

УДК 579.26, 579.25

DOI: 10.18522/2308-9709-2024-50-1

Гены антибиотикорезистентности и бактериоценоз донных отложений озера Маныч-Гудило

Ажогина Т.Н.^{1*}, Воропина Д.С.¹, Хмелевцова Л.Е.¹, Лицевич А.Р.¹, Чернышенко Е. Р.¹

¹ Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия; tazhogina@sfedu.ru

Аннотация

Гены антибиотикорезистентности (АРГ) являются новыми поллютантами, а донные отложения озер были признаны важным резервуаром и горячей точкой распространения АРГ. Присутствующие в донных отложениях озер АРГ могут попадать в вышележащие воды и проникать в грунтовые воды из-за изменений окружающей среды и внешних воздействий. В данной работе были изучены десять АРГ, включая гены устойчивости к макролидам (*ermB* и *mphA*), сульфониламидам (*sul2*), тетрациклину (*tetO*), карбапенемам (*blaVIM*), ванкомицину (*vanA*, *vanB*), аминогликозидам (*aadA2*), метициллину (*mecA*), цефалоспорином и монобактамам (*blaCTX-M*), интегроны классов 1-3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*) и бактериоценоз донных отложений оз. Маныч-Гудило. Было отмечено наличие всех 10 исследованных АРГ, а также интегронов двух классов (*intI1* и *intI3*). Количество копий АРГ в донных отложениях можно расположить в следующем порядке по убыванию: *blaCTX-M* > *sul2* > *aadA2* > *blaVIM* > *vanB* > *tetO* > *ermB* > *vanA* > *mphA* > *mecA*. На уровне родов преобладали *Streptococcus* (8,55 %), неопределенный род семейства *Rhodobacteraceae* (6,25 %), неопределенный род порядка *Bacteroidales* (5,03 %). Доминирующими типами являлись *Proteobacteria* (38,80 %), *Bacteroidetes* (19,75 %) и *Firmicutes* (11,85 %). С использованием функциональной аннотации прокариотических таксонов (FAPROTAX) было определено наличие 41 функциональной группы. Большая доля таксонов относилась к таким функциональным группам, как хемогетеротрофы, аэробные хемогетеротрофы, а также группы, принимающие участие в цикле серы.

Ключевые слова: гены антибиотикорезистентности; бактериоценоз; донные отложения; Маныч-Гудило; FAPROTAX; функциональные группы.

Antibiotic resistance genes and bacteriocenosis of Manych-Gudilo Lake bottom sediments

Azhogina T.N.^{1*}, Voropina D.S.¹, Khmelevtsova L.E.¹, Litsevich A.L.¹, Chernyshenko E.R.¹

¹ *Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia; tazhogina@sfedu.ru*

Abstract

Antibiotic resistance genes (ARGs) are emerging pollutants, and lake sediments have been recognized as an important reservoir and hotspot for ARGs spread. ARGs present in lake sediments may enter overlying waters and infiltrate groundwaters due to environmental changes and external influences. In this study, ten ARGs were studied, including resistance genes to macrolides (*ermB* and *mphA*), sulfonamides (*sul2*), tetracycline (*tetO*), carbapenems (*blaVIM*), vancomycin (*vanA*, *vanB*), aminoglycosides (*aadA2*), methicillin (*mecA*), cephalosporins and monobactams (*blaCTX-M*), integrons of classes 1-3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*) and bacteriocenosis of bottom sediments of Lake Manych-Gudilo. Presence of all 10 investigated ARGs, as well as integrons of two classes (*intI1* and *intI3*) was noted. The number of ARG copies in bottom sediments can be arranged in the following descending order: *blaCTX-M* > *sul2* > *aadA2* > *blaVIM* > *vanB* > *tetO* > *ermB* > *vanA* > *mphA* > *mecA*. At the genus level, *Streptococcus* (8.55%), an unspecified genus of the family Rhodobacteraceae (6.25%), and an unspecified genus of the order Bacteroidales (5.03%) prevailed. The dominant phyla were Proteobacteria (38.80%), Bacteroidetes (19.75%), and Firmicutes (11.85%). Using the functional annotation of prokaryotic taxa (FAPROTAX), the presence of 41 functional groups was determined. A larger proportion of taxa belonged to functional groups such as chemoheterotrophs, aerobic chemoheterotrophs, and groups involved in the sulfur cycle.

Keywords: antibiotic resistance genes; bacteriocenosis; bottom sediments; Manych-Gudilo; FAPROTAX; functional groups.

ВВЕДЕНИЕ

Гены устойчивости к антибиотикам (АРГ) рассматриваются как новый вид загрязнения и привлекают всё большее внимание в связи с их широким присутствием в окружающей среде (Wang и др., 2017). Потенциальными резервуарами антибиотикорезистентных бактерий и генов устойчивости к антибиотикам являются водные экосистемы (Bhattacharya и др., 2019). Недавние исследования показывают, что факторы окружающей среды оказывают комплексное влияние на распространение АРГ (Wang и др., 2018). Известно, что некоторые химические соединения (например, антибиотики, тяжелые металлы) могут обеспечивать постоянную коселекцию резистентности к антибиотикам (An и др., 2018). Многие гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные в патогенных бактериях, эволюционировали или переносятся из микробных сообществ окружающей среды, что указывает на необходимость определения резервуаров устойчивости к антибиотикам в окружающей среде (Mafiz и др., 2018).

АРГ, присутствующие в донных отложениях озер, могут попадать в вышележащие воды и проникать в грунтовые воды из-за изменений окружающей среды и внешних воздействий (например, ветра, волн и дноуглубительных работ) (Brown и др., 2020). Антропогенное воздействие и животноводство может оказывать значительное влияние на распространение АРГ в донных отложениях озер (Shi и др., 2024). Таким образом, донные отложения озер были признаны важным резервуаром и горячей точкой распространения АРГ (Deng и др., 2020; Zhang и др., 2022).

Установлено, что изменения в структуре микробных сообществ и активности окислительно-восстановительных ферментов донных отложений являются индикаторами поступления в водоем природных и техногенных загрязнений (Чухлебова, 2008). На микробные сообщества водных объектов могут влиять микропластик (Maisto и др., 2024), полиароматические углеводороды (ПАУ) (Lin и др., 2023), тяжелые металлы (Pan и др., 2022; Wang и др., 2021). Очистные сооружения могут значительно изменить структуру микробного сообщества донных отложений водохранилищ (Xie и др., 2021).

