

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДВНЗ «УЖГРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені ОЛЕСЯ ГОНЧАРА

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

САВЕНКО МАРІАННА ВІКТОРІВНА

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

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_М.В. Савенко

Науковий керівник: Кривцова Марина Валеріївна  
доктор біологічних наук, професор

## 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<sub>tet</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*). 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**

*M.V. Savenko. Anthropogenic Load on Microbiota of Aquatic Ecosystems in Transcarpathia (Zakarpatska Oblast). – A qualification scientific thesis (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<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, and *bla<sub>NDM</sub>*). 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 ( $\text{NO}_3$ ) 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.

## 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.есо.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*).

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ .....	12
ВСТУП.....	13
РОЗДІЛ 1 .....	19
ПРОБЛЕМИ ЗАБРУДНЕННЯ ПРІСНОВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ.....	19
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	19
1.1. Основні чинники забруднення гідроекосистем та їх вплив на зміну мікробіоти води.....	19
1.2. Мікробне забруднення водойм та його наслідки .....	21
1.3. Вода як чинник передачі генів резистентності та антибіотикостійких мікроорганізмів .....	23
1.4. Порівняльна характеристика нормативів якості питної води в різних країнах світу .....	26
Перелік посилань .....	30
РОЗДІЛ 2 .....	43
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1. Гідроекологічна характеристика річок Закарпаття .....	43
2.2. Розташування моніторингових точок пробовідбору зразків води та донних відкладів із річки Уж .....	44
2.3 Методика визначення гідрохімічних показників якості води та донних відкладів .....	49
2.4 Визначення мікробіологічних показників якості води .....	51
2.5 Виділення ізолятів, їх ідентифікація та визначення чутливості.....	53
до антибіотиків.....	53
2.6. Вивчення здатності мікроорганізмів до утворення біоплівки.....	54
2.7 Визначення генотипових детермінант антибіотикорезистентності грамнегативних мікроорганізмів.....	55
Висновки до розділу .....	58
Перелік посилань .....	58
РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ЗА ГІДРОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ....	63

	11
3.1 Вміст металів у системі «вода–донні відклади» річки Уж .....	63
3.2. Вміст сполук азоту та летких органічних сполук у воді річки Уж .....	76
Висновки по розділу .....	86
Перелік посилань .....	88
<b>РОЗДІЛ 4. СКЛАД МІКРОБОЦЕНОЗІВ ГІДРОЕКОСИСТЕМ ТА ЇХ СТАН В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ .....</b>	<b>93</b>
4.1. Розподіл мікробних угруповань річки Уж в умовах антропогенного навантаження .....	93
4.2. Встановлення взаємозв'язків між гідрохімічними та мікробіологічними показниками якості природних вод .....	107
4.3. Видове різноманіття домінуючих представників мікробних спільнот річки Уж .....	112
Висновки до розділу .....	114
Перелік посилань .....	116
<b>РОЗДІЛ 5. ЧУТЛИВІСТЬ МІКРОБНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ВОДОЙМИ ДО АНТИБІОТИКІВ .....</b>	<b>118</b>
5.1. Чутливість умовно–патогенних мікроорганізмів річки Уж до антибіотиків..	118
5.2 Вивчення здатності до біоплівкоутворення ізолятів роду <i>Escherichia</i> виділених із зразків води.....	122
5.3. Генотипові детермінанти антибіотикорезистентності мікробних популяцій річки Уж .....	128
5.4. Розповсюдження генетичних детермінант стійкості в природних водах та джерелах водопостачання.....	130
5.5. Визначення взаємозв'язків між рівнем антропогенного навантаження та ступенем антибіотикостійкості мікроорганізмів.....	132
Висновки до розділу .....	138
Перелік посилань .....	141
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>144</b>
<b>ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ .....</b>	<b>146</b>
<b>ДОДАТОК 1 .....</b>	<b>147</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

БГКП – бактерії групи кишкової палички

Буфер TE – буферний розчин, який використовується в молекулярній біології, в процедурах із залученням дезоксирибонуклеїнова кислоти або рибонуклеїнової кислоти. "TE" походить від його компонентів: Tris, звичайного рН-буфера, та EDTA, молекули, яка хелатує катіони, такі як  $Mg^{2+}$ .

ВМ– важкі метали

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГДК–гранично допустима концентрація

ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСанПіН – Державні Санітарні Правила і Норми

ДСТУ – Державні стандарти України

ЄС – Європейський Союз

ЗМЧ –загальне мікробне число

КУО – колонієутворюючі одиниці

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я України

НАТО – Організація Північноатлантичного договору

ООН – Організація Об'єднаних Націй

ЮНІСЕФ – Міжнародний надзвичайний фонд допомоги дітям при Організації Об'єднаних Націй

ESBL – Бета-лактамази розширеного спектра дії

pH – від'ємний десятковий логарифм концентрації йонів водню ( $H^+$ )

## ВСТУП

**Актуальність роботи.** Широке та неконтрольоване застосування антибіотиків призвело до зростання антибіотикостійкості мікроорганізмів та розповсюдженню генів резистентності в екосистемах. Антибіотики стали істотними забруднювачами довкілля, оскільки їх використання вже давно вийшло за межі первинного призначення. Розповсюдження антибіотичних речовин у водних екосистемах становить суттєву небезпеку для здоров'я людини [73]. 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. Проблема антибіотикостійкості в XXI сторіччі визнана однією з ключових проблем. 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», № ДР 0115U003902, 2014–2019 рр.

**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 мікробіоценозів 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, 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 концентрацій 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.

## РОЗДІЛ 1

### ПРОБЛЕМИ ЗАБРУДНЕННЯ ПРІСНОВОДНИХ ЕКОСИСТЕМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

#### **1.1. Основні чинники забруднення гідроекосистем та їх вплив на зміну мікробіоти води**

Токсичне забруднення водного середовища – глобальний процес, що охоплює протягом останніх десятиріч усі морські й континентальні водойми світу. Він зумовлений застосуванням у промисловості “брудних” технологій, подальшою урбанізацією, хімізацією сільського господарства, використанням сотень тисяч нових хімічних продуктів – ксенобіотиків, що включаються у біотичний колообіг біосфери і врешті решт потрапляють у водне середовище. Крім залпових і аварійних викидів стічних вод та інших екстремальних чинників із катастрофічними наслідками у вигляді задухи риб та безхребетних, токсифікація найчастіше є наслідком систематичного надходження у водні об’єкти токсикантів із різних джерел, що об’єднуються загальним поняттям “токсикогенний стік”. Водні об’єкти України забруднені, головним чином, сполуками азоту, нафтопродуктами й важкими металами. Більшість річок України можна віднести до забруднених і дуже забруднених. Винятком є гірські річки Криму і Карпат, які знаходяться в задовільному стані. У притоках Західного Бугу концентрація шестивалентного хрому часом перевищує ГДК від 10 до 50 разів. Басейн річки Південний Буг біля міст Хмельницький і Первомайськ забруднений сполуками міді, цинку, марганцю й шестивалентного хрому. Найвищий рівень забруднення важкими металами спостерігався на річках Горинь, Устя, Тетерів, Унава, Десна, Рось, Самара, Інгулець, Уж [6].

