

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА**

САВЕНКО МАРІАННА ВІКТОРІВНА

УДК 504.5(282) (477.87): 577.18:546.95

**АНТРОПОГЕННЕ НАВАНТАЖЕННЯ НА МІКРОБІОТУ ВОДНИХ
ЕКОСИСТЕМ В УМОВАХ ЗАКАРПАТТЯ**

03.00.16 – екологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Дніпро – 2023

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у державному вищому навчальному закладі «Ужгородський національний університет» Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Кривцова Марина Валеріївна,
Ужгородський національний університет,
біологічний факультет, кафедра генетики,
фізіології рослин і мікробіології, професор

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Гандзюра Володимир Петрович,
«Інститут біології та медицини»,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
кафедра екології та зоології, професор

доктор біологічних наук, професор
Воронкова Ольга Сергіївна,
Дніпровський національний університет
імені Олеся Гончара,
факультет медичних технологій діагностики
та реабілітації, в. о. декана

Захист відбудеться « 8 » листопада 2023 року об 11-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 08.051.04 для захисту дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук у Дніпровському національному університеті імені Олеся Гончара за адресою: 49010, м. Дніпро, пр. Гагаріна 72, корпус 17, біолого-екологічний факультет, ауд. 711.

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара за адресою: 49010, м. Дніпро, вул. Ніла Армстронга, 8.

Автореферат розісланий « 6 » жовтня 2023 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



В. О. Комлик

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Широке та неконтрольоване застосування антибіотиків призвело до зростання антибіотикостійкості мікроорганізмів та розповсюдження генів резистентності в екосистемах. Антибіотики стали істотними забруднювачами довкілля, оскільки їх використання вже давно вийшло за межі первинного призначення. Встановлено значне поширення мультирезистентних мікроорганізмів та генетичних детермінант стійкості у водоймах по всьому світу (Amarasiri et al., 2019). Високі концентрації антибіотиків та мультирезистентні мікроорганізми найчастіше зустрічаються у водоймах зі значним антропогенним тиском. Проте досі не впроваджені заходи з контролю за цими речовинами у джерелах водопостачання. Зважаючи на соціально-економічні наслідки розвитку антибіотикостійкості ВООЗ розробляє стратегії, спрямовані на запобігання зростання резистентності, які включають контроль за антибіотикостійкими штамми в клінічних умовах, харчових продуктах та об'єктах навколишнього середовища. Саме тому неабиякої актуальності набуває пошук чутливих критеріїв, здатних забезпечити епідемічну безпеку водних об'єктів, що використовуються населенням як джерела господарсько-побутового водопостачання та для рекреаційних цілей.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах науково-дослідної роботи 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» (№ 0115U003902, 2014–2019 р.).

Мета та завдання досліджень. *Мета дисертаційної роботи* – дослідити рівень забруднення річки Уж за гідрохімічними показниками та визначити склад і антибіотикорезистентність мікроорганізмів екосистем річки Уж в умовах різного рівня токсичного навантаження.

Для досягнення мети поставлено такі *завдання*:

- 1) визначити гідрохімічні показники (концентрації важких металів, сполук азоту, фенолів загальних, формальдегіду) досліджених екосистем;
- 2) з'ясувати видовий склад мікробних угруповань, виділених з поверхневих вод;
- 3) визначити рівень чутливості до антибіотиків умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених із зразків води;
- 4) провести молекулярно-генетичний аналіз ізолятів, виділених із зразків води річки Уж на наявність генетичних детермінант стійкості до антибіотиків;
- 5) визначити генетичні детермінанти антибіотикостійкості в поверхневих водах та джерелах централізованого і децентралізованого водопостачання міста Ужгород та Ужгородського району;
- 6) з'ясувати наявність взаємозв'язків між рівнем токсичного навантаження, складом мікробного ценозу та рівнем антибіотикорезистентності мікроорганізмів досліджених водних екосистем;

7) на основі результатів досліджень розробити рекомендації щодо введення нового чутливого показника якості води в систему санітарно-епідеміологічного контролю якості питної води.

Об'єкт досліджень – антибіотикорезистентність мікробоценозів екосистем річки Уж із різним рівнем токсичного забруднення.

Предмет дослідження – показники гідрохімічного та мікробіологічного стану водних екосистем в умовах токсичного навантаження.

Методи дослідження – польові, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, спектрофотометричні, фотометричні, фотоколориметричні, мас-спектрометричні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. З'ясовано склад мікробних угруповань поверхневих вод транскордонної річки Уж. Виявлено значне поширення умовно-патогенних бактерій, які мають високий ступінь антибіотикорезистентності, встановлено залежність між антибіотикорезистентністю мікробоценозів та рівнем токсичного забруднення водних екосистем. Доведено та обґрунтовано необхідність введення показника антибіотикочутливості в систему санітарно-гігієнічної оцінки якості води.

Уперше:

- встановлено видовий склад умовно-патогенних грамнегативних мікроорганізмів, виділених з водойми на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження;

- визначено рівні чутливості умовно-патогенних мікроорганізмів до антибіотиків та виявлено гени стійкості полірезистентних та мультирезистентних культур;

- досліджено гени стійкості на ділянках з різним ступенем антропогенного навантаження у зразках води з річки Уж;

- проведено комплексний моніторинг визначення рівня важких металів у системі вода-донні відклади річки Уж;

- виявлено гени резистентності з джерел централізованого та децентралізованого водопостачання в умовах м. Ужгород та Ужгородського району;

- встановлено взаємозв'язок між рівнем стійкості мікроорганізмів до антибіотиків та ступенем антропогенного навантаження на гідроекосистему, зумовленим зростанням концентрацій важких металів та сполук азоту;

- за результатами дослідження розроблено рекомендації щодо використання показника ступеня чутливості мікроорганізмів до антибіотиків як індикатора антропогенного забруднення водного середовища.

Практичне значення одержаних результатів. Особливості просторового поширення умовно-патогенних мікроорганізмів та їхня чутливість до антибіотиків дозволяють виявити ступінь впливу антропогенного навантаження на гідроекосистеми та оцінити їхню потенційну епідемічну небезпеку. Обґрунтовано необхідність введення в систему санітарно-епідеміологічного моніторингу тесту на чутливість до антибіотиків, що забезпечить підвищення вірогідності прогнозу інфекційної небезпеки досліджуваних водних об'єктів. Отримані результати необхідні для підвищення ефективності епідеміологічного нагляду та моніторингу в

боротьбі з інфекційними захворюваннями, вирішення низки теоретичних і практичних питань санітарної мікробіології та гігієни. Вони важливі при проведенні:

- профілактичних заходів при масових інфекційних захворюваннях;
- спостережень та екологічного контролю за станом водних об'єктів (річки, озера, водосховища, джерела централізованого водопостачання);
- екологічних обстежень водних об'єктів і прогнозуванні якості води.

Матеріали дисертації використовуються при викладанні курсів та практичних занять для студентів закладів вищої освіти медичного та біологічного профілю з таких дисциплін: «Санітарна мікробіологія», «Екологія мікроорганізмів», «Загальна мікробіологія», «Гігієна і санітарія».

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора, в якій проаналізовано наукову літературу за обраною темою, визначено мету та завдання роботи, розроблено та обґрунтовано програму та методи досліджень, проаналізовано отримані експериментальні дані, проведено їхню інтерпретацію та сформульовано основні висновки та положення роботи, підготовлено матеріали до публікацій. Дисертаційну роботу виконано особисто автором на базі кафедри генетики, фізіології рослин та мікробіології ДВНЗ «Ужгородський національний університет», а саме: проведено аналіз літературних джерел за темою дисертації; проведено дослідження просторового розподілу мікробних угруповань річки Уж протягом трьох вегетаційних періодів 2016, 2018 та 2020 років; здійснено ідентифікацію виділених штамів та постановку на чутливість до антибіотиків; статистичну обробку даних. Пілотні дослідження з визначення важких металів у зразках води та донних відкладів річки Уж проводили спільно зі страшим науковим співробітником відділу фізіології живлення рослин Михальською Л. М. та д. б. н., професором Швартау В. В. (Інститут фізіології рослин та генетики НАН України). Моніторингові дослідження з визначення концентрацій важких металів, сполук азоту, фенолів та формальдегіду в зразках води та донних відкладів у сезонній трирічній динаміці проведено на базі лабораторії вод Басейнового управління водних ресурсів річки Тиса спільно з керівником лабораторії Сеник Л. М. Молекулярно-генетичні дослідження проведено на базі лабораторії медичного центру «Інтерсоно Medicover Group» спільно з завідувачем клініко-діагностичної лабораторії Чорненькою О. І. Планування роботи, аналіз та узагальнення отриманих результатів проведено за консультативної допомоги наукового керівника д. б. н., професора Кривцової М. В.

