

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/352774592>

# Distribution of the Antibiotic-Resistant Isolates of Bacteria Belonging to the Enterobacteriaceae Family in the System Human-Aquatic Ecosystem

Article · June 2021

DOI: 10.26693/jmbs06.03.232

CITATIONS

0

READS

27

5 authors, including:



**Marianna Savenko**  
Uzhhorod National University

9 PUBLICATIONS 14 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Kryvtsova Maryna**  
Uzhhorod National University

105 PUBLICATIONS 372 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



**Ivan Skliar**  
Uzhhorod National University

5 PUBLICATIONS 2 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

DOI: 10.26693/jmbs06.03.232

УДК 579.842.1./2:[599.89+502.211(204)

Савенко М. В.<sup>1</sup>, Кривцова М. В.<sup>1</sup>, Костенко Є. Я.<sup>1</sup>,Анісімов Є. М.<sup>2</sup>, Скляр І. І.<sup>1</sup>

## ЦИРКУЛЯЦІЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНИХ ІЗОЛЯТІВ БАКТЕРІЙ РОДИНИ *ENTEROBACTERIACEAE* У СИСТЕМІ ЛЮДИНА – ВОДНІ ЕКОСИСТЕМИ

<sup>1</sup>Ужгородський національний університет, Україна<sup>2</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

Стрімкий розвиток резистентності мікроорганізмів до протимікробних препаратів призвів до розповсюдження антибіотикорезистентних бактерій та їх генетичних детермінант стійкості в об'єктах навколишнього середовища. Це обумовило появу нової загрози для здоров'я людини, передумовою якої є потрапляння генів стійкості до організму через харчовий ланцюг.

**Мета дослідження** — полягала у визначенні взаємозв'язків міграції антибіотикорезистентних мікроорганізмів у системі людина – водне середовище та оцінці ризиків розповсюдження резистентності.

**Матеріал та методи.** Для досягнення поставленої мети проведено ряд мікробіологічних досліджень, що включали виділення мікробних ізолятів зі зразків води річки Уж (Україна), поверхневій воді якої є джерелом питного й господарсько-побутового водопостачання, та клінічних зразків з ротової порожнини хворих на запальні захворювання тканин пародонту. Ідентифіковані ізоляти тестували на чутливість до антибіотиків різних груп.

**Результати та висновки.** За результатами проведеного дослідження в зразках води та ротової порожнини домінував однаковий спектр грам-негативних мікроорганізмів, які належали до родів *Enterobacter*, *Citrobacter* та *Escherichia* й характеризувалися високим ступенем резистентності до тетрациклінів, макролідів та незахищених бета-лактамних антибіотиків. Формування подібного антибіотикорезистентного в екологічних та клінічних зразках може свідчити про ймовірні шляхи міграції антибіотикорезистентних мікроорганізмів та генетичних детермінант стійкості у системі людина – водне середовище.

Існує необхідність в подальших дослідженнях з вивчення поширеності антибіотикорезистентних мікроорганізмів в доквіллі й розробці відповідних нормативних документів що регламентують ведення санітарно-епідеміологічного контролю за поширенням мікроорганізмів з множинною стійкістю в об'єктах навколишнього середовища.

**Ключові слова:** антибіотикорезистентні мікроорганізми, мікробіота ротової порожнини, водні екосистеми, антибіотикорезистент.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота пов'язана з багаторічною плановою науковою тематикою кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології біологічного факультету ДВНЗ «Ужгородський національний університет» «Дослідження генетичних та фізіолого-біохімічних механізмів адаптації біологічних систем різного рівня організації в умовах антропогенного навантаження», № держ. реєстрації 0115U003902.

**Вступ.** Справжнім викликом ХХІ сторіччя є проблема розвитку резистентності до антибіотиків, що ставить під загрозу ефективність протимікробної терапії у боротьбі з інфекційними захворюваннями [1, 2]. За даними ВООЗ тільки на території Європи зафіксовано 37 000 смертей протягом 2016 року спричинених резистентністю мікроорганізмів до лікарських препаратів [3]. Використання антибіотиків вже давно перетнуло межу клінічного профілю і користується значним попитом в сільськогосподарській та харчовій галузях, що унеможливує введення контролю за раціональним застосуванням протимікробних препаратів [4].

