

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



СЕДОВА ДАРЬЯ АНДРЕЕВНА

**ОЦЕНКА МИКРОБИОМОВ
И СОДЕРЖАНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В
ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

1.5.15. Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2026

Работа выполнена в лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов и на кафедре экологии и природопользования Академии биологии и медицины им. Д. И. Ивановского
Южного федерального университета

Научный руководитель

Сазыкин Иван Сергеевич,

доктор биологических наук, ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Академия биологии и медицины им. Д.И. Ивановского, кафедра биохимии и микробиологии, профессор.

Официальные оппоненты:

Тихомирова Елена Ивановна,

доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», Институт урбанистики, архитектуры и строительства, кафедра экологии и техносферной безопасности, заведующая;

Водопьянов Сергей Олегович,

доктор медицинских наук, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций, главный научный сотрудник.

Защита диссертации состоится **24 сентября 2026 года в 13:00** на заседании диссертационного совета ЮФУ801.01.14 по биологическим наукам на базе Академии биологии и медицины им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, к. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю.А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Р. Зорге, 21Ж и на сайте Южного федерального университета <https://hub.sfedu.ru/diss/show/1356777/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Отзыв на автореферат в 2-х экз. (с указанием даты, полностью ФИО, учёной степени со специальностью, звания, организации, подразделения, должности, адреса, телефона, e-mail), заверенный печатью организации, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к.804, ученому секретарю диссертационного совета ЮФУ801.01.14 Тимошенко А.Н., а также в формате .pdf на e – mail: atimoshenko@sfedu.ru.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тимошенко Алёна Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Сточные воды являются одним из основных источников антропогенного загрязнения водных экосистем. На протяжении последних десятилетий помимо традиционно изучаемых загрязнителей все большее внимание привлекает изучение содержания генов резистентности к антибиотикам (АРГ), которые были признаны новым классом загрязнителей (Drane et al., 2024). Микробная резистентность к антибиотикам остается нерешенной проблемой, несмотря на усилия мирового сообщества (CDC, 2025). С появлением новых исследований в области резистомы становится ясно, что возникновение и распространение антибиотикорезистентности - явление гораздо более глубокое и сложное, чем просто следствие неконтролируемого использования антибиотиков, и в этом процессе естественные и антропогенные экосистемы, включая сточные воды, играют значительную роль (Selvarajan et al., 2021).

Сточные воды содержат огромное разнообразие микроорганизмов, включая антибиотикорезистентные бактерии (АРБ), и являются естественным резервуаром для множества АРГ (Barancheshme, Munir, 2018). Структура микробного сообщества сточных вод отражает сложность их источников: поступление из коммунальных, коммерческих, медицинских и промышленных объектов (Numberger et al, 2019). Особое внимание привлекают гены интеграз (*intI1*, *intI2*, *intI3*), которые считаются маркерами ГПП и антропогенного загрязнения (Emamgholitabar Malekshah et al., 2025). Они обеспечивают перенос нескольких генов, обуславливающих резистентность к различным классам веществ (Soni et al., 2024).

Экотоксичность сточных вод представляет значительный риск для экосистем и здоровья человека. Сложность состава сточных вод и взаимодействие между различными компонентами затрудняют оценку их токсичности с помощью только химического анализа. Интегрированный подход к оценке экотоксичности, основанный на использовании батареи цельноклеточных бактериальных биосенсоров предлагается как достаточно эффективный метод биотестирования для получения более полной оценки рисков, связанных со сбросом сточных вод в окружающую среду (Wang et al., 2021; Cheliukanov et al., 2025).

Таким образом, сточные воды представляют собой комплексный источник загрязнения, объединяющий наличие резистентной микрофлоры с высоким содержанием АРГ к разным классам антибактериальных препаратов и токсикантов, которые способны влиять на селективное давление внутри микробного сообщества, способствуя обмену АРГ между бактериями.

Цель работы. Комплексная оценка микробных сообществ, содержания генов антибиотикорезистентности и интегронов, а также экотоксикологических характеристик сточных вод канализационных очистных сооружений (КОС) и поверхностных водоемов Ростовской области.

Задачи исследований.

1. Охарактеризовать таксономический состав и показатели альфа- и бета-разнообразия микробных сообществ сточных вод на разных этапах очистки очистных сооружений ряда городов Ростовской области, и поверхностных вод в местах сброса методом высокопроизводительного секвенирования.

2. Определить относительное содержание генов антибиотикорезистентности (АРГ) и интеграз 1, 2, 3 классов в тотальной ДНК сточных вод и поверхностных водоемов (р. Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону, р. Дон в акватории г. Азова), а также в геномной ДНК выделенных из них условно-патогенных (УПМ) и патогенных бактерий (АРБ).

3. Оценить интегральную токсичность, генотоксичность, прооксидантные свойства, эффекты повреждения белков и нарушения целостности клеточных мембран, индукции кворум-сенсинга в сточных и поверхностных водах с использованием батареи цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров.

4. Проанализировать статистические взаимосвязи между структурой микробных сообществ, содержанием АРГ и интегронов.

Защищаемые положения.

1. Доминирующими типами бактерий микробных сообществ сточных и поверхностных вод исследуемого региона являются: Pseudomonadota (100% проб), Bacillota I (92 %), Actinomycetota (84 %), при заметном вкладе Bacillota_A_368345 (64 %), Bacteroidota (64 %), Planctomycetota (56 %), Verrucomicrobiota (60 %), Patescibacteria (56 %) и Cyanobacteriota (8 % исследуемых проб, но с высокой относительной численностью) в ряде проб. Представители типа Pseudomonadota имеют более высокую относительную численность в весенне-летний сезон, а Bacillota I/Actinomycetota - в осенний.

2. В тотальной ДНК воды и геномной ДНК бактерий отмечено высокое содержание генов интеграз 1 класса (*intI1*) и генов *tetO*, *sul2*, *aadA2*, *ermB*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{VIM}*. В процессе очистки сточных вод содержание генов бета-лактамаз не изменялось. Гены *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *mphA*, *bla_{CTX-M}*, *tesA* раза чаще встречались в акватории г. Ростова-на-Дону в отличие от г. Азова.

3. При определении бактериальными lux-биосенсорами наиболее токсичными оказались неочищенные сточные воды КОС г. Аксая, Сальска и Таганрога, а также пробы активного ила КОС г. Новошахтинска. Эффекты генотоксичности, повреждения мембран и интегральная токсичность проб воды р. Дон в г. Азове превышают токсичность воды р. Дон в г. Ростове-на-Дону.

4. Присутствуют статистически значимые корреляции между генами интеграз и отдельными генами резистентности как в бактериальных культурах, так и в тотальной ДНК проб воды. Положительные значимые корреляции выявлены между *intI1* и генами *aadA2*, *sul2*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{VIM}*, *mecA*, *tetO*; *intI2* и *aadA2*, *sul2*, *mecA*; *intI3* и *aadA2*, *bla_{VIM}*, *sul2*, *tetO*.

Научная новизна и теоретическая значимость. В работе впервые установлен таксономический состав микробиомов очистных сооружений на разных этапах очистки на Юге России. Впервые определены основные функциональные таксоны активного ила, а также сезонные закономерности динамики относительной бактериальной численности. Впервые выявлен широкий спектр АРГ и генов интеграз 1, 2, 3 классов в метагеномной ДНК образцов воды и у культивируемых форм бактерий, изолированных из проб сточных вод на разных этапах очистки и поверхностных водоемов бассейна р. Дон. Впервые определены экотоксикологические эффекты сточных вод на разных этапах очистки, в том числе, для проб активного ила. Полученные взаимосвязи между обнаружением АРГ и интегронов вносят вклад в понимание механизмов мобилизации и распространения антибиотикорезистентности в водных экосистемах.

