

## Роль очистных сооружений сточных вод в распространении генов резистентности к антибиотикам

© 2020. И. С. Сазыкин, к. б. н., в. н. с., Т. Н. Ажогина, м. н. с.,  
Л. Е. Хмелевцова, к. б. н., с. н. с., М. И. Хаммами, м. н. с.,  
М. А. Сазыкина, д. б. н., в. н. с.,  
Южный федеральный университет,  
344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194/2,  
e-mail: issa@sfedu.ru, tazhogina@sfedu.ru, lehmelevcova@sfedu.ru,  
mars@sfedu.ru, samara@sfedu.ru

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам в настоящее время является одной из актуальнейших проблем здравоохранения. Неоправданно широкое и слабо контролируемое применение антибиотиков приводит к взрывообразному росту количества резистентных штаммов бактерий и распространению генов резистентности к антибиотикам (АРГ). Установлено, что очистные сооружения являются «горячими точками» распространения нового вида загрязнений окружающей среды – АРГ. В данном обзоре обобщена информация о роли очистных сооружений в распространении генетических детерминант устойчивости к антибиотикам и проанализированы условия, благоприятствующие диссеминации резистентности. Подробно рассмотрены такие стрессорные факторы, как воздействие тяжёлых металлов и сублетальных доз антибиотиков. Показана роль мобильных элементов бактериального генома, таких как транспозоны и плазмиды, и бактериофагов в поддержании и распространении генетических детерминант устойчивости к антибиотикам в бактериальных популяциях очистных сооружений. Рассмотрено взаимодействие различных стрессорных воздействий, а также мобильных элементов генома и бактериофагов в процессе горизонтального переноса генетического материала. Оценена роль очистных сооружений, связанных со здравоохранением, и возможности дезинфекции в снижении уровня поступления в окружающую среду генов резистентности и бактерий, обладающих лекарственной устойчивостью.

**Ключевые слова:** устойчивость к антибиотикам, антибиотикорезистентные бактерии, очистные сооружения, городские сточные воды, горизонтальный перенос генов.

## Role of wastewater treatment plants in distribution of antibiotic resistance genes

© 2020. I. S. Sazykin ORCID: 0000-0002-0864-1473, T. N. Azhogina ORCID: 0000-0003-0274-783X  
L. E. Khmelevtsova ORCID: 0000-0003-0781-2207, M. I. Khammami ORCID: 0000-0002-8438-9150  
M. A. Sazykina ORCID: 0000-0001-6974-3361  
Southern Federal University,  
194/2, Stachki Prospekt, Rostov-on-Don, Russia, 344090,  
e-mail: issa@sfedu.ru, tazhogina@sfedu.ru, lehmelevcova@sfedu.ru,  
mars@sfedu.ru, samara@sfedu.ru

The resistance of microorganisms to antibiotics is currently one of the most relevant health problems. The unreasonably wide and poorly controlled use of antibiotics leads to an explosive increase in the number of resistant bacteria strains and the distribution of antibiotic resistance genes (ARGs). It is established that wastewater treatment plants (WWTPs) are hot spots of the distribution of a new type of environmental pollution, i. e. ARG. The information on the role of WWTPs in distribution of genetic determinants of resistance to antibiotics is summarized and the conditions facilitating resistance dissemination are analyzed in the review. Such stressors as influence of heavy metals and sublethal doses of antibiotics are described in detail. The role of mobile elements of bacterial genome, such as transposons and plasmids, and bacteriophages in maintenance and distribution of genetic determinants of antibiotic resistance in WWTPs bacterial populations is shown. Interaction of various stressors and also mobile elements of the genome and bacteriophages in the process of horizontal transfer of genetic material is considered. The role of WWTPs associated with healthcare and possibilities of disinfection for reducing the inflow of resistance genes and drug resistant bacteria into the environment is estimated.

**Keywords:** antibiotic resistance, antibiotic resistant bacteria, wastewater treatment plants, city sewage, horizontal transfer of genes.

Устойчивость к противомикробным препаратам является серьёзной проблемой общественного здравоохранения во всём мире. Широкое и всё более растущее использование антибиотиков и других противомикробных препаратов в медицине, ветеринарии, животноводстве, растениеводстве и в быту расширило разнообразие и распространение антибиотикорезистентных бактерий (АРБ) и генов резистентности к антибиотикам (АРГ) [1].