Одним з наслідків нераціонального використання антибіотиків є зростання антибіотикорезистентних мікроорганізмів та їх генетичних детермінант стійкості не тільки в межах стаціонару, а й об'єктах навколишнього середовища [5, 6]. Результати наукових досліджень проведених за останнє десятиріччя вказують на значне поширення полі- й мультирезистентних мікроорганізмів та генів стійкості у поверхневих, стічних й ґрунтових водах, питній та бутильованій воді, ґрунті та харчових продуктах рослинного походження [7].

Дані результати свідчать про потенційні ризики надходження антибіотичних речовин до організму людини через харчовий ланцюг, адже навіть споживання води неналежної якості може призвести до розвитку резистентності. Сучасні системи очисних споруд не здатні до повного очищення води від генетичних детермінант, найбільшим джерелом яких, як відомо, є лікарняні стоки та господарсько-побутові стічні води [8]. В контексті даної проблеми неабиякої актуальності набуває

вивчення впливу екологічного резистому на розвиток антибіотикостійкості в організмі людини.

**Мета** даного дослідження полягала у визначенні взаємозв'язків міграції антибіотикорезистентних мікроорганізмів у системі людина – водне середовище та оцінці ризиків розповсюдження резистентності.

**Матеріал та методи дослідження.** Ідентифікація мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* із зразків води та ротової порожнини включала вивчення морфологічних характеристик на агарі Хотінгера та подальшу диференціацію на селективних середовищах (Ендо, Плоскірева, вісмут-сульфіт агарі). Визначення родової та видової приналежності мікроорганізмів проводили за допомогою біохімічних тестів (Enterotest 24 та Enterotest 16) виробництва Erba Lachema, Чехія.

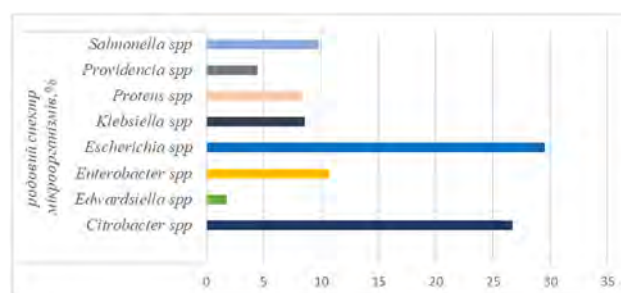
Антибіотикочутливість виділених ізолятів визначали диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера згідно з EUCAST (Європейський комітет з тестування чутливості до антимікробних препаратів) [9]. Для проведення тесту на чутливість до антибіотиків використовували наступні диски з антибіотиками: ампіцилін (AMP, 10 мг), цефтріаксон (CTR, 30 мг), імпенем (IMP, 10 мг), цефуроксим (СХМ, 30 мг), меропенем (MRP, 10 мг); амікацин (AK, 30 мг); гентаміцин (GEN - 10 мг); ципрофлоксацин (CIP, 5 мг), левофлоксацин (LE, 5 мг), гатифлоксацин (GAT, 5 мг), норфлоксацин (NX, 10 мг), ломефлоксацин (LOM, 30 мг); тетрациклін (TE, 30 мг), доксициклін (ДО, 10 мг) та азитроміцин (AZ, 15 мг) виробництва HiMedia та Фармактив. В якості контрольної тест культури використовували штам *Escherichia coli* ATCC 25922 для перевірки якості середовищ, дисків з антибіотиками та точності процедури тестування.

Мікробіологічні дослідження проводили на базі мікробіологічної лабораторії кафедри генетики, мікробіології та фізіології рослин біологічного факультету Ужгородського національного університету.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Водне середовище є одним з найбільших резервуарів антибіотикорезистентних мікроорганізмів та генетичних детермінант стійкості [10, 11], яке забезпечує можливість безперервної циркуляції резистентності між людиною та навколишнім середовищем. Зростання антропогенного тиску в умовах навколишнього середовища служать тригером для формування резистентності [12, 13].