Однією з основних екологічних проблем 21 століття є забруднення водних екосистем. Головними джерелами забруднення водних об’єктів виступають комунальне та сільське господарство, а також хімічна й металургійна промисловості [91, 97].

Стічні води, які утворюються під час використання води для технологічних процесів, як правило, викидаються до річок або водоймищ, а в приморських районах – у прибережну зону морів. Значна кількість забруднювачів надходить у водойми із шахтними й водами копалень, а також із дренажними, що підходять з територій зрошування, землеробства [101]. Об'єми таких викидів сягають кількох мільярдів кубічних метрів на рік [118].

Узагальнюючи вищевикладене, можна виділити наступні типи забруднення водних екосистем:

- хімічне – кислоти, солі, луги;
- біологічне – мікроорганізми, віруси, бактерії, грибки;
- органічне – нафта та її сполуки, відходи тваринництва;
- теплове – надходження у водойми підігрітих вод від ТЕС, АЕС та інших енергетичних об'єктів;
- забруднення мікропластиком;
- фізичне забруднення: пил, радіоактивні домішки, частини золи від ТЕС;
- поверхневе: активні речовини, миючі засоби, пестициди, інсектициди, фармакологічні препарати [12, 31, 44, 47, 54, 58, 66, 69, 70, 74, 85, 118]. Не менш важливу роль відіграє забруднення атмосферними опадами, які в межах активного впливу автотранспорту утворюють екологічно небезпечні модифікації [7].

Широке використання антибіотиків в різних галузях спровокувало їх накопичення в навколишньому середовищі, що стало початком появи нового типу забруднювальних речовин [86]. Найбільшим джерелом міграції антибіотиків є стічні води, недосконалі методи очищення стічних вод та значна стійкість антибіотиків до дезактивації зумовлює їх надходження в природні екосистеми [2]. Новітні дослідження доводять що антибіотики накопичуються в харчових продуктах, питній воді й довкіллі, потрапляючи через харчовий ланцюг до організму людини [67].

Сучасні тенденції свідчать, що більшість малих водотоків знаходяться на різних стадіях деградації, спричинених засміченням, замуленням, зниженням самоочисної здатності, пересиханням й формуванням ділянок стоячої води, які несуть катастрофічні наслідки [30]. Відомо, що мікроорганізми відіграють ключову роль у

біогеохімічних процесах кругообігу речовин і забезпечують стабільність гідроекосистеми. На зростання екологічної напруги у водних об'єктах першими реагують бактерії, що супроводжується якісними та кількісними змінами у структурі мікробних спільнот [15]. Дослідження динаміки у зміні складу бактеріальних угруповань дозволяє встановити ступінь техногенного впливу на гідроекосистему [62].

## 1.2. Мікробне забруднення водойм та його наслідки

Мікрофлора поверхневих вод численна й різноманітна за своїм видовим складом. Формування мікробних спільнот водойми залежить від фізико–хімічних особливостей водойми, сезонних й метеорологічних факторів, відстані від потенційних джерел забруднення, перш за все, населених пунктів [4, 14, 33, 64].

Оцінка якості поверхневих вод ґрунтується на визначенні кількісної динаміки санітарно–показових мікроорганізмів. До індикаторних мікроорганізмів належать бактерії групи кишкової палички, при оцінці якості води розраховують коли–індекс — кількість лактозопозитивних кишкових паличок (*Escherichia coli*) в 1 л води. Кишкову паличку використовують як санітарно–показовий (індикаторний) мікроорганізм фекального забруднення об'єктів, а її кількість характеризує ступінь забруднення об'єкта. Кишкові бактерії, що мешкають в кишківнику людини, так само як і патогенні ентеробактерії, не пристосовані до вільного існування. Вони зазвичай не розмножуються у воді і не можуть зберігатися там тривалий термін. Життєздатність одних (*Enterococcus faecalis*) вимірюється добами, а інших (*Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp) – тижнями та навіть місяцями. Ці показники використовуються для встановлення строків давності забруднення води фекаліями. За певними показниками проводять безпосереднє виділення з води підозрюваних патогенних бактерій [17].

При повноцінному санітарно–мікробіологічному дослідженні води визначають загальне мікробне число – кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) мікроорганізмів у 1 см<sup>3</sup> води. Загальне мікробне число є непрямим показником

бактеріального забруднення води, оскільки характеризує загальний вміст мікроорганізмів у воді без їх якісної характеристики [28, 55].

При мікробному забрудненні води зростає частка умовно–патогенних мікроорганізмів, які надходять до водойм в результаті неконтрольованого скиду стічних вод з прибережних населених пунктів, а також промислових вод, багатих органічними сполуками, джерелами поживних речовин для цих мікроорганізмів. При забрудненні водойм стічними водами в них виявляють *E. coli*, *E. faecalis*, *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Clostridium* spp, а також спірили, вібріони, лептоспіри та ін, деякі віруси людини [29, 50, 59, 60]. Зростання чисельності умовно–патогенних мікроорганізмів у відкритих водоймах збільшує ризики поширення інфекційних захворювань, що ставить під загрозу не тільки екологічне благополуччя водойм, а й здоров'я людей [9, 100].

За даними ВООЗ та ЮНІСЕФ у 2016 році зафіксовано 829 000 смертей які були спричинені незадовільним станом води, чи не найбільше від захворювань пов'язаних із забрудненою водою страждають діти, так, 361000 дітей у віці до 5 років щороку помирають від захворювань викликаних збудниками які передаються через воду неналежної санітарно–гігієнічної якості [112, 113]. За даними ретроспективного аналізу проведеного в Сполучених штатах Америки протягом 2011–2012 років зареєстровано щонайменше 431 випадок захворювань пов'язаних з водою [43], в той час, як протягом 2013 – 2014 років встановлено 289 випадків, основними збудниками захворювань яких були бактерії родів *Legionella*, *Pseudomonas*, паразити родів *Cryptosporidium*, *Giardia* [88].

До найбільш поширених «водних» інфекцій належать захворювання шлунково–кишкового тракту [46, 57]. Чимало досліджень описують випадки спалахів інфекційних захворювань, пов'язаних з водним фактором передачі, так, за даними ВООЗ в Європейському регіоні щодня фіксують 14 смертей, спричинених інфекційною діареєю. Найгірша ситуація спостерігається в країнах третього світу, де й досі існує проблема дефіциту якісної питної води [72, 82, 108] й щодня помирає близько 2500 дітей у віці до 5 років [96]. Глобальні зміни клімату тільки посилюють проблему нестачі якісної води [79], і загрожують зменшенням ресурсів прісної води

[65, 90, 92, 103]. В той час як потреби у воді щорічно зростають, а її дефіцит переростає у світову проблему. Актуальність проблеми вимагає розроблення нових методів очищення води та пошуку ефективних й чутливих.

Для інтегральних оцінок наслідків забруднення навколишнього середовища в науковій літературі останніми роками активно використовується поняття «ecosystem health» – здоров'я екосистем. На відміну від звичних підходів, які зводяться до понять «екологічний стан», «екологічний статус», «екологічний потенціал» «токсобність екосистеми», «трансформація екосистеми» тощо, в рамках концепції здоров'я екосистем обґрунтовуються кількісно змінні інформативні критерії порушень у біологічних системах, а також інтегральні кількісні значення дози впливу, які відображають наслідки комплексного забруднення (хімічного, гідрофізичного теплового, біологічного тощо) і ті умови середовища, на фоні котрих діють забруднювальні елементи й сполуки.

