

ПОШИРЕННЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ У НАВКОЛИШНЬОМУ ПРИРОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ¹

Тимошук С.А., Симочко Л.Ю.

Ужгородський національний університет
вул. Університетська, 14, 88000, м. Ужгород
svitlana.tymoshchuk@uzhnu.edu.ua, lyudmilassem@gmail.com

Безсумнівно, що найважливішою причиною набуття бактеріями резистентності до антибіотиків є широке та безконтрольне застосування самих антибіотиків та неналежна їх утилізація. Сьогодні в Україні, незважаючи на актуальність проблеми, не розроблена уніфікована система моніторингу за поширенням антибіотикорезистентних мікроорганізмів у навколишньому середовищі, що є одним з факторів ризику для здоров'я людини. Нормативні документи, які регулюють застосування антимікробних препаратів, не відповідають сучасному рівню знань, що не дає змоги розробити і впровадити в медичну та ветеринарну практику ефективні заходи боротьби з інфекціями. Використання антимікробних засобів у тварин (окрім лікування) призводить до збільшення кількості бактерій, резистентних до антибактеріальних засобів, – як патогенів, які здатні прямо або опосередковано інфікувати людей, так і умовно-патогенних бактерій, котрі можуть переносити детермінанти резистентності в організм людини в різний спосіб: безпосередньо через контакт з тваринами і опосередковано через харчовий ланцюг, воду, повітря та ґрунти, удобрені гноєм, або стічні води. У ланцюгу «ґрунт (вода) – мікроорганізми – рослини» ґрунтова (водна) мікробіота є невіддільним складником. Мікроорганізми виступають зручним об'єктом спостережень, адже вони тісно контактують з середовищем існування, характеризуються високою швидкістю росту і розмноження, що дозволяє вивчати дію на них екологічних чинників протягом доволі короткого терміну. Ця робота є експериментальною. Досліджено водний і ґрунтовий мікробіом на наявність резистентних мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів на території м. Ужгород та Ужгородського району зокрема. Визначено наявність антибіотикорезистентних мікроорганізмів у навколишньому природному середовищі, зокрема у водній та ґрунтовій екосистемах. Встановлено, що водний мікробіом р. Уж містить *Klebsiella pneumoniae* та *Enterococcus faecium*, що належать до умовно-патогенних мікроорганізмів. У мікробіомі ґрунту виявлено – *Yersinia pestis*, яка є патогеном. Мікроорганізми, виділені з водної екосистеми, володіють досить високим рівнем резистентності до антибактеріальних препаратів. *Ключові слова*: мікроорганізми, екосистема, ґрунт, вода, мікробіом, антимікробні препарати, резистентність.

Spread of antibiotic-resistant bacteria in the environment. Tymoshchuk S., Symochko L.

Undoubtedly, the major cause of bacterial resistance to antibiotics is the widespread and uncontrolled use of antibiotics themselves and their improper disposal. Today, despite the urgency of the problem, a unified system for monitoring the spread of antibiotic-resistant microorganisms in the environment, which is one of the risk factors for human health, has not been developed. Regulatory documents the use of antimicrobials do not correspond to the current level of knowledge, which does not allow the development and implementation of effective infection control measures in medical and veterinary practice. The use of antimicrobials in animals (other than treatment) leads to an increase in bacteria resistant to antibacterial agents – both pathogens capable of directly or indirectly infecting humans and conditionally pathogenic bacteria capable of transferring resistance determinants into the human body: directly through contact with animals and indirectly through food chains, water, air and soil, manure or wastewater. In the soil-micro-organisms-plants scheme, the soil microbiota is an integral component. Microorganisms are a convenient target for observation because they interact closely with the habitat, are characterized by high growth and reproduction rates, which allow them to study the effects of environmental factors on them fairly quickly. This work is experimental. Water and soil microbiome were investigated for the presence of resistant microorganisms to antibacterial drugs in Uzhgorod and Uzhhorod district in particular. The presence of antibiotic-resistant microorganisms in aquatic and soil ecosystems has been determined. In the microbiome of the river Uzh has been found *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecium*, related to conditionally pathogenic microorganisms. In the soil microbiome, *Yersinia pestis* has been found. Microorganisms isolated from the aquatic ecosystem have a fairly high level of resistance to antibacterial agents. *Key words*: microorganisms, ecosystem, soil, water, microbiome, antimicrobials, resistance.

