

Vodárenská biologie 2021

10. - 11. 2. 2021

EFEKTIVITA ODSTRAŇOVÁNÍ GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE NA ČOV MODŘICE A JEJICH VÝSKYT V RECIPIENTU ŘEKY SVRATKY



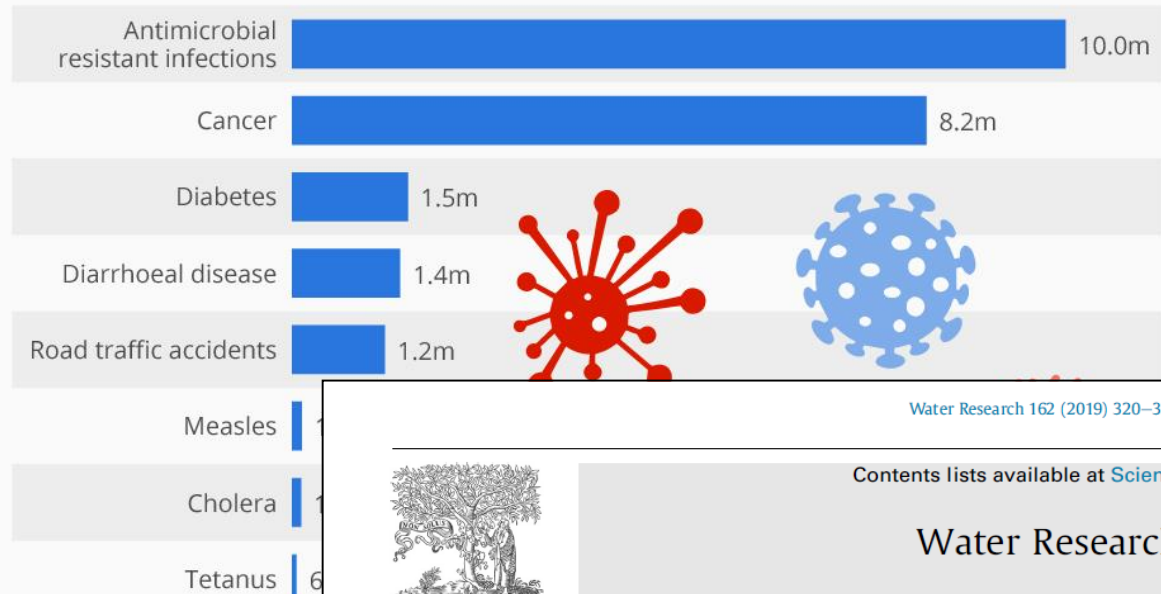
Iva Buriánková ,
Peter Kuchta , Anna Molíková , Monika
Vítězová , Kateřina Sovová , Martin Rulík



Problematika ATB rezistence

Deaths From Drug-Resistant Infections Set To Skyrocket

Deaths from antimicrobial resistant infections and other causes in 2050



@StatistaCharts Source: Review of

Water Research 162 (2019) 320–330



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres



Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings

Damiano Cacace ^a, Despo Fatta-Kassinos ^b, Celia M. Manaia ^c, Eddie Cytryn ^d, Norbert Kreuzinger ^e, Luigi Rizzo ^f, Popi Karaolia ^b, Thomas Schwartz ^g, Johannes Alexander ^g, Christophe Merlin ^h, Hemda Garelick ⁱ, Heike Schmitt ^j, Daisy de Vries ^j, Carsten U. Schwermer ^k, Sureyya Meric ^l, Can Burak Ozkal ^l, Marie-Noelle Pons ^m, David Kneis ^a, Thomas U. Berendonk ^{a,*}



- nedostatek informací o mechanismech, které řídí transport, přenos a akumulaci genů antibiotické rezistence (ARG) ve vodních ekosystémech
- i když vyčištěná odpadní voda obsahuje výrazně nižší množství ARG než surová odpadní voda, přesto vypouštění odpadní vody může zvýšit množství ARG v recipientu [1,2]
- odpadní vody z ČOV mohou sloužit jako zdroj ARG a mobilních prvků pro vodní prostředí recipientu
- nezávisle na procesech čištění v konkrétní ČOV [3]
- prostředí po proudu od ČOV tak bývá obohaceno o vlastní geny antibiotické rezistence
- ale také o mobilní genetické prvky