Історія походження терміну «здоров'я екосистем» пов'язана із важливістю питання раціонального обмеження антропогенних впливів на екосистеми, що у світовій практиці бере початок від концепції критичних навантажень, затвердженій на робочій нараді ООН у 1998 р. Попри те, що величини «критичного навантаження» мають різні трактування в окремих дослідників, методологічний підхід до їх визначення зводиться до виявлення двох основних інтегральних складових у стані екосистеми: фактору антропогенного навантаження на навколишнє середовище та відгуку, що визначає функціональну стійкість, продуктивність та різноманіття біотичних елементів [61].

### **1.3. Вода як чинник передачі генів резистентності та антибіотикостійких мікроорганізмів**

Широке використання протимікробних препаратів в різних галузях призвело до розповсюдження антибіотикорезистентних штамів та їх генів стійкості в об'єктах навколишнього середовища [3, 24, 26, 49]. Найбільшу увагу привертає стрімке зростання множинної стійкості до антибіотиків серед мікробних спільнот водних

середовищ [27, 32, 42, 83]. Основним джерелом антимікробної резистентності у водних екосистемах є господарсько-побутові, промислові стічні води та лікарняні стоки [1]. Потрапляючи у водні екосистеми мікроорганізми з набутою стійкістю часто підпадають під вплив антропогенного тиску що призводить до позитивної селекції резистентності до кількох груп антибіотиків [25]. Адже, донедавна, виділення полірезистентних штамів було характерним тільки для клінічних випадків, однак наразі полірезистентність, та, навіть, мультирезистентність все частіше зустрічається в природних екологічних нішах [93].

Одним з факторів розвитку та передачі резистентності є біоплівки, які формують мікроорганізми у природних екосистемах. Згідно наукових досліджень, бактерії утворюють біоплівки на будь-яких твердих поверхнях, що підвищує їх можливості до перенесення та виживання за різних умов існування, до того ж це підвищує їхню гігієнічну та епідеміологічну значимість [8]. Не менш важливою є здатність біоплівок до утворення резистентності до лікарських засобів, таких як, антибіотики. Відомо, що бактерії, які утворюють біоплівки витримують високі дози антибіотичних речовин формуючи до них стійкість, яка розвивається під впливом порушення взаємодій мішені та активної речовини фармацевтичного препарату [19, 111].

Біоплівкотвірні бактерії володіють рядом механізмів які підвищують резистентність до антибіотиків, серед таких виділяють інактивацію антибіотиків полімерами; нездатність препаратів проникати вглиб біоплівки; уповільнений ріст та розмноженням бактерій в структурі біоплівки [84].

Перелічені вище фактори вказують на складність лікування інфекційних процесів викликаних біоплівковою інфекцією, до якої, як відомо, не завжди формується імунна відповідь. Низький ступінь розпізнавання інфекційного агента зачасту призводить до хронічного рецидивуючого запального процесу та розвитку аутоімунної відповіді. Інфекційні процеси викликані біоплівкотвірними мікроорганізмами мають обтяжений анамнез та важко піддаються антибіотикотерапії [18, 81, 84].



Ключовими механізмами набуття стійкості до протимікробних препаратів є передача генетичних касет в складі мобільних елементів геному, що може проходити трьома шляхами: трансформацією трансдукцією та кон'югацією [11, 87].

За літературними даними генетичні детермінанти стійкості виділяють у водоймах по всій планеті [104]. В найбільших водних артеріях Європи, таких як річка Дунай, ідентифіковували мікроорганізми родів *Klebsiella* та *Enterobacteriaceae* які були носіями генів NDM-1 та KPC-2, бактерії роду *Pseudomonas* виділені із зразків води проявляли фенотипову стійкість меропенему – 30,4%, піперацилін-тазобактаму – 10,6%, та цефтазидиму – 4,2%, а до 3,1% виділених ізолятів були мультирезистентними [77]. З поверхневих вод Рейну (Німеччина) виділені мультирезистентні мікроорганізми роду *Escherichia* [106], у водах Темзи зустрічаються стійкі до фторхінолону штами *E.coli* O25b:H4/ST131 що продукують гени стійкості CTX-M-15 [52]. В річках Азії відомо найбільше випадків виділення генів стійкості до сульфеніламідів та тетрациклінів, в притоках ріки Чжуцзян генетичні детермінанти tetA та tetB виділяють з частотою 43% та 40% [71, 107]. Для країн Африки характерна найбільша частота виділення мультирезистентних штамів, також відмічається підвищений рівень резистентності до ампіциліну [45]. У водоймах Америки виявлене значне поширення ESBL – позитивних штамів, зі зразків води 16 досліджуваних річок виділено понад 40% стійких штамів, які були носіями плазмідів [40].

Окреслюючи масштаби проблеми стрімкого зростання антибіотикорезистентності у водних екосистемах, важливим завданням є визначення ролі водних екосистем в передачі генетичних детермінант стійкості до людини. Проте серед наукових праць спостерігається брак досліджень які безпосередньо доводять вплив водних об'єктів на перенесення генів стійкості до організму людини. Серед таких праць, і дослідження проведене на півдні Франції яке доводить прямий зв'язок між циркуляцією штаму *Enterobacter asburiae*, що несе плазмідний ген IMI-2 у річці та встановленим збудником бактеріємії у місцевих мешканців [80].

Розповсюдження генетичних детермінант резистентності у джерелах питного водопостання становить високі ризики потенційного розвитку стійкості до протимікробних препаратів у споживачів [73, 115]. В роботі Muniesa M. описана визначна роль бактеріофагів у перенесенні генетичної стійкості з водних об'єктів до організму людини, адже трансдукція бактеріофагами є ключовим механізмом в горизонтальному перенесенні генів з навколишнього середовища [48, 94, 95].

Отже, водні екосистеми є певним резервуаром генетичних детермінант стійкості та несуть потенційну небезпеку в розповсюдженні протимікробної стійкості, як в навколишньому середовищі, так і на шляху до людини. Підтвердження ролі водних джерел в поширенні антимікробної резистентності передбачає необхідність введення моніторингу за міграцією антибіотикорезистентності в джерелах водопостачання.

#### **1.4. Порівняльна характеристика нормативів якості питної води в різних країнах світу**

Основною запорукою здоров'я нації є забезпечення якісною питною водою. Дефіцит водних ресурсів та неналежне їх використання призвели до міжгалузевої та багатоаспектної проблеми забезпечення населення життєвонеобхідним ресурсом. В Україні водозабезпечення населення здійснюється за рахунок централізованого водопостачання джерелом якого є поверхневі та підземні води [22,23].

В той час в країні практично не залишилося водойм які б відповідали по екологічному стану до першої категорії, так, до 1–3 категорії належить 15 %, 4–5 категорії – 60 % та до 6–7 категорії належить 25% водойм, що свідчить про незадовільний стан водних об'єктів [20]. У різних країнах світу регламентуються основні вимоги до якості питної води, які мають певні відмінності, що обумовлені природними і соціально–економічними факторами [10].