Постановка проблеми. Масове застосування різноманітних антимікробних речовин у клінічній практиці, харчовій, мікробіологічній та біотехнологічній промисловості може призводити до появи резистентних форм мікроорганізмів зі зміненням метаболізмом й деякими біологічними ознаками [1; 2]. Постійні взаємозв'язки між людиною, твари-

нами і навколишнім середовищем сприяють виникненню і поширенню стійкості до антибіотиків [3]. Явище антибіотикорезистентності виникло практично одночасно із синтезом перших антибіотиків, однак за останні декілька десятиліть воно набуло загрозливих соціально-економічних масштабів [1; 2].

¹ Автори висловлюють подяку у сприянні цього дослідження директору НДНЦ Молекулярної мікробіології та імунології слизових оболонок в м. Ужгород проф., д.б.н. Бойко Надії Володимирівні.

Антибіотикорезистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з найбільших проблем сучасної медицини, енвайронментальної мікробіології та екології. Швидкість, з якою формується і розповсюджується стійкість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, досить висока.

Мультирезистентність є однією з перших трьох загроз для глобального здоров'я населення і зазвичай викликана надмірним вживанням препаратів або їх призначенням, нераціональною утилізацією антимікробних препаратів. Відомо також про існування зворотних векторів поширення антибіотикорезистентності [4]. Застосування антибіотиків у тваринництві спричиняє їх поширення у навколишньому природному середовищі, зокрема в агроекосистемах, де використовуються органічні системи удобрення [5–6]. Присутність антибіотиків у навколишньому середовищі також може вплинути на здоров'я людини. Хоча ефект такого впливу поки невідомий людям, епідеміологічні дослідження показують, що тривалий вплив антибіотиків може призвести до хронічних станів, включаючи ожиріння, діабет і астму [7–8].

Використання антибіотиків також зростає в аквакультури, що зумовлено швидким зростаючим темпом харчової промисловості в усьому світі завдяки інтенсивному сільському господарству [9–10]. З цієї причини антибіотики фармацевтичного походження на цей час виявляються у великих кількостях у техногенних середовищах, таких як очисні споруди, стічні води [11]. Міські очисні споруди є одними із джерел надходження антибіотиків у навколишнє середовище [12]. Ця проблема може особливо вплинути на країни, які страждають від нестачі питної води, оскільки вони більш схильні до використання очищених стічних вод для зрошення агроекосистем [13–14].

Актуальність дослідження. Сьогодні в Україні не розроблена система спостереження за стійкістю мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів та не існує контролюючого органу з боротьби з внутрішньо-лікарняними інфекціями. Це пояснюється відсутністю контрольних тестів, що унеможлиблює порівняння різних заходів або стратегій з контролю за розповсюдженням антибіотикорезистентних мікроорганізмів [15].

Особливе занепокоєння викликають збудники, які є резистентними до дії кількох лікарських препаратів. До таких відносять метицилін-резистентні *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкоміцин-резистентні ентерококи (VRE) та окремі грам-негативні бактерії (GNB) [15–16].

Є безліч причин, які перешкоджають розробці нових антибіотиків. Одна з них – це складність і висока вартість наукових розробок зі створення нових лікарських засобів з принципово новими механізмами дії. Друга причина – комерційна. Інвестиції в розробку антибактеріальних препаратів прино-

сять невисокий прибуток, оскільки вони призначені для короткострокового лікування певних гострих захворювань [17].

Мета роботи – проаналізувати наявність антибіотикорезистентних мікроорганізмів у водному і ґрунтовому мікробіомах у м. Ужгород та Ужгородському районі.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Проблема поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів досить обговорювана за останні десятиліття, над її вирішенням працюють науковці з усього світу. Серед них необхідно виділити J.E. Davies, C.W. Knapp, M.M. Katariina, Pärnänen, Carlos Narciso-da-Rocha. Автори розглядають антибіотикорезистентність (АБР) як важливу загрозу для людства зараз і у найближчі десятиліття. Основними причинами розвитку АБР вважають: нераціональне та неконтрольоване застосування антимікробних препаратів; застосування антибіотиків із широким спектром дії у випадках достатньої ефективності засобів з обмеженим спектром; недотримання пацієнтами визначених режимів прийому та неправильне профілактичне застосування; доступність з причини безрецептурного відпуску; неконтрольоване та неаргументоване застосування в ветеринарії й аграрному виробництві [18].