Апробація результатів дисертації. Матеріали, викладені у дисертаційній роботі, апробовані на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях: на VII та X регіональних конференціях молодих вчених та студентів «Проблеми збереження біорізноманіття Українських Карпат» (Ужгород, 2014, 2017), III International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century» (Київ, 2018), науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека» (Київ, 2018), I міжнародному конгресі «Раціональне використання антибіотиків» (Київ, 2018), International Congress on Biological and Health Sciences (Афьонкарагісар, 2020), Науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека» (Київ, 2020),

I Міжнародній науково-технічній конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (Тернопіль, 2021), IV International Scientific Conference «Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century» (Київ, 2022), II Міжнародній науково-технічній конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (Тернопіль, 2023).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 18 наукових праць, із яких: три статті у наукових журналах, що входять до наукометричних баз даних Scopus та Web of Science, одна стаття у періодичному науковому виданні іншої держави та чотири – у наукових фахових виданнях України, 10 матеріалів та тез доповідей вітчизняних і міжнародних конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, практичних рекомендацій та одного додатку. Загальний список використаної літератури містить 220 джерел, з яких 130 – іноземними мовами. Повний обсяг дисертації становить 147 сторінок. Робота містить 8 таблиць, 56 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ПРОБЛЕМИ ЗАБРУДНЕННЯ ПРІСНОВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ. У розділі узагальнено літературні дані про основні джерела забруднення поверхневих вод (Колесник, 2015; Шостак, Полукаров, 2017; Гандзюра та ін., 2021; Hampson et al., 2017; Kirschner et al., 2017; Mandaric et al., 2018; Schweitzer & Noblet, 2018; Fomicheva & Nasibulina, 2019; Hu et al., 2020; Zolkefli et al., 2020; Zolkefli et al., 2021). Розглянуто роль мікробного забруднення водойм, обґрунтовано ризики, обумовлені бактеріальним забрудненням води для здоров'я людини (Тропівська, Нідзвецька, 2018; McClung et al., 2017; Fotina et al., 2019; Fourie et al., 2019; Chijoke et al., 2021; Gandziura et al., 2023). Висвітлено проблему зростання мікроорганізмів з множинною стійкістю у водних середовищах та їхню роль у передачі генетичних детермінант стійкості (Виноградова та ін., 2013; Сазикіна та ін., 2016; Сазикін та ін., 2021; Khan et al., 2016; Xu et al., 2016; Mate et al., 2017; Laurens, et al., 2018). Наведено порівняльну характеристику якості питної води в різних країнах світу (Прибилова, 2016; Spinu et al., 2016; Kittinger et al., 2016; Giebułtowicz et al., 2018; Kittinger et al., 2018; Alygizakis et al., 2019; Wang et al., 2019; Koniuszewska et al., 2020; Yang et al., 2020; Zhang et al., 2020; Banciu et al., 2021; Dielacher et al., 2021).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. У розділі описано розташування моніторингових точок пробовідбору зразків води із річки Уж. Відбір зразків проводили з 8-ми точок, які характеризувалися різним рівнем антропогенного навантаження на водойму: 1) рекреаційна, що на території витoku річки; 2) техногенно-трансформована (знаходиться в межах міста Перечин, де розміщений Перечинський лісохімічний комбінат); 3) урбанізована (охоплює територію міста Ужгород і прилеглих сіл); 4) аграрна (розташована в районі с. Сторожниця, де зосереджена значна кількість сільськогосподарських угідь і фермерських господарств). Результати польових досліджень дозволили визначити потенційні джерела антропогенного забруднення водойми, які розміщувались по всій протяжності річки Уж.

Також в цьому розділі описано методи визначення хімічних токсикантів у зразках води, мікробіологічних показників стану мікробіоценозу води та донних відкладів, антибіотичну активність мікробних популяцій. Представлено методи молекулярно-генетичних досліджень із визначення генетичних детермінант стійкості до антибіотиків у зразках води з поверхневих вод і джерел водопостачання.

ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ЗА ГІДРОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ.

Вміст важких металів у системі «вода-донні відклади» річки Уж. За результатами аналізу зразків води річки Уж, проведеного протягом весни–літа 2016, 2018 та 2020 років, встановлено перевищення нормативних значень концентрацій важких металів. Дослідження, проведені упродовж трьох років, показали значне коливання концентрацій купруму на техногенно-трансформованій території. Найвищі значення зафіксовані навесні 2016 року і перевищують ГДК_{риб.} у 10 разів, у 2018 році їхній вміст дещо знижується, перевищуючи норми у 8,6 разів, а у 2020 році знову підвищується до попередніх значень, перевищуючи ГДК у 9,8 разів (моніторингова ділянка № 3). Вміст цинку характеризується схожим до міді просторовим розповсюдженням, наднормативні значення металу зафіксовані в літній період у зоні промислового напруження, де перевищують ГДК_{риб.} від 1,1 до 4,5 раза (створи № 4, № 3) у 2016 році, в 3,8 раза в 2018 році, та у 4,8 раза в 2020 році.

Стосовно нормативних значень для водойм господарсько-побутового користування, то перевищення концентрацій Cr не зафіксовано, проте встановлено незначні перевищення ГДК_{риб.} у межах техногенно-трансформованої території, де в 2016 році вміст хрому у воді перевищував норми в 7,1 раза, в 2018 році в 6,6 раза та в 2020 році в 7,5 раза. Протягом досліджуваного періоду з 2016 по 2020 роки найвищі концентрації плюмбуму вставлені на техногенно-трансформованій території. За результатами, проведеними в 2020 році, вміст металу сягає наднормативних значень щодо норм для водойм господарсько-побутового користування та зростає в 10 разів порівняно з фоновими показниками. Вміст арсену зростає в напрямку до пониззя річки та сягає максимальних значень у межах аграрної території, й порівняно з фоновими значеннями збільшується в 3–4 рази протягом досліджуваного періоду.

Вміст сполук азоту та летких органічних сполук у воді річки Уж. У результаті проведених досліджень протягом 2016, 2018 та 2020 років виявлено, що найбільш забрудненою сполуками азоту є техногенно-трансформована та аграрна території.

Вміст нітритів сягав високих значень на моніторинговій ділянці № 3, перевищуючи фонові значення в 73,3 раза, а ГДК_{риб.} в 13,7 раза в літній період. Навесні 2018 року відмічені перевищення фонових значень нітрит-іонів у 49 разів, а нормативних – у 12,2 раза. За межами техногенно-трансформованої території концентрації нітритів дещо знижуються, проте в пониззі річки знову зростають, перевищуючи фоновий показник на ділянці № 8 у 18 разів у 2018 році. Підвищений рівень нітратів зафіксовано у межах аграрної території, а саме на моніторинговій ділянці № 8, й перевищує фоновий показник у 42 рази навесні 2018 року та у 26,8 раза у 2020 році.

За період досліджень концентрація азоту амонійного у поверхневих водах річки зростала на техногенно-трансформованій території та поступово знижувалась у

напрямку до пониззя водойми, а саме до ділянки річки в межах аграрного впливу. У межах моніторингової ділянки № 3 техногенно-трансформованої ділянки вміст азоту амонійного перевищував ГДК_{риб} у 26,8 раза, а фонові значення у 52,7 раза навесні 2018 році. Влітку 2018 року концентрації забруднювача зростали та перевищували фоновий вміст в 70,5 раза.

Дані результати вказують на значний ступінь органічного забруднення річки, що свідчить про безперервне надходження сполук органічного походження у водойму. У ході проведених досліджень встановлені локальні зони басейну річки Уж із найвищими концентраціями сполук азоту, серед таких техногенно-трансформована та аграрна території.

Вміст фенолів та формальдегіду у зразках води річки Уж коливалися в межах норми протягом трьох років, проте на техногенно-трансформованій території виявлені незначні перевищення ГДК_{риб}. Підвищений вміст фенолів загальних та формальдегіду у воді техногенно-трансформованої ділянки є наслідком потрапляння промислових відходів у навколишнє середовище.

СКЛАД МІКРОБОЦЕНОЗІВ ГІДРОЕКОСИСТЕМ ТА ЇХНІЙ СТАН В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ. *Розподіл мікробних угруповань річки Уж в умовах антропогенного навантаження.* За результатами моніторингових досліджень, проведених протягом трьох вегетативних сезонів 2016, 2018 та 2020 років, встановлено, що найбільш поширеною групою мікроорганізмів річки Уж були бактерії, які використовують органічні форми азоту.