Чем больше антибиотиков используется для лечения или профилактики заболеваний, тем выше вероятность возникновения резистентных штаммов, и тем менее эффективными они станут со временем. Кроме того, риски для здравоохранения значительно возрастают, когда бактерии приобретают множественную устойчивость к антибиотикам, что делает лечение таких инфекций особенно затруднительным.

Гены резистентности к антибиотикам были обнаружены в различных нишах окружающей среды (ОС), включая почвы, озёра, реки, стоки очистных сооружений, донные отложения. В результате деятельности человека, включая повседневную жизнь, медицинское обслуживание и сельское хозяйство, образуются отходы, которые содержат различные уровни антибиотиков и их метаболитов, АРБ и АРГ. При попадании ОС, АРБ и АРГ представляют потенциальную опасность для здоровья людей и животных [2]. Они могут сохраняться в ОС, распространяться по суше и воде, и передаваться с помощью диких животных [3, 4].

Гены резистентности к антибиотикам обладают способностью распространяться среди бактерий. Наличие всего одной бактериальной клетки с генетическим изменением, которое придаёт устойчивость к антибиотику, является достаточным, чтобы в результате её последующей пролиферации появились резистентные бактерии, несущие АРГ, которые могут также передаваться между бактериальными клетками посредством горизонтального переноса генов (ГПГ) [2, 5]. Механизмы ГПГ включают в себя трансформацию (поглощение бактериальной клеткой ДНК из ОС); конъюгативную передачу мобильных генетических элементов, таких как плазмиды, транспозоны, интегроны, генные кассеты; и трансдукцию чужеродных генетических элементов бактериофагами [6]. Некоторые из этих механизмов могут передавать несколько АРГ одновременно.

В настоящее время АРГ считаются новым классом загрязнителей ОС [7]. Анализ поч-

венных образцов за последние 70 лет показал, что базальные уровни АРГ увеличиваются параллельно с современным массовым производством антибиотиков [8, 9]. Роль антропогенной активности в распространённости АРБ и АРГ привела к введению термина «экологическая устойчивость к антибиотикам» [10].

### Очистные сооружения сточных вод – «горячие точки» распространения АРГ

Муниципальные очистные сооружения сточных вод (ОССВ) играют ключевую роль в защите ОС, в частности, природных водоёмов. Удаление органических веществ, химических загрязнителей и нежелательных микроорганизмов (МО) из сточных вод с помощью сочетания физико-химических и биологических методов обработки стало крупным технологическим достижением прошлого века. Тем не менее, конечные стоки далеки от стерильности и поставляют в ОССВ большое количество бактерий. Многие из этих бактерий содержат приобретённые АРГ и являются потенциальными носителями, способствующими распространению этих генов в микробиоме ОССВ [11, 12]. Одновременное присутствие на ОССВ АРБ, остаточных количеств антибиотиков и других селективных факторов, богатого запаса питательных веществ и возможность тесного межклеточного взаимодействия способствуют горизонтальному переносу АРГ. Это делает очистные сооружения одной из самых важных экологических ниш, влияющих на судьбу АРБ и АРГ.

Муниципальные очистные сооружения являются одним из наиболее важных источников поступления АРГ в ОС из-за высокой плотности клеток и загрязнения как антибиотиками, так и резистентными бактериями [13, 14]. Так, например, была проведена оценка содержания АРГ и транспозаз на городских очистных сооружениях в течение четырёх разных сезонов [15]. В сточных водах были обнаружены все исследуемые транспозазы и две трети анализируемых АРГ. Полученные результаты подтвердили ожидаемое более высокое относительное содержание большинства генов в поступающих канализационных водах и относительно более низкое содержание в сточных водах. Однако некоторые из генов, участвующих в ГПГ, такие как ген транспозазы типа *tn25* и клинические интегроны класса 1, в сточных водах содержались в большем количестве. Недавняя работа китайских исследователей показала, что различные АРГ

удаляются при обработке стоков с разной эффективностью [16]. Так, гены резистентности к тетрациклину эффективно элиминировались, в то время как *sulI*, который был самым многочисленным АРГ во входящих стоках, практически не был удалён при обработке стоков на очистных сооружениях.

Другое подобное исследование было направлено на определение сезонных моделей численности АРГ [17]. Образцы отбирались в течение двух лет из канализационной системы и очистных сооружений в г. Дрездене (Германия). Более высокое содержание АРГ было обнаружено осенью и зимой, что соответствовало более высоким показателям назначения антибиотиков врачами в эти сезоны.