- vybrané ARG jsou považovány za relevantní indikátory rezistence různých prostředí [6]
- běžně vyskytují v městských odpadních vodách a vodních prostředích
- beta-laktamy (geny bla CTX-M a blaTEM)
- sulfonamid (sul1)
- tetracyklin (tetM)
- kolistin (mcr1)
- gen mcr-1 kóduje rezistenci na kolistin a jeho výskyt a prevalence na ČOV je zajímavý, protože byl zatím detekován v upravené odpadní vodě pouze sporadicky
- gen int11 představuje mobilní element přenášející ARG prostřednictvím HGT dále do prostředí a je velmi hojný jak v odpadních vodách i ve sladkovodním prostředí
- uvádí se, že ATB mají významnou korelaci s int11 a proto se tento gen používá jako indikátor antropogenního znečištění [8]

Cíle



Relativní kvantifikace vybraných genů
antibiotické rezistence (ARG) pomocí qPCR

Kultivace ATB rezistentních E.coli

- nátok/odtok z ČOV
- v říční vodě a sedimentech řeky Svatky
 - nad/pod výpustí z ČOV
- odhad efektivity ČOV Modřice v Brně v
odstranění ARG

Metodika



Odběr vzorků probíhal jednou měsíčně
ve spolupráci s ČOV Modřice
v období od listopadu 2019 – září 2020

1. Nátok na ČOV/ odtok) z ČOV
(duben-září 2020)
2. 24 hod vzorek odtoku z ČOV
(listopad 2019-září 2020)
3. Voda a sediment z recipientu
nad/pod výpustí ČOV
(listopad 2019-září 2020)

qPCR

- filtrace 0,2 um, izolace DNA kity Mo Bio
- pro stanovení relativní kvantity ARG pomocí metody qPCR byly vybrány
- 4 typy primerů pro analýzu vybraných ARG na beta-laktamová ATB (*blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-32*), sulfonamid (*sul1*), tetracyklin (*tetM*) a kolistin (*mcr-1*)
- integron (*int1*)
- 16S rRNA (poskytuje odhad celkového mikrobiálního osídlení ve vzorku) jako vnitřní kontrolu

Kultivace

- kultivačně stanoveny počty rezistentních *E. coli* na vybraná ATB (ampicilin, imipenem, sulfametaxazol, tetracyklin, kolistin)
- VUV Brno

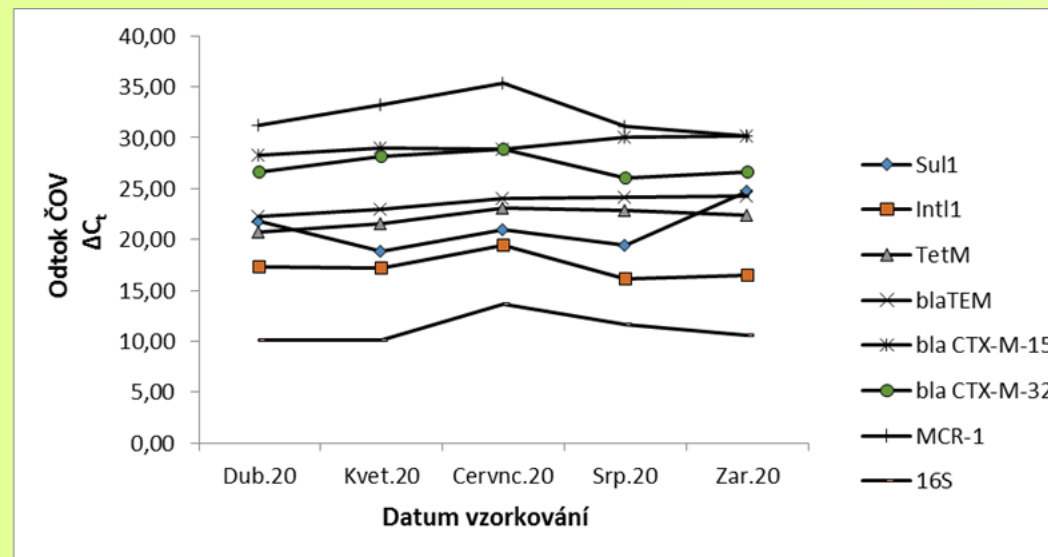
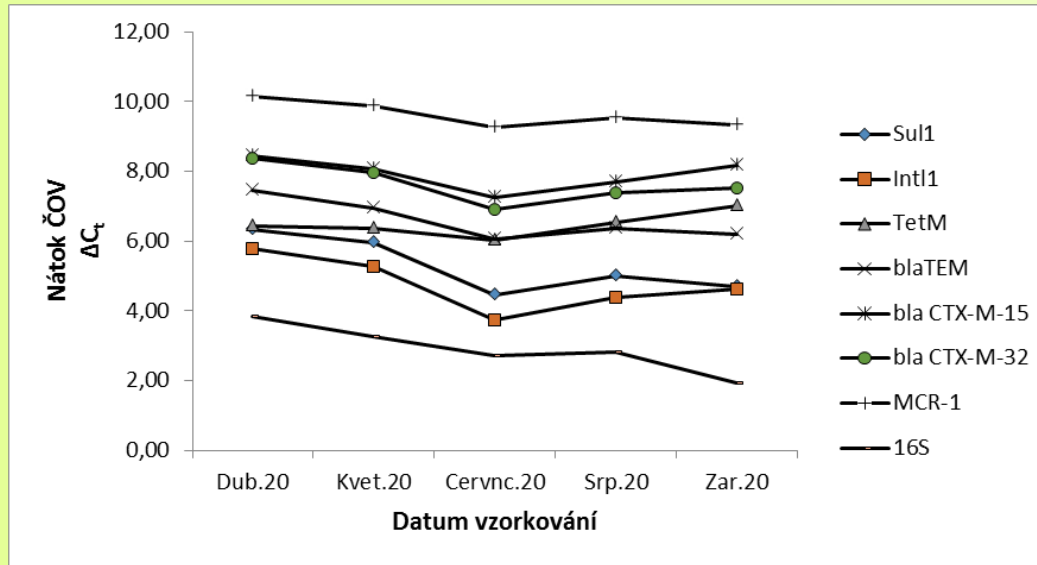
Výsledky