Микробные сообщества с разными функциями участвуют в различных процессах цикла C, N и S, что может в определенной степени поддерживать стабильность экосистемы (Liang и др., 2020). Разнообразие и состав микробных сообществ напрямую связаны с их функциями (Legrand и др., 2018). Функциональная аннотация таксонов

прокариот (FAPROTAX) представляет собой базу данных, созданную на основе литературы о культивируемых штаммах микробов и содержащую программное обеспечение, которое преобразует идентифицированные профили таксонов в образцах в предполагаемые функциональные группы (Louca, Parfrey, Doebeli, 2016). Следовательно, эта база данных позволяет напрямую связать микробные таксоны и прогнозируемые функции. FAPROTAX считается подходящим инструментом для оценки биогеохимических циклов различных проб окружающей среды (Louca, Parfrey, Doebeli, 2016; Sansupa и др., 2021).

Озеро Маныч-Гудило расположено на границе Калмыкии, Ростовской области и Ставропольского края. От состояния этого озера зависят благополучие и развитие многих регионов Российской Федерации (Доценко, Зеленко, Кознеделева, 2016). Антропогенные факторы негативно влияют на экосистему озера Маныч-Гудило. Причиной загрязнения воды озера Маныч-Гудило является сброс сточных вод с полей орошения, расположенных по берегам озера, и частично природно-почвенным происхождением.

Таким образом, целью данной работы было изучить гены антибиотикорезистентности, состав микробного сообщества и функциональные группы бактериоценозов донных отложений оз. Маныч-Гудило (Россия).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования были отобраны донные отложения озера Маныч-Гудило. Водная система озера Маныч-Гудило расположена в зоне резко континентального климата с суточными и годовыми колебаниями температуры воздуха. Осадки выпадают преимущественно в виде кратковременных ливней, но в водной системе усваивается лишь незначительная их доля, потому что большая часть воды стекает в пониженные места.

Отбор проб. Отбор проб донных отложений был проведен в июне 2022 года в прибрежной линии с глубины 20 см в 3 повторностях. После отбора донные отложения были перемешаны для получения интегральной пробы. В течение суток пробы были доставлены в лабораторию на холоде и заморожены для дальнейшего анализа.

Выделение тотальной ДНК из донных отложений. Тотальную метагеномную ДНК выделяли из почвы с помощью набора FastDNA для почвы (MP Biomedicals, США) согласно инструкции производителя. Гомогенизацию проводили с использованием мельницы Mixer Mills MM400 («Retsch», Германия) в течение 8 минут при частоте 30 Гц.

Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Выделенную тотальную ДНК хранили при температуре -20 °С перед последующей количественной ПЦР (кПЦР). Все образцы ДНК разводили до концентрации 5 нг/мкл, с целью уменьшения ингибирования амплификации.

ПЦР-амплификация АРГ. Количественная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл, содержащем 1× реакционной смеси с красителем EVA Green (Синтол, Россия), 0,2 мкМ каждого праймера и 20 нг исследуемой ДНК. Были исследованы десять АРГ, включая гены устойчивости к макролидам (*ermB* и *mphA*), сульфониламидам (*sul2*), тетрациклину (*tetO*), карбапенемам (*blaVIM*), ванкомицину (*vanA*, *vanB*), аминогликозидам (*aadA2*), метициллину (*mecA*), цефалоспорином и монобактамам (*blaCTX-M*), интегроны классов 1-3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*). Нуклеотидные последовательности праймеров и условия ПЦР приведены в таблице 1. ПЦР-амплификацию проводили с использованием амплификатора QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и условия ПЦР.

Название гена	Последовательность нуклеотидов, 5'-3'	Количество нуклеотидов, п.н.	Условия ПЦР	Ссылка
Консервативный регион гена 16S рРНК	f: GTGSTGCA YGGYTGTCGTCA r: ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	146	95°C - 3 мин 35 циклов: 95°C - 15 с 60°C - 30 с 72°C - 30 с	(Rodriguez-Mozaz и др., 2015)
<i>bla-VIM</i>	f: ACTGTCGGATACTCACCACTC r: GTTATGGAGCAGCAACGATGT	189	95°C - 3 мин 40 циклов: 94°C - 15 с 57°C - 15 с 72°C - 30 с	(Tan и др., 2018)
<i>vanB</i>	f: AGACATTCCGGTCGAGGAAC r: GCTGTCAATTAGTGCGGGAA	220	94°C - 3 мин 35 циклов: 94°C - 60 с 56,5°C - 60 с 72°C - 60 с	(Akanbi и др., 2017)
<i>ermB</i>	f: GCATTTAACGACGAAACTGGCT r: TGGTGAATTAAAGTGACACGAATGT	123	95°C - 3 мин 40 циклов: 95°C - 15 с	(Azhogina и др., 2022)

			58°C – 30 с 72°C – 30 с	
<i>tetO</i>	f: ATGGCATAACAGGCACAGACC r: GGATGCTGCCCAACCTTTTG	178	95°C - 3 мин 35	
<i>sul2</i>	f: TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG r: CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	191	циклов: 95°C – 30 с 58°C – 40 с 72°C – 30 с	(Wang и др., 2018)
<i>mphA</i>	f: AGTTCGTGGTGAACGACAAG r: AGTCGATCATCCCGCTGAC	153	95°C – 3 мин 35 циклов: 94°C – 60 с 58°C – 60 с 72°C – 45с	(Szczepanowski и др., 2009)
<i>aadA2</i>	f: TAAGACGGGCTGATACTGG r: CATAGCGTTGCCTTGGTAG	251	95°C – 3 мин 40 циклов: 95°C – 10 с 53°C – 30 с 72°C – 30 с	(Wang и др., 2017)
<i>mecA</i>	f: GTGAAGATATACCAAGTGATT r: ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	147	95°C – 3 мин 40 циклов:	(Azhogina и др., 2022)
<i>blaCTX-M</i>	f: ACCAACGATATCGCGGTGAT r: ACATCGCGACGGCTTTCT	101	95°C – 15 с 58°C – 30 с 72°C – 30 с	(Guo и др., 2018)
<i>vanA</i>	f: CATGGCAAGTCAGGTGAAGA r: CCACCGGCCTATCATCTTT	187		(Lekunberri и др., 2017)
<i>intI1</i>	f: GCCTTGATGTTACCCGAGAG r: GATCGGTCGAATGCGTGT	196	95°C - 3 мин	(Quintela-Baluja и др., 2021)
<i>intI2</i>	f: TGCTTTTCCCACCCTTACC r: GACGGCTACCCTCTGTTATCTC	195	35 циклов: 95°C – 15 с	
<i>intI3</i>	f: GCCACCACTTGTTTGAGGA r: GGATGTCTGTGCCTGCTTG	138	60°C – 30 с 72°C – 30 с	

Для нормализации количества АРГ в каждом образце также определяли количество генов 16S рРНК. Для расчета числа копий АРГ и гена 16S рРНК использовали калибровочную кривую, полученную с использованием 10-кратных серийных разведений (10^2 - 10^8 копий) стандартной плазмиды, содержащей продукт амплификации для каждой пары праймеров соответственно. Все кПЦР были выполнены в трех повторностях. Значения эффективности амплификации (E) находились в диапазоне 93–110 %. Чтобы свести к минимуму различия, связанные с аналитической эффективностью, дифференциальной экстракцией и вариациями фоновых локальных количеств

бактериальных генов, в этой работе количество АРГ выражалось как отношение количества копий АРГ к содержанию копий гена 16S рРНК.