За межами контрольної точки чисельність сапрофітів зростає, особливо на техногенно-трансформованій території за 100 м від впадіння струмка Доморадж у річку Уж та на аграрній місцевості (ділянка № 8), де протягом трьох років відмічено високі титри мікроорганізмів – 10^5 – 10^6 КУО/мл. Індекс бактерій групи кишкових паличок зростає за межами міста та сягає максимальних значень, перевищуючи контрольні показники у 13,3 раза протягом весняних місяців 2016 року та в 82,1 раза у літній період 2018 року. У досліджуваній водоймі вміст оліготрофних бактерій коливався у значних межах, найменші значення зафіксовані на аграрній та техногенно-трансформованій території 10^3 – 10^4 КУО/мл. Нітрифікувальні бактерії переважали в контрольній ділянці та на аграрній території, їх зменшення в зоні техногенної та урбанізованої території протягом досліджуваного періоду 2016, 2018 та 2020 років, ймовірно, спричинене підвищеним вмістом важких металів та органічних сполук (фенолів, формальдегіду), які, як відомо, можуть спричиняти інгібуючий ефект, навіть коливаючись у межах гранично допустимих концентрацій (Кирсанов, 2017).

За результатами проведених досліджень целюльозоруйнівні мікроорганізми виявилися найбільш поширеними в межах аграрної та техногенно-трансформованої території: на ділянці № 3 спостерігається перевищення фонових значень в 29 разів, а на ділянці № 8 в 20 разів навесні 2016 року. Влітку кількість целюльозоруйнівних бактерій зростає, на аграрній території (моніторингова ділянка № 8) зафіксоване зростання у 2,3 раза в літні місяці 2020 року.

Протягом досліджуваного періоду найбільшу чисельність мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту, зафіксовано в районі аграрної ділянки

навесні 2020 року, яка перевищувала фонові показники у 18,5 раза. Найменша чисельність досліджуваних бактерій зафіксована на техногенно-трансформованій території, вірогідно, це пов'язано з неналежними умовами, сформованими під впливом техногенного екотопу.

За результатами проведених досліджень поширення мікроскопічних грибів у водоймі залежало від температурного фактора та низки зовнішніх чинників. Найменшу кількість мікроміцетів виявлено на рекреаційній та техногенно-трансформованій територіях 10^2 – 10^3 КУО/мл, що зумовлено посиленою сонячною інсоляцією у високогірних районах рекреаційної місцевості та підвищеними концентраціями токсикантів у межах техногенно-трансформованої території (Babič et al., 2017).

Встановлення взаємозв'язків між гідрохімічними та мікробіологічними показниками якості природних вод. На основі отриманих результатів мікробіологічних та гідрохімічних досліджень протягом вегетативних сезонів 2016, 2018 та 2020 років встановлено кореляційні зв'язки між динамікою концентрацій сполук азоту у воді та чисельністю представників алохтонної та автохтонної мікробіоти води річки Уж.

Проведений аналіз дозволив виявити позитивні кореляційні зв'язки між мікроорганізмами, що засвоюють органічні форми азоту, та сполуками азоту, так протягом 2016 року прослідковується прямий зв'язок між зростанням бактерій та хімічних сполук на техногенно-трансформованій ділянці (точки № 3, № 4) (рис. 1).



Рис. 1. Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами, виділеними з води річки Уж (весна, 2016 р.), $p \leq 0,05$

На урбанізованій та аграрній території зв'язок між NO₃ та сапрофітами варіює від слабкого до оберненого протягом трьох років, в той час, як по відношенню до NO₂ та NH₄ кореляційний зв'язок залишається незмінним, що свідчить про спільне джерело надходження біогенних речовин та мікроорганізмів (рис. 2).



Рис. 2. Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами, виділеними з води річки Уж (літо, 2016 р.), $r \leq 0,05$

Коливання чисельності мікроскопічних грибів у воді знаходилось у зворотній залежності зі зростанням концентрацій сполук азоту. На всіх моніторингових ділянках, крім аграрної території, зростання токсикантів корелювало зі зменшенням кількості мікроміцетів. Протягом досліджуваного періоду встановлений помірний та сильний зв'язок між зростанням кількості бактерій групи кишкової палички та забрудненням води сполуками азоту. Найбільш виражений зв'язок між зростанням вмісту нітратів та даних мікроорганізмів проявляється на урбанізованій території, зокрема за містом Ужгород, що є наслідком надходження забруднюючих речовин до водойми разом із скидом несанкціонованих стічних вод і змивами з прилеглих територій (рис. 3, 4).



Рис. 3. Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами, виділеними з води річки Уж (літо, 2018 р.), $r \leq 0,05$

Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та групами мікроорганізмів

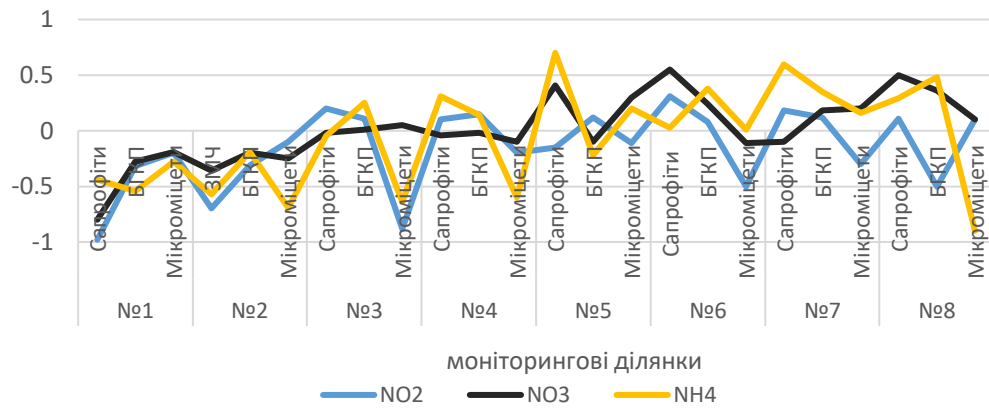


Рис. 4. Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами, виділеними з води річки Уж (весна, 2020 р.), $p \leq 0,05$

На рекреаційній території (точка № 1) та на території до м. Перечин (точка № 2) встановлений негативний зв'язок між змінами концентрацій сполук азоту та коливанням кількості мікроорганізмів, ці території належать до екологічно чистих та малозаселених (рис. 5).

Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та групами мікроорганізмів

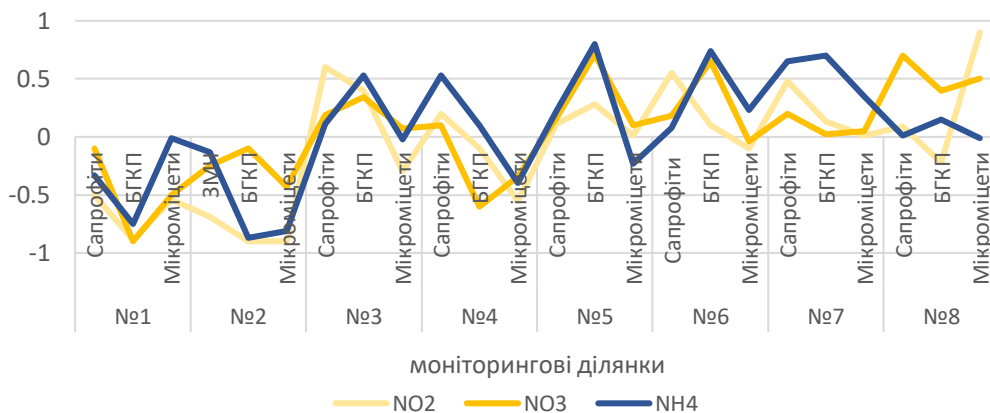


Рис. 5. Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами, виділеними з води річки Уж (літо, 2020 р.), $p \leq 0,05$

Видове різноманіття домінуючих представників мікробних спільнот річки Уж. Під час проведення просторового моніторингу мікробіологічних показників річки Уж визначено, що 38,1 % з виділених штамів належали до грамозитивних паличок та коків, а переважаючою групою виявилися грамнегативні мікроорганізми – 61,9 %, які циркулювали у воді протягом року. Так, у мікробному спектрі води кількісно переважала грамнегативна мікробіота, яка належала до родини *Enterobacteriaceae*. Таксономічна характеристика виділених мікроорганізмів включала 10 родів та 16 видів. Впродовж 2016, 2018 та 2020 років на моніторингових ділянках виділено 665 ізолятів. Найчастіше з-поміж представників грамнегативної мікробіоти водою зустрічалися мікроорганізми роду *Escherichia*, які виділяли зі зразків води по всій

протяжності річки Уж. У кількісному співвідношенні представники роду *Escherichia* spp переважали на техногенно-трансформованій території (64,2 %), у меншій кількості зустрічалися роди *Citrobacter* (14,6 %), *Edwardsiella* spp (3,3 %), *Providencia* spp (8,6 %) та *Enterobacter* spp (9 %). Нижче за течією водойми, в зоні урбанізованої місцевості, переважали мікроорганізми родів *Klebsiella* spp. (17,2 %), *Escherichia* spp. (59,2 %), *Salmonella* spp. (10,9 %) та *Acinetobacter* spp. (12,5 %). У пониззі річки, а саме на територіях села Сторожниця, виділені представники родів *Citrobacter* spp. (47,1 %), *Proteus* spp. (20,7 %), *Pseudomonas* spp. (6,7 %), *Salmonella* spp. (10,5 %), *Enterobacter* spp. (15,0 %).