У країнах Європи якість питної води нормується Директивою 98/83/ЄС та іншими національними стандартами які діють в різних країнах [99]. У порівнянні зі

стандартами які діють на території України (ДСанПіН,) нормативи ЄС суворіші, до прикладу згідно ДСанПіНу оцінка якості води по вмісту органічних сполук передбачає тестування до 7-ми органічних компонентів, в той же час за стандартами ЄС до переліку нормованих органічних сполук входить 11 компонентів [13]. Гранично допустима загальна жорсткість води за українськими стандартами  $\leq 7$  ммоль/дм<sup>3</sup>, за нормативами ЄС становить 1,2 ммоль/дм<sup>3</sup>. Між допустимим вмістом неорганічних компонентів також виявлені певні відмінності, до прикладу, граничні концентрації алюмінію у 2,5 рази менші за стандартами ЄС відносно вітчизняних. Концентрації марганцю, нітрогену та сульфатів за Директивою 98/83/ЄС нижче у 2 рази ніж за ДСанПіНом, ще нижче регламентуються допустимі концентрації арсену та срібла — в 5 разів.

В системі нормування якості питної води, варто відзначити Німеччину, в якій встановлені чи не найжорсткіші вимоги до якості води серед країн ЄС. Зокрема, у відношенні до органічних сполук, таких як поліхлоровані біфеноли, феноли та пестициди, що до останніх їх вміст регулюється в межах до 0,1 мкг/дм<sup>3</sup>. Система нормування питної води у Швеції здійснюється в основному відповідно Директиви 98/83/ЄС, проте по певним показникам відрізняється жорсткішими вимогами, таких як хлориди—100 мг/дм<sup>3</sup>, сульфати—100 мг/дм<sup>3</sup>.

Стандарти прописані Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я регламентують більший перелік нормативних показників [114] ніж вимоги які пропонуються Директивою 98/83/ЄС та є суворішими. Варто зазначити, що вимоги до мікробіологічного забруднення води не мають суттєвих відмінностей як у країнах Європи, так і в цілому світі [21].

З бурхливим розвитком людства, посиленням тиску індустріалізації та збільшенням населення на планеті людство стикнулося з новими екологічними загрозами, серед яких провідне місце займає забруднення водних екосистем мікропластиком, лікарськими речовинами, перш за все антибіотиками, та пестицидами. Такі тенденції спонукають до перегляду нормативів з регулювання

якості питної води з внесенням доповнень відносних нових токсикантів та посилення моніторингу [56, 68, 109].

Останнє десятиліття чи не найбільшу увагу привертають залишкові концентрації антибіотиків у воді та стійкі до них мікроорганізми. У всіх куточках світу антибіотики виділяють з різних водних джерел, починаючи від водойм рекреаційного значення, поверхневих вод річок, озер та морів, завершуючи питною водою яка надходить до споживача.

Проведений ряд досліджень які вказують на наявність антибіотиків та мікроорганізмів резистентних до декількох груп лікарських препаратів у одній з найбільших річок Європи – Дунаї [37, 41, 53, 75, 76, 105]. Дослідження проведені в Польщі також вказують на значне забруднення поверхневих вод річок Вісла, Пилиця та води з водопровідних мереж антибіотичними речовинами, генетичними детермінантами стійкості та мультирезистентними бактеріями [63, 78]. Результати тестувань зразків води з річки Янцзи (Китай) демонструють значну поширеність генетичних детермінант стійкості в поверхневих водах [110, 116, 117]. В Сполучених Штатах Америки було проведено широкомасштабне тестування що включало вивчення зразків води з 16 річок на наявність антибіотикорезистентних бактерій, за результатами якого понад 40% виділених мікроорганізмів виявилися стійкими до більш ніж одного антибіотика [40].

Отже, на підставі вище викладеного короткого огляду літературних джерел, можна зробити висновок про масштаби поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів та генетичних детермінант стійкості у водоймах всього світу. Отримані результати спонукають до введення нормативного контролю за мультирезистентними мікроорганізмами та генами що викликають резистентність до антибіотиків у воді [39]. На думку, вчених поширення генів антибіотикорезистентності відбувається через неналежне очищення води [86, 89], водночас деякі дослідження доводять вплив хлорування при очищенні стічних вод,

який виступає тригером до формування стійкості мікроорганізмів до лікарських засобів [38, 51, 102].

Поширення антибіотикорезистентних штамів у джерелах водопостачання загрожує високими ризиками потрапляння антибіотиків у харчовий ланцюг людини, що в кінцевому етапі може призвести до масового розвитку стійкості до лікарських препаратів даючи початок не тільки «супербактеріями», а й неможливості лікування типових інфекційних захворювань [39].

Окреслюючи важливість проблеми, вчені рекомендують введення показника чутливості мікроорганізмів до антибіотиків у нормативну базу контролю якості води, що надасть можливість слідкувати за коливанням антибіотикостійких мікроорганізмів в навколишньому середовищі та водночас буде слугувати одним з маркерів екологічного стану гідроекосистем [34, 98].

Вищевказані проблеми є важливими компонентами екобезпекової складової національної системи стійкості. Означені особливості забезпечення національної системи стійкості як складової національної безпеки України, а також співробітництва України, ЄС і НАТО у природоохоронній сфері. Так, Указом Президента України № 479/2021 від 27 вересня 2021 року введено в дію рішення Ради національної безпеки і оборони України від 20 серпня 2021 року «Про запровадження національної системи стійкості» та затверджено Концепцію забезпечення національної системи стійкості. Проте аналіз прийнятого документу засвідчив, що в ньому вкрай недостатньо уваги приділено екобезпековій складовій.

Розбудова національної системи стійкості посідає важливе місце в системі національної безпеки України. Реалізація даної програми необхідна для захисту та повноцінного функціонування держави на всіх рівнях. Попри те, що реалізація такого завдання закріплена в законодавчих документах, наразі ця тема потребує наукового обґрунтування. Перш за все, необхідні теоретичні основи та втілення механізмів гарантування екобезпеки в системі національної стійкості України. Під час роботи у такому напрямку важливо спиратися на успішний досвід країн ЄС і НАТО в

розробленні національних систем стійкості цих країн. Розв'язання проблеми розбудови національної системи стійкості України завдяки поліпшенню екобезпекової складової дозволить істотно вплинути на зміцнення національної безпеки країни [3].

І в цьому аспекті дослідження антибіотикорезистентності мікробіоценозів має важливе значення як в аспекті збереження належного стану водних екосистем, так і здоров'я населення, яке споживає воду з відповідних джерел.