Методологічне або загальнонаукове значення. Визначення наявності антибіотикорезистентних мікроорганізмів у водній та ґрунтовій екосистемах несе вагомий вклад у формування моніторингової системи поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів у навколишньому природному середовищі. Це може слугувати базисом для удосконалення наявних методів очистки стічних вод та оцінки масштабів і векторів поширення резистентних мікроорганізмів як складників водного і ґрунтового мікробіомів.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для досліджень слугували зразки ґрунту та води, відібрані у визначених точках екосистеми Ужгородського району Закарпатської області. Точки відбору проб води та ґрунту визначалися таким чином, щоб охопити рекреаційну зону, урбоекосистему та агроекосистему у межах Ужгорода та Ужгородського району. Для виділення штамів мікроорганізмів користувалися загальноприйнятими методиками [19] з використанням твердих елективних поживних середовищ. Приналежність мікроорганізмів до роду визначали за культуральними, бактеріоскопічними та морфологічними властивостями. Подальшу ідентифікацію штамів, які проявили антибіотикорезистентність, проводили за схемою: фарбування за Грамом та мікроскопія; виділення чистої культури та подальша біохімічна ідентифікація за допомогою тестових систем компанії LACHEMA згідно з інструкцією.

Верифікацію антибіотикорезистентності ізолятів здійснювали методом Кірбі – Бауера на середовищі Мюллера-Хінгтона, з використанням дисків

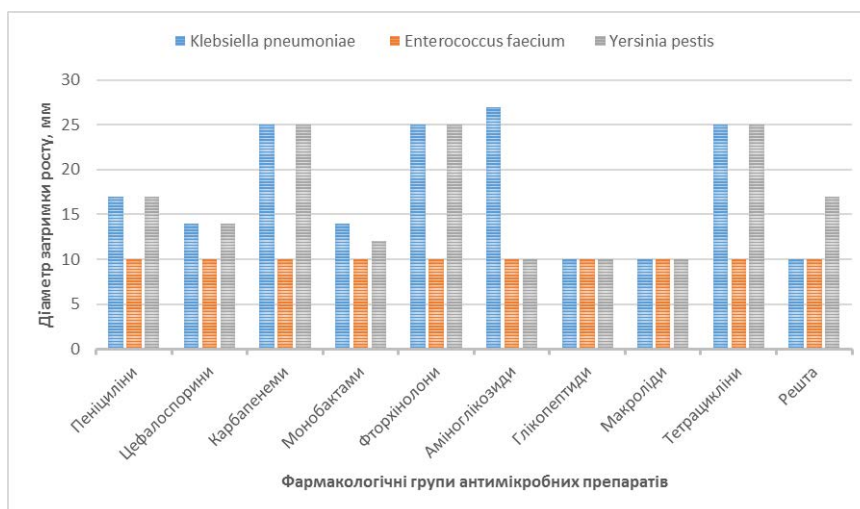


Рис. 1. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів до фармакологічних препаратів різних груп

ТОВ «Фармактив» та HIMEDIA. Вибір антибактеріальних препаратів до виділених та ідентифікованих мікроорганізмів базувався на рекомендаціях комітету EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). У роботі використано антибактеріальні препарати (АБП), які охоплюють основні фармакологічні групи.

Виклад основного матеріалу. Результати досліджень засвідчили, що серед домінуючих бактерій, виділених з ґрунтової та водної екосистеми досліджуваних зон, є патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, які володіють множинною резистентністю до препаратів фармакологічних груп, що рекомендовано застосовувати комітетом EUCAST (рис. 1). З водної екосистеми було виділено *Klebsiella pneumoniae* та *Enterococcus faecium*. У складі мікробіому ґрунту було виявлено *Yersinia pestis*, цей мікроорганізм характеризувався досить високим рівнем АБР. *Klebsiella pneumoniae* та *Yersinia pestis* – грам-негативні нерухомі бактерії, що належать до родини Enterobacteriaceae, здатні викликати запалення легень у людини, а в навколишньому середовищі за типом живлення – сапрофіти.

У 2017 році мікробіологічні дослідження екосистеми ґрунту на території Ужгородського району свідчили, що була виділена *Yersinia pestis* в агро-екосистемах, де вирощують лікарські рослини [20]. Це вказує на те, що тривалий час *Yersinia pestis* колонізує ґрунти місцевості. Порівнявши отримані дані АБР бактерії в 2017 та 2019 рр., можна відмітити, що стійкість до таких фармакологічних груп АБП, як глікопептиди, пеніциліни та цефалоспорини, залишилась.

Бактерія виявилась чутливою лише до 20% АБП, що рекомендовано до застосування у боротьбі з нею. Дослідження показали, що *Yersinia pestis* колонізує ґрунт усіх зон, але найбільшу кількість було виділено з ґрунту агроекосистем.