Практическая значимость. С помощью батареи из 8 цельноклеточных lux-биосенсоров впервые проведено биотестирование токсичности сточных вод на разных этапах очистки. Данные по экотоксичности могут быть использованы для поиска источника загрязнения. Полученные данные определения распространения АРГ и интегронов в метагеномной ДНК образцов воды и штаммов условно-патогенных микроорганизмов могут быть использованы санитарными службами при проведении мониторинга антибиотикорезистентности в Южном федеральном округе.

Материалы работы используются при чтении лекций и проведении практических занятий по курсам «Методы бактериологии», «Экологическая биохимия», «Бактериальные трансформации поллютантов» в Академии биологии и медицины им. Д. И. Ивановского ЮФУ, а также в рамках дисциплин «Микробиология» и «Микробиология и вирусология с основами эпидемиологии» на факультете «Биоинженерия и ветеринарная медицина» ФГАОУ ВО ДГТУ.

Личный вклад автора. Все экспериментальные работы, кроме метагеномного секвенирования, выполнены лично автором. Постановка цели и задач исследования, формулировка положений, выносимых на защиту определены совместно с научным руководителем. Обобщение результатов, анализ данных, формулировка выводов, выносимых на защиту, произведены автором лично. Научные публикации подготовлены самостоятельно под руководством научного руководителя.

Степень достоверности результатов исследования. Степень достоверности полученных результатов подтверждается применением современных методов при исследовании таксономического состава (высокопроизводительное секвенирование), идентификации культивируемых форм бактерий (временнóлетная масс-спектрометрия), детекции АРГ (ПЦР в реальном времени), оценке экотоксикологических эффектов (биотестирование с помощью цельноклеточных lux-биосенсоров) проб. Для обработки данных применяли современные методы статистического анализа.

Апробация работы. Результаты исследований, представленные в диссертационной работе, доложены и обсуждены на XVI, XVII, XVIII Всероссийской научно-практической с международным участием конференции «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2021, 2022, 2023); на I и II Международной конференции «Экология родного края: проблемы и пути их решения» (Киров, 2024, 2025); на XXI, XXIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (Киров, 2023, 2025); на Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на Юге России. Ермольевские чтения» (Ростов-на-Дону, 2021, 2022, 2023); на XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Москва, 2022).

Соответствие паспорту специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.15 Экология, прежде всего, пункту 4: Экология сообществ, биоценология. Состав, структура, динамика, факторы формирования и регуляции сообществ. Экологические ниши. Также работа соответствует пункту 10: Антропогенное воздействие на популяции, сообщества и экосистемы. Биологические эффекты загрязнения среды (экотоксикология). Разработка биологических методов и критериев оценки состояния среды, биоиндикация, биотестирование, биомониторинг. Разработка экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу.

Публикации. По материалам работы опубликовано 4 статьи журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК, из которых 1 – в журнале, индексируемом Web of Science и Scopus. Опубликовано 11 работ в других рецензируемых изданиях и материалах научно-практических конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, глав, выводов, списка литературы, содержит приложения. Работа изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы, 22 рисунка, 18

приложений. Список использованной литературы включает 259 источников, в том числе 221 на иностранных языках.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках следующих проектов: госзадание № FENW-2024-0026 «Оценка экотоксикологических характеристик, присутствия клинически значимых генов антибиотикорезистентности и микробного углеводород-деградирующего потенциала донных отложений прибойной зоны побережья Азовского моря в Ростовской области» (рег. № 124102500899-3), госзадание № FENW-2026-0025 «Оценка экологических рисков восточного побережья Азовского моря в связи с планами развития рекреационной инфраструктуры» (рег. № 126021617430-9)».

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность за поддержку, помощь и ценные рекомендации своему научному руководителю, д.б.н., в.н.с., профессору кафедры биохимии и микробиологии, И.С. Сазыкину; заведующему лабораторией экологии и молекулярной биологии микроорганизмов ЮФУ, д.б.н., доценту М.А. Сазыкиной и сотрудникам руководимой ею лабораторией за сотрудничество и помощь в экспериментальных исследованиях; д.м.н., профессору кафедры общей гигиены РостГМУ, П.В. Журавлёву, за сотрудничество и ценные рекомендации при планировании исследования. Автор также выражает благодарность к.б.н., И.В. Попову, ФГБУ ВО ДГТУ; И.С. Березинской, м.н.с РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора, за оказанное содействие и помощь при проведении экспериментов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор отечественной и зарубежной литературы по теме исследования представлен в трех подглавах. Сточные воды охарактеризованы как антропогенный фактор воздействия на водные экосистемы, а также как резервуар для распространения антибиотикорезистентности. Приведен обзор по использованию цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров в качестве инструмента тестирования токсичности водных объектов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом данного исследования являлись микробные сообщества проб воды поверхностных водоемов, сточных вод и активного ила очистных сооружений канализации ряда городов Ростовской области (Рисунок 1).

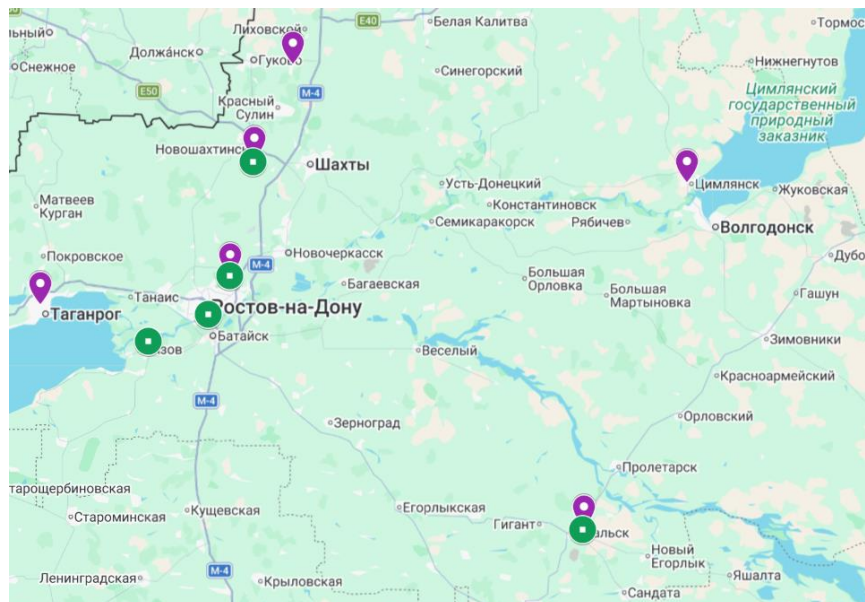


Рисунок 1 – Карта-схема мест отбора проб сточных вод очистных сооружений канализации на разных этапах очистки (фиолетовый) и поверхностных водоемов (зеленый).

Исследовались пробы очистных сооружений канализации городов Аксая, Звереве, Новошахтинска, Сальска, Таганрога и Цимлянска. Выбор точек отбора проб осуществлялся согласно действующим в РФ нормативным документам: МУ 1.2.2743-10, СанПиН 2.1.5.980-00, СанПиН 1.2.3685-21.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор и транспортировка проб воды осуществлялся согласно требованиям ГОСТ 31942-2012.

Секвенирование выполняли на платформе PacBio Sequel IIe (Pacific Biosciences, США). Биоинформатическую обработку и таксономическую классификацию выполняли в программной среде QIIME2 (сборка amplicon-2024.10). Альфа-разнообразие оценивали по индексам Шеннона, Симпсона, Чао1, Пиелу. Бета-разнообразие оценивали с использованием метрики несходства Брея–Кертиса.