Метагеномный анализ генов 16S рРНК. Библиотеки секвенирования гена 16S рРНК были созданы в соответствии с Протоколом подготовки библиотеки метагеномного секвенирования генов 16S рРНК. Амплификацию региона V3-V4 гена 16S рРНК проводили с использованием прокариотических праймеров: прямой – TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTACGGGNGGCWGCAG; обратный – GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC (Khmelevtsova и др., 2023) с последующей индексацией ампликонов. Последовательности анализировали методом секвенирования нового поколения с использованием системы MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в режиме 2 × 300 п.н.

Определение структуры бактериального сообщества и прогнозирование функциональных групп микробов по прокариотическим таксонам (FAPROTAX)

Считывания обрабатывались и анализировались с помощью программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 (<http://qiime.org/>) (Caporaso и др., 2010). После качественной фильтрации, удаления химер и этапов разрежения последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с порогом сходства последовательностей 97 %. Была использована база данных GreenGenes 13.8 (DeSantis и др., 2006). Чтобы охарактеризовать богатство и выравненность бактериального сообщества, были рассчитаны индексы Чоу1, Шеннона и Симпсона. Прогнозирование функциональных групп микробов по прокариотическим таксонам (FAPROTAX) использовалось для прогнозирования метаболических функций в бактериальном сообществе донных отложений (Louca, Parfrey, Doebeli, 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

АРГ и интегроны

Были исследованы десять АРГ, включая гены устойчивости к макролидам (*ermB* и *tphA*), сульфониламидам (*sul2*), тетрациклину (*tetO*), карбапенемам (*blaVIM*), ванкомицину (*vanA*, *vanB*), аминогликозидам (*aadA2*), метициллину (*mecA*),

цефалоспорином и монобактамам (*bla*CTX-M), интегроны классов 1-3 (*intI1*, *intI2*, *intI3*). Данные АРГ были выбраны, поскольку они являются клинически значимыми и часто определяемыми в природных экосистемах. В донных отложениях оз. Маныч-Гудило были обнаружены все 10 исследуемых АРГ.

В наибольшем количестве был обнаружен ген *bla*CTX-M ($5,15 \times 10^{-4}$ копий / копию гена 16S рРНК), а в наименьшем – *tesA* ($3,56 \times 10^{-7}$ копий / копию гена 16S рРНК). Оба гена отвечают за устойчивость к цефалоспорином. За счет гидролиза β -лактамного кольца продукты генов *bla* обеспечивают устойчивость к антибиотикам. Причины изменчивости и обилия генов *bla* в донных отложениях озер весьма сложны. Chen с соавт. (2018). показали, что преобладание генов *bla* в донных отложениях озер, вероятно, связано либо с использованием антибиотиков, либо с горизонтальным переносом генов от местного бактериального сообщества в донных отложениях.

Ген *sul2*, отвечающий за устойчивость к сульфониламидам, был обнаружен в количестве $3,76 \times 10^{-4}$ копий / копию гена 16S рРНК. Достаточно большое количество генов *sul2* может быть связано с их включением в различные носители, такие как интегроны, что облегчает их распространение (Chen и др., 2018).

Количество гена *aadA2*, отвечающего за устойчивость к аминогликозидам, составило $2,76 \times 10^{-4}$ копий / копию гена 16S рРНК. В меньшем количестве были обнаружены гены, обеспечивающие устойчивость к макролидам: *ermB* $1,35 \times 10^{-5}$ и *mphA* – $1,87 \times 10^{-6}$ копий / копию гена 16S рРНК и карбапенемам: *bla*VIM $9,83 \times 10^{-5}$ копий / копию гена 16S рРНК.

Количество АРГ, отвечающего за устойчивость к тетрациклинам – *tetO*, составило $6,72 \times 10^{-5}$ копий / копию гена 16S рРНК. Обилие *tet*-генов, вероятно, связано со стрессами, вызванными различными химическими агентами. Такие химические агенты, как антибиотики, могут оказывать давление на бактериальное сообщество, что в итоге может вызвать отбор этих генов устойчивости (Zhang и др., 2019).

Количество АРГ, отвечающих за устойчивость к гликопептидам, составило: *vanA* – $2,08 \times 10^{-6}$, *vanB* – $7,77 \times 10^{-5}$ копий / копию гена 16S рРНК.

В целом, количество АРГ в донных отложениях можно расположить в следующем порядке убывания: *bla*CTX-M > *sul2* > *aadA2* > *bla*VIM > *vanB* > *tetO* > *ermB* > *vanA* > *mphA* > *tesA*.

АРГ обычно связаны с мобильными генетическими элементами (например, плазмидами, транспозонами, интегронами), которые способствуют горизонтальному

переносу генов. В связи с этим представляло интерес исследовать наличие 3 классов интегронов – *intI1*, *intI2*, *intI3*. В донных отложениях оз. Маныч-Гудило были обнаружены интегроны 1 и 3 классов ($1,71 \times 10^{-5}$ и $4,57 \times 10^{-5}$ копий / копию гена 16S рРНК, соответственно). В настоящее время наблюдается преобладающая роль мобильных генетических элементов в распространении АРГ, среди которых в озерах чаще всего преобладают интегроны класса 1 (Ohore и др., 2019; Tong и др., 2020). Так, в работе Shi и др. (2024) показано широкое распространение гена *intI1*, а также то, что в генной кассете, наряду с самой интегразой, обнаруживался ген устойчивости к аминогликозидам (*aadA2*). Исследование донных отложений оз. Маныч-Гудило показало присутствие этих двух генов.

Одним из важных векторов для передачи АРГ у различных бактерий является продукт гена *intI1*, который часто обнаруживается в окружающей среде (Yang и др., 2018). Однако о распространенности генов *intI2* и *intI3* известно гораздо меньше. В основном кассеты генов, кодирующие устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, переносятся интегронами, и располагаются либо на хромосоме, либо на плазмидах, что способствует горизонтальному переносу АРГ широкому спектру патогенных бактерий (Gillings и др., 2008). Более того, сообщалось, что разнообразие и распространенность АРГ значительно коррелируют с содержанием интегронов в образцах окружающей среды (Yang и др., 2017a; Yang и др., 2017b).