Klebsiella pneumoniae була виділена із р. Уж після проходження системи очистки. Найбільш ефективними виявилися АБП, такі як амоксицилін (10 мкг/диск), іміпенем (10 мкг) та меропенем (10 мкг), левофлоксацин (5 мкг) та моксифлоксацин (5 мкг), показали найвищу чутливість. Отже, *Klebsiella pneumoniae* проявила чутливість до 22% АБП, що застосовуються у боротьбі із цим мікроорганізмом (рис. 2).

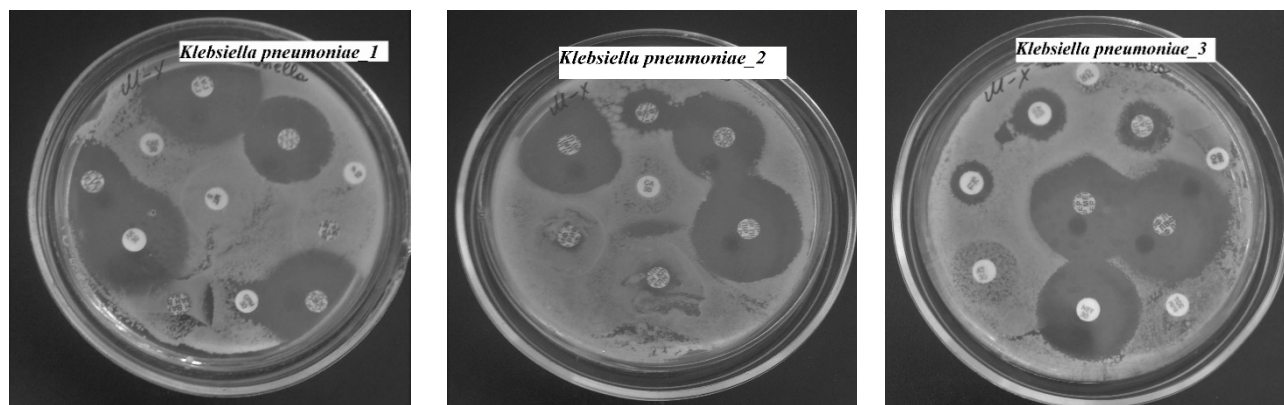


Рис. 2. Верифікація ізоляту *Klebsiella pneumoniae*

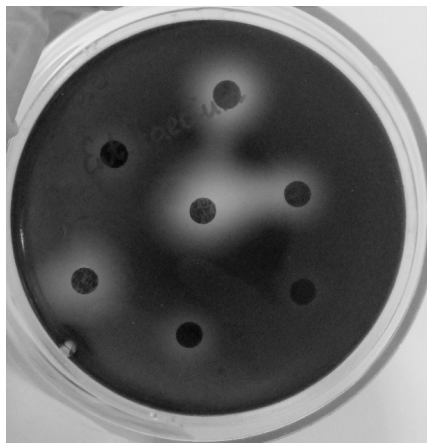


Рис. 3. Верифікація ізоляту *Enterococcus faecium*

На території заплавної едафотопи р. Уж у межах центральної частини урбоекосистеми виділено *Enterococcus faecium*. Хоча ентерококи є частиною нормальної кишкової мікробіоти людини та тварин, вони відіграють важливу роль в процесах колонізаційної резистентності слизових оболонок, вони також є представниками групи умовно-патогенних бактерій, що здатні викликати аутоінфекцію, а у разі накопичення у навколишньому середовищі – призводити до екзогенного інфікування. Ці бактерії широко розповсюджені у природі, є представниками нормальної мікробіоти людини та тварин, можуть у нормі зустрічатися в харчових продуктах, воді, рослинах. В той же час деякі штами мікроорганізмів, набуваючи ряд ознак патогенності, можуть викликати інфекційні захворювання.

Enterococcus faecium проявив стійкість до всіх АБП, що застосовувалися у нашому дослідженні, згідно вимог комітету EUCAST (рис. 3). Встановлено високий рівень стійкості досліджуваного мікроорганізму до АБП, що підтверджує актуальність пошуку нових підходів до лікування інфекцій, ускладнених цим збудником.

Головні висновки. За результатами дослідження визначено наявність антибіотикорезистентних мікроорганізмів у навколишньому природному середовищі, а саме водній та ґрунтовій екосистемах у межах міста Ужгород та Ужгородського району. Показано їх стійкість до всіх фармакологічних груп АБП. Встановлено, що водна екосистема є джерелом поширення умовно-патогенних мікроорганізмів на території Ужгородського району, навіть після очисних споруд у водному мікробіомі були виявлені *Klebsiella pneumoniae* і *Enterococcus faecium*. Цей факт свідчить про неналежний санітарний стан навколишнього природного середовища, що несе загрозу для здоров'я людини та довкілля.