### **Перелік посилань:**

1. Баренбойм, Г. М., Чиганова, М. А. (2012). Забруднення поверхневих та стічних вод лікарськими препаратами. *Вода: хімія та екологія*, (10), 40–46.
2. Батуєва, А. М., Дягелев, М. Ю. (2018). Аналіз вмісту антибіотиків у міських стічних водах. *Хімія. Екологія. Урбаністика*, 1, 205–210.
3. Бондар О.І., Гандзюра В.П., Матвієнко М.Г. Екобезпекова складова національної системи стійкості *Екологічні науки*, 2022, № 4(43), 7–11.
4. Васенко, О. Г., Зінченко, І. В., Карлюк, А. А. (2018). Дослідження процесів самоочищення водних об'єктів Харківської області (на прикладі озер Лиманської групи і ділянки р. Сіверський Донець) за мікробіологічними характеристиками. *Проблеми охорони навколишнього природного середовища та екологічної безпеки*, (40), 85–98.
5. Виноградова, К. А., Булгакова, В. Г., Полин, А. Н., & Кожевин, П. А. (2013). Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистома, её объём, разнообразие и развитие. *Антибиотики и химиотерапия*, 58(5–6).
6. Гандзюра В.П., Клименко М.О., Бедункова О.О. Біосистеми в токсичному середовищі. Монографія. – Рівне, Вид-во НУВГП, 2021. – 261 с.
7. Герещун, Г. М., Масікевич, Ю. Г., Гольонко, Р. А. (2019). Аналіз забруднення атмосферних опадів домішками на вулицях міста. *Науковий вісник НЛТУ України*, 29(1), 66–69.

8. Глушанова, Н.А., Блінов, А.І., Алексеєва, Н.Б. (2015) Бактеріальні біоплівки у інфекційній патології людини. *Медицина в Кузбасі, (Спецвипуск 2): 30–35.*
9. Григоренко, Л. В. (2018) Динаміка інфекційної і паразитарної захворюваності серед дитячого населення сільських районів та водний фактор, що її обумовлює. *Гігієна населених місць, 68, 65–69.*
10. Зацерковний, В.І., Плічко Л.В. (2018) Аналіз підходів щодо створення бази геоданих ГІС моніторингу якості поверхневих вод . *Наукоємні технології, 1(37), 114–124.*
11. Землянко, О. М., Рогоза, Т. М., Журавльова, Г. А. (2018). Механізми множинної стійкості бактерій до антибіотиків. *Екологічна генетика, 16(3), 4–14.*
12. Колесник, Н. Л. (2015). Токсичний вплив пестицидів на біоту прісних водойм України (огляд). *Рибогосподарська наука України, (4), 31–53.*
13. Косянчук, Н.І., Кузьменко, Н. В. (2011). Вивчення вимог до питної води за нормативними документами, чинними в Україні та директивах ЄС. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького, 13(2), 241–244.*
14. Кривцова, М.В. Ніколайчук В.І. (2011). Екологія мікроорганізмів. Навчальний посібник. 184 с.
15. Міхеєв, А. О., Дейнека, С. Є. (2021). Адаптаційні можливості мікроорганізмів (короткий огляд літератури). *Trends in the development of modern scientific, 31, 262.*
16. Нестерова, О.В., Шарков В.В., Журавльова О.А, Нестеров Я.С. (2019). Проблеми басейнів малих річок. *Вісник Придніпровської державної академії будівництва та архітектури, 5, 67–74.*
17. Новосельська, Л. П., Іващенко, Т. Г., Гандзюра, В. П., Кулінич О. П. (2017). Основи біобезпеки (екологічний складник): навч. посіб. ред. д.б.н. О. І. Бондаря. – К.: *Інститут екологічного управління та збалансованого природокористування, 35–36 с.*
18. Окулич, В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.Б. (2017) Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. *ВГМУ., 300 с.*

19. Онищенко, П.С., Гаврилюк, В.Г. (2018) Вивчення метаболічних властивостей клінічних штамів стафілококів з різним ступенем стійкості до антибіотиків. Наукові доповіді НУБіП України; 1(71).
20. Пономаренко, А. М. (2008). Питна вода як значущий фактор інфекційної захворюваності населення України. *Актуальні проблеми транспортної медицини*, 4(14), 7–13.
21. Прибилова, В.М. (2016). Порівняльна характеристика нормативів якості питної води, що застосовуються в окремих країнах світу. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, серія «Геологія. Географія. Екологія*, 44, 55–62.
22. Прокопов, В. О. (2014). Стан та якість питної води централізованих систем водопостачання України в сучасних умовах (погляд на проблему з позицій гігієни) *Гігієна населених місць*, 64, 56–66.
23. Прокопов, В. О., Липовецька, О. Б. (2019). Вплив хлороформу питної води на онкологічну захворюваність населення Кіровоградщини. *Довкілля та здоров'я*, 3 (92), 42–46.
24. Сазикін, І. С., Хмелевцова, Л. Є., Селіверстова, Є. Ю., Сазикіна, М. А. (2021). Вплив антибіотиків, що використовуються у тваринництві, на поширення лікарської стійкості бактерій (огляд). *Прикладна біохімія та мікробіологія*, 57(1), 24–35.
25. Сазикін, І. С., Хмелевцова, Л. Е., Хаммамі, М. І., & Сазикіна, М. А. (2019). Забруднення довкілля генами антибіотикорезистентності. Трансформація екосистем під впливом природних та антропогенних факторів, 87–91.
26. Сазикіна, М. А., Сазикін, І. С., Хмелевцова, Л. Є., Хаммамі, М. І., Селіверстова, Є. Ю. (2016). Антибіотики та гени антибіотикорезистентності у навколишньому середовищі. *Вісник біотехнології та фізико-хімічної біології ім. ЮА Овчиннікова*, 12 (2),
27. Терехова, В. А., Руднева, И. И., Поромов, А. А., Парамонова, А. И., & Кыдралиева, К. А. (2019). Распространение и биологические эффекты антибиотиков в водных экосистемах (обзор). *Вода: химия и экология*, (3–6), 92–112.



28. Терлецька, О. В. (2017). Екологічний стан вод урбосистеми Дрогобича. *Український географічний журнал*, (1), 61–65.
29. Тропівська, Г. Г., & Нідзвецька, Л. М. (2018). Санітарно–мікробіологічна оцінка якості донних відкладень Хаджибейського лиману та Одеської затоки в умовах скидання стічних вод. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія*, (23, Вип. 1), 55–66.
30. Хоменко, О.М., Гайдар І.О. (2010). Аналіз екологічного стану малих річок Черкаської області (на прикладі р. Золотоношка). *Екологічна безпека*, 10, 2, 39–42.
31. Шостак В., Полукаров Ю. О. (2017). Фармацевтичні засоби та засоби особистої гігієни (фззог) у водних акваторіях. *Проблеми охорони праці, промислової та цивільної безпеки*, (1), 283–286.
32. Шульгіна, Л. В., Валентинович, Я. Е., Шульгин, Ю. П., Шендерюк, В. В., Чукалова, Н. Н., & Бахолдина, Л. П. (2015). Антибіотики в об'єктах аквакультури и их экологическая значимость. *Обзор. Известия ТИИРО*, 181.
33. Юрасов, С. М., Сафранов, Т. А., Чугай, А. В. (2012). Оцінка якості природних вод: навчальний посібник, 35 с.
34. Al-Bahry, S., Mahmoud, I., & Al-Musharafi, S. (2012). Antibiotic resistant bacteria used as bioindicators of environmental pollution produced by tertiary treated sewage effluent. *11th International Conference on Modelling, Monitoring and Management of Water Pollution*, 146, 313–321.
35. Albert, J. S., Destouni, G., Duke-Sylvester, S. M., Magurran, A. E., Oberdorff, T., Reis, R. E., & Ripple, W. J. (2020). Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio*, 1–10.
36. Allaire, M., Wu, H., & Lall, U. (2018). National trends in drinking water quality violations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), 2078–2083.
37. Alygizakis, N. A., Besselink, H., Paulus, G. K., Oswald, P., Hornstra, L. M., Oswaldova, M., & Slobodnik, J. (2019). Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. *Environment international*, 127, 420–429.