Таксономический состав, разнообразие бактериоценоза и функциональные группы бактерий

Для определения разнообразия и состава микробного сообщества в донных отложениях оз. Маныч-Гудило было использовано высокопроизводительное секвенирование. После сборки и фильтрации было получено в 2534 ОТЕ. Индексы α -разнообразия были следующими: Chao1 2534, индекс Шеннона 9,43, Симпсона 0,99.

На рисунке 1 представлена структура микробного сообщества на уровне родов, семейств и типов.

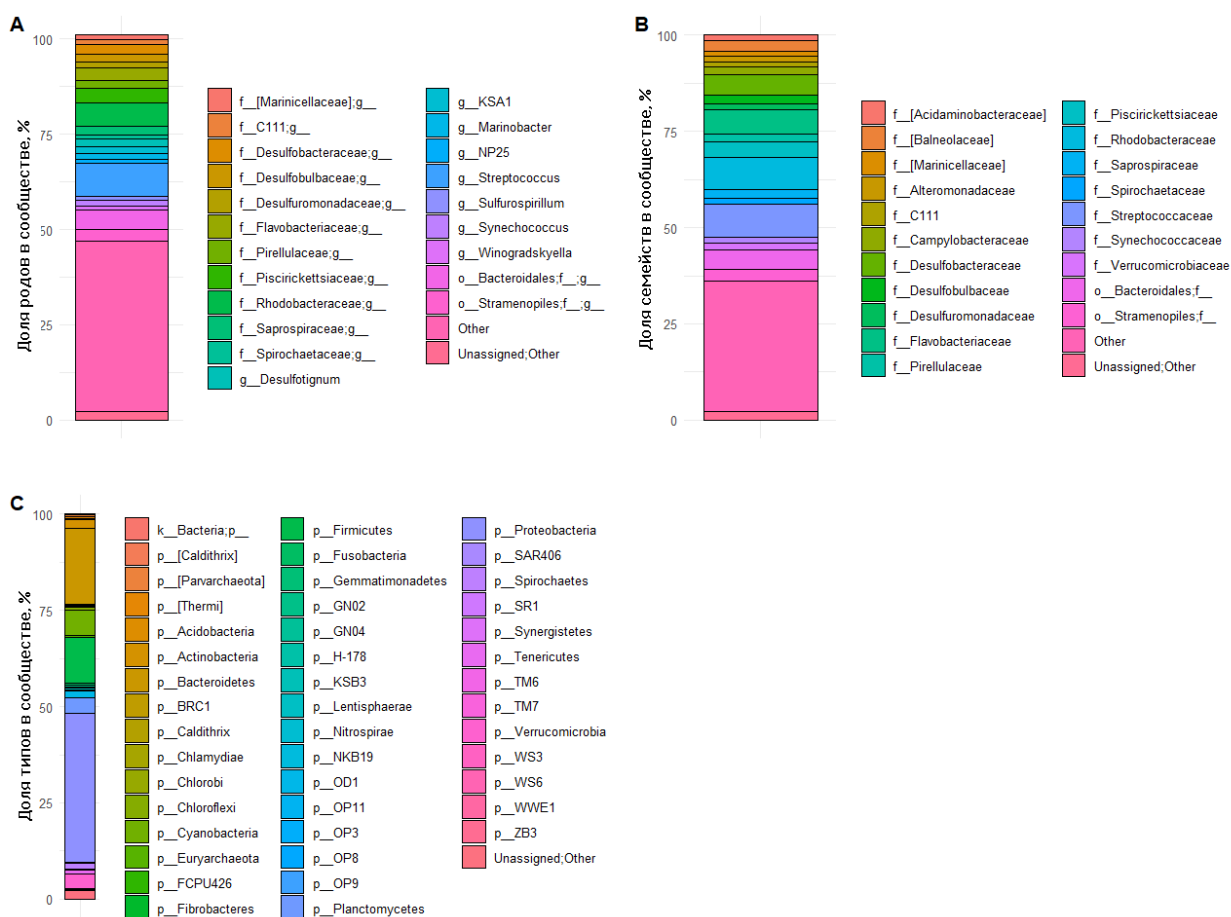


Рис. 1. Структура бактериального сообщества донных отложений оз. Маныч-Гудило на уровне родов (A), семейств (B), типов (C).

Всего зарегистрировано 423 рода бактерий, из них 23 рода были представлены в количестве более 1 %. На уровне родов преобладали *Streptococcus* (8,55 %), неклассифицированные представители семейства *Rhodobacteraceae* (6,25 %), неклассифицированные представители порядка *Bacteroidales* (5,03 %).

Было обнаружено 285 семейств. Число семейств, на каждое из которых пришлось более 1 % микробного сообщества, составило 22. На уровне семейств доминирующими являлись *Streptococcaceae* (8,55 %), *Rhodobacteraceae* (8,45 %), *Flavobacteriaceae* (6,30 %), *Desulfobacteraceae* (5,46 %).

Всего зарегистрировано 46 типов. Доминирующими типами являлись *Proteobacteria* (38,80 %), *Bacteroidetes* (19,75 %) и *Firmicutes* (11,85 %). В несколько меньшем количестве были обнаружены типы *Cyanobacteria* (6,56 %), *Planctomycetes* (4,01 %), *Verrucomicrobia*

(3,62 %) и Actinobacteria (2,36 %), что согласуется с работами других авторов. В работе Wang и соавт. (2024) были исследованы 4 озера, расположенные в среднем течении р. Янцзы. Авторами также было установлено, что доминировали типы Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes.

Известно, что представители типа Verrucomicrobia способны к деструкции органических полимеров, и способны выживать в более широком диапазоне условий окружающей среды, чем считалось ранее. Представители некоторых родов типа Firmicutes способны к биоконтролю патогенов. Представители Bacteroidetes были идентифицированы как одни из основных деструкторов органических загрязнителей, эффективно метаболизирующих органические полимеры, в особенности полисахариды и белки (Kirchman, 2002). Микроорганизмы, относящиеся к данному типу, являются одними из наиболее распространенных групп водных гетеротрофных бактерий (Bosshard и др., 2000; Zwart и др., 1998).