Для изучения распространения АРГ в микробной популяции исследовали штаммы бактерий-индикаторов фекальной контаминации родов *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* и *Salmonella*. Идентификацию бактерий осуществляли по культуральным, тинкториальным и биохимическим свойствам, а также при помощи масс-спектрометрического метода.

Выделение метагеномной ДНК проб воды и геномной ДНК бактерий проводили по методу Галиева–Цирюльникова с внесенной авторской модификацией. Выделенную ДНК исследовали для обнаружения АРГ с помощью ПЦР в реальном времени. Для нормализации количества АРГ в каждом образце определяли количество генов 16S рРНК. В ходе работы были исследованы 12 типов

АРГ: *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*, *bla_{CTX-M}*, *mecA*, *vanA*, *vanB*, *tetO*, *ermB*, *mphA*, *sul2*, *aadA2*, включая гены интегронов 3 классов (*intI1*, *intI2*, *intI3*).

Для биотестирования изучаемых образцов воды использовали батарею цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров, позволяющую регистрировать различные типы токсического действия. Штаммы *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) и *E. coli* MG1655 (pAlkA-lux) применялись для выявления генотоксичности, реализуемой через индукцию SOS-ответа и действия алкилирующих агентов. Штаммы *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) и *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) использовали для регистрации супероксидного и пероксидного стресса соответственно. Выявление токсических эффектов, связанных с повреждением белков, проводили с помощью штамма *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux). Для детекции токсикантов, нарушающих целостность клеточных мембран, применяли штамм *E. coli* MG1655 (pFabA-lux). Наличие индукторов кворум-сенсинга I типа определяли с использованием штамма *E. coli* MG1655 (pVFR1-lux). Штамм *E. coli* MG1655 (pXen7-lux) - контрольный штамм с конститутивным промотором для коррекции артефактов, связанных с изменениями активности бактериальной люциферазы, не связанными с индукцией стрессовых промоторов.

Для оценки интегральной токсичности использовали природный биолюминесцентный штамм *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245.

Первичная статистическая обработка проводилась в MS Excel 2015, корреляционный анализ и визуализация тепловых карт выполнялись в RStudio 4.4.2 с применением пакетов ggplot 3.5.1 и corrplot 0.95. Для определения взаимосвязи между содержанием АРГ и интегронов применялся коэффициент корреляции Спирмена. Оценка экотоксичности относительно контроля оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистический анализ различий в содержании АРГ/генов интеграз и экотоксических эффектов между акваториями проводился с применением двухстороннего критерия Фишера. Величины доверительных интервалов были рассчитаны при $p < 0,05$.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Метапрофилирование микробиомов очистных сооружений канализации

В результате метапрофилирования были получены данные о таксономическом составе исследуемых проб: выявлено 426 видов 354 родов, 119 семейств 117 порядков 47 классов 24 типов бактерий. На уровне типа (Рисунок 2) в бактериальных сообществах всех точек отбора проб доминировал тип Pseudomonadota, который встречался в 100% проб и составлял более половины общей относительной численности (медиана встречаемости 62,58 %).



Рисунок 2 – Относительная численность бактериальных сообществ на уровне типа. Каждая строка отражает один образец; места отбора проб сгруппированы по этапам очистки.

Также многочисленными типами бактерий являлись *Bacillota I* (92 %) и *Actinomycetota* (84 %). Доли типов *Bacillota_A_368345* (64 %), *Bacteroidota* (64 %), *Planctomycetota* (56 %), *Verrucomicrobiota* (60 %), *Patescibacteria* (56 %), составляли значительную часть в исследуемых микробиомах. Тип *Cyanobacteriota* выявлен в 8 % исследуемых проб, но встречался с высокой относительной численностью.

На уровне родов (Рисунок 3) структура сообщества в значительной степени определялась представителями рода *Pseudomonas*, в частности *Pseudomonas E 647464*. В глобальном анализе микробиома сточных вод *Pseudomonas* и другие представители класса *Gammaproteobacteria* определяются как таксоны, общие для разных континентов, что позволяет рассматривать высокую относительную численность *Pseudomonas* в исследуемых образцах как типичную особенность сообществ сточных вод. Представители родов *Trichococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium 388775* также часто выявлялись. В особенности, их повышенное содержание было характерно для неочищенных СТВ в приемной камере КОС и пробах активного ила.

Пробы активного ила характеризовались более высоким уровнем микробного разнообразия, в отличие от неочищенных СТВ. В составе родов доминировали, помимо описанных ранее *Pseudomonas E 647464*, *Trichococcus* и *Psychrobacter*, неклассифицированные представители семейств *Planctomycetaceae* и *Rhodobacteraceae*. Среди функционально-активных родов активного ила встречались сероокисляющие бактерии (*Thiobacillus*, *Thiothrix_606507*),

нитрификаторы (*Nitrosomonas*), фосфатаккумулирующие бактерии (*Accumulibacter*).

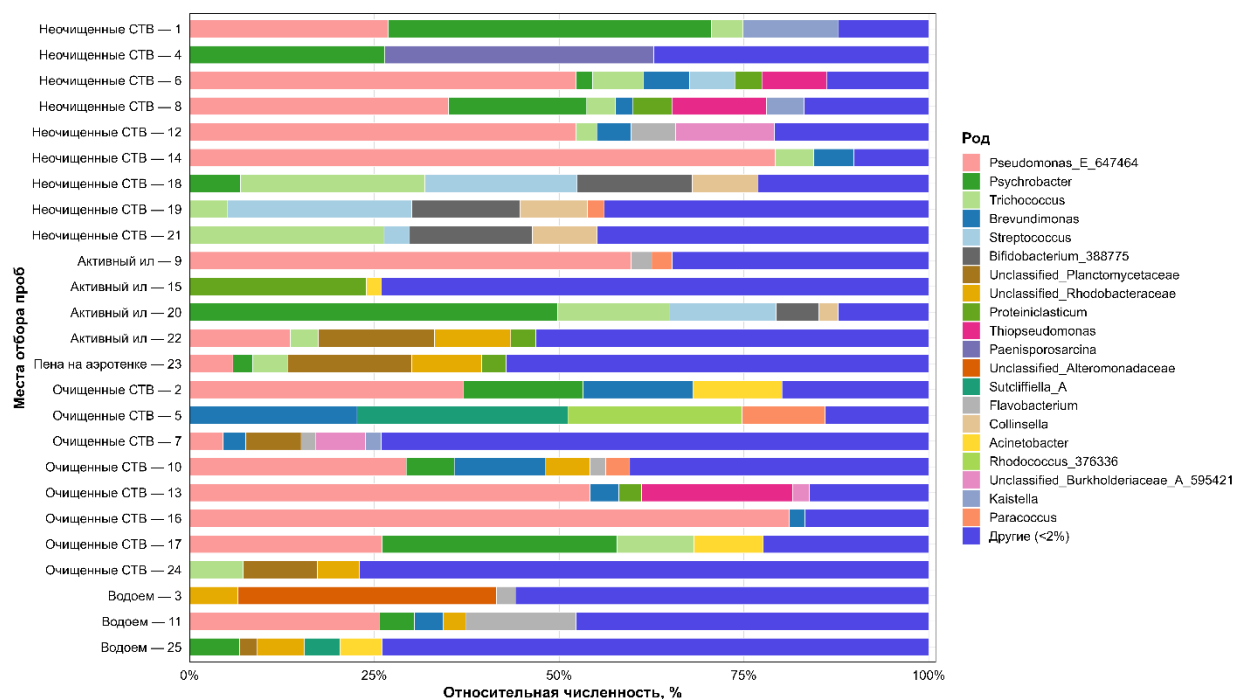


Рисунок 3 – Относительное обилие бактериальных сообществ на уровне рода. Каждая строка отражает один образец; места отбора проб сгруппированы по этапам очистки.