- všechny vybrané geny rezistence na ATB – *sul1*, *tetM*, *blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-32*, *mcr1* a integron *intl1* byly detekovány pouze v surové vodě v nátoku
- *blaTEM* pouze v nátoku a odtoku
- průměrná abundance ARG ve všech typech vzorků v průběhu vzorkování:

sul1* > *intl1* > *tetM* > *blaTEM* > *blaCTX-M-15* > *blaCTX-M-32* > *mcr-1

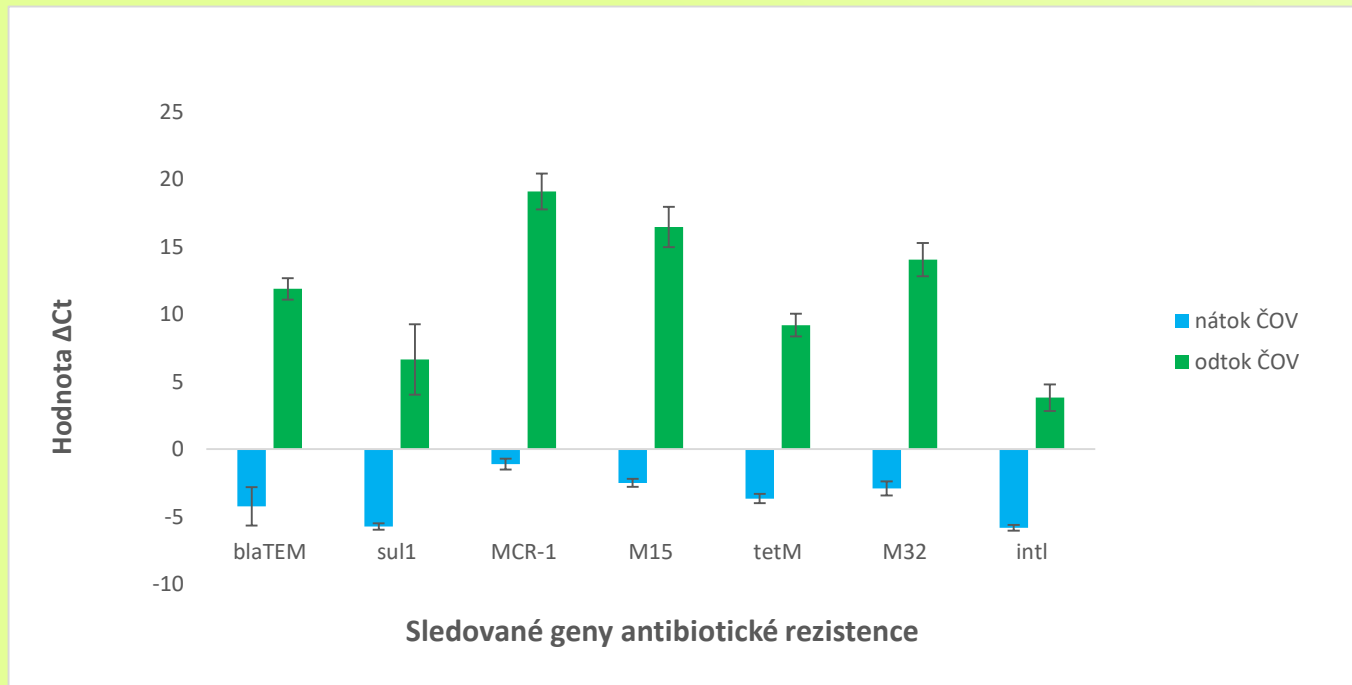