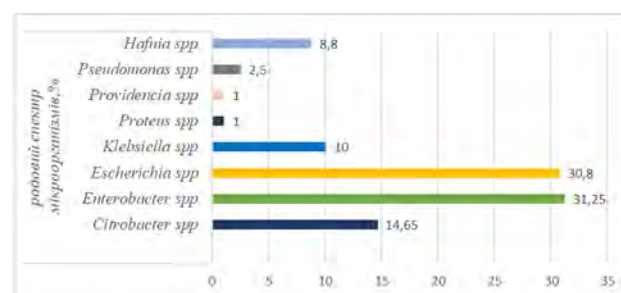
У 2017 році Всесвітньою організацією охорони здоров'я було опубліковано список пріоритетних умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів які за численними даними проявляли стійкість до антибіотиків та становили найбільшу загрозу для здоров'я людини. Серед таких мікроорганізмів

родини *Enterobacteriaceae* які продукують бета-лактамази розширеного спектра дії ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) [14]. Дані тенденції спонукали до визначення спектру мікроорганізмів у зразках з навколишнього середовища, а саме поверхневих вод річки Уж та зразках з ротової порожнини людини. За результатами досліджень в зразках води та біоматеріалу виділеного із ротової порожнини переважали мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae*. У мікробних спільнотах води домінували мікроорганізми родів *Escherichia*, *Citrobacter* та *Enterobacter* (рис. 1). Виділені групи мікроорганізмів належать до нормофлори шлунково-кишкового тракту людини, тому найбільш ймовірним шляхом потрапляння їх у водне середовище є господарсько-побутові стічні води [15].



**Рис. 1.** Спектр мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, ізольованих із зразків води

В ході науково-дослідного експерименту, із ротової порожнини 64 хворих на запальні захворювання тканин пародонту виділено бактерії родини *Enterobacteriaceae*, видова різноманітність яких була представлена наступними видами: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Hafnia alvei* (рис. 2).



**Рис. 2.** Спектр мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae*, ізольованих із ротової порожнини людей

Згідно результатів, представлених на рис. 2, у зразках з ротової порожнини переважають мікроорганізми роду *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*. Отже, спектр виділених мікроорганізмів умовно-патогенних ентеробактерій організму людини та водного середовища, вказує на можливість міграцію у системі водне середовище-людина. Подібна міграція становить значну небезпеку

розвитку транзиторних бактеріємій та розповсюдженню генетичних детермінант стійкості між людськими популяціями [16]. Тому наступним етапом даних досліджень було визначення чутливості до антибіотиків виділених мікроорганізмів з водного середовища та ротової порожнини.

За результатами дослідження представники родини *Enterobacteriaceae* виділені із зразків води проявили значну стійкість до антибіотиків природного походження, таких як тетрациклін, аміпіцилін та гентаміцин, а також до бета-лактамінів та макролідів II покоління (рис. 3). Виділені штами родів *Klebsiella* та *Escherichia* характеризувалися полі- та мультирезистентністю, яка раніше зустрічалася тільки серед збудників внутрішньолікарняних інфекцій.

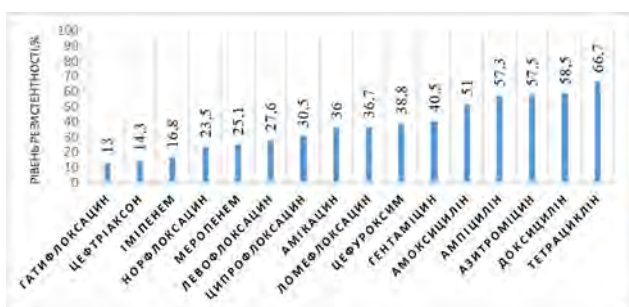


Рис. 3. Рівень резистентності мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* виділених із зрізків води річки Уж

В той час як, аналіз антибіограм ентеробактерій, ізолюваних з ротової порожнини (рис. 4) показав їх найвищий рівень резистентності до тетрациклінів, макролідів, незахищених бета-лактамінів. Найвища чутливість зареєстрована до фторхінолонів II-III покоління, а також цефалоспоринів III та IV поколінь.