Состав микробиоты сточных вод после цикла очистки характеризовался высоким относительным содержанием аэробных родов *Pseudomonas* E 647464, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Unclassified_Planctomycetaceae* и *Unclassified_Rhodobacteraceae*. Для проб КОС г. Новошахтинска (№ 21 – 24), в целом, было выявлено наиболее высокое разнообразие всех таксонов.

Анализ альфа-разнообразия с использованием индексов Шеннона, Симпсона, Чао1 и Пиелу не выявил статистически значимых различий в разнообразии бактериальных сообществ между стадиями очистки, городами и датами отбора проб ($p > 0,05$ по критерию Краскела–Уоллиса для всех сравнений).

Анализ бета-разнообразия на основе несходства Брея–Кертиса показал высокую общую несхожесть бактериальных сообществ между всеми образцами: попарные расстояния варьировали от 0,87925 до почти 1,0. Это свидетельствует о том, что, несмотря на наличие общих таксонов, состав сообществ существенно различался между точками, городами и датами отбора. Дата отбора проб оказала значимое влияние ($p = 0,001$) на таксономический состав сообществ.

Анализ дифференциального обилия выявил несколько бактериальных таксонов с существенными различиями относительной численности между биотопами, городами и датами отбора проб. Это может указывать на то, что временной фактор влияет не только на общую структуру сообществ (что показано

анализом бета-разнообразия), но и на распределение отдельных экологически значимых групп.

4.2 Содержание АРГ и интегров в микробиомах очистных сооружений канализации

Гены *intI1*, *tetO*, *aadA2*, *vanB*, *sul2*, *mecA*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}* были обнаружены в 100% исследуемых проб сточных вод. Наиболее высокое значение относительного содержания (генов/16SpPHK) было зафиксировано для генов интеграз (*intI1*, *intI2*) в пробе № 5 (сточные воды после обработки) и ряда АРГ, включая *tetO* ($3,13 \times 10^{-2}$), *aadA2* ($1,34 \times 10^{-1}$), *vanB* ($3,01 \times 10^{-4}$), *sul2* ($4,42 \times 10^{-2}$) и *mecA* ($7,40 \times 10^{-4}$), *bla_{OXA-48}* ($1,18 \times 10^{-2}$), *bla_{VIM}* ($2,92 \times 10^{-2}$).

Всего было исследовано 48 штаммов бактерий, которые относятся к этиологически-значимым микроорганизмам, ассоциированным с антибиотикорезистентностью. Наиболее часто обнаруживались гены *aadA2* (100% культур), *bla_{CTX-M}* (89,6%), *ermB* (72,9%), *mphA* (66,7%) и *sul2* (64,6%). Значения относительного содержания (10^{-2}) были характерны для *intI1*, *intI2*, *aadA2*, *ermB*, *vanA*, *vanB*, *sul2*, *bla_{CTX-M}*, *mphA*.

Ген устойчивости к метициллину (*mecA*) не был обнаружен ни у одной из исследуемых бактерий. Наиболее редко выявлялись гены интеграз 3 класса (*intI3*), *vanA*, *vanB* и *bla_{NDM}*. Ген *intI3* также редко встречался в сточных водах, что подтверждает его ограниченную роль в ГПГ резистентности в сравнении с *intI1* и *intI2*. В целом, данная частота встречаемости генов была характерна и для образцов тотальной ДНК.

4.3 Определение экотоксикологических эффектов проб сточных вод и поверхностных водоемов в местах сброса КОС

Результаты определения экотоксикологических параметров проб сточных вод и вод поверхностных водоемов в местах сброса сточных вод представлены на рисунках 4 и 5.

Выраженный эффект, соответствующий среднему уровню токсичности ($2,0 \leq I \leq 10,0$) для *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), отмечался лишь в отдельных образцах: № 1 ($I = 2,38$ и $3,18$ в разведениях 10^{-3} и 10^{-4} соответственно), № 2 ($3,40$ и $2,19$ в разведениях 10^{-2} и 10^{-3} соответственно), № 14 ($2,37$ в разведении 10^{-3}). Максимальный показатель генотоксичности ($4,01$ в разведении 10^{-2}) был определен в пробе № 2 (очищенные СТВ) в КОС г. Таганрога. Определение генотоксичности с помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pAlkA-lux) (наличие алкилирующих агентов) показало, что наибольшую токсичность наблюдали в пробах канализации г. Сальска, Аксая и Таганрога и очищенных сточных водах г. Аксая.

Умеренный окислительный стресс по биосенсору *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) был зафиксирован в пробах № 1, 2, 4, 6, 14 и 18 (2,2–3,77, преимущественно в разведениях 10^{-2} – 10^{-3}), тогда как со штаммом *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) умеренная токсичность наблюдалась в менее широком спектре образцов.

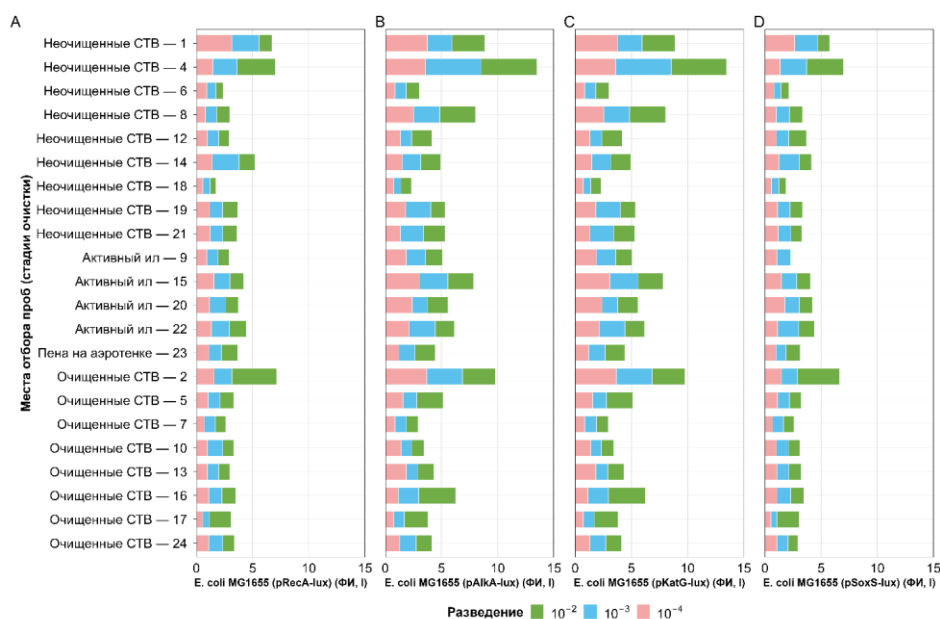


Рисунок 4 – Генотоксичность и проокислительные свойства исследуемых проб сточных вод на разных этапах очистки КОС и поверхностных водоемов в местах сброса.