ЧУТЛИВІСТЬ МІКРОБНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ВОДОЙМИ ДО АНТИБІОТИКІВ. Чутливість умовно-патогенних мікроорганізмів річки Уж до антибіотиків. У ході роботи зі зразків води річки Уж було виділено мікроорганізми, з яких найчисленніша група належала до родини *Enterobacteriaceae*.

Так, з огляду на потенційну небезпеку грамнегативних мікроорганізмів, виділених із зразків води, проведено дослідження на чутливість до антибіотиків різних груп (рис. 6). Відповідно до рисунків 7 та 8, найвищі ступені резистентності спостерігаються на техногенно-трансформованій та аграрній територіях. Показники стійкості зростають нижче за течією річки з помітним збільшенням за межами поселень та в місці скиду стічних вод заводу. За межами заводу відмічається високий рівень стійкості до β -лактамів та до тетрациклінів. Порівняно з іншими територіями зростає кількість мультирезистентних форм та стійкість до карбапенемів та «захищених» антибіотиків (ампіцилін сульбактам, цефоперазон сульбактам).

Територія за межами заводу забруднена важкими металами та сполуками азоту, що може бути основним фактором зростання рівня антибіотикостійкості (Bilkey & Nikolaichuk, 2017; Bilkei & Kryvtsova, 2018). Відомо, що високі концентрації важких металів сприяють поширенню та накопиченню генів антибіотикорезистентності (Martins et al., 2014).

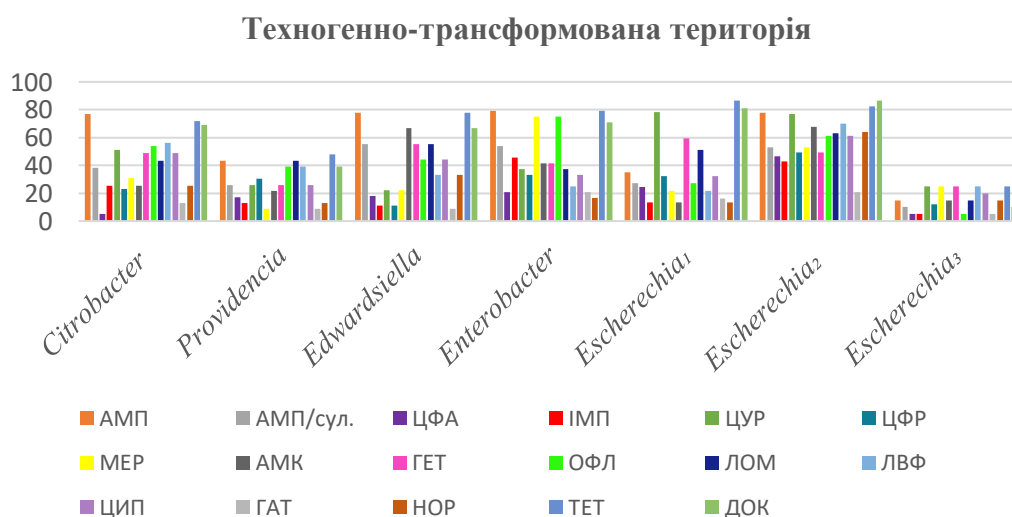


Рис. 6. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів, виділених з техногенно-трансформованої ділянки:

*Роди *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*¹ – дослідна ділянка № 3; роди *Providencia*, *Escherichia*² – дослідна ділянка № 4; рід *Escherichia*³ – дослідна ділянка № 2.

Аграрна територія

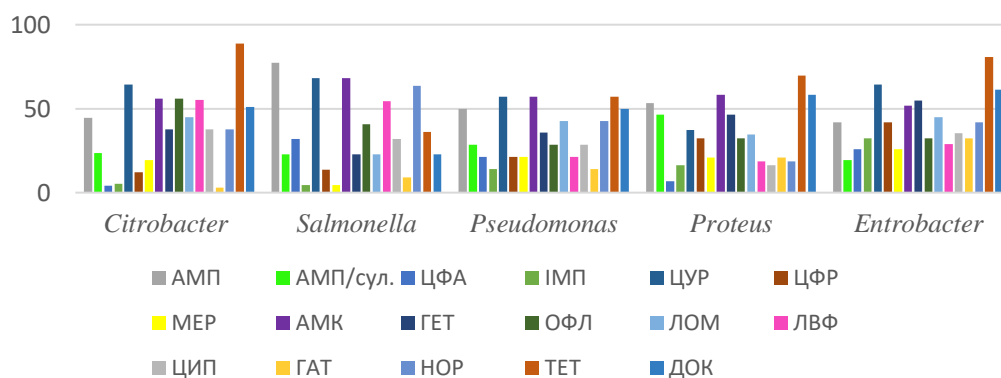


Рис. 7. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів виділених з аграрної ділянки:

*Роди *Citrobacter*, *Proteus* – дослідна ділянка № 7; роди *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* – дослідна ділянка № 8.

Нижче за течією річки, в межах міста, спостерігається дещо вищий ступінь чутливості до антибіотиків, ніж на антропогенно-навантаженій ділянці, проте зберігається тенденція до порівняно високого рівня резистентності до тетрациклінів та пеніцилінів (рис. 8). На аграрній території, в пониззі річки, зростає стійкість до фторхінолонів другого покоління та на незмінно високому рівні залишається стійкість до антибіотиків природного походження (ампіцилін, гентаміцин, тетрациклін).

Урбанізована територія

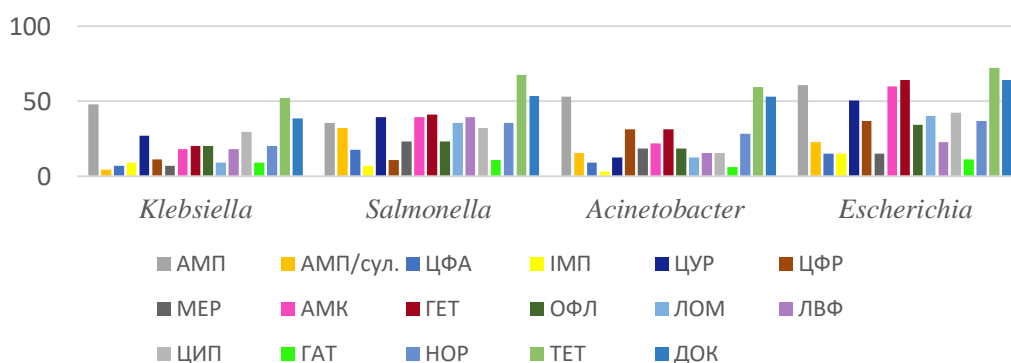


Рис. 8. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів, виділених з урбанізованої ділянки:

*Роди *Klebsiella*, *Acinetobacter* spp. – дослідна ділянка № 5; роди *Salmonella*, *Escherichia* – дослідна ділянка № 6.

Варто зазначити, що незначний відсоток стійкості характерний для карбапенемів (іміпенем, карбапенем) та цефалоспоринів третього покоління (цефтріаксон). З огляду на вище вказані результати, антибіотикорезистентності води річки Уж в районі антропогенно-навантаженої території зазнав найбільших змін під впливом несприятливих умов, зумовлених забрудненням даної території.

Вивчення здатності до біоплівкоутворення ізолятів роду *Escherichia* виділених із зразків води. У процесі проведення досліджень із визначення чутливості мікроорганізмів, виділених зі зразків води, встановлено, що бактерії роду *Escherichia* характеризувалися резистентністю до двох і більше антибіотиків, що спонукало до вивчення їхньої здатності до утворення біоплівки. Проведені дослідження показали, що найбільшу здатність до біоплівкоутворення проявляли штами роду *Escherichia*, виділені з техногенно-трансформованої території – 38 ізолятів, а також із урбанізованої місцевості – 17 ізолятів. За результатами аналізу щільності до біоплівкоутворення встановлено, що більшість штамів формували біоплівку високої щільності, тобто з усіх протестованих штамів 28 % (34 ізоляти) було властиве формування щільної біоплівки. Найбільша щільність формування біоплівок властива ізолятам, що виділені з техногенно-трансформованої території – 20 % (24 ізоляти). Виділені ізоляти роду *Escherichia*, які проявляли біоплівкотвірні властивості, характеризувалися найвищим рівнем резистентності до таких антибіотиків, як ампіцилін, тетрациклін, гентаміцин та доксициклін. Порівняльний аналіз резистентності планктонних мікроорганізмів показав найбільшу чутливість до фторхінолонів IV покоління та карбапенемів. Аналогічні закономірності виявлені і серед мікроорганізмів, здатних утворювати біоплівку. Проведені дослідження вказують на значний рівень розповсюдження мультирезистентних біоплівкотвірних бактерій у водному середовищі.