Протеобактерии - эволюционно, геологически и экологически важная группа микроорганизмов. Протеобактерии часто встречаются в экстремальных местах обитания. Возможно, обилие бактерий типа Proteobacteria в оз. Маныч-Гудило можно объяснить их хемоавтотрофией, т. е. способностью получать энергию для обеспечения жизненных функций из неорганических химических веществ. К протеобактериям относятся дельтапротеобактерии, которые являются хемоорганотрофными микроорганизмами, среди которых есть сульфат- и сероредуцирующие бактерии, активность которых связана с циклом серы (Marín, 2015). В связи с этим представляло интерес исследовать функциональные особенности прокариот оз. Маныч-Гудило. С этой целью была использована база данных FAPROTAX. Это база данных, разработанная Louca и др. в 2016 году, предназначена для функциональной аннотации таксонов прокариот. На ее основе можно классифицировать прокариотические микроорганизмы и анализировать функции микробного сообщества. Основанная на современной литературе, база данных FAPROTAX в первую очередь нацелена на определение функций культивируемых бактерий в океанах и озерах. Особое внимание уделяется круговороту серы, углерода, водорода и азота (Louca, Parfrey, Doebeli, 2016).

Использование FAPROTAX позволило обнаружить 41 функциональную группу микроорганизмов (рисунок 2). Больше всего ОТЕ было отмечено в группах хемогетеротрофов; аэробных хемогетеротрофов; ферментирующих бактерий; бактерий, использующих серное дыхание и сульфатное дыхание.

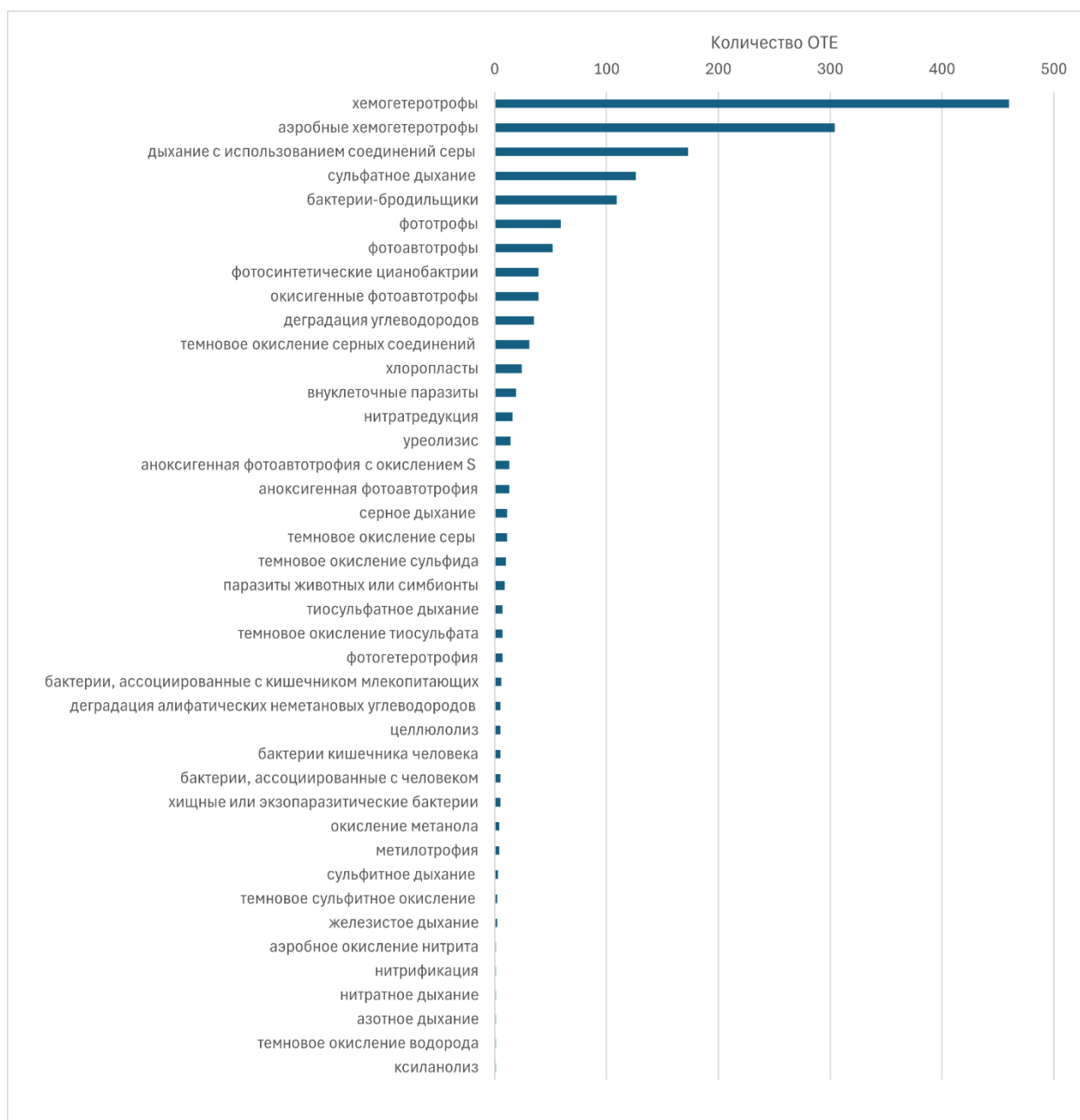


Рис. 2. Метаболический потенциал сообщества микроорганизмов донных отложений оз. Маныч-Гудило, полученный с помощью анализа FAPROTAX.

К хемотрофам были отнесены 460 ОТЕ, в том числе следующие семейства: *Acidaminobacteraceae*, *Marinicellaceae*, *Acholeplasmataceae*, *Alcanivoracaceae*, *Alteromonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Caldilineaceae*, *Clostridiaceae*, *Cryomorphaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Desulfuromonadaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Flammeovirgaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*,

Fusobacteriaceae, Hahellaceae, Halanaerobiaceae, Halobacteriaceae, Halobacteroidaceae, Halomonadaceae, HTCC2188, Hyphomicrobiaceae, Idiomarinaceae, Lachnospiraceae, Leptotrichiaceae, Micrococcaceae, Nitriliruptoraceae, Oceanospirillaceae, Oleiphilaceae, OM60, Opitutaceae, Peptostreptococcaceae, Piscirickettsiaceae, Porphyromonadaceae, Psychromonadaceae, Puniceicoccaceae, Rhodobacteraceae, Ruminococcaceae, Saccharospirillaceae, Saprospiraceae, Sphingomonadaceae, Spirochaetaceae, Streptococcaceae, Verrucomicrobiaceae, Vibrionaceae.