38. Armstrong, J. L., Calomiris, J. J., & Seidler, R. J. (1982). Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(2), 308–316.
39. Arshad M., Zafar R., Chapter 9 – Antibiotics, AMRs, and ARGs: fate in the environment, Editor(s): In *Advances in Environmental Pollution Research series, Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*, Elsevier, Volume 1, 2020, 138–154.
40. Ash, R. J., Mauck, B., & Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging infectious diseases*, *8*(7), 713.
41. Banciu, A. R., Ionica, D. L., Vaideanu, M. A., Radulescu, D. M., Nita-Lazar, M., & Covaliu, C. I. (2021). The occurrence of potentially pathogenic and antibiotic resistant Gram-Negative bacteria Isolated from the Danube Delta Ecosystem. *Sustainability*, *13*(7), 3955.
42. Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, *19*(3), 260–265.
43. Beer, K. D., Gargano, J. W., Roberts, V. A., Hill, V. R., Garrison, L. E., Kutty, P. K., & Yoder, J. S. (2015). Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water—United States, 2011–2012. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, *64*(31), 842.
44. Behrooz, B., Delbari, A., FayyazMohammadi, M. (2021). Modeling Oil Pollution Dissemination in Different Areas of Arvandroud River, Iran. *Environmental Researches*, *12*(23), 185–198.
45. Belachew, T., Mihret, A., Legesse, T., Million, Y., & Desta, K. (2018). High level of drug resistance by gram-negative bacteria from selected sewage polluted urban rivers in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC research notes*, *11*(1), 1–6.
46. Black, R. E., Morris, S. S., & Bryce, J. (2003). Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet (London, England)*, *361*(9376), 2226–2234.
47. Boretti, A., Rosa, L. (2019) Reassessing the projections of the World Water Development Report. *npj Clean Water*. *2*, *15*, 1–6.

48. Calero-Cáceres, W., Ye, M., & Balcázar, J. L. (2019). Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends in microbiology*, 27(7), 570–577.
49. Chen, J., Ying, G. G., Deng, W. J. (2019). Antibiotic residues in food: extraction, analysis, and human health concerns. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(27), 7569–7586.
50. Chijoke, N. C., Emmanuel, A. C., Eucharia, I. O., Tochukwu, C. S., Ifeoma, O. O. (2021). Identification of *Clostridium botulinum* from Drinking and Food Processing Water Source in a Rural Area in Enugu, Nigeria. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 9(1), 28–31.
51. Destiani, R., Templeton, M. R. (2019). Chlorination and ultraviolet disinfection of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in drinking water. *AIMS Environmental Science*, 6(3), 222–241.
52. Dhanji, H., Murphy, N. M., Akhigbe, C., Doumith, M., Hope, R., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2011). Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* with CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from UK river water. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(3), 512–516.
53. Dielacher, I., Hack, K., Jakwerth, S., Kolarevic, S., Kračun-Kolarević, M., Toth, E., Savio, D., Farnleitner, A.H., Kittinger, C., Kirschner, A.K.T., Zarfel, G. & Koller, M., 2021. Occurrence of non-wild type antibiotic resistant *Escherichia coli* in the River Danube. In *Joint Danube Survey 4 Scientific Report: A shared Analysis of the Danube River*. Vienna, S. 193–198
54. Ebenstein A. (2012). The Consequences of Industrialization: Evidence from Water Pollution and Digestive Cancers in China/ *The Review of Economics and Statistics*, 94 (1), 186–201.
55. Edberg, S. C. L., Rice, E. W., Karlin, R. J., Allen, M. J. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of applied microbiology*, 88(S1), 106S–116S.

56. Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., & Aldridge, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water research*, 75, 63–82.
57. Ercumen, A., Gruber, J. S., & Colford, J. M., Jr (2014). Water distribution system deficiencies and gastrointestinal illness: a systematic review and meta-analysis. *Environmental health perspectives*, 122(7), 651–660.
58. Fomicheva, G. P., & Nasibulina, B. M. (2019). The biotesting of oil pollution of aquatic environments. In *Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность*, 53–57.
59. Fotina, T. I., Nazarenko, S. M., Fotin, A. I. (2019). Sanitary and microbiological indicators of drinking water of livestock farms. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 21(95), 112–116.
60. Fourie, J. C. J., Sanko, T. J., Bezuidenhout, C. C., Mienie, C., Adeleke, R. A. (2019). Draft genome sequences of potentially pathogenic *Clostridium perfringens* strains from environmental surface water in the North West province of South Africa. *Microbiology resource announcements*, 8(32), e00407–19.
61. Gandziura V.P., Afanasyev S.O., Biedunkova O.O. (2023) The concept of hydroecosystems' health (a review) *Hydrobiological Journal*, 59 (2), 3–17.
62. García-Armisen, T., Inceoğlu, Ö., Ouattara, N. K., Anzil, A., Verbanck, M. A., Brion, N., Servais, P. (2014). Seasonal variations and resilience of bacterial communities in a sewage polluted urban river. *PloS one*, 9(3), e92579.
63. Giebułtowicz, J., Tyski, S., Wolinowska, R., Grzybowska, W., Zaręba, T., Drobnińska, A., & Nałęcz-Jawecki, G. (2018). Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), 5788–5807.
64. Gomes, I. B., Maillard, J. Y., Simões, L. C., Simões, M. (2020). Emerging contaminants affect the microbiome of water systems—strategies for their mitigation. *npj Clean Water*, 3(1), 1–11.
65. Gosling, S. N., & Arnell, N. W. (2016). A global assessment of the impact of climate change on water scarcity. *Climatic Change*, 134(3), 371–385.

66. Hampson, D. I., Ferrini, S., Rigby, D., Bateman, I. J. (2017). River water quality: who cares, how much and why? *Water*, 9(8), 621.
67. Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Lundborg, C. S. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: it is potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment international*, 114, 131–142.
68. Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the total environment*, 586, 127–141.
69. Hu, D., Zhang, Y., Shen, M. (2020). Investigation on microplastic pollution of Dongting Lake and its affiliated rivers. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111555.
70. Järup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68, 167–182
71. Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., Yin, D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *The Science of the total environment*, 458–460, 267–272.
72. Kausley, S. B., Dastane, G. G., Kumar, J. K., Desai, K. S., Doltade, S. B., & Pandit, A. B. (2018). Clean Water for Developing Countries: Feasibility of Different Treatment Solutions. *Encyclopedia of Environmental Health*, 1–10.
73. Khan, S., Knapp, C. W., & Beattie, T. K. (2016). Antibiotic resistant bacteria found in municipal drinking water. *Environmental Processes*, 3(3), 541–552.
74. Kirschner, A. K. T., Reischer, G. H., Jakwerth, S., Savio, D., Ixenmaier, S., Toth, E., Farnleitner, A. H. (2017). Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. *Water research*, 124, 543–555.
75. Kittinger, C., Kirschner, A., Lipp, M., Baumert, R., Mascher, F., Farnleitner, A. H., & Zarfel, G. E. (2018). Antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolates from the river

Danube: susceptibility stays high. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 52.