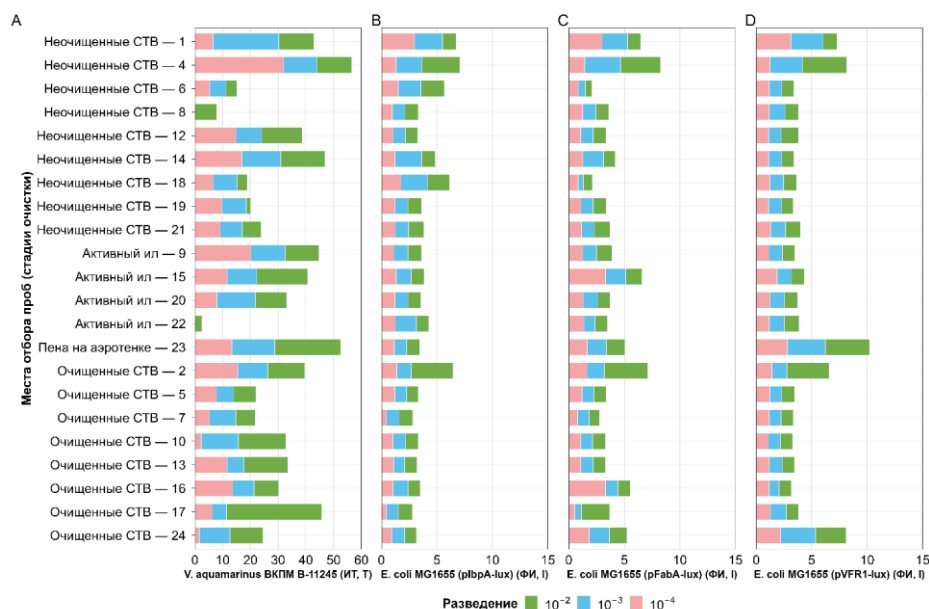


Рисунок 5 – Интегральная токсичность и индукция системы *Quorum sensing*, токсичность, ассоциированная с повреждением белков и мембран, в пробах сточных вод на разных этапах очистки КОС и поверхностных водоемов в местах сброса.

Пробы речной воды имели слабую генотоксичность, за исключением № 25 (балка Жанкина), где фактор индукции биосенсора *E. coli* MG1655 (pAlkA-lux) имел значение, свидетельствующее об умеренной генотоксичности ($I = 2,33$).

Интегральную токсичность определяли по ответу lux-биосенсора *V. aquamarinus* ВКПМ В 11245 (Рисунок 5А). Наиболее выраженную токсичность показали образцы № 17 и 23, для которых при разведении 10^{-2} значения индекса токсичности составляли соответственно 34 и 23,7, но при более высоких разведениях токсичность снижалась до допустимого уровня.

Реакция биосенсора *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) на белок-повреждающие эффекты, была наиболее сильной в 6 образцах: № 1 (10^{-4} - 2,99), 2 (10^{-2} - 3,94), 4 (10^{-2} - 3,62), 15 (10^{-4} - 3,33), 16 (10^{-4} - 3,33), 17 (10^{-2} - 2,53).

С помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pFabA-lux) (повреждение мембран) было выявлено 5 умеренно-токсичных проб. Биосенсор *E. coli* MG1655 (pVFR1-lux) показал наличие веществ, активирующих аутоиндукторы системы *Quorum sensing*, в пробах: № 1, 2, 4, 6, 8, 15, 23, 24.

Полученные результаты свидетельствуют, что для сточных вод и поверхностных водоемов в местах сброса КОС Ростовской области в большей степени было характерно присутствие алкилирующих агентов, которые обусловили средний эффект генотоксичности исследуемых проб, а также наличие аутоиндукторов, активирующих систему *Quorum sensing* грамотрицательных бактерий.

4.4 Взаимосвязь между таксономическим составом, содержанием АРГ и интегров в микробиомах сточных вод

Анализ корреляции Спирмена не выявил статистически значимых ассоциаций между характеристиками бактериальных сообществ (в численности бактерий любого таксономического ранга), индексами альфа-разнообразия и содержанием АРГ после поправки на множественное тестирование.

Тем не менее, при определении взаимосвязи между содержанием АРГ и генами ингераз 1, 2, и 3 класса были обнаружены значимые корреляции. В культурах бактерий были выявлены сильные положительные корреляции между генами *aadA2* и *intI1*, *intI2*. Ген устойчивости *sul2* имел сильную положительную значимую корреляцию с *intI2*, а также почти идеальная корреляция выявлена между *intI1* и *bla_{OXA-48}*. Также были обнаружены отрицательные корреляции, причем наиболее заметная отмечена между *intI2* и *tetO*. В образцах тотальной ДНК проб воды статистически значимые положительные корреляции включали взаимосвязи между *intI1* и *mecA*, и *tetO*, в то время как *intI3* показывал значимую отрицательную корреляцию с *ermB*.

4.5 Содержание АРГ и интегронов в микробиомах воды рек Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону и Азова

Результаты определения содержания АРГ в метагеномной ДНК образцов воды р. Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону представлены на рисунке 6.

В 100 % проб встречались гены *intI1*, *aadA2*, *tetO*, *sul2*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*. Также, с высокой частотой выявлялись гены *bla_{CTX-M}*, *ermB*, *mphA*, *bla_{OXA-48}*, *mecA*, *intI3* (41,9–96,8 %). Наименьшая частота обнаружения была характерна для *intI2* (3,2%), *vanB* (6,5%) и *vanA* (25,8%). Наибольшее относительное содержание генов *intI1* ($1,27 \times 10^{-2}$), *intI3* ($7,81 \times 10^{-3}$), *bla_{CTX-M}* ($1,10 \times 10^{-2}$), *bla_{VIM}* ($2,80 \times 10^{-4}$) и *aadA2* ($4,74 \times 10^{-2}$) было выявлено в пробе № 28 (речной вокзал г. Ростов-на-Дону, 22.03.2021). Для проб № 40 и 49 (речной вокзал 25.03.2022 и 27.06.2023) также были зарегистрированы максимумы – для *vanB* ($3,27 \times 10^{-5}$), *bla_{NDM}* ($1,05 \times 10^{-3}$) и *mphA* ($1,10 \times 10^{-2}$).

В ДНК бактерий гены *aadA2* и *sul2* встречались во всех образцах, а максимальное содержание выявлено для *intI3* у штамма *P. aeruginosa* 63 ($3,14 \times 10^{-2}$), *intI2* встречался в 2 штаммах энтеробактерий (*E. coli* 59, *K. pneumoniae* 61) и имел низкие количественные показатели ($2,46 \times 10^{-8}$ и $1,77 \times 10^{-7}$ соответственно). Гены бета-лактамаз (*bla_{VIM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{NDM}*) характеризовались максимальным содержанием в штаммах энтеробактерий - $1,48 \times 10^{-3}$, $1,10 \times 10^{-2}$, $2,87 \times 10^{-1}$ соответственно.

В пробах р. Дон акватории г. Азова была следующей ген *sul2* встречался в 100 % исследуемых проб воды с максимальным относительным содержанием (копий/16SpPHK) $2,24 \times 10^{-3}$ в пробе № 76 места сброса СТВ. Пробы воды р. Дон, отобранные в месте сброса очищенных СТВ и водозабора, были наиболее контаминированными АРГ. Пробы № 67, 70, 76, 82 имели наибольшие значения содержания генов: *mecA* ($1,22 \times 10^{-4}$), *intI1* ($4,56 \times 10^{-4}$), *tetO* ($9,11 \times 10^{-4}$), *mphA* ($1,09 \times 10^{-1}$) и *bla_{VIM}* ($3,45 \times 10^{-4}$) соответственно. Пробы азовского водозабора имели наибольшие значения содержания генов: *ermB* - $9,77 \times 10^{-4}$, *bla_{NDM}* - $6,01 \times 10^{-4}$, *bla_{OXA-48}* - $5,61 \times 10^{-4}$ (№ 69); *bla_{CTX-M}* - $1,18 \times 10^{-2}$ (№ 81); *vanA* - $1,4 \times 10^{-5}$ (№ 72).

В ДНК бактерий, выделенных из образцов воды р. Дон в акватории г. Азова АРГ обнаруживали со следующей частотой: *aadA2* > *bla_{VIM}* > *tetO* > *ermB* > *bla_{CTX-M}* > *vanA* > *sul2* > *mphA* > *mecA*. Результаты количественного определения содержания интегронов показали, что наиболее часто выявлялись интегроны 1 и 3 классов (*intI1*, *intI3*), а *intI2* реже и с наименьшим относительным содержанием.