Генотипові детермінанти антибіотикорезистентності мікробних популяцій річки Уж. Для визначення генетичних детермінант стійкості (*bla*_{TET}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{NDM}) були обрані мультирезистентні грамнегативні мікроорганізми, які домінували в мікробіомі досліджуваних територій. У мікроорганізмів, виділених у зоні розташування лісохімічного заводу, серед яких переважали представники роду *Escherichia*, виявлено наявність генів стійкості до тетрациклінів (*bla*_{TET} – 33 %) та β-лактамаз (*bla*_{TET-M} – 37,5 %). Протестовані мікроорганізми виявляли й високий рівень фенотипової стійкості до відповідних груп антибіотиків (рис. 9).

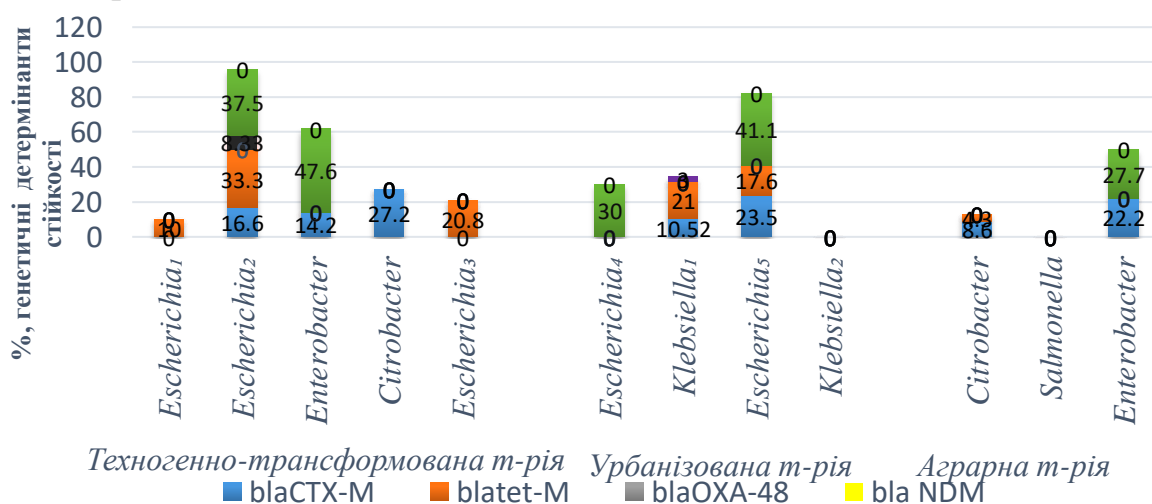


Рис. 9. Генетичні детермінанти резистентності, виділені з фенотипово стійких штамів на ділянках з різним характером антропогенного навантаження:

**Escherichia*₁ – до м. Перечин; *Escherichia*₂, *Enterobacter*, *Citrobacter*₁ – в межах струмка Доморадж, *Escherichia*₃ – за м. Перечин; *Escherichia*₄, *Klebsiella*₁ – до м. Ужгород; *Escherichias*; *Klebsiella*₂ – за м. Ужгород; *Salmonella*, *Enterobacter* – до с. Сторожниця; *Citrobacter* – за с. Сторожниця.

У межах урбоєкосистеми спостерігається значне поширення генів ESBL, таких, як *bla*TEM та *bla*CTX–M. Найбільший відсоток *bla*TEM генів зафіксований серед представників роду *Escherichia*. За результатами попередніх досліджень бактерії роду *Escherichia* характеризуються більшою часткою поширення резистентності (наприклад, ESBL) у природних спільнотах, ніж на інші ентеробактерії (Brolund & Sandegren, 2016). На території, що підпадає під вплив агросектору, виділено ESBLs, найбільша частка з яких припадає на гени типу *bla*CTX–M, які кодують резистентність до хінолонів. Результати мікробіологічних досліджень також вказують на зростання резистентності до фторхінолонів другого та третього покоління на вказаній дослідній ділянці.

У цьому дослідженні виявлено появу більш ніж однієї β-лактамази в одному й тому ж ізоляті, гени *bla*TEM зустрічалися як поодинокі, так і в комбінації з *blatet* генами. Це свідчить про еволюціонування мікроорганізмів до стійкості до протимікробних препаратів.

Розповсюдження генетичних детермінант стійкості в природних водах та джерелах водопостачання. Основним джерелом централізованого водопостачання міста Ужгород та прилеглих сіл є поверхневі води річки Уж, в яких, за попередніми дослідженнями, виявлені мікроорганізми-носії генів резистентності. Керуючись результатами попередніх досліджень проведено тестування зразків води з джерел централізованого та децентралізованого водопостачання на наявність генетичних детермінант резистентності. Зі зразків води методами молекулярно-генетичної діагностики було виділено метагеномну ДНК та протестовано її на наявність генів резистентності до антибіотиків.

Встановлено, що в пробах води з криниці смт. Великий Березний не виявлено генів стійкості, дана територія розміщена у високогірному районі, який, за результатами польових досліджень, належить до екологічно благополучних. З тотальної ДНК води відібраної з криниці, розташованої у м. Перечин, виділено гени *blatet*. Наявність генетичних детермінант резистентності в криничній воді могли спровокувати безліч причин, серед яких неналежне санітарне облаштування колодязя, забруднення прилеглих територій, нехтування періодичним знезаражуванням згідно з санітарними вимогами або ж неправильне його проведення. У зразках криничної води села Сторожниця виділено гени типу *bla*CTX–M, територія, на якій розташована дана криниця, знаходиться у густонаселенішому районі порівняно з попередніми, а також розміщена з порушенням санітарних вимог. У пробах води, відібраних із джерел централізованого водопостачання, генетичних детермінант резистентності не виявлено.

Визначення взаємозв'язків між рівнем антропогенного навантаження та ступенем антибіотикостійкості мікроорганізмів. На основі отриманих нами результатів гідрохімічних та мікробіологічних досліджень якості води проведено аналіз взаємозв'язків між концентраціями важких металів (Cu, Ni, Zn, Cr), сполук азоту (NO₂, NO₃ та NH₄) та ступенем антибіотикорезистентності мікроорганізмів, виділених з поверхневих вод річки Уж. Наявність взаємозалежностей визначали за допомогою лінійного коефіцієнту кореляції Пірсона (r). Для визначення зв'язку між показними хімічного забруднення та ступенем антибіотикорезистентності мікроорганізмів обрано домінуючі групи мікроорганізмів, виділені із зразків води.

До таких належали мікроорганізми роду *Escherichia*, з представниками *E. coli* (n = 114), серед яких зустрічалися штами зі зміненими ферментативними властивостями, виділені на техногенно-трансформованій території; в межах урбанізованої моніторингової ділянки також були відібрані штами роду *Escherichia*, серед яких були виділені бактерії з гемолітичною активністю *E. coli* (n = 151); на аграрній території переважали мікроорганізми роду *Citrobacter* з переважаючою групою штамів *Citrobacter freundii* (n = 98). Для проведення аналізу обрано ділянки, які підпадали під найбільший антропогенний вплив: техногенно-трансформована, урбанізована та аграрна.

Результати кореляційного аналізу вказують на тісний взаємозв'язок між концентраціями Zn та підвищенням антибіотикорезистентності мікроорганізмів по всій протяжності річки Уж. Особливо сильний позитивний зв'язок прослідковується на техногенно-трансформованій території між Zn та антибіотиками, які є інгібіторами синтезу нуклеїнових кислот (рис. 10) та інгібіторами синтезу клітинної стінки бактерій (рис. 11).