В другом исследовании пробы воды ОССВ в пяти штатах Индии были оценены на предмет распределения АРГ среди *Escherichia coli*, устойчивых к цефалоспоринолу, и/или резистентных к расширенному спектру карбапенемов [18]. Было обнаружено, что 169 из 446 (37,9%) случайно выбранных изолятов *E. coli* устойчивы к расширенному спектру цефалоспоринов и/или карбапенемов. Было показано, что более половины из 169 изолятов устойчивы и к другим противомикробным препаратам.

Помимо легко метаболизируемого органического вещества, сточные воды содержат вещества-стрессоры, например, тяжёлые металлы (ТМ) и стойкие природные или синтетические соединения, включая остаточные количества антибиотиков и их метаболиты. Эти стрессоры могут формировать бактериальное сообщество из выживших МО, толерантных к таким неблагоприятным воздействиям [19]. Кроме того, стрессоры в сочетании с высокой питательной нагрузкой, стабильным рН, температурой, непосредственной близостью клеток во флокулах, могут способствовать горизонтальному переносу генетических элементов, кодирующих устойчивость к антибиотикам [20, 21]. В целом, условия, существующие в резервуарах биологической очистки, могут привести к росту бактериальной популяции, способной переносить неблагоприятные условия, включая антибиотики.

### Влияние антибиотиков

Уровни антибиотиков, обнаруженные в бытовых сточных водах, варьируют от нанogramмов до сотен микрограммов в 1 литре [22, 23]. Однако традиционные установки биологической очистки, в которых используются

плотно агломерированные бактерии (хлопья активного ила или биоплёнки), изначально не были предназначены для снижения количества антибиотиков [22]. Наблюдаемое снижение содержания некоторых антибиотиков при очистке сточных вод в большей степени свидетельствует об их исчезновении благодаря биоадсорбции, а не об их биологическом разложении [24]. Это происходит потому, что бактерии конкурируют за быстрое поглощение органических веществ из сточных вод, а затем проводят более медленную метаболическую ассимиляцию [25]. Однако не все антибиотики сорбируются в фазу активного ила. В отличие от сорбирующихся тетрациклинов, сульфаметоксазол подвергается биотрансформации преимущественно в жидкой фазе, а сульфаметазин, офлоксацин и кларитромицин обнаруживали в очищенных стоках в значительной степени в неизменном виде [16].

Часть этих клеток циклически возвращается в биологический резервуар, что позволяет обогащать осадок клетками, высоко адаптированными к условиям, преобладающим в ОССВ, включая присутствие широкого спектра стрессоров. Следовательно, вторичные стоки могут допускать сброс до  $10^{12}$  АРБ/сут или  $10^{18}$  АРГ/сут [19]. В этом контексте время пребывания АРБ в реакторе может быть критическим фактором, определяющим вероятность их размножения или участия в событиях ГПГ. Можно утверждать, что рециркуляция биомассы между различными резервуарами способствует обогащению осадка АРБ и АРГ.

Анализ распределения антибиотиков [26] показал, что в среднем 70% тетрациклина, поступающего на бытовые очистные сооружения, попадает в фазу активного ила. Для фторхинолонов (норфлоксацина и ципрофлоксацина) эта величина может возрасти до 80% [27].

Согласно [28], добавление плазмид удвоило скорость поглощения АРГ из внеклеточного матрикса в условиях стресса, вызванного присутствием антибиотиков (канамицин; 20 мг/л), по сравнению с опытом без внесения канамицина. Однако, в тех же условиях, в которых антибиотик создавал стресс, но без добавления плазмид, переноса АРГ не наблюдалось. Отмечалось, что скорость переноса плазмиды pV10 в микробиоту активного ила может быть значительно увеличена в присутствии от 10 до 100 частей на миллиард тетрациклина или сульфаметоксазола [21]. Аналогичные результаты были получены для тетрациклина (10 мкг/л), хлоргексидина

(24,4 мкг/л), триклозана (100 мкг/л), гентамицина (100 мкг/л) и сульфаметоксазола (1000 мкг/л) [29].

Показано, что бактерии в иле из бытовых очистных сооружений проявляют пониженную восприимчивость к антибиотикам, и в то же время в системе было обнаружено 140 клинически важных АРГ, расположенных на мобильных генетических элементах (МГЭ) [30]. Плазмиды играют крайне важную роль в распространении АРГ [31], в том числе, облегчая перенос интегративных и конъюгативных МГЭ [32].