Следует отметить широкую представленность функциональных групп прокариот, участвующих в цикле серы: сульфатное дыхание (126 ОТЕ), серное дыхание (11 ОТЕ), темновое сульфитное окисление (2 ОТЕ), сульфитное дыхание (3 ОТЕ), тиосульфатное дыхание (7 ОТЕ), дыхание с использованием соединений серы (173 ОТЕ), темновое окисление сульфида (10 ОТЕ), темновое окисление серы (11 ОТЕ), темновое окисление тиосульфата (7 ОТЕ), темновое окисление серных соединений (31 ОТЕ), аноксигенная фотоавтотрофия с окислением S (13 ОТЕ). К данным функциональным группам относились такие семейства, как *Acidaminobacteraceae, Campylobacteraceae, Chromatiaceae, Clostridiaceae, Desulfarculaceae, Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae, Desulfohalobiaceae, Desulfomicrobiaceae, Desulfovibrionaceae, Desulfuromonadaceae, Ectothiorhodospiraceae, Halothiobacillaceae, Helicobacteraceae, Piscirickettsiaceae, Rhodobacteraceae, Syntrophaceae, Thiotrichaceae.*

Цикл серы интегрирует и связывает между собой различные компоненты экосистемы (почву, горные породы, отложения, водную фазу и атмосферу). Сера присутствует в виде органической серы (в аминокислотах, коферментах и т. д.) и неорганической серы: сульфидов (S^{2-}), элементарной серы (S^0), сульфатов (S^{6+}) и ряда промежуточных веществ, имеющих незначительное экологическое значение. Сульфат (SO_4^{2-}) является основной биодоступной формой серы в природе. В анаэробных условиях, преимущественно в донных отложениях, серо- и сульфатредуцирующие бактерии восстанавливают серу и сульфаты соответственно до сероводорода (Zhang и др., 2024).

Среди таксонов, участвующих в цикле азота можно выделить следующие семейства: *Thermodesulfovibrionaceae, Desulfovibrionaceae, Hahellaceae, Halobacteriaceae, Opitutaceae, Vibrionaceae*, принимающие участие в процессах нитритного дыхания (1 ОТЕ), нитратредукции (16 ОТЕ), нитратного дыхания (1 ОТЕ), азотного дыхания (1 ОТЕ), нитрификации (1 ОТЕ).

Также были обнаружены семейство *Alcanivoracaceae*, принимающее участие в деградации алифатических неметановых углеводородов (5 ОТЕ) и семейства *Alteromonadaceae* и *Halomonadaceae*, участвующие в деградации углеводородов (35 ОТЕ).

В работе Zhang и др. было установлено, что метаболизм углеводов является ключевым связующим фактором для сопряжения циклов N и S в донных отложениях эвтрофных озер (Zhang и др., 2024). Сульфиды и органические соединения углерода являются обычными донорами электронов, тогда как кислород, сульфат, NO_3^- и NO_2^- являются основными акцепторами электронов в отложениях (Lin и др., 2019; Vandieken, Finke, Thamdrup, 2014). Как правило, микробы не являются независимыми в природных экосистемах, они всегда взаимодействуют и сочетаются с различными биогеохимическими процессами, такими как циклы C, N, P и S. Следовательно, понимание сложной взаимосвязи между круговоротом N и S имеет важное значение для выяснения происходящих динамических процессов в экосистемах (Li и др., 2021).

Ряд функциональных групп был представлен единичными ОТЕ: паразиты животных или симбионты - 9 ОТЕ; по 7 ОТЕ - тиосульфатное дыхание, темновое окисление тиосульфата, фотогетеротрофия; 6 ОТЕ - бактерии, ассоциированные с кишечником млекопитающих; по 5 ОТЕ - деградация алифатических неметановых углеводородов, целлюлолиз, бактерии кишечника человека, бактерии, ассоциированные с человеком, хищные или экзопаразитические; по 4 ОТЕ - окисление метанола, метилотрофия; 3 ОТЕ - сульфитное дыхание; по 2 ОТЕ - темновое сульфитное окисление и железистое дыхание; по 1 ОТЕ - аэробное окисление нитрита, нитрификация, нитратное дыхание, азотное дыхание, темновое окисление водорода, ксиланолиз.

Бактерии-потенциальные хозяева АРГ

В работе Wang и соавт. (2024) было показано, что основными хозяевами АРГ в донных отложениях озер являлись Proteobacteria, составлявшие 18,5 % от общей численности. В работе Wanyan отмечено, что Bacteroidetes и Proteobacteria имели сильную положительную корреляцию с *aadA* и *tnpA*. Таким образом, Bacteroidetes и Proteobacteria могли быть основными бактериальными группами, ответственными за распространение АРГ (Wanyan и др., 2023). Chen и соавт. установили, что Proteobacteria доминировали в донных отложениях (Chen и др., 2020), и многие рода, принадлежащие к Proteobacteria, были антибиотикоустойчивыми бактериями, несущими множество АРГ (Vasiliadou и др.,

2018), которые способствовали доминированию этих бактерий в речных микробных сообществах (Zhang и др., 2021).

Chen и соавт. установили, что Bacteroidetes и Firmicutes были потенциальными хозяевами таких АРГ, как *bla*TEM, *tetC*, *sul1*, и *intI1* в донных отложениях Восточно-Китайского моря (Chen и др., 2023). В исследовании Feng и соавт. установлено, что Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Planctomycetes и Cyanobacteria имели значительную корреляцию с множеством типов и подтипов АРГ в марикультурных донных отложениях. В нашем исследовании бактерии именно этих типов и такие АРГ, как *bla*CTX-M, *sul2*, *aadA2* и *bla*VIM доминировали в донных отложениях оз. Маньч-Гудило.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании были обнаружены 10 генов антибиотикорезистентности, включая гены устойчивости к макролидам (*ermB* и *mphA*), сульфониламидам (*sul2*), тетрациклину (*tetO*), карбапенемам (*bla*VIM), ванкомицину (*vanA*, *vanB*), аминогликозидам (*aadA2*), метициллину (*mecA*), цефалоспорином и монобактамам (*bla*CTX-M) и интегроны двух классов (*intI1* и *intI3*) в донных отложениях оз. Маньч-Гудило, Россия. На уровне родов преобладали *Streptococcus* (8,55 %), неклассифицированные представители семейства *Rhodobacteraceae* (6,25 %), неклассифицированные представители порядка Bacteroidales (5,03 %). Доминирующими типами являлись Proteobacteria (38,80 %), Bacteroidetes (19,75 %) и Firmicutes (11,85 %). С использованием FAPROTAX была обнаружена 41 функциональная группа бактерий. Наибольшая представленность наблюдалась в группах хемогетеротрофов, аэробных хемогетеротрофов, ферментирующих бактерий, а также бактерий, использующих серное и сульфатное дыхание.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Финансирование работы - работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2024-0026.