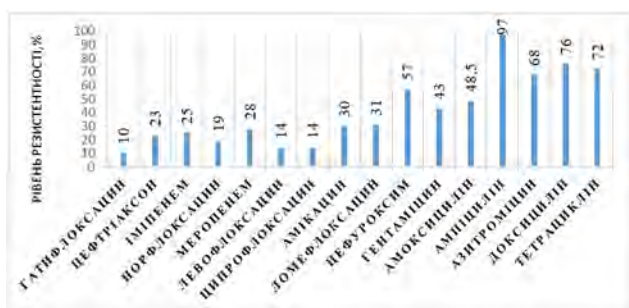


Рис. 4. Рівень резистентності мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* виділених із ротової порожнини людей

Слід зазначити, що найвищий рівень резистентності спостерігався серед видів *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella rhinoscleromatis* (рис. 5).

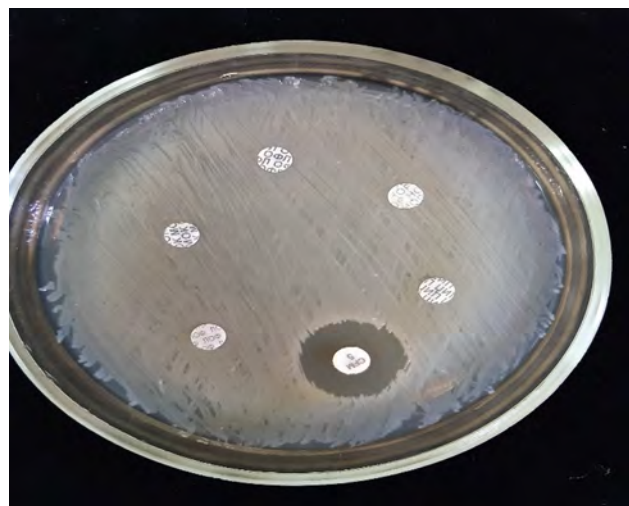


Рис. 5. Антибіотикорезистентний ізолят *Enterobacter cloacae*

Проведений порівняльний аналіз антибіограм клінічних та екологічних штамів вказує на формування спільного антибіотикорезистентного, що характеризується перш за все, міграцією бактерій які належать до родів *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, та їх стійкістю до тетрациклінів, макролідів й незахищених бета-лактамінів й свідчить про високі ризики надходження антибіотикорезистентних мікроорганізмів та їх генетичних детермінант стійкості з водних об'єктів до організму людини.

#### Висновки

1. Встановлено високий рівень антибіотикорезистентності мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* як у водних екосистемах, так і організмі людини. Найвищі показники антибіотикостійкості виявлені щодо незахищених бета-лактамінів, тетрациклінів, макролідів, цефалоспоринів I покоління.
2. Результати дослідження доводять значну роль водних екосистем у формуванні й міграції антибіотикорезистентних мікроорганізмів, як в навколишньому середовищі, так і на шляху до споживача.
3. Отримані дані обґрунтовують доцільність введення нових показників санітарно-гігієнічного контролю за розповсюдженням антибіотикорезистентних мікроорганізмів та генів стійкості.

**Перспективи подальших досліджень.** Перспективними є дослідження з визначення мікробного спектру мікроорганізмів стічних вод урбанізованих територій з подальшим тестуванням на чутливість до антибіотиків та детекцією їх генів резистентності з метою визначення ймовірних ризиків циркуляції генетичних детермінант стійкості у водних екосистемах та джерелах питного водопостачання.