Эти наблюдения показывают, что для быстрого распространения АРГ посредством естественной трансформации бактериальных клеток требуется не только внеклеточная ДНК, но и достаточное количество МГЭ, и присутствие антибиотиков, которые создают селективное давление. Биоадсорбция антибиотиков хлопьями ила обеспечивает эти две предпосылки.

### Влияние тяжёлых металлов

Тяжёлые металлы оказывают относительно сильное селективное давление на бактерии. Встречаемость *int1*, АРГ и генов устойчивости к ТМ на муниципальных очистных сооружениях показана в работе [33]. Относительное содержание шести АРГ (*tetA*, *sulI*, *blaTEM*, *blaCTXM*, *ermB* и *qnrS*), двух генов устойчивости к ТМ (*czcA* и *arsB*) и гена *int1* было изучено в пробах воды с трёх разных станций очистки сточных вод. Содержание генов *sulI*, генов устойчивости к ТМ и *int1* сильно коррелировало между собой.

Механизмы резистентности, индуцированные металлами, сгруппированы в три класса [34]. Первый механизм представляет собой устойчивость к перекрёстному отбору, когда один ген кодирует устойчивость как к антибиотикам, так и к металлам. Второй механизм – это устойчивость к совместному отбору, когда АРГ и металлорезистентные гены (МРГ) кодируют устойчивость к антибиотикам и металлам, соответственно; но физически они расположены близко (обычно в МГЭ, например, в плаزمиде). Третий механизм – ко-регуляторная устойчивость, когда генетическая транскрипция объединяет устойчивость к металлам и антибиотикам, которая проявляется как неселективный, активный отток ингибирующих токсикантов, независимо от воздействия металлов или антибиотиков. Среди этих механизмов устойчивости,

в системах биологической очистки чаще всего наблюдался совместный отбор устойчивости к антибиотикам и металлам, вероятно, из-за высокого содержания МГЭ [33].

Показано, что множественная лекарственная устойчивость чаще всего встречается в сочетании с резистентностью к металлам (25% всех образцов) [35]. Метагеномный анализ показал, что эффлюксные насосы, обеспечивающие мультирезистентность к металлам и антибиотикам, являются преобладающим механизмом (50–80% типов резистентности) в местах хранения и переработки бытовых отходов и в системах биологической очистки [36].

### Роль бактериофагов в распространении АРГ

В очистных сооружениях значительная часть бактериальной популяции постоянно уничтожается бактериофагами. Высокие скорости их размножения (около  $1 \cdot 10^{25}$  в секунду) значительно облегчают мультипликацию и приобретение генетических элементов другими бактериальными клетками посредством трансдукции [37]. Во время трансдукции фрагменты ДНК от инфицированного донора могут быть случайно загружены в фаг и затем перенесены в клетку реципиента. Агрегированная биомасса в системах обработки отходов густо заселена фагами [38]. Фаги часто заражают доминирующие штаммы бактерий в системах обработки отходов [39], где бактерии могут извлечь выгоду из приобретения АРГ и затем стать основными видами.

Важно отметить, что широко используемые технологии дезинфекции, включая УФ-облучение и хлорирование, не оказывают существенного влияния на инактивацию фаговых фракций АРГ [38, 40]. Показано, что АРГ (*blaTEM*, *blaCTX-M* и *sulI*) могут сохраняться дольше, когда они находятся в фагах, чем в бактериальной фракции [40]. Это говорит о том, что активное размножение бактериофагов в АРГ-несущих бактериях увеличивает время удерживания АРГ в системах обработки отходов. АРГ-содержащие фаги будут выбрасываться в ОС вместе с очищенными сточными водами, где они могут повторно инфицировать бактериальные популяции, не содержащие АРГ [41].

В результате функционирования вышеизложенных механизмов распространения детерминант лекарственной устойчивости, на выходе из очистных сооружений в сбрасываемых сточных водах и активном иле со-

держание АРБ и АРГ может в значительной степени варьировать.

Так, например, оценено высвобождение бактерий и АРГ в сточных водах и активном иле пяти очистных сооружений в штате Мичиган (США) [42]. После обработки диапазон концентраций АРГ в конечных очищенных стоках варьировал от необнаруживаемых до  $10^6$  геномных копий на 100 мл. Концентрации АРБ также варьировали в пределах от  $10^2$  до  $10^5$  КОЕ на 100 мл. В иле уровни АРГ варьировали от  $10^6$  до  $10^9$  геномных копий на 1 г. Для соответствующих АРБ количество варьировало от  $3,2 \cdot 10^4$  до  $1,9 \cdot 10^9$  КОЕ/г. Устойчивость к антибиотикам в очищенных сточных водах отмечалась также в работах [43, 44].