Статистический анализ различий между акваториями с применением двухстороннего критерия Фишера показал, что АРГ существенно чаще встречались

в акватории г. Ростова-на-Дону ($p < 0,01$): *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *mphA*, *bla_{CTX-M}*, *mecA*. Гены, которые значимо чаще встречались в Ростове ($0,01 \leq p < 0,05$): *intI1*, *vanA*.

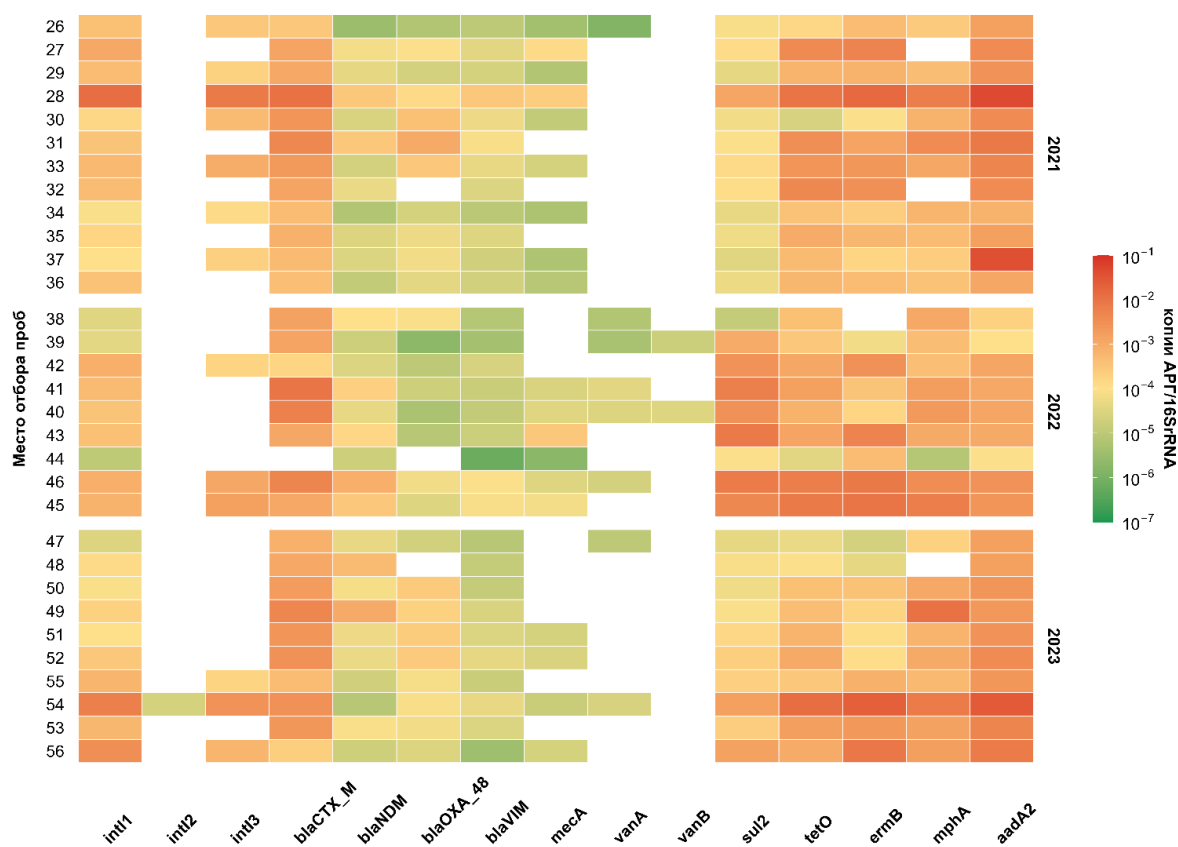


Рисунок 6 – Содержание АРГ и генов интеграз 1-3 классов в образцах воды р. Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону (копии АРГ/16SrRNA)

4.6 Определение экотоксикологических эффектов проб воды рек Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону и Азова

Показатели высокого эффекта генотоксичности ($I > 10,0$) не зафиксированы ни для одной из проб. Сравнение факторов индукции при определении генотоксического эффекта с помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) (ДНК-повреждение) показало, что индукция люминесценции в подавляющем большинстве проб оставалась на уровне слабой токсичности ($I < 2,0$), кроме пробы - № 41 (р. Дон в районе устья р. Темерник, 25.03.2022; $I = 2,01$) (Рисунок 7).

Определение генотоксичности с помощью биосенсора *E. coli* MG1655 (pAlkA-lux) (наличие алкилирующих агентов) позволило получить сходные результаты (№ 31 (городской пляж, 12.05.2021; $I = 2,03$) и № 54 (р. Дон в районе устья р. Темерник, 10.10.2023; $I = 2,17$)).

Токсичных проб, связанных с прооксидантными свойствами и наличием веществ, повреждающих белки, выявлено не было.

Проба № 41 (устье р. Темерник, 25.03.2022; $T = 22,10$) определена как токсичная по показателю биосенсора *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245.

Биосенсор *E. coli* MG1655 (pFabA-lux) показал более выраженную реакцию. Значения фактора индукции в диапазоне умеренной токсичности зафиксированы в трех образцах: № 27 (городской пляж, 22.03.2021; $I = 2,12$), № 32 (речной вокзал, 12.05.2021; $I = 2,12$) и № 54 (р. Дон в районе устья р. Темерник, 10.10.2023; $I = 2,21$). Это указывает на наличие токсикантов, связанных с нарушением целостности мембран в речной воде, преимущественно в зонах рекреации и в районе устья р. Темерник.

При использовании биосенсора *E. coli* MG1655 (pVFR1-lux), значение фактора индукции $I \geq 2,0$ было отмечено в двух образцах р. Дон в районе устья р. Темерник: № 33 (12.05.2021; $I = 2,21$) и № 50 (27.06.2023; $I = 2,08$).

Исследования экотоксикологических эффектов также проводились для проб воды р. Дон в акватории г. Азова.

Умеренный генотоксический эффект был зарегистрирован в 5 пробах: № 69 (водозабор, 29.03.2022; $I = 2,22$), № 76 (место сброса СТВ, 13.09.2022; $I = 2,07$), № 77 (место рекреации, 13.09.2022; $I = 2,15$), № 81 (водозабор, 4.07.2023; $I = 2,12$) и № 83 (место рекреации, 4.07.2023; $I = 2,14$), что свидетельствует о регулярном присутствии ДНК-повреждающих соединений как в зоне сброса СТВ, так и в прибрежной рекреационной зоне. Также, в пробе № 76 была отмечена токсичность, ассоциированная с супероксидным стрессом.