## References

1. Wright GD. Antibiotics: a new hope. *Chemistry and biology*. 2012; 19(1): 3-10. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.10.019
2. Kryvtsova MV, Kostenko YeYa. Dominant microbial associations of oral cavat periodontitis and features of their sensitivity to antibacterial drugs. *Studia Biologica*. 2020; 14(1): 51–62. doi: 10.30970/sbi.1401.613
3. King DT, Sobhanifar S, Strynadka NC. One ring to rule them all: Current trends in combating bacterial resistance to the  $\beta$ -lactams. *Protein Science*. 2016; 25(4): 787-803. doi: 10.1002/pro.2889
4. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*. 2012; 127(1): 4-22. doi: 10.1177/003335491212700103
5. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52(1): 5-7. doi: 10.1093/jac/dkg293
6. Savenko MV, Kryvtsova MV. Anthropogenic impact on the development of resistance to antibiotics in microorganisms of the Uzh River (Ukraine). *Studia Biologica*. 2020; 14(3): 79–90. doi: 10.30970/sbi.1403.633
7. Pan M, Wong CK, Chu LM. Distribution of antibiotics in wastewater-irrigated soils and their accumulation in vegetable crops in the Pearl River Delta, Southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(46): 11062-11069. doi: 10.1021/jf503850v
8. Derakhshan Z, Mokhtari M, Babaei F, Malek Ahmadi R, Ehrampoush MH, et al. Removal methods of antibiotic compounds from aqueous environments—a review. *J Environmen Health Sustain Devel*. 2016; 1(1): 43-62.
9. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. 2017. Available from: <http://www.eucast.org>
10. Amarasiri M, Sano D, Suzuki S. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2020; 50(19): 2016-2059. doi: 10.1080/10643389.2019.1692611
11. Marti E, Variatza E, Balcazar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*. 2014; 22(1): 36-41. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001
12. Sazykyn YS, Khmelevtsova LE, Khammamy MY, Sazykina MA. Zagryaznenye okruzhayushchey sredy genamy antybyotykokorezistentnosti [Environmental pollution with antibiotic resistance genes]. *Transformatsyya ekosystem pod vozdeystviyem pryrodnykh y antropogennykh faktorov*. 2019; 87-91. [Russian]
13. Bilkei MV, Nikolaichuk VI. The distribution of heavy metals content in the bottom deposits of the trans-border Uzh river system. *Biosystems Diversity*. 2017; 25(2): 145–153. doi: 10.15421/011722
14. World Health Organization. (2017b). List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2018. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
15. Zhou ZC, Feng WQ, Han Y, Zheng J, Chen T, Wei YY, et al. Prevalence and transmission of antibiotic resistance and microbiota between humans and water environments. *Environment international*. 2018; 121:1155-1161. doi: 10.1016/j.envint.2018.10.032
16. Laurens C, Jean-Pierre H, Licznar-Fajardo P, Hantova S, Godreuil S, Martinez O, et al. Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from river water to human. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2018; 15: 88–92. doi: 10.1016/j.jgar.2018.06.022

УДК 579.842.1./2:[599.89+502.211(204)

**ЦИРКУЛЯЦИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE В СИСТЕМЕ ЧЕЛОВЕК – ВОДНЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ**

**Савенко М. В., Кривцова М. В., Костенко Е. Я., Анисимов Е. М., Скляр И. И.**

**Резюме.** Стремительное развитие резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам привело к распространению антибиотикорезистентных бактерий и их генетических детерминант устойчивости в объектах окружающей среды. Это обусловило появление новой угрозы для здоровья человека, причиной которой является попадание генов устойчивости в организм человека через пищевую цепь.

**Цель исследования** — определение взаимосвязей между миграцией антибиотикорезистентных микроорганизмов в системе человек-водная среда.

**Материал и методы.** Для достижения поставленной цели проведен ряд микробиологических исследований, включавших выделения микробных изолятов из образцов воды реки Уж (Украина), поверхностные воды которой является источником питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, и

клинических образцов из ротовой полости больных на воспалительные заболевания тканей пародонта. Идентифицированные изоляты тестировали на чувствительность к антибиотикам различных групп.

**Результаты и выводы.** По результатам проведенного исследования в образцах воды и ротовой полости доминировал одинаковый спектр грамотрицательных микроорганизмов, принадлежащих к родам *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Escherichia* и характеризовались высокой степенью резистентности к тетрациклинам, макролидам и незащищенным бета-лактамным антибиотикам. Формирование подобного антибиотикорезистента в экологических и клинических образцах может свидетельствовать о возможных путях миграции антибиотикорезистентных микроорганизмов и генетических детерминант устойчивости в системе человек-водная среда.