### Очистные сооружения, ассоциированные со здравоохранением

Сточные воды больниц также несут потенциальный риск для здоровья населения и экологической безопасности [45]. Из-за широкого использования антибиотиков в больницах они могут представлять значительный риск в отношении распространения АРГ. Остатки антибиотиков, а также АРБ и АРГ обнаруживаются в сточных водах больниц и способствуют их распространению [46].

Так, устойчивые энтерококки были обнаружены в сточных водах больниц в концентрациях порядка  $10^3$  КОЕ/мл [47]. Задokumentирована стойкая к противомикробным препаратам *E. coli* в сточных водах больниц на уровне  $10^5$  КОЕ/100 мл [48]. В больничных сточных водах в Турции обнаружены бактериальные изоляты с множественной устойчивостью к антибиотикам, включая ципрофлоксацин, триметоприм и цефтазидим [49]. Анализ устойчивых к ципрофлоксацину бактерий в сточных водах одной из больниц во Франции показал, что преобладающей группой были  $\gamma$ -протеобактерии [50]. В том случае, если больничные стоки попадают в очистные сооружения, они могут увеличить общее количество АРБ и АРГ в сточных водах, и, соответственно, в ОС.

Метагеномный подход был использован для исследования АРГ в иле из установок станций очистки фармацевтических сточных вод [51]. Результаты показали, что содержание АРГ в иле из фармацевтической очистной установки ( $54,7\text{--}585$  млн<sup>-1</sup>) было выше, чем в сточных водах ( $27,2\text{--}86,4$  млн<sup>-1</sup>).

В ОССВ со стадией дезинфекции клетки сталкиваются со стрессовыми условиями,

вызванными процессом дезинфекции перед выбросом в ОС. Дезинфекция способствует удалению АРБ и АРГ [19]. При использовании дезинфекции погибает значительная часть клеток, в том числе АРБ, в то время как некоторая их часть под воздействием стресса переходит в состояние покоя. После снятия воздействия, вызывающего стресс, такие бактериальные клетки способны восстанавливаться, например, из-за разбавления конечного стока в принимающем водоёме или хранилище воды [52]. Некоторые дезинфицирующие средства, такие как перуксусная кислота или хлор, оказывают избирательное воздействие на АРГ [20]. Этот избирательный эффект означает, что даже если наблюдается уменьшение численности АРГ (копий гена/1 мл образца), относительная численность или распространённость гена (копий гена на общее количество бактерий) может увеличиться. Тем не менее, дезинфекцию следует использовать, в частности, для критических стоков, сбрасываемых больницами [12]. Даже при увеличении распространённости АРБ и АРГ после дезинфекции, она может привести к сокращению количества бактерий на 2–4 порядка [12]. В недавно опубликованном исследовании показано, что при очистке стоков в мембранном биореакторе можно достичь степени элиминации АРГ аналогичной дезинфекции, даже в присутствии антибиотиков [53].

### Заключение

Бытовые стоки являются горячими точками распространения АРГ. При их обработке традиционно используются микробные сообщества с большой плотностью клеток, которые способствуют распространению в них АРГ, и усугубляют проблемы лекарственной устойчивости в ОССВ, в которую поступают стоки.

В данном обзоре подчёркивается, что распространение АРГ не является случайным процессом, а требует селективного давления (металлов и антибиотиков) и наличия мобильных генетических элементов (например, плазмид). Очистные сооружения обеспечивают оба этих фактора.

Проанализирована возможность распространения АРГ бактериофагами. Количественное влияние бактериофагов на распространение АРГ ещё предстоит изучить.

Очевидно, что технологии очистки сточных вод, массово применяемые сегодня, не обеспечивают приемлемого уровня элиминации АРГ и АРБ. Генетические детерминанты

резистентности обнаруживаются после процесса обработки, при сбросе стоков в местах, расположенных ниже по течению от ОССВ. Нет сомнений в том, что увеличение АРБ и АРГ является глобальным кризисом в области здравоохранения, и что необходимо понимание и контроль путей их распространения. Роль природной среды в динамике АРГ и АРБ представляет собой в значительной степени мало исследованную область, вызывающую большой интерес, и имеющую большое практическое значение.

Необходимо расширять исследования в данной сфере. Это особенно актуально для России, ввиду практически полного отсутствия работ подобной направленности. В таких исследованиях необходимо использовать методологию, учитывающую сложность, присутствующую экологическим системам, подверженным постоянным изменениям.

*Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (грант № 6.2379.2017/ПЧ), Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-00787 А), гранта Президента Российской Федерации (грант № НШ 3464.2018.11).*

### References

1. Meek R.W., Vyas H., Piddock L.J.V. Nonmedical uses of antibiotics: time to restrict their use? // PLoS Biology. 2015. V. 13. Article No. e1002266. doi: 10.1371/journal.pbio.1002266
2. Ashbol N.J., Amezcua A., Backhaus T., Borriello P., Brandt K.K., Collignon P., Coors A., Finley R., Gaze W.H., Heberer T., Lawrence J.R., Larsson D.G., McEwen S.A., Ryan J.J., Schonfeld J., Silley P., Snape J.R., Van Den Eede C., Topp E. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance // Environmental Health Perspectives. 2013. V. 121. P. 993–1001. doi: 10.1289/ehp.1206316
3. Berendonk T.U., Manaia C.M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., Burgmann H., Sorum H., Norstrom M., Pons M., Kreuzinger N., Huovinen P., Stefani S., Schwartz T., Kisand V., Baquero F., Martinez J.L. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 13 (5). P. 310–317. doi: 10.1038/nrmicro3439
4. Vittecoq M., Godreuil S., Prugnotte F., Durand P., Brazier L., Renaud N., Arnal A., Aberkane S., Jean Pierre H., Gauthier Clerc M. Review: antimicrobial resistance in wildlife // Journal of Applied Ecology. 2016. V. 53. P. 519–529. doi: 10.1111/1365-2664.12596
5. Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics // Infection Ecology & Epidemiology. 2015. V. 5. Article No. 28564. doi: 10.3402/iee.v5.28564
6. Nwosu V.C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms // Res. Microbiol. 2001. V. 152. P. 421–430. doi: 10.1016/S0923-2508(01)01215-3
7. Hsu C., Hsu B., Ji W., Chen J., Hsu T., Ji D., Tseng S., Chiu Y., Kao P., Huang Y. Antibiotic resistance pattern and gene expression of nontyphoid Salmonella in riversheds // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. P. 7843–7850. doi: 10.1007/s11356-014-4033-y
8. Graham D.W., Knapp C.W., Christensen B.T., McCluskey S., Dolfing J. Appearance of beta-lactam resistance genes in agricultural soils and clinical isolates over the 20(th) century // Sci Rep. 2016. V. 6. No. 1. Article No. 21550. doi: 10.1038/srep21550
9. Knapp C.W., Dolfing J., Ehlert P.A., Graham D.W. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940 // Environ Sci Technol. 2010. V. 44. No. 2. P. 580–587. doi: 10.1021/es901221x
10. Gaze W.H., Krone S.M., Joakim Larsson D.G., Li X.Z., Robinson J.A., Simonet P., Smalla K., Timinouni M., Topp E., Wellington E.M., Wright G.D., Zhu Y.G. Influence of humans on evaluation and mobilization of environmental antibiotic resistome // Emerging Infect. Dis. 2013. V. 19. No. 7. Article No. e120871. doi: 10.3201/eid1907.120871
11. Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M.C., Michael I., Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review // Sci Total Env. 2013. V. 447. P. 345–360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
12. Manaia C.M. Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk // Trends Microbiol. 2017. V. 25. No. 3. P. 173–181. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.014
13. Ferro G., Guarino F., Castiglione S., Rizzo L. Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process // Sci. Total Environ. 2016. V. 560–561. P. 29–35. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.047
14. Nikitina A.A., Kalininskiy V.B., Darmov I.V. The study of antibiotic resistance of bacteria isolated from wastewater in Kirov // Dezinfektsiya. Antiseptika. 2015. V. 6. No. 1 (21). P. 36–43 (in Russian).
15. Karkman A., Johnson T.A., Lyra C., Stedtfeld R.D., Tamminen M., Tiedje J.M., Virta M. Highthroughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. No. 3. Article No. fiw014. doi: 10.1093/femsec/fiw014
16. Liu H., Zhou X., Huang H., Zhang J. Prevalence of antibiotic resistance genes and their association with antibiotics in a wastewater treatment plant: process distribution and analysis // Water. 2019. V. 11 (12). Article No. 2495. doi: 10.3390/w11122495