Sezónní průběh koncentrací sledovaných ARG v nátoku a odtoku z ČOV. (Hodnoty ΔC_t jsou v nepřímé úměře k množství detekovaných ARG)



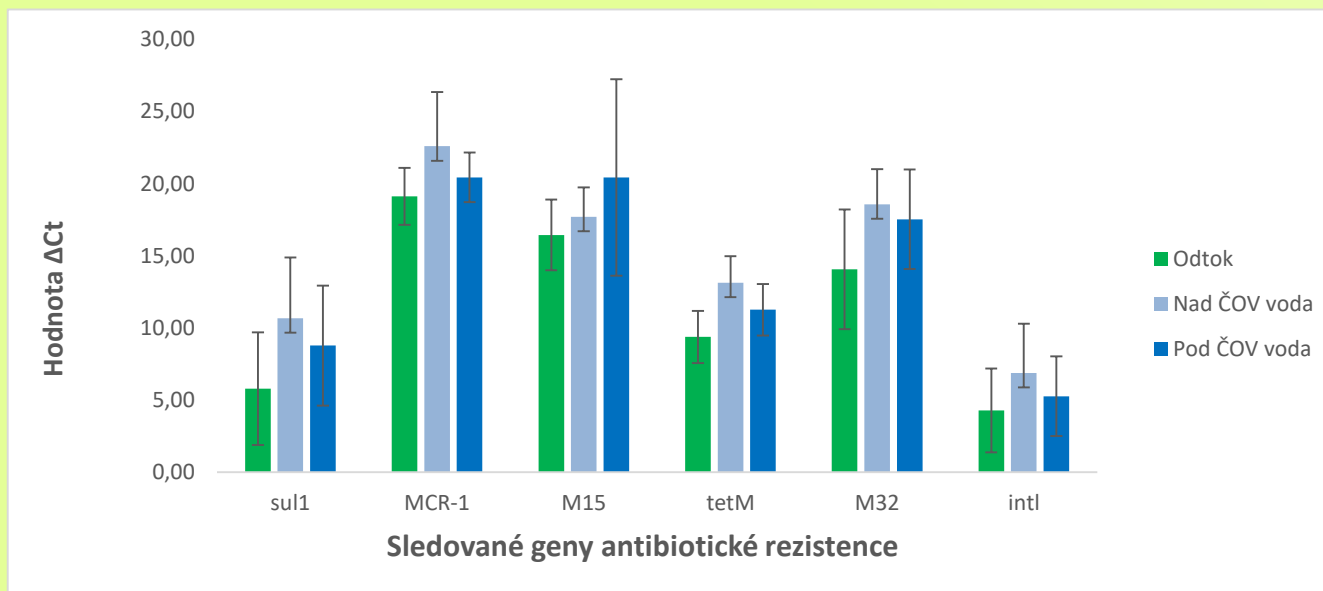
ARG v nátoku a na odtoku z ČOV

- hodnoty relativní kvantity u všech zkoumaných ARG ukazují na úbytek po kompletním vyčištění vody na ČOV
- kultivační pokusy ukázaly, že účinnost eliminace bakterií nesoucích ARG (min. 95%)
- míra eliminace ARG je mnohem menší než eliminace bakterií a dochází k jejich uvolňování do prostředí