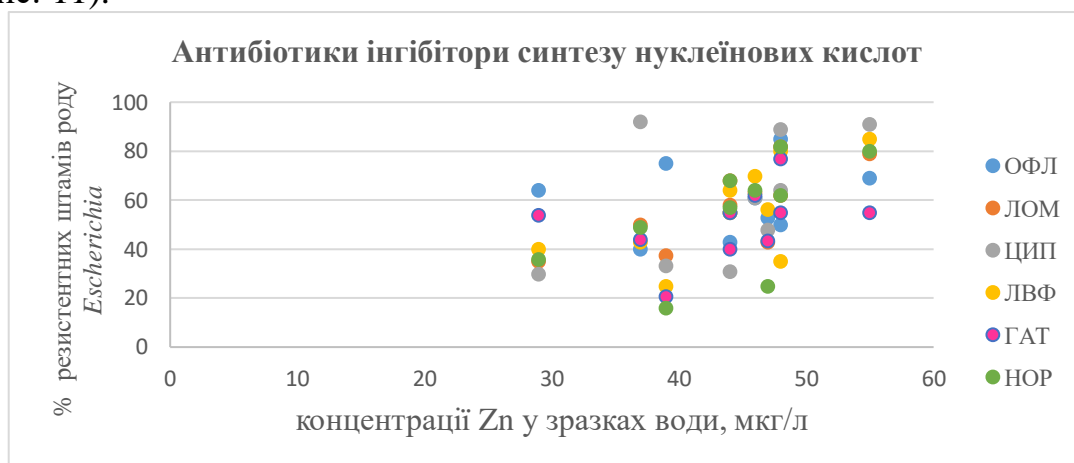


Рис. 10. Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Zn та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот

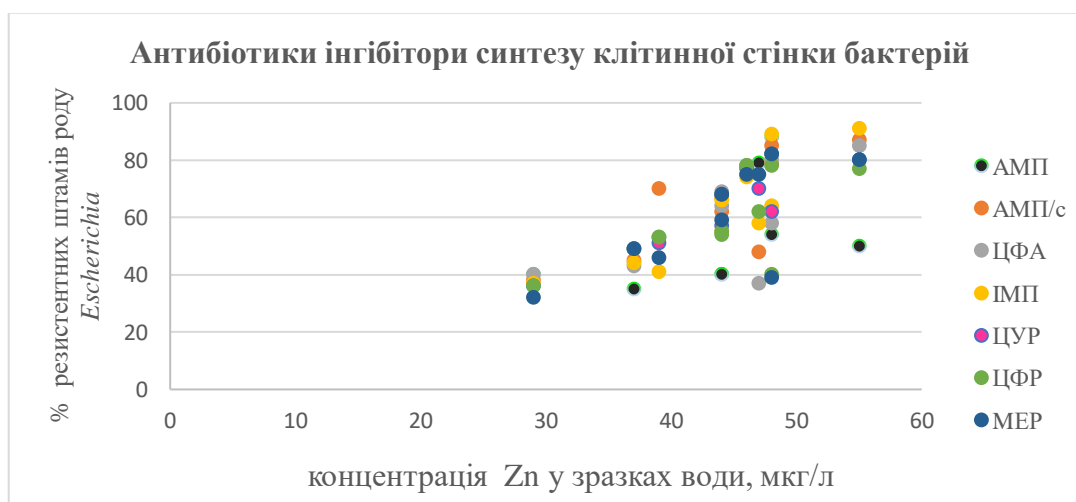


Рис. 11. Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Zn та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій на техногенно-трансформованій ділянці (n = 10, p < 0,05)

Виявлено слабкий зв'язок з Ni на досліджуваних територіях, крім урбанізованої ділянки, де концентрації Ni тісно корелюють із показниками резистентності до антибіотиків, які інгібують синтез бактеріальної стінки (рис. 12) та нуклеїнових кислот бактерій (рис. 13).

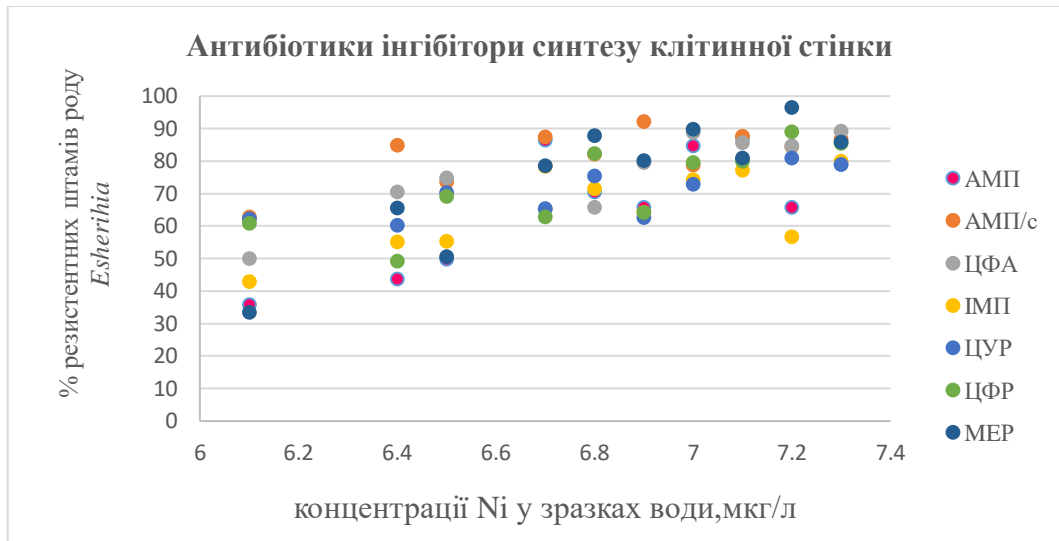


Рис.12. Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Ni та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій на урбанізованій ділянці (n = 10, p < 0,05)



Рис.13. Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Ni та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот бактерій на урбанізованій ділянці (n = 10, p < 0,05)

Серед досліджених показників сполук нітрогену (нітрати, нітрити, нітрогену амонійного) виявлено високі кореляційні зв'язки між концентраціями нітратів і ступенем антибіотикорезистентності досліджуваних мікроорганізмів на урбанізованій та аграрній територіях. Значні зв'язки спостерігали на аграрній ділянці між концентраціями нітритів, азоту амонійного та штамів, стійких до антибіотиків інгібіторів синтезу бактеріальної стінки (рис. 14) та інгібіторів синтезу білка (рис. 15).

За результатами наших досліджень на вказаній ділянці водойми фіксували найвищі концентрації сполук азоту.

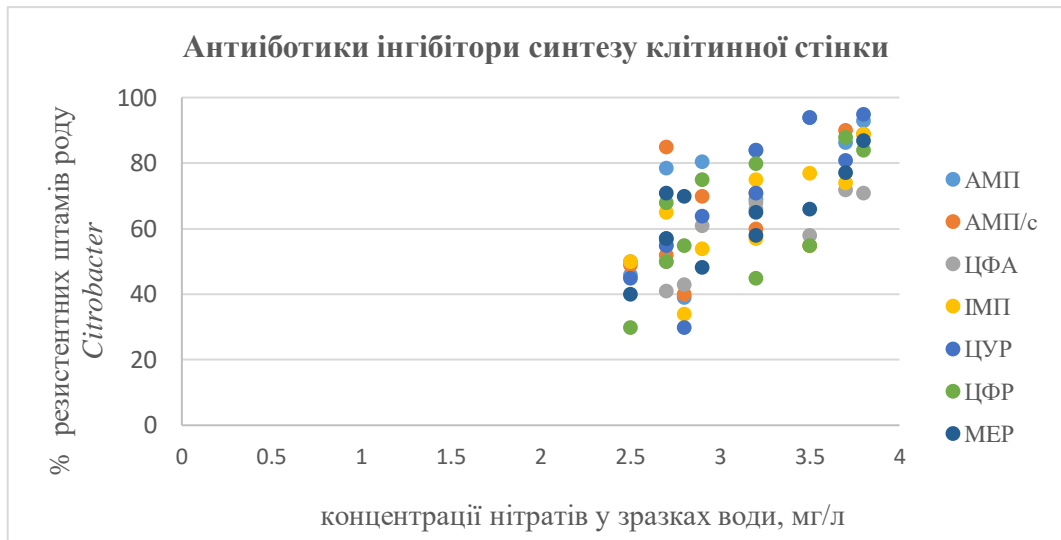


Рис. 14. Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями нітрат-іонів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій на аграрній ділянці ($n = 10$, $p < 0,05$)

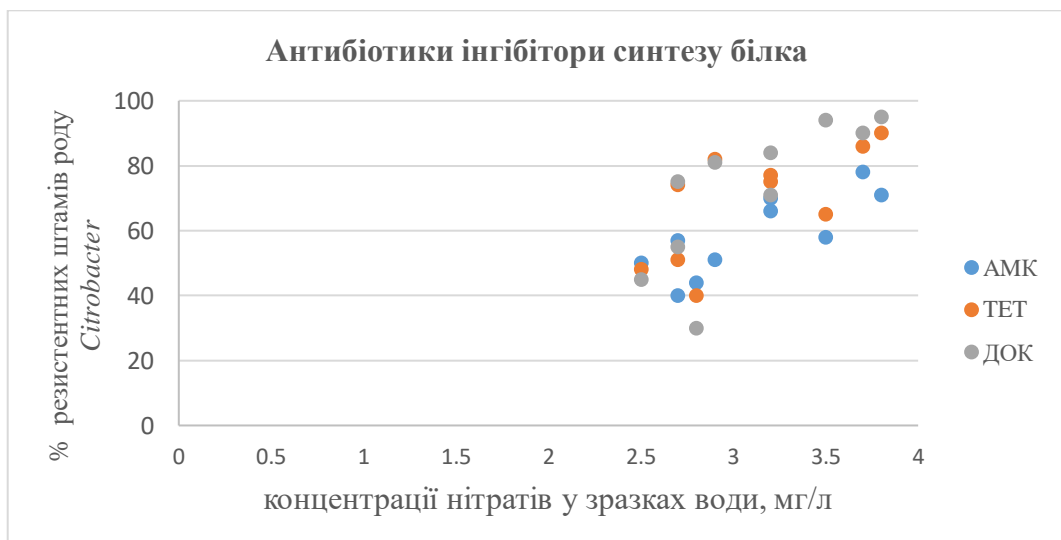


Рис.15. Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями нітрат-іонів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу білка на аграрній ділянці ($n = 10$, $p < 0,05$)

Отже, встановлено, що існують чіткі взаємозв'язки між розвитком антибіотикорезистентності та концентраціями металів і сполук нітрогену у водоймі. Це може бути обумовлено як джерелами забруднення, так і безпосереднім впливом токсикантів на розвиток механізмів стійкості.