17. Caucci S., Karkman A., Cacace D., Rybicki M., Timpel P., Voolaid V., Gurke R., Virta M., Berendonk T.U. Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. Article No. fiw014. doi: 10.1093/femsec/fiw014
18. Akiba M., Sekizuka T., Yamashita A., Kuroda M., Fujii Y., Murata M., Lee K., Joshua D.I., Balakrishna K., Bairy I., Subramanian K., Krishnan P., Munuswamy N., Sinha R.K., Iwata T., Kusumoto M., Guruge K.S. Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants among extended-spectrum-cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant *Escherichia coli* Isolates from rivers and sewage treatment plants in India // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. No. 5. P. 2972–2980. doi: 10.1128/AAC.01950-15
19. Manaia C.M., Macedo G., Fatta-Kassinos D., Nunes O.C. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 1543–1557. doi: 10.1007/s00253-015-7202-0
20. Di Cesare A., Fontaneto D., Doppelbauer J., Corno G. Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments // *Environ. Sci. Technol.* 2016. V. 50. P. 10153–10161. doi: 10.1021/acs.est.6b02268
21. Kim S., Yun Z., Ha U.H., Lee S., Park H., Kwon E.E., Cho Y., Choung S., Oh J., Medriano C.A., Chandran K. Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations // *Sci. Total Environ.* 2014. V. 468–469. P. 813–820. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.100
22. Marx C., Gunther N., Schubert S., Oertel R., Ahnert M., Krebs P., Kuehn V. Mass flow of antibiotics in a wastewater treatment plant focusing on removal variations due to operational parameters // *Sci Total Environ.* 2015. V. 538. P. 779–788. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.112
23. Kulkarni P., Olson N.D., Raspanti G.A., Goldstein R.E.R., Gibbs S.G., Sapkota A., Sapkota A.R. Antibiotic concentrations decrease during wastewater treatment but persist at low levels in reclaimed water // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2017. V. 14. Article No. E668. doi: 10.3390/ijerph14060668
24. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the Environment: sources, fate, effects and risks*, 3rd edn. Springer-Verlag Berlin: Heidelberg, 2008. 521 p.
25. Chua H., Hua F.L. Effects of a heavy metal (zinc) on organic adsorption capacity and organic removal in activated sludge // *Appl Biochem Biotechnol.* 1996. V. 57. No. 8. P. 845–849. doi: 10.1007/BF02941764
26. Zhou L.J., Ying G.G., Liu S., Zhao J.L., Yang B., Chen Z.F., Lai H.J. Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China // *Sci Total Environ.* 2013. V. 452–453. P. 365–376. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.010
27. Lindberg R.H., Olofsson U., Rendahl P., Johansson M.I., Tysklind M., Andersson B.A.V. Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge // *Environ Sci Technol.* 2006. V. 40. No. 3. P. 1042–1048. doi: 10.1021/es0516211
28. Mao D., Luo Y., Mathieu J., Wang Q., Feng L., Mu Q., Feng C., Alvarez P.J. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation // *Environ Sci Technol.* 2014. V. 48. No. 1. P. 74–78. doi: 10.1021/es404280v
29. Jutkina J., Marathe N.P., Flach C.F., Larsson D.G.J. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations // *Sci. Total Environ.* 2018. V. 616–617. P. 172–178. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.312
30. Szczepanowski R., Linke B., Krahn I., Gartemann K.H., Gutzkow T., Eichler W., Puhler A., Schluter 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 (Pt. 7). P. 2306–2319. doi: 10.1099/mic.0.028233-0
31. Li Q., Chang W., Zhang H., Hu D., Wang X. The role of plasmids in the multiple antibiotic resistance transfer in ESBLs-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater treatment plants // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Article No. 633. doi: 10.3389/fmicb.2019.00633
32. Che Y., Xia Y., Liu L., Li A.D., Yang Y., Zhang T. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing // *Microbiome.* 2019. V. 7 (1). Article No. 44. doi: 10.1186/s40168-019-0663-0
33. Di Cesare A., Eckert E.M., D'Urso S., Bertoni R., Gillan D.C., Wattiez R., Corno G. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants // *Water Res.* 2016. V. 94. P. 208–214. doi: 10.1016/j.watres.2016.02.049
34. Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V. Coselection of antibiotic and metal resistance // *Trends Microbiol.* 2006. V. 14. No. 4. P. 176–182. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006
35. Li L.G., Xia Y., Zhang T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection // *ISME J.* 2017. V. 11. No. 3. P. 651–662. doi: 10.1038/ismej.2016.155
36. Christgen B., Yang Y., Ahammad S.Z., Li B., Rodriguez D.C., Zhang T., Graham D.W. Metagenomics shows that low-energy anaerobic-aerobic treatment reactors reduce antibiotic resistance gene levels from domestic wastewater // *Environ Sci Technol.* 2015. V. 49. No. 4. P. 2577–2584. doi: 10.1021/es505521w
37. Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.L., Brüßow H. Phage as agents of lateral gene transfer // *Curr Opin Microbiol.* 2003. V. 6. No. 4. P. 417–424. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00086-9