Существует необходимость в дальнейших исследованиях по изучению распространенности антибиотикорезистентных микроорганизмов в окружающей среде и разработке соответствующих нормативных документов, регламентирующих ведение санитарно-эпидемиологического контроля за распространением микроорганизмов с множественной устойчивостью в объектах окружающей среды.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентные микроорганизмы, микробиота ротовой полости, водные экосистемы, антибиотикорезистентом.

UDC 579.842.1./2:[599.89+502.211(204)

***Distribution of the Antibiotic-Resistant Isolates of Bacteria Belonging to the Enterobacteriaceae Family in the System Human-Aquatic Ecosystem***

**Savenko M. V., Kryvtsova M. V., Kostenko Ye. Ya., Anisimov Ye. M., Skliar I. I.**

**Abstract.** The rapid development of resistance of microorganisms to antimicrobial drugs has led to the spread of antibiotic-resistant bacteria and their genetic determinants of resistance in the environment. It has led to the emergence of a new threat to human health, the precondition of which is the entry of resistance genes to the human body through the food chain. Modern systems of treatment plants are not capable of complete purification of water from genetic determinants, the largest source of which is known to be hospital effluents and domestic wastewater. In the context of this problem, the study of the influence of ecological resist on the development of antibiotic resistance in the human body becomes very important.

*The purpose of the study* was to determine the relationships between the migration of antibiotic-resistant microorganisms in the system human-aquatic ecosystem.

**Materials and methods.** To achieve the purpose, a number of microbiological studies were performed, which included the isolation of microbial isolates from water samples of the Uzh River (Ukraine), surface waters of which are a source of drinking and domestic water supply, and clinical samples from the oral cavity of patients with inflammatory periodontal diseases. Identified isolates were tested for sensitivity to antibiotics of different groups.

**Results and discussion.** During the research experiment, bacteria of the *Enterobacteriaceae* family were isolated from the oral cavity of 64 patients with inflammatory diseases of periodontal tissues, the species diversity of which was represented by the following species: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Hafnia alvei*. According to the study, members of the *Enterobacteriaceae* family isolated from water samples showed significant resistance to antibiotics of natural origin, such as tetracycline, ampicillin and gentamicin, as well as to beta-lactams and second-generation macrolides.

**Conclusion.** According to the results of the study, the samples of water and oral cavity were dominated by the same spectrum of gram-negative microorganisms belonging to the genera *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia* and characterized by a high degree of resistance to tetracyclines, macrolides and unprotected beta-lactam antibiotics. The formation of such an antibiotic resistance in ecological and clinical samples may indicate probable migration routes of antibiotic-resistant microorganisms and genetic determinants of stability in the system human-aquatic ecosystem. There is a need for further research to study the prevalence of antibiotic-resistant microorganisms in the environment and the development of appropriate regulations governing the conduct of sanitary and epidemiological control over the spread of microorganisms with multiple resistance in the environment.

**Keywords:** antibiotic-resistant microorganisms, oral microbiota, aquatic ecosystems, antibiotic-resistant.

**ORCID and contributionship:**Maryna V. Kryvtsova : 0000-0001-8454-2509<sup>B,D,F</sup>Marianna V. Savenko: 0000-0003-4434-182X<sup>C,D,F</sup>Yevhen Ya. Kostenko: 0000-0002-3997-2371<sup>B,E,F</sup>Ye.M. Anisimov : 0000-0001-6822-5212<sup>A,C,E</sup>Ivan I. Skliar: 0000-0001-8664-3952<sup>A,B,C</sup>

---

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,  
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,  
E – Critical review, F – Final approval of the article

**CORRESPONDING AUTHOR****Marianna V. Savenko**

Uzhhorod National University,

Biology Department

32, Voloshina St., Uzhhorod 88000, Ukraine

tel. +380994324377, e-mail: savenko.marianna.uzhnu.edu.ua

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Received: 04.04.2021 p.

*Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*