Соблюдение этических стандартов - настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Конфликт интересов – авторы отрицают наличие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА:

- Доценко В., Зеленко Г., Кознеделева Т. Экологические проблемы озера Маныч-Гудило // Сохранение биологического разнообразия - основа устойчивого развития. Грозный: Грозный: Чеченский государственный педагогический университет, 2016. С. 132–135.
- Чухлебова Л. Влияние крупных притоков на структуру и активность бактериобентосных сообществ реки Амур // Влияние Крупных Притоков На Структуру И Активность Бактериобентосных Сообществ Реки Амур. 2008. № 6. С. 85–89.
- Akanbi O.E., Njom H.A., Fri J., Otigbu A.C., Clarke A.M. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Recreational Waters and Beach Sand in Eastern Cape Province of South Africa // *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. 2017. V. 14. № 9. P. 1001.
- An X.-L., Su J.-Q., Li B., Ouyang W.-Y., Zhao Y., Chn Q.-L., Cui L., Chen H., Cillings M., Zhang T., Zhu Y.-G. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR // *Environ. Int.* 2018.
- Azhogina T., Sazykina M., Konstantinova E., Khmelevtsova L., Minkina T., Antonenko E., Sushkova S., Khammami M., Mandzhieva S., Sazykin I. Azhogina T. et al. Bioaccessible PAH influence on distribution of antibiotic resistance genes and soil toxicity of different types of land use // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022. V. 30. № 5. P. 12695–12713.
- Bhattacharyya A., Haldar A., Bhattacharyya M., Ghosh A. Anthropogenic influence shapes the distribution of antibiotic resistant bacteria (ARB) in the sediment of Sundarban estuary in India // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 647. P. 1626–1639.
- Bosshard P.P., Santini Y., Grater D., Stettler R., Bachofen R. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. V. 31. № 2. P. 173–182.
- Brown P.C., Borowska E., Peschke R., Schwartz T., Horn H. Decay of elevated antibiotic resistance genes in natural river sediments after sedimentation of wastewater particles // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 705. P. 135861.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F., Costello E., Fierer N., Peña A., Goodrich J., Gordon J., Huttley G., Kelley S., Knights D., Koenig J., Ley R., Lozupone C., McDonald D., Muegge B., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J., Turnbaugh P., Walters W., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 5. P. 335–336.

- Chen H., Liu S., Xu X.-R., Diao Z.-H., Sun K.-F., Hao Q.-W., Liu S.-S., Ying G.-G. Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area // *J. Hazard. Mater.* 2018. V. 343. P. 140–148.
- Chen H., Li Y., Sun W., Song L., Zuo R., Teng Y. Characterization and source identification of antibiotic resistance genes in the sediments of an interconnected river-lake system // *Environ. Int.* 2020. V. 137. P. 105538.
- Chen H., Zheng M., Mu H., Kuang S., Zhang S., Liu S. Spatial distribution of antibiotic resistance genes in marine sediments of east China seas // *J. Hazard. Mater. Adv.* 2023. V. 11. P. 100363.
- Deng C., Liu X., Li L., Shi J., Guo W., Xue J. Temporal dynamics of antibiotic resistant genes and their association with the bacterial community in a water-sediment mesocosm under selection by 14 antibiotics // *Environ. Int.* 2020. V. 137. P. 105554.
- DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. № 7. P. 5069–5072.
- Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A., Krishnan S., Holley M., Stokes H.W. The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 14. P. 5095–5100.
- Guo X., Yan Z., Zhang Y., Xu W., Kong D., Shan Z., Wang N. Behavior of antibiotic resistance genes under extremely high-level antibiotic selection pressures in pharmaceutical wastewater treatment plants // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 612. P. 119–128.
- Khmelevtsova L., Konstantinova E., Karchava S., Klimova M., Azhogina T., Polienko E., Khammami M., Sazykin I., Sazykina M. Influence of Pesticides and Mineral Fertilizers on the Bacterial Community of Arable Soils under Pea and Chickpea Crops // *Agronomy.* 2023. V. 13. № 3. P. 750.
- Kirchman D. L. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002. V. 39. № 2. P. 91–100.
- Legrand F., Picot A., Cobo-Díaz J.F., Carof M., Chen W., Le Floch G. Effect of tillage and static abiotic soil properties on microbial diversity // *Appl. Soil Ecol.* 2018. V. 132. P. 135–145.
- Lekunberri I., Villagrasa M., Balcázar J.L., Borrego C.M. Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 601–602. P. 206–209.

- Li Y., Zhang M., Xu R., Lin H., Sun X., Xu F., Gao P., Kong T., Ziao E., Yang N., Sun W. Arsenic and antimony co-contamination influences on soil microbial community composition and functions: Relevance to arsenic resistance and carbon, nitrogen, and sulfur cycling // *Environ. Int.* 2021. V. 153. P. 106522.
- Liang S., Deng J., Jiang Y., Wu S., Zhou Y., Zhu W. Functional Distribution of Bacterial Community under Different Land Use Patterns Based on FaProTax Function Prediction // *Pol. J. Environ. Stud.* 2020. V. 29. № 2. P. 1245–1261.
- Lin W., Fan F., Xu G., Gong K., Cheng X., Yuan X., Zhang C., Gao Y., Wan S., Ng H.Y., Dong Y. Microbial community assembly responses to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination across water and sediment habitats in the Pearl River Estuary // *J. Hazard. Mater.* 2023. V. 457. P. 131762.
- Lin X., Hetharua B., Lin L., Xu H., Zheng T., He Z., Tian Y. Mangrove Sediment Microbiome: Adaptive Microbial Assemblages and Their Routed Biogeochemical Processes in Yunxiao Mangrove National Nature Reserve, China // *Microb. Ecol.* 2019. V. 78. № 1. P. 57–69.
- Louca S., Parfrey L. W., Doebeli M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome // *Science.* 2016. V. 353. № 6305. P. 1272–1277.
- Mafiz A.I., Perera L.N., He Y., Zhang W., Xiao S., Hao W., Sun S., Zhou K., Zhang Y. Case study on the soil antibiotic resistome in an urban community garden // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018. V. 52. № 2. P. 241–250.
- Maisto M., Ranauda M., Zuzolo D., Tartaglia M., Postiglione A., Prigioniero A., Falzarano A., Scarano P., Castelvetro V., Corti A., Modugno F., La Nasa J., Biale G., Sciarrillo R., Guarino C. Effects of microplastics on microbial community dynamics in sediments from the Volturno River ecosystem, Italy // *Eff. Microplastics Microb. Community Dyn. Sediments Volturno River Ecosyst. Italy.* 2024. V. 349. P. 140872.
- Marín I. Proteobacteria // *Encyclopedia of Astrobiology* / под ред. M. Gargaud и др. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. P. 2036–2037.
- Ohore O.E., Addo F.G., Zhang S., Han N., Anim-Larbi K. Distribution and relationship between antimicrobial resistance genes and heavy metals in surface sediments of Taihu Lake, China // *J. Environ. Sci.* 2019. V. 77. P. 323–335.
- Pan Y., Xie J., Yan W., Zhang T.C., Chen C. Response of microbial community to different land-use types, nutrients and heavy metals in urban river sediment // *J. Environ. Manage.* 2022. V. 321. P. 115855.