ВИСНОВКИ

1. У зразках води річки Уж виявлені підвищені концентрації важких металів, які значно перевищують допустимі норми ГДК_{риб} (Cu у 10 разів, Cr в 7,5 раза, Zn у 4,8 раза) у межах техногенно-трансформованої території, на рівнинній частині (урбанізована та аграрна території) встановлений підвищений вміст Cu, V та As. У донних відкладах техногенно-трансформованої ділянки відмічено зростання концентрацій важких металів порівняно з фоновими значеннями: Cr у 18,8 раза та Ni у 7 разів в літній період, на урбанізованій – Pb у 13,2 рази, а на аграрній – Cu у 41,8 та As у 38,9 раза.

2. Найвищий вміст сполук азоту у зразках води встановлений на аграрній та техногенно-трансформованій ділянці; максимальні концентрації поллютантів виявлені у 2018 році з перевищенням нітритів ГДК_{риб} у 13,7 раза (ділянка № 3), азоту амонійного – у 26,8 раза (ділянка № 3) в той час, як нітрати не перевищували ГДК_{риб} і були більшими за фонові показники у 42 рази (ділянка № 8). У зразках води феноли загальні та формальдегід знаходились у допустимих межах по всій протяжності річки Уж.

3. Серед ізольованих представників алохтонної та автохтонної мікробіоти річки Уж найпоширенішою групою мікроорганізмів були бактерії, які використовують органічні форми азоту. В найвищому титрі 10^5 – 10^6 КУО/мл зустрічались в межах техногенно-трансформованої та аграрної територій в 2016 та 2020 роках. Урбанізована територія характеризувалась зростанням кількості мікроорганізмів групи кишкових паличок (моніторингова ділянка № 6), які перевищували контрольні показники у 13,3 раза навесні 2016 року та у 82,1 раза у літній період 2018 року аграрна – зростанням кількості мікроміцетів до 10^6 КУО/мл.

4. Порівняльна характеристика співвідношення автохтонних та алохтонних мікроорганізмів, виділених на ділянках із різним характером антропогенного навантаження, вказує на найбільші перебудови у складі мікробіоценозу в районі техногенно-трансформованої території, які є наслідком трансформації екосистеми під впливом високих концентрацій токсикантів. Видовий спектр мікроорганізмів річки Уж представлений переважно грамнегативною мікробіотою – 61,9 %, яка належить до родини *Enterobacteriaceae*, серед умовно-патогенних мікроорганізмів домінантними є роди *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* та *Citrobacter*.

5. Досліджувані штами характеризуються асоційованою стійкістю до 2–3 фармакологічних груп антибіотиків, однак прослідковується чітка залежність між збільшенням резистентності до 3–4 груп зі ступенем забруднення досліджуваної території. Найвища стійкість виявлена до антибіотиків природного походження (тетрациклінів, пеніцилінів).

6. Встановлено здатність до формування біоплівки у виділених мультирезистентних мікроорганізмах роду *Escherichia*, виявлено значний рівень поширення біоплівкотвірних ізолятів – 52 % на техногенно-трансформованій території та 34 % на урбанізованій місцевості, які характеризувалися найвищим рівнем резистентності до ампіциліну, тетрацикліну, гентаміцину та доксицикліну.

7. При дослідженні домінантних полі- та мультирезистентних мікроорганізмів виявлено генетичні детермінанти стійкості *bla*TEM, *bla*KPC, *bla*SHV, *bla*CTX–M та *bla*tet–M. Досліджувані ізоляти виділені з екологічно напружених ділянок водойми.

У воді децентралізованого водопостачання міста Ужгород та Ужгородського району виявлено генетичні детермінанти стійкості *bla*CTX–M та *bla*tet–M. У зразках води централізованого водопостачання міста Ужгород маркерів резистентності не виявлено.

8. Встановлено прямий зв'язок між збільшенням концентрації важких металів (Zn, Ni), сполук азоту (NO₃) та зростанням резистентності до антибіотиків різних груп. Розроблено рекомендації щодо розширення спектра гігієнічного моніторингу якості питної води зі введенням показника чутливості до антибіотиків як індикаторного до забруднення хімічними речовинами.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. На основі отриманих результатів досліджень рекомендується включати показники антибіотикорезистентності мікроорганізмів, виділених із зразків природних вод, як додатковий елемент моніторингових бактеріологічних досліджень поверхневих вод.

2. Для вирішення проблеми поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів у довкіллі доцільно проводити дослідження на чутливість антибіотичних препаратів мікроорганізмів виділених у стічних водах та в межах очисних споруд.

3. Для зменшення розповсюдження антибіотикостійкості в довкіллі рекомендується впроваджувати контроль за рівнем антибіотикочутливості мікроорганізмів, виділених із зразків ґрунту.

4. Рекомендується включити показники антибіотикорезистентності мікроорганізмів в обов'язковий моніторинг води централізованого та децентралізованого водопостачання.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

У виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. **Savenko, M. V.**, Kryvtsova, M. V., Skliar, I. I., & Fohel, I. I. (2022). Potential risks of the spread of antibiotic-resistant microorganisms and antibiotic-resistance genes in potable water - human organism chain. *Wiadomosci lekarskie*, 75(4, pt 2), 987–992. doi:10.36740/WLek20220420112 (**Scopus**) (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
2. **Bilkei, M. V.**, & Nikolaichuk, V. I. (2017). The distribution of heavy metals content in the bottom deposits of the trans-border Uzh River system. *Biosystems Diversity*, 25(2), 145–153. doi:10.15421/011722 (**Web of Science**) (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
3. Nikolaichuk, V. I., Vakerich, M. M., & **Bilkey, M. V.** (2016). Possible ecologically based ways of preserving and developing the Ukrainian Carpathians. *Biosystems Diversity*, 24(1), 157–163. doi:10.15421/011619 (**Web of Science**) (особистий внесок: опрацювання літератури, збір та аналіз отриманих результатів).

Публікації у періодичних наукових виданнях інших держав

4. **Savenko, M.**, & Kryvtsova M. (2021). Urban aquatic ecosystems as a factor of the spread of antibiotic resistant microorganisms and resistance genes. *Transylvanian Review of*

Systematical and Ecological Research, 2(23), 1–12. doi:10.2478/trser-2021-0009 (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).

Публікації у наукових фахових виданнях України

5. **Савенко, М. В.**, Кривцова, М. В., Федурця, О. І. (2021). Вплив антропогенного навантаження на структуру мікробоценозу річки Уж (Україна). *Екологічні науки*, 4(37), 52–59. doi:10.32846/2306-9716/2021.eco.4-37.7 (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
6. **Савенко, М. В.**, Кривцова, М. В., Костенко, Є. Я., Анісімов, Є. М., Скляр, І. І. (2021). Циркуляція антибіотикорезистентних ізолятів бактерій родини *Enterobacteriaceae* у системі людина-водні екосистеми. *Український журнал медицини, біології та спорту*, 3(31), 232–237. doi:10.26693/jmbs06.03.232 (особистий внесок: моделювання експериментів, збір та аналіз отриманих результатів, написання статті).
7. **Savenko, M. V.**, & Kryvtsova, M. V. (2020). Anthropogenic impact on the development of resistance to antibiotics in microorganisms of the Uzh River (Ukraine). *Studia Biologica*, 14(3), 79–90. doi:10.30970/sbi.1403.633 (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
8. **Білкей, М. В.**, Кривцова, М. В. (2018). Просторово-часова характеристика мікробіологічних та гідрохімічних показників якості поверхневих вод річки Уж (Україна). *Біоресурси і природокористування*, 10(5–6), 24–37. doi:10.31548/bio2018.05.004 (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).