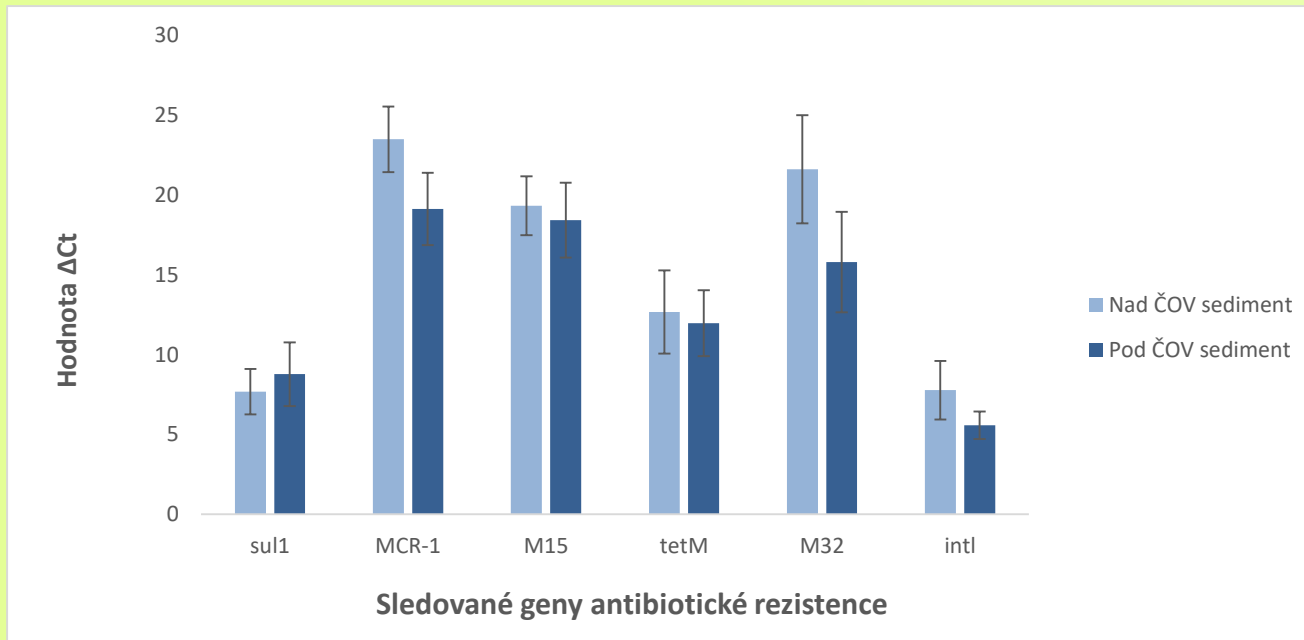
ARG ve vodním recipientu

- množství ARG ve vyčištěné odpadní vodě na odtoku bylo větší než hodnoty získané z říční vody nad výpustí z ČOV (N voda)
- dochází k významnému poklesu ARG během procesu přečištění na ČOV
- i tak se uvolňuje nezanedbatelné množství ARG do prostředí
- tím dochází k obohacení recipientu řeky oproti situaci nad výpustí
- trend je zřetelný u všech zkoumaných ARG s výjimkou integronu (intl1)
- hladina ARG ovlivněna ČOV FN Bohunice...?



ARG v říčním sedimentu

- vykazují koncentrace ARG mnohem menší rozdíly nad a pod výpustí vody z ČOV oproti hodnotám nalezeným ve volné vodě
- s výjimkou genu *sul1* a genu pro integron
- sediment slouží jako „hot-spot“ nejen mikrobiálního metabolismu v říčním toku, ale taky jako rezervoár ARG



Odhad % podílu ATB rezistentních bakterií ve společenstvu

	Intl1	Sul1	TetM	bla CTX-M-15	bla CTX-M-32	MCR-1	blaTEM
nátok na ČOV	7,54%	2,56%	2,32%	3,44%	0,54%	0,04%	18,87%
odtok z ČOV	7,10%	1,00%	0,17%	0,00%	0,01%	0,00%	0,03%

	Intl1	Sul1	TetM	bla CTX-M-15	bla CTX-M-32	MCR-1
odtok ČOV	5,17%	1,82%	0,15%	0,00%	0,01%	0,00%
voda nad ČOV	0,85%	0,06%	0,01%	0,00%	0,00%	0,00%
voda pod ČOV	2,70%	0,23%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%