76. Kittinger, C., Lipp, M., Baumert, R., Folli, B., Koraimann, G., Toplitsch, D., & Zarfel, G. (2016). Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from the river Danube. *Frontiers in microbiology*, 7, 586.

77. Kittinger, C., Lipp, M., Folli, B., Kirschner, A., Baumert, R., Galler, H. & Zarfel, G. (2016). Enterobacteriaceae isolated from the river Danube: antibiotic resistances, with a focus on the presence of ESBL and carbapenemases. *PloS one*, 11(11), e0165820.

78. Koniuszewska, I., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Kiedrzyńska, E., Kiedrzyński, M., Czatkowska, M., & Zalewski, M. (2020). The occurrence of antibiotic–resistance genes in the Pilica River, Poland. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 20(1), 1–11.

79. Kusangaya, S., Warburton, M. L., Van Garderen, E. A., & Jewitt, G. P. (2014). Impacts of climate change on water resources in southern Africa: A review. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 67, 47–54.

80. Laurens, C., Jean–Pierre, H., Licznar–Fajardo, P., Hantova, S., Godreuil, S., Martinez, O., & Jumas–Bilak, E. (2018). Transmission of IMI–2 carbapenemase–producing Enterobacteriaceae from river water to human. *Journal of global antimicrobial resistance*, 15, 88–92.

81. Lewis K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*,45(4): 999–1007.

82. Li, Z., Zhang, W., Shan, B. (2019). The effects of urbanization and rainfall on the distribution of, and risks from, phenolic environmental estrogens in river sediment. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 250, 1010–1018.

83. Ma, L., Li, B., Jiang, X. T., Wang, Y. L., Xia, Y., Li, A. D., & Zhang, T. (2017). Catalogue of antibiotic resistome and host–tracking in drinking water deciphered by a large scale survey. *Microbiome*, 5(1), 154.

84. Mah, T–F., C, O’Toole, G.,A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, Elsevier BV, 9(1): 34–39.

85. Mandaric, L., Mor, J. R., Sabater, S., Petrovic, M. (2018). Impact of urban chemical pollution on water quality in small, rural and effluent-dominated Mediterranean streams and rivers. *Science of the Total Environment*, 613, 763–772.
86. Manzetti, S., Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. *Marine pollution bulletin*, 79(1–2), 7–15.
87. Martinez J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants // *Environ. Pollut.* 2009. V. 157. No 11. P. 2893–2902
88. McClung, R. P., Roth, D. M., Vigar, M., Roberts, V. A., Kahler, A. M., Cooley, L. A., & Hill, V. R. (2017). Waterborne disease outbreaks associated with environmental and undetermined exposures to water—United States, 2013–2014. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 66(44), 1222.
89. Meride, Y., & Ayenew, B. (2016). Drinking water quality assessment and its effects on residents health in Wondo genet campus, Ethiopia. *Environmental Systems Research*, 5(1), 1–7.
90. Michalak, A. M. (2016). Study role of climate change in extreme threats to water quality. *Nature News*, 535(7612), 349.
91. Michałowicz, J., Duda, W., (2007). Phenols – Sources and Toxicity. *Polish J. of Environ. Stud.*, 16, 3, 347–362.
92. Misra, A. K. (2014). Climate change and challenges of water and food security. *International Journal of Sustainable Built Environment*, 3(1), 153–165.
93. Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., & Bierbaum, G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS microbiology ecology*, 94(5), fiy057.
94. Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., & Jofre, J. (2013). Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations ?. *Mobile genetic elements*, 3(4), e25847.
95. Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., & Jofre, J. (2013). Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future microbiology*, 8(6), 739–751

96. Oloruntoba, E. O., Folarin, T. B., & Ayede, A. I. (2014). Hygiene and sanitation risk factors of diarrhoeal disease among under-five children in Ibadan, Nigeria. *African health sciences, 14*(4), 1001–1011.
97. Ozmen, M., Güngördü, A., Kucukbay, F. Z., & Güler, R. E. (2006). Monitoring the effects of water pollution on *Cyprinus carpio* in Karakaya Dam Lake, Turkey. *Ecotoxicology, 15*(2), 157–169.
98. Paulson, J. R., Mahmoud, I. Y., Al-Musharafi, S. K., & Al-Bahry, S. N. (2016). Antibiotic resistant bacteria in the environment as bio-indicators of pollution. *Open Biotechnology Journal, 10*, 342–351.
99. Roccaro, P., Mancini, G., Vagliasindi, F. G. (2005). Water intended for human consumption—Part I: Compliance with European water quality standards. *Desalination, 176*(1–3), 1–11.
100. Säve-Söderbergh, M., Bylund, J., Malm, A., Simonsson, M., & Toljander, J. (2017). Gastrointestinal illness linked to incidents in drinking water distribution networks in Sweden. *Water research, 122*, 503–511.
101. Schweitzer, L., Noblet, J. (2018). Water contamination and pollution. *In Green chemistry: Elsevier*, 261–290.
102. Shi, P., Jia, S., Zhang, X. X., Zhang, T., Cheng, S., & Li, A. (2013). Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water research, 47*(1), 111–120.
103. Shiklomanov A., (2000). Appraisal and assessment of world water resources. *Water International, 25*(1), 11–32.
104. Singh R., Singh A. P., Kumar S., Giri B.S., Kim K-H. (2019). Antibiotic Resistance in Major Rivers in the World: A Systematic Review on Occurrence, Emergence, and Management Strategies. *Journal of Cleaner Production, 234*.
105. Spinu, M., Niculae, M., Brudasca, G. F., Sandru, C. D., & Pall, E. (2016). The antibiotic resistance pattern of water polluting cocci around the Danube river mouth. *International Journal of Infectious Diseases, 53*, 48–49.



106. Stange, C., Sidhu, J., Tiehm, A., & Toze, S. (2016). Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. *International journal of hygiene and environmental health*, 219 (8), 823–831.
107. Tao, R., Ying, G. G., Su, H. C., Zhou, H. W., & Sidhu, J. P. (2010). Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 158(6), 2101–2109.
108. van Vliet, M.T.H., Jones, E., Franssen, W.H.P., Flörke, M., Hanasaki, N., Wada, Y., Yearsley, J.R., (2020). Global water scarcity including surface water quality and expansions of clean water technologies. *Environ. Res. Lett.*, 16, 024020.
109. Wagner, M., Scherer, C., Alvarez–Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Reifferscheid, G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 1–9.
110. Wang, R. N., Zhang, Y., Cao, Z. H., Wang, X. Y., Ma, B., Wu, W. B., & Yuan, Q. B. (2019). Occurrence of super antibiotic resistance genes in the downstream of the Yangtze River in China: Prevalence and antibiotic resistance profiles. *Science of The Total Environment*, 651, 1946–1957.
111. Weigel, L.M., Donlan, R.M., Shin, D.H. (2007). High–level vancomycin–resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 231–238.
112. WHO, UNICEF. World Health Organization (WHO) and the United Nations Children’s Fund (UNICEF); Geneva: 2017. Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene: Update and Sustainable Development Goal Baselines. License: CC BY–NC–SA 3.0 IGO.
113. World Health Organization (WHO). *Global Report on Drowning: Preventing a Leading Killer*. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.
114. World Health Organization. (2008). Guidelines for drinking–water quality: second addendum. Vol. 1, Recommendations.