Перспективи використання результатів дослідження. Визначення наявності антибіотикорезистентних мікроорганізмів у водному і ґрунтовому мікробіомі у межах досліджуваних екосистем дозволяє оцінити їх санітарно-екологічний стан та ефективність роботи очисних споруд. Річка Уж є основною артерією водопостачання в Ужгородському районі, тому результати цих досліджень можуть бути використані для водоохоронної діяльності, а також для формування стратегії стримування АБР з метою зниження ризиків для здоров'я людини та захисту навколишнього природного середовища.

Література

1. Сидоренко С.В. Механізми резистентності мікроорганізмів. Практичне керівництво по антиінфекційній хіміотерапії / Под редакцією Л.С. Страчунського, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Москва, 2002. 290 с.
2. Яковлев В.П., Яковлев С.В. Рациональная антимикробная фармакотерапия: Руководство для практикующих врачей. Москва : Литтерра, 2003. 1008 с.
3. Summers A.O., Wireman J., Vimy M.J., Lorscheider F.L., Marshall B., Levy S.B., Bennett S., Billard L. Mercury released from dental 'silver' fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993 ; 37 : 825–834. doi: 10.1128/AAC.37.4.825.
4. Тодосійчук Т.С., Іздебська Т.І., Громико О.М., Федоренко В.О. / Сучасний стан і перспективи біотехнологічного виробництва антибіотиків. Біологічні Студії / *Studia Biologica.* 2011. Том 5/№1. С. 159–172.
5. Feshchenko, Yu.I., Gumenyuk, M.I., Denisov, O.S. (2010). Antybiotyko rezystentnistj mikroorganismiv. Stan problemy ta shljakhy iji vyrishennja [Antibiotic resistance of microorganisms. State of problem and ways of its solutions]. *Ukrainsjkyj khimioterapevtychnyj zhurnal — Ukrainian chemotherapeutic Journal*, 1–2 (23), 4–10 [in Ukrainian].
6. Martínez, J.-L. (2012) Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: The two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front. Microbiol.*, 3, 338–346 [in English].
7. Knapp, C.W., Dolfig, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 560–587 [in English]. 8. Diaz-Cruz, M.S., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem.*, 22, 340–351 [in English].
8. Яковлева Л.В., Баглай Т.О. Проблеми антибіотикорезистентності в Україні. Фармакоєкономіка в Україні: стан і перспективи розвитку : матеріали XI наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 24 трав. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 134–135.
9. Larsson DGJ. (2014). Antibiotics in the environment. *Ups J Med Sci.* 119(2):108-12
10. Ianiro G., Tilg H., Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: Between good and evil. *Gut.* 2016;65:1906–1915. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312297.
11. Martínez J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* 2008;321:365–367. doi: 10.1126/science.1159483.

12. Henriksson P.J.G., Rico A., Troell M., Klinger D.H., Buschmann A.H., Saksida S., Chadag M.V., Zhang W. Unpacking factors influencing antimicrobial use in global aquaculture and their implication for management: A review from a systems perspective. *Sustain. Sci.* 2018;13:1105–1120. doi: 10.1007/s11625-017-0511-8.
13. Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, McEwen SA, Li X-Z, Gaze WH, et al (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Dis*, 57(5):704-10.
14. 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 Environ.* 2013;447:345–360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
15. 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 Environ.* 2013;447:345–360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.032.
16. Салманов А.Г. Антибіотикорезистентність основних збудників гнійно-запальних інфекцій у стаціонарах хірургічного профілю / А.Г. Салманов, В.Ф. Марієвський, С.І. Доан [та ін.]. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2010. Том 11, №1. с. 106–112.
17. Lewis K., Ausubel F.M. Prospects for plant-derived antibacterials. (2006). *Nat. Biotechnol*, 24, 1504–1507 [in English].
18. Davies, J.E., Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. (2010) / *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74, 417–433 [in English].
19. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 13(12):1057-98.
20. Goldman E., & Green L.H. (Eds.). *Practical handbook of microbiology*, Third Edition. 2015. 467 p. Doi:10.1201/b17871
21. Симочко Л.Ю. Антибіотикорезистентні мікроорганізми в агроекосистемах як чинник ризику для здоров'я людини. *Агроекологічний журнал.* 2017. № 2. С. 201–204.