38. Colomer-Lluch M., Calero-Caceres W., Jebri S., Hmaied F., Muniesa M., Jofre J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population // *Environ Int.* 2014. V. 73. P. 167–175. doi: 10.1016/j.envint.2014.07.003
39. Shapiro O.H., Kushmaro A., Brenner A. Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater // *ISME J.* 2010. V. 4. No. 3. P. 327–336. doi: 10.1038/ismej.2009.118
40. Calero-Caceres W., Muniesa M. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater // *Water Res.* 2016. V. 95. P. 11–18. doi: 10.1016/j.watres.2016.03.006
41. Thingstad T.F. Elements of a theory for mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems // *Limnol Oceanogr.* 2000. V. 45. No. 6. P. 1320–1328. doi: 10.4319/lo.2000.45.6.1320
42. Munir M., Wong K., Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan // *Water Res.* 2011. V. 45. P. 681–693. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.033
43. Gao P., Munir M., Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant // *Sci. Total Environ.* 2012. V. 421–422. P. 17–183. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.061
44. Rosenberg Goldstein R.E., Micallef S.A., Gibbs S.G., George A., Clay E., Sapkota A., Joseph S.W. Detection of vanomycin-resistant enterococci (VRSE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse // *Sci. Total Environ.* 2014. V. 466–467. P. 404–411. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.039
45. Carraro E., Bonetta S., Bertino C., Lorenzi E., Bonetta S., Gilli G. Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries // *J. Environ. Manage.* 2016. V. 168. P. 185–199. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.11.021
46. Harris S.J., Cormican M., Cummins C. Antimicrobial residues and antimicrobial-resistant bacteria: impact on the microbial environment and risk to human health – a review // *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2012. V. 18. 767–809. doi: 10.1080/10807039.2012.688702
47. Verlicchi P., Aukidy M., Galletti A., Petrovic M., Barceló D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment // *Sci. Total Environ.* 2012. V. 430. P. 109–118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055
48. Harris S., Morris C., Morris D., Cormican M., Cummins E. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the municipal wastewater system: effect of hospital effluent and environmental fate // *Sci. Total Environ.* 2014. V. 468–469. P. 1078–1085. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.017
49. Yilmaz G., Kaya Y., Vergili I., Beril Gonder Z., Ozhan G., Celik B.O., Altinkum S.M., Bagdatli Y., Boergers A., Tuerk J. Characterization and toxicity of hospital wastewaters in Turkey // *Environ. Monit. Assess.* 2017. V. 189. Article No. 55. doi: 10.1007/s10661-016-5732-2
50. Ory J., Bricheux G., Togola A., Bonnet J.L., Donnadiou-Bernard F., Nakusi L., Forestier C., Traore O. Ciprofloxacin residue and antibiotic-resistant biofilm bacteria in hospital effluent // *Environ. Pollut.* 2016. V. 214. P. 635–645. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.033
51. Tao W., Zhang X.X., Zhao F., Huang K., Ma H., Wang Z., Ye L., Ren H. High levels of antibiotic resistance genes and their correlations with bacterial community and mobile genetic elements in pharmaceutical wastewater treatment bioreactors // *PLoS One.* 2016. V. 11. No. 6. Article No. e0156854. doi: 10.1371/journal.pone.0156854
52. Sousa J.M., Macedo G., Pedrosa M., Becerra-Castro C., Castro-Silva S., Pereira M.F.R., Silva A.M.T., Nunes O.C., Manaia C.M. Ozonation and UV 254 nm radiation for the removal of microorganisms and antibiotic resistance genes from urban wastewater // *J. Hazard. Mater.* 2017. V. 323. P. 434–441. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.096
53. Zhu Y., Wang Y., Zhou S., Jiang X., Ma X., Liu C. Robust performance of a membrane bioreactor for removing antibiotic resistance genes exposed to antibiotics: Role of membrane foulants // *Water Research.* 2018. V. 130. P. 139–150. doi: 10.1016/j.watres.2017.11.067