—The effect of waste treatment plants in Pushchino, Russia on abundance of antibiotic-resistant microorganisms and determinants of multiple drug resistance in the Oka River water and sediments was investigated. Treated wastewater was found to contribute to contamination of the Oka surface water layer with aminoglycoside-resistant strains. The role of Pushchino waste treatment plants in the dissemination of multidrug-resistant strains and plasmids of the A/C incompatibility groups (IncA/C) was demonstrated. Waste treatment plants were shown to affect both the total abundance of eubacteria in sediments and to affect their composition, increasing the relative abundance of pseudomonads.

Keywords: antibiotics, waste treatment plants, multiple drug resistance, pseudomonads, integrons, plasmid incompatibility groups