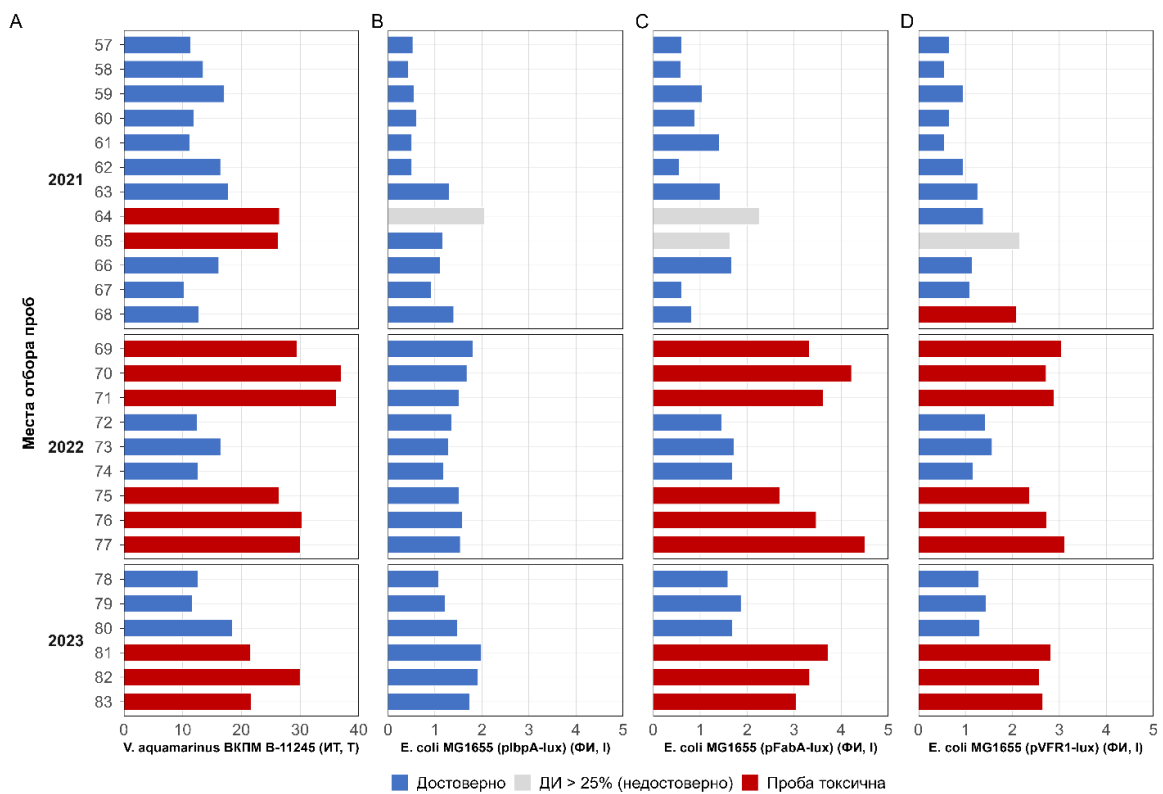
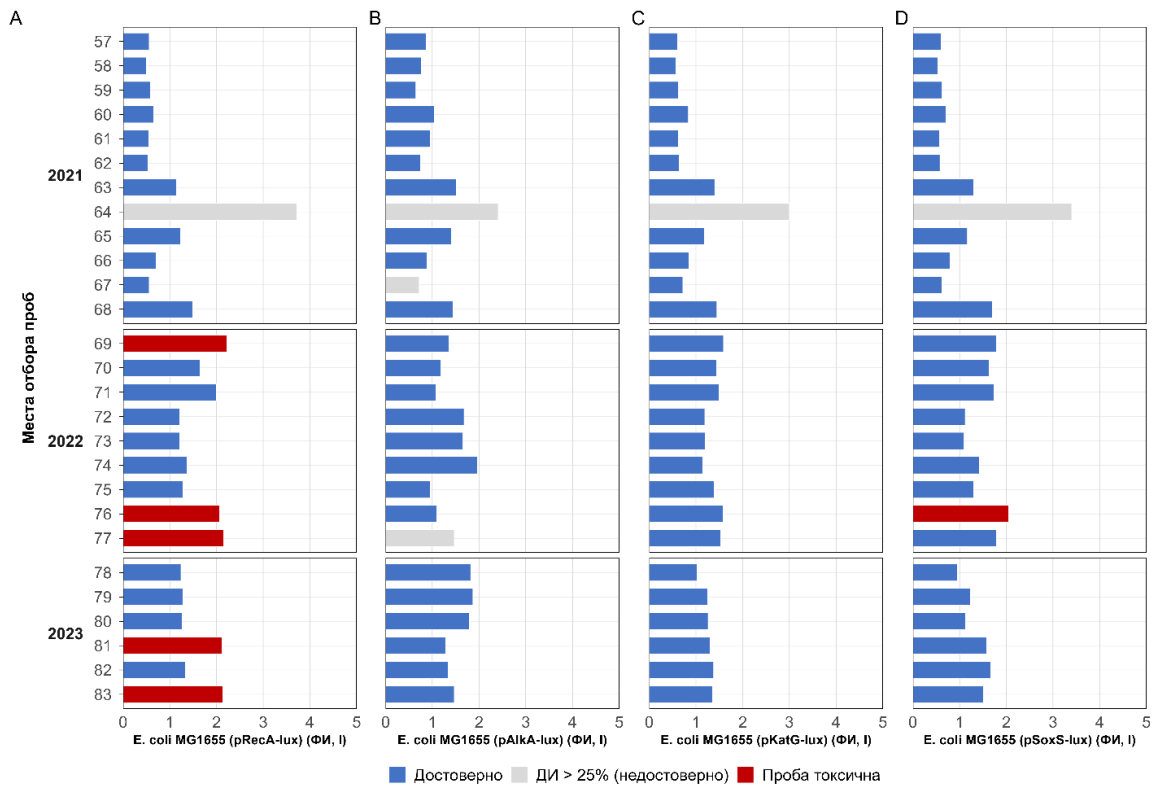
Интегральная токсичность была выявлена у проб: № 64 и 65 (5.10.2021; $T = 26,49$; $26,27$), № 69–71 (29.03.2022; $T = 29,51$; $36,96$; $36,19$), № 75–77 (13.09.2022; $T = 26,38$; $30,27$; $30,00$) и № 81–83 (4.07.2023; $T = 21,60$; $29,99$; $21,73$). Причем, интегральную токсичность выявили в конкретные даты отбора проб вне зависимости от точки отбора.

Пробы № 70, 71, 75–77, 81–83 были определены как токсичные с помощью сенсорного штамма *E. coli* MG1655 (pFabA-lux) (Рисунок 8С).

Также в этих пробах регистрировались значения фактора индукции $I > 2,0$ с биосенсором *E. coli* MG1655 (pVFR1-lux). Максимальное значение фактора индукции было зарегистрировано в образце № 77 ($I = 4,51$; место рекреации; 13.09.2022).

Полученные результаты указывают на существенную нагрузку на р. Дон в акватории г. Азова веществами, вызывающими повреждение мембран и ДНК, индукторами кворум-сенсинга I типа.

Для биосенсоров *E. coli* MG1655 (pAlkA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) токсичные пробы не выявлены.



Сравнение интегральной токсичности проб воды из двух акваторий показало статистически значимое превышение токсичности в г. Азове по сравнению с г. Ростовом-на-Дону ($p = 0,0006$). Также достоверные различия ($p < 0,05$) между акваториями выявлены по результатам биотестирования с тремя биосенсорами: *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pFabA-lux) и *E. coli* MG1655 (pVFR1-lux); во всех случаях токсичность и наличие индукторов *Quorum sensing* значимо выше в пробах из г. Азова. По результатам тестирования с остальными биосенсорами различия недостоверны, так как число токсичных проб мало в обеих группах.

4.7 Взаимосвязь между содержанием АРГ и интегров в микробиомах проб воды рек Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону и Азова

Результаты определения взаимосвязи между содержанием АРГ и интегров представлены на рисунке 9.