	Intl1	Sul1	TetM	bla CTX-M-15	bla CTX-M-32	MCR-1
sediment nad ČOV	0,54%	0,49%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%
sediment pod ČOV	1,89%	0,85%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%

Závěr

- abundance analyzovaných genů rezistence mohla být seskupena do tří skupin a tyto výsledky jsou ve shodě s jinými evropskými zeměmi
- první skupinu hojných ARG tvořily výše zmíněné geny *int1* a *sul1*
- druhou skupinou střední četnosti *tetM*, *blaTEM* (ne v recipientu!)
- třetí nejméně početnou skupinu pak tvoří *mcr-1*, *blaCTX-M-15* a *blaCTX-M-32*
- kopírujeme trendy zjištěné na jiných evropských ČOV
- z hlediska hojnosti vybraných ARG v prostředí
- tak i v efektivitě jejich odstranění

- vlivem procesů na ČOV dochází k výraznému úbytku abundance všech sledovaných skupin ARG i intl1
- efektivita čištění nedostatečná
- obohacení recipientu pod výpustí z ČOV o ARG

- tento efekt je výraznější u volné vody než u sedimentu

- sediment představuje hlavní rezervoár ARG v recipientu

- množství ARG zjištěných v sedimentu by po přepočtu a objem vykazoval asi tisíckrát větší koncentrace ARG než volná voda...

Poděkování

Brněnské vodárny a kanalizace, a.s.

ČOV Modřice Brno za sběr vzorků

příjemnou spolupráci a v neposlední řadě také za pomoc (resp. záchranou misi) v terénu



Literatura

- [1] Amos G.C.A., Ploumakis S., Zhang L., Hawkey P.M., Gaze W.H., Wellington E.M.H. (2018): The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *ISME J.* 12, 681e691. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0030-8>.
- [2] Jager T., Hembach N., Elpers C., Wieland A., Alexander J., Hiller C., Krauter G., Schwartz T. (2018): Reduction of antibiotic resistant bacteria during conventional and advanced wastewater treatment, and the disseminated loads released to the environment. *Front. Microbiol.* 9, 2599. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02599>.
- [3] Freeman C.N., Scriver L., Neudorf K.D., Truelstrup Hansen, L., Jamieson R.C., Yost C.K., (2018): Antimicrobial resistance gene surveillance in the receiving waters of an upgraded wastewater treatment plant. *FACETS* 3, 128e138. <https://doi.org/10.1139/facets-2017-0085>.
- [4] Marano R.B.M., Cytryn E., (2017): The mobile resistome in wastewater treatment facilities and downstream environments. In: *Antimicrobial Resistance in Wastewater Treatment Processes*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 129e155. <https://doi.org/10.1002/9781119192428.ch8>
- [5] Antonio E.J., Mazel D.N., Aleksandra L.C. (2015): The Integron: Adaptation On Demand. "ASMscience, Microbiology Spectrum. 3. doi:10.1128/microbiolspec.mdna3-0019-2014
- [6] Rocha J., Cacace D., Kampouris I., Guilloteau H., Jager T., Marano R.B.M., Karaolia P., Manaia C.M., Merlin C. F-K, Cytryn E., Berendonk T.U., Schwartz T. (2018): Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *J. Environ. Chem. Eng.* <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2018.02.022>.
- [7] Graham D.W., Knapp C.W., Christensen B.T., McCluskey S., Dolfing J. (2016): Appearance of b-lactam resistance genes in agricultural soils and clinical isolates over the 20th century. *Sci. Rep.* 6, 21550. <https://doi.org/10.1038/srep21550>
- [8] Gatica, J. T., Green S., Manaia C.M., Berendonk T., Cacace D., Merlin C., Kreuzinger N., Schwartz T., F.K., D., Rizzo L., Schwermer C.U., Garelick H., Jurkevitch E., Cytryn E., (2016): High throughput analysis of integron gene cassettes in wastewater environments. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03188>.
- [9] Cacace D., Fatta-Kassinos D., Manaia C.M., Cytryn E., Kreuzinger N., Rizzo L., Karaolia P., Schwartz T., Alexander J., Merlin C., Garelick H., Schmitt H., Vries D., Schwermer C.U., Meric S., Ozkal C.B., Pons M.N., Kneis D., Berendonk T.U., (2019): Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings, *Water research*, 162 volume, p 320-330, doi: 10.1016/j.watres.2019.06.039