- Quintela-Baluja M., Frigon D., Abouelnaga M., Jobling K., Romalde J.L., Gomez Lopez M., Graham D.W. Dynamics of integron structures across a wastewater network – Implications to resistance gene transfer // *Water Res.* 2021. V. 206. P. 117720.
- Rodriguez-Mozaz S., Chamorro S., Marti E., Huerta B., Gros M., Sánchez-Melsió A., Borrego C.M., Barceló D., Balcázar J.L. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river // *Water Res.* 2015. V. 69. P. 234–242.
- Sansupa C., Wahdan S.F.M., Hossen S., Disayathanoowat T., Wubet T., Purahong W. Can We Use Functional Annotation of Prokaryotic Taxa (FAPROTAX) to Assign the Ecological Functions of Soil Bacteria? // *Appl. Sci.* 2021. V. 11. № 2. P. 688.
- Shi X., Shen Z., Shao B., Shen J., Wu Y., Wang S. Antibiotic resistance genes profile in the surface sediments of typical aquaculture areas across 15 major lakes in China // *Environ. Pollut.* 2024. V. 347. P. 123709.
- Szczepanowski R., Linke B., Krahn I., Gartemann K.-H., Gützkow T., Eichler W., Pühler A., Schlüter A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics // *Microbiology.* 2009. V. 155. № 7. P. 2306–2319.
- Tan L., Li L., Ashbolt N., Wang X., Cui Y., Zhu X., Xu Y., Yang Y., Mao D., Luo Y. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 621. P. 1176–1184.
- Tong L., Qin L., Guan C., Wilson M.E., Li X., Cheng D., Ma J., Liu H., Gong F. Antibiotic resistance gene profiling in response to antibiotic usage and environmental factors in the surface water and groundwater of Honghu Lake, China // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020. V. 27. № 25. P. 31995–32005.
- Vandieken V., Finke N., Thamdrup B. Hydrogen, acetate, and lactate as electron donors for microbial manganese reduction in a manganese-rich coastal marine sediment // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014. V. 87. № 3. P. 733–745.
- Vasiliadou I.A., Molina R., Martinez F., Melero J.A., Stathopoulou P.M., Tsiamis G. Toxicity assessment of pharmaceutical compounds on mixed culture from activated sludge using respirometric technique: The role of microbial community structure // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 630. P. 809–819.

- Wang C., Mao Y., Zhang L., Wei H., Wang Z. Insight into environmental adaptability of antibiotic resistome from surface water to deep sediments in anthropogenic lakes by metagenomics // *Water Res.* 2024. V. 256. P. 121583.
- Wang F., Dong W., Zhao Z., Wang H., Li W., Chen G., Wang F., Zhao Y., Huang J., Zhou T. Heavy metal pollution in urban river sediment of different urban functional areas and its influence on microbial community structure // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 778. P. 146383.
- Wang J., Wang J., Zhao Z., Chen J., Lu H., Liu G., Zhou J., Guan X. PAHs accelerate the propagation of antibiotic resistance genes in coastal water microbial community // *Environ. Pollut.* 2017. V. 231. P. 1145–1152.
- Wang M., Liu P., Xiong W., Zhou Q., Wangxiao J., Zeng Z., Sun Y. Fate of potential indicator antimicrobial resistance genes (ARGs) and bacterial community diversity in simulated manure-soil microcosms // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 147. P. 817–823.
- Wanyan R., Pan M., Mai Z., Xiong Z., Wang S., Han Q., Yu Q., Wang G., Wu S., Li H. Fate of high-risk antibiotic resistance genes in large-scale aquaculture sediments: Geographical differentiation and corresponding drivers // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 905. P. 167068.
- Xie E., Zhao X., Li K., Zhang P., Zhou X., Zhao X. Microbial community structure in the river sediments from upstream of Guanting Reservoir: Potential impacts of reclaimed water recharge // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 766. P. 142609.
- Yang Y., Liu W., Xu C., Wei B., Wang J. Antibiotic resistance genes in lakes from middle and lower reaches of the Yangtze River, China: Effect of land use and sediment characteristics // *Chemosphere.* 2017a. V. 178. P. 19–25.
- Yang Y., Xu C., Cao X., Lin H., Wang J. Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact // *Ecotoxicology.* 2017b. V. 26. № 6. P. 831–840.
- Yang Y., Song W., Lin H., Wang W., Du L., Xing W. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis // *Environ. Int.* 2018. V. 116. P. 60–73.
- Zhang D., Liu F., Al M.A., Yang Y., Yu H., Li M., Wu K., Niu M., Wang C., He Z., Yan Q. Nitrogen and sulfur cycling and their coupling mechanisms in eutrophic lake sediment microbiomes // *Sci. Total Environ.* 2024. V. 928. P. 172518.
- Zhang L., Zhang C., Lian K., Ke D., Xie T., Liu C. River restoration changes distributions of antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial community // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 788. P. 147873.

Zhang L., Ji L., Liu X., Zhu X., Ning K., Wang Z. 2022. Linkage and driving mechanisms of antibiotic resistome in surface and ground water: Their responses to land use and seasonal variation // *Water Res.* 2022. V. 215. P. 118279.

Zhang M.-Q., Yuan L., Li Z.-H., Zhang H.-C., Sheng G.-P. Tetracycline exposure shifted microbial communities and enriched antibiotic resistance genes in the aerobic granular sludge // *Environ. Int.* 2019. V. 130. P. 104902.

Zwart G., Hiorns W.D., Methé B.A., Van Agterveld M.P., Huisman R., Nold S.C., Zehr J.P., Laanbroek H.J. Nearly Identical 16S rRNA Sequences Recovered from Lakes in North America and Europe Indicate the Existence of Clades of Globally Distributed Freshwater Bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* 1998. V. 21. № 4. P. 546–556.

Статья поступила в редакцию 5 ноября 2024 г.

Поступила после доработки 14 ноября 2024 г.

Принята к печати 1 декабря 2024 г.

Received 5, November, 2024

Revised 14, November, 2024

Accepted 1, December, 2024