115. Xu, L., Ouyang, W., Qian, Y., Su, C., Su, J., & Chen, H. (2016). High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 213, 119–126.
116. Yang, J., Wang, H., Roberts, D. J., Du, H. N., Yu, X. F., Zhu, N. Z., & Meng, X. Z. (2020). Persistence of antibiotic resistance genes from river water to tap water in the Yangtze River Delta. *Science of The Total Environment*, 742, 140592.
117. Zhang, G., Lu, S., Wang, Y., Liu, X., Liu, Y., Xu, J., & Yang, Y. (2020). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes and their correlations in lower Yangtze River, China. *Environmental Pollution*, 257, 113365.
118. Zolkefli, N., Sharuddin, S. S., Yusoff, M. Z. M., Hassan, M. A., Maeda, T., Ramli, N. (2020). A Review of Current and Emerging Approaches for Water Pollution Monitoring. *Water*, 12(12), 3417

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Гідроекологічна характеристика річок Закарпаття

Закарпатський регіон має один з найбільших водно – ресурсних потенціалів України. Гідрологічна мережа області налічує 152 річки. До найбільших багатоводних річок належать Тиса, Латориця, Уж, Боржава, Ріка, Риня, Тересля, Тересва, які беруть початок у високогірній частині Карпатських гір [1, 4, 25, 26].

Найбільшою вважається річка Тиса, довжина якої складає 201 км в межах України, а площа басейну 157 тис. км<sup>2</sup>. Річка протікає на територіях Угорщини, Сербії та України і є притокою Дунаю [19]. Для водного режиму річки характерні літньо – осінні дощові паводки, та високе весняне водопілля [16]. Живлення водойми переважно дощове, в зимній період – снігове [28]. Річка Тиса по всій протяжності підпадає під антропогенний вплив, оскільки протікає через населені пункти, піддається забрудненню комунально–побутовими стічними водами. В період повноводдя відмічається зростання концентрацій важких металів Cu, Zn, Cr, а в період обробки сільськогосподарських угідь в точкових джерелах фіксується коливання вмісту нітратів, нітритів та фосфатів [8, 27]. Також відмічається забруднення поліароматичними вуглеводнями, кадмієм та свинцем, як у воді річки Тиса, так і в її притоках [14].

Річка Латориця бере свій початок на схилах Водороздільного хребта [9], загальна довжина водойми становить 191 км<sup>2</sup>, на території України 144 км<sup>2</sup> [3, 21]. На берегах річки розташовані населені пункти, зокрема місто Мукачево та прилеглі до нього села й місто Чоп де, водойма перетинає кордон України, й вже в Словаччині впадає в річку Бодрог [13]. Латориця підпадає під чималий антропогенний тиск, з одного боку це, стічні господарсько–побутові води, розташування сільськогосподарських угідь неподалік берегових ліній водойми, а з іншого, магістральні нафто- і газопроводи які перетинають річку [7,11].

На південних схилах Верховинського Вододільного хребта бере свій початок річка Уж, яка протікає через місто Ужгород та прилеглі до нього села й впадає в річку Лаборець, що на території Словаччини [15, 20]. Основними забруднювачами річки Уж є комунально–побутові й промислові стоки, автомагістралі та залізничні шляхи, які проходять через водотік, об'єкти деревообробної та лісохімічної промисловостей, а також осередки сільськогосподарських угідь розташованих на її берегах [20].

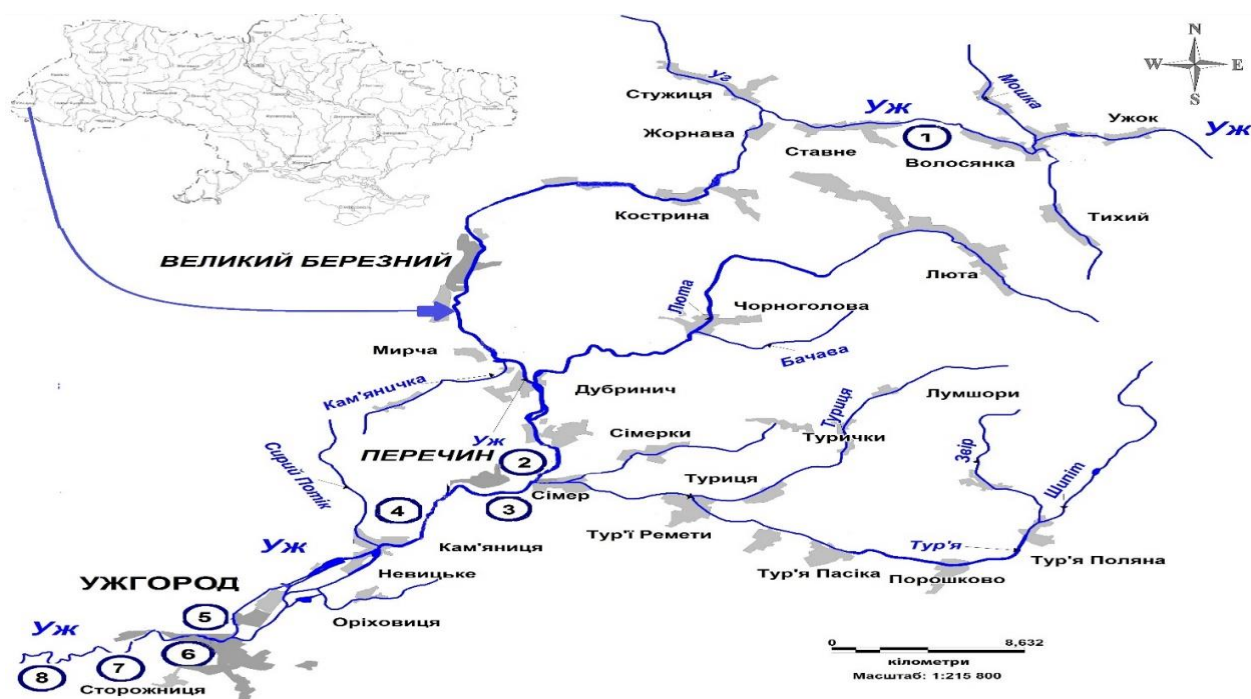
Зростання гідроекологічних проблем річково–басейнових систем області зумовлює до проведення комплексних досліджень з метою розробки нових шляхів поліпшення стану річок Закарпаття.

## **2.2. Розташування моніторингових точок пробовідбору зразків води та донних відкладів із річки Уж**

Для проведення досліджень зразки води та донних відкладів річки Уж відбрили з 8–ми точок, які характеризувалися різним рівнем антропогенного навантаження на водойму:

- 1) рекреаційна, що на території витоку 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 (рис. 2.2.1).



**Рис. 2.2.1.** Картохема досліджуваних ділянок річки Уж  
 1–рекреаційна територія (село Волосянка); 2 – до м. Перечин; 3–100 м від струмка Доморадж; 4–за м.Перечин (техногенно–трансформована територія); 5– до м.Ужгород; 6–за м.Ужгород (урбанізована територія); 7–до с. Сторожниця; 8–за с. Сторожниця (аграрна територія).

Найменш ураженою виявилася територія у витокі річки, яка знаходиться в