Публікації, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

9. **Savenko, M. V.**, & Kryvtsova, M. V. (2023). Distribution of antibiotic resistance genes in microorganisms in potable water-human organism chain. *Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти*: Тези доповідей II Міжнародної науково-технічної конференції. (С. 106). Тернопіль. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
10. **Savenko, M. V.**, Kryvtsova, M. V., & Hanych, T. T. (2022). Phenotypic and genotypic characterization of microorganisms in the human-drinking water system. *Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century*: Abstracts book of the IV International Scientific Conference. (P. 48). Kyiv. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
11. **Savenko, M. V.**, & Kryvtsova, M. V. (2021). The impact of anthropogenic pollution on the development and spread of resistance genes in surface waters. *International congress on biological and health sciences*: Abstracts book of the Third International Congress on Biological and Health Sciences. (P. 395). Afyon. (особистий внесок: опрацювання

літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).

12. **Савенко, М. В.,** Кривцова, М. В., Костенко, Є. Я., Скляр, І. І. (2021). Шляхи міграції антибіотикорезистентних мікроорганізмів у системі людина (ротова порожнина)-водні екосистеми. *Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти*: Тези доповідей I Міжнародної науково-технічної конференції. (С. 72–73). Тернопіль. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
13. **Савенко, М. В.,** Кривцова, М. В., Чорненька, О. І. (2020). Циркуляція генів резистентності в джерелах централізованого та децентралізованого водопостачання міста Ужгород та Ужгородського району. *Актуальна інфектологія*, 8(5–6), 167–168. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
14. **Bilkei, M., & Kryvtsova, M.** (2018). Facultative microbiota of the river Uzh as an indicator of structural alterations of the hydro ecosystem in anthropogenic conditions. *Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century: Abstracts book of the III International Scientific Conference*. (P. 27–28). Kyiv. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
15. **Білкей, М. В.,** Кривцова, М. В. (2018). Поширення антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів у природних водах. *Раціональне використання антибіотиків. Antibiotic resistance STOP!*: Тези доповідей I Міжнародного конгресу. (С. 30–32). Київ. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
16. **Білкей, М. В.,** Кривцова, М. В., Співак, М. Я. (2018). Циркуляція антибіотикорезистентних штамів у системі «людина-водне середовище». *Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, профілактика. біологічна безпека*: Матеріали науково-практичної конференції. (С. 27–28). Київ. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
17. **Білкей, М. В.** (2017). Вміст важких металів у річці Уж на територіях з різним рівнем антропогенного навантаження. *Проблеми збереження біорізноманіття Українських Карпат*: Матеріали X регіональної конференції молодих вчених та студентів. (С. 100). Ужгород: Вид-во УжНУ «Говерла». (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, виконання практичних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання статті).
18. **Білкей, М. В.** (2014). Показники мікробіологічного забруднення води. *Проблеми збереження біорізноманіття Українських Карпат*: Матеріали регіональної VII конференції молодих вчених та студентів. (С. 84). Ужгород. (особистий внесок: опрацювання літератури, моделювання експериментів, аналіз отриманих результатів, написання статті).

АНОТАЦІЯ

Савенко М. В. Антропогенне навантаження на мікробіоту водних екосистем в умовах Закарпаття. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.16 – екологія. – Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню екологічного стану поверхневих вод річки Уж за показниками складу мікробних ценозів, рівнем токсикантів та антибіотикорезистентності мікроорганізмів з метою встановлення нових чутливих показників екологічного стану гідроекосистем. З'ясовано посезонну динаміку вмісту металів (Pb, Cr, Zn, As, Ni, Cu та V) у зразках води та донних відкладів річки Уж на територіях з різним характером антропогенного навантаження. Визначено вміст сполук азоту та летких органічних сполук у поверхневих водах річки Уж. Досліджено розподіл мікробних асоціацій річки Уж в умовах різного ступеня антропогенного навантаження.

Проаналізовано взаємозв'язки між динамікою концентрацій сполук азоту у воді та чисельністю представників алохтонної та автохтонної мікробіоти водойми. Визначено найчисленнішу групу мікроорганізмів води, яка належала до родини *Enterobacteriaceae*. Встановлено видовий склад домінуючих представників мікробних спільнот, виділених із зразків води та визначено їх чутливість до антибіотиків різних груп. Виділені мультирезистентні грамнегативні мікроорганізми досліджено на наявність генетичних детермінант стійкості (*bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}*, *bla_{SHV}*, *bla_{NDM}*). З'ясовано розповсюдження генетичних детермінант стійкості в природних водах річки Уж та джерелах централізованого та децентралізованого водопостачання прилеглих територій. Встановлені взаємозв'язки між рівнем антропогенного навантаження та ступенем антибіотикостійкості мікроорганізмів. Розроблено рекомендації щодо розширення спектра гігієнічного моніторингу якості питної води з введенням показника чутливості до антибіотиків, як індикаторного до забруднення хімічними речовинами.

Ключові слова: поверхневі води, мікробіоценози, антибіотикорезистентні мікроорганізми, генетичні детермінанти антибіотикостійкості, важкі метали, сполуки азоту, антибіотики.

ABSTRACT

Savenko M. V. Anthropogenic load on microbiota of aquatic ecosystems in Transcarpathia (Zakarpatska Oblast). – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 03.00.16 – Ecology – Oles Honchar Dnipro National University, Dnipro, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the ecological state of the surface waters of the Uzh River with regard to the composition of microbial coenoses, the level of toxicants, and antibiotic resistance of microorganisms, in order to establish new sensitive indicators of the environmental state of the hydroecosystems. Sampling of water samples from the Uzh River was carried out from 8 points, which were characterized by different levels of anthropogenic load on the reservoir: recreational, located on the territory of the source of the river; technogenically transformed (located within the city of Perechyn, where the

Perechyn Forestry Chemical Plant is located); urbanized (covers the territory of the city of Uzhhorod and nearby villages); agricultural (located in the area of the village of Storozhnytsia, where a significant amount of agricultural land and farms are concentrated).

It clarified the seasonal behaviour of the contents of metals (Pb, Cr, Zn, As, Ni, Cu and V) in water and bottom sediment samples taken from the Uzh River in areas with different anthropogenic loads. The thesis established the contents of nitrogen compounds and volatile organic compounds in the surface waters of the Uzh River, and identified the most polluted sites of the river. The highest content of nitrogen compounds in water samples was found in the agricultural and technologically transformed area. It investigated into the distribution of microbial associations of the Uzh River affected by different anthropogenic loads, it was established that among the isolated representatives of allochthonous and autochthonous microbiota of the Uzh River, the most common group of microorganisms are bacteria that use organic forms of nitrogen. The comparative characteristics of the ratio of autochthonous and allochthonous microorganisms isolated in areas with different types of anthropogenic load indicate the greatest changes in the composition of the microbiocenosis in the vicinity of the technogenically transformed territory, which are a consequence of the transformation of the ecosystem under the influence of high concentrations of toxicants.

The researcher analysed the relationships existing between the changes in concentrations of nitrogen compounds in the water and the number of members of the allochthonous and autochthonous microbiota of the river. The most numerous group of water microorganisms was identified as belonging to the *Enterobacteriaceae* family. The work established the species composition of the dominant members of microbial communities (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* та *Citrobacter*) isolated from water samples, and their sensitivity to antibiotics of different groups. The studied strains were characterized by associated resistance to 2–3 pharmacological groups of antibiotics, however, there was a clear relationship between the increase in resistance to 3 – 4 groups of antibiotics with the degree of contamination of the studied territory. The highest resistance was found to antibiotics of natural origin, such as tetracyclines and penicillins. The ability of biofilm formation was established in the isolated multiresistant microorganisms of the genus *Escherichia*, a significant level of distribution of biofilm-forming isolates – 52% in the technologically transformed territory and 34% in the urban area, which were characterized by the highest level of resistance to ampicillin, tetracycline, gentamicin and doxycycline.

The isolated multidrug-resistant gram-negative microorganisms were tested for the presence of genetic resistance determinants (*bla_{TET}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}*, *bla_{SHV}*, and *bla_{NDM}*). The author clarified the distribution of genetic resistance determinants in the natural waters of the Uzh River and sources of centralised and decentralised water supply in the adjacent areas. The work established the relationships between the level of anthropogenic load and the degree of antibiotic resistance of microorganism, a direct relationship between the increase the concentration of heavy metals (Zn, Ni), nitrogen compounds (NO₃) and the growth of resistance to antibiotics of different groups was established. It provides recommendations regarding expanding the range of hygienic monitoring of drinking water quality by introducing the antibiotic sensitivity index as an indicator of chemical contamination.

Keywords: surface waters, microbiocoenoses, antibiotic resistant microorganisms, genetic resistance determinants, heavy metals, nitrogen compounds, antibiotics.