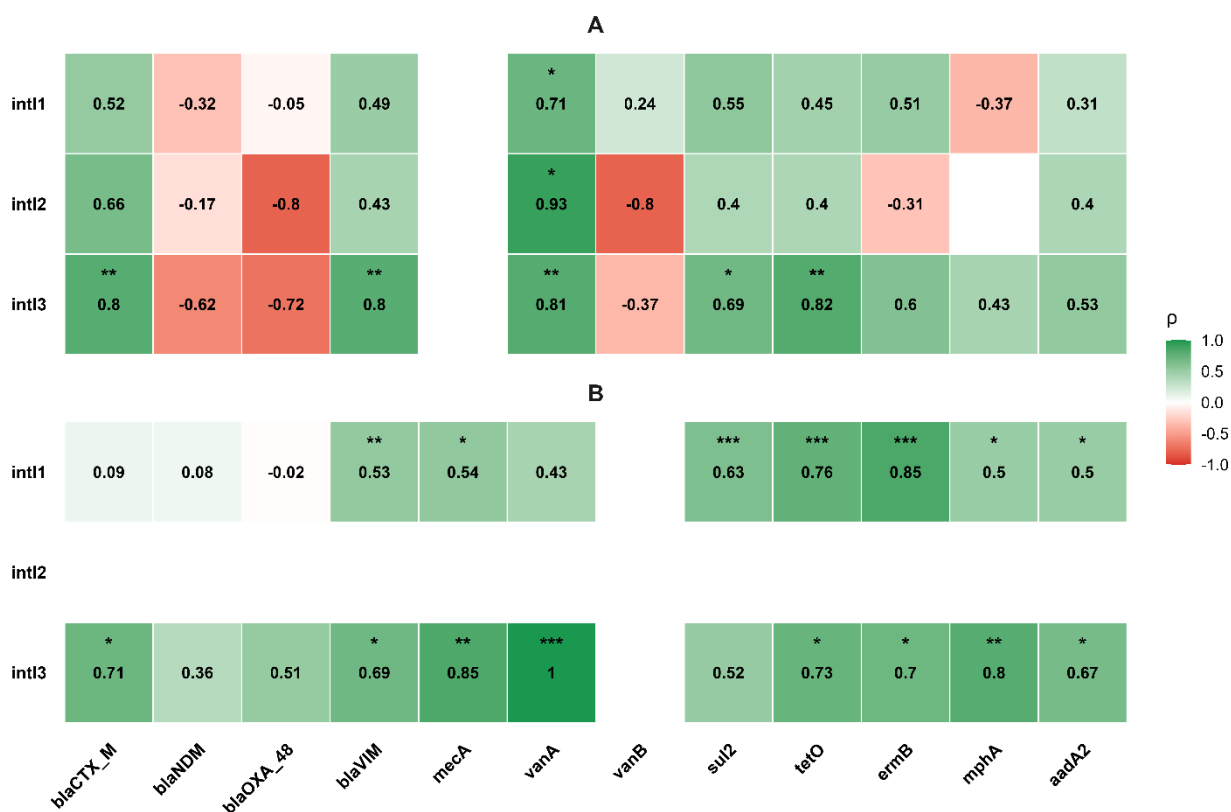


Рисунок 9 – Взаимосвязь между содержанием АРГ и интегров в геномной ДНК бактерий, выделенных из проб р. Дон в акватории г. Азова (А); метагеномной ДНК проб воды р. Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону (В).

Статистически значимые корреляции выявлялись между АРГ и генами интеграз в геномной ДНК бактерий, выделенных из проб р. Дон в акватории г. Азова метагеномной ДНК проб воды р. Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону. В штаммах УПМ выявлены положительные корреляции между генами

устойчивости к тетрациклинам (*tetO*), сульфонамидам (*sul2*), ванкомицину (*vanA*) генами бета-лактамаз (*bla_{VIM}*, *bla_{CTX-M}*) и интегроном 3 типа. Ген устойчивости *vanA*, имел положительные статистически значимые корреляции с интегронами всех трех классов.

Положительная сильная взаимосвязь в метагеномной ДНК проб воды р. Дон и Темерник в акватории г. Ростова-на-Дону определена для генов *intI1* и *tetO/ermB*, *intI3* и *mecA/vanA/mphA/bla_{CTX-M}*. Ген *bla_{VIM}* был ассоциирован с интегронами 1 и 3 классов.

ВЫВОДЫ

1. Состав микробиома сточных вод в значительной степени определялся сезонностью. Доминирующими типами определены Pseudomonadota, Bacillota I, Actinomycetota, Bacillota_A_368345, Bacteroidota, Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Patescibacteria. Также в структуру микробиома рек в местах сброса сточных вод значительный вклад вносил тип Cyanobacteriota. Установлено, что тип Pseudomonadota доминировал в большинстве исследуемых проб. Тем не менее, в осенний период (октябрь, ноябрь) в отдельных образцах доминировали Bacillota и Actinomycetota. Такие параметры, как этап очистки и географическое положение очистных сооружений, не показали статистическую значимость с показателями альфа- и бета-разнообразия.

2. Все исследуемые 12 типов АРГ (*bla_{CTX-M}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *vanA*, *vanB*, *mecA*, *tetO*, *sul2*, *aadA2*, *ermB*, *mphA*) и 3 гена интеграз (*intI1*, *intI2*, *intI3*) обнаруживались в 7 пробах неочищенных сточных вод на входе в очистные сооружения, в 4 образцах очищенных сточных вод и в 2 пробах активного ила. Наибольшее количество типов АРГ обнаруживалось в культурах бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*C. freundii*, *E. coli*, *S. enterica*). Выявление клинически-значимых АРГ подчеркивает роль сточных вод как резервуара и источника распространения антибиотикорезистентности в микробиомах природных водных экосистем.

3. По результатам биотестирования с использованием цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров установлено, что среди исследованных проб воды наиболее токсичными оказались неочищенные сточные воды КОС г. Аксая, Сальска и Таганрога, а также пробы активного ила КОС г. Новошахтинска. Генотоксические эффекты исследованных проб воды были обусловлены присутствием алкилирующих агентов, а прооксидантные свойства – супероксидным стрессом.

4. Установлены статистически значимые корреляции между генами интеграз и отдельными генами резистентности как в бактериальных культурах, так и в тотальной ДНК проб воды: положительные - между *intI1* и генами *aadA2*, *sul2*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{VIM}*, *mecA*, *tetO*; между *intI2* и *aadA2*, *sul2*, *mecA*; между *intI3* и *aadA2*, *bla_{VIM}*, *sul2*, *tetO*. Выявленные значимые положительные корреляции указывают на активный процесс горизонтального переноса клинически-значимых детерминант резистентности в исследуемых микробиомах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в Перечень ВАК

1. **Седова Д. А.** Распространение генов резистентности к антибиотикам в объектах и компонентах экосистем аквакультуры (обзор) / **Д. А. Седова**, М. А. Сазыкина, П. В. Журавлев [и др.]. – Текст: непосредственный // Водные биоресурсы и среда обитания. – 2024. – Т. 7, № 1. – С. 65–82. – DOI 10.47921/2619-1024_2024_7_1_65. K4
2. **Седова Д. А.** Оценка резистома условно-патогенных бактерий, выделенных из воды рек Дон и Темерник в акватории городов Ростов-на-Дону и Азов / **Д. А. Седова**, Е. А. Егорова, М. А. Сазыкина [и др.]. – Текст: электронный // Живые и биокосные системы. – 2025. – № 54. – DOI 10.18522/2308-9709-2025-54-11. K3
3. **Седова Д. А.** Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из воды поверхностных водоемов и сточных вод / **Д. А. Седова**, М. А. Сазыкина, П. В. Журавлев [и др.]. – Текст: непосредственный // Теоретическая и прикладная экология. – 2025. – № 3. – С. 82–90. – DOI 10.25750/1995-4301-2025-3-082-090. K1
4. **Седова Д. А.** Экотоксикологические показатели воды рек Дон и Темерник в акватории городов Ростов-на-Дону и Азов / **Д. А. Седова**, М. А. Сазыкина, М. В. Климова, И. С. Сазыкин. – Текст: электронный // Живые и биокосные системы. – 2026. – № 55. – URL: <https://jbks.ru/archive/issue-55/article-18>. – DOI 10.18522/2308-9709-2026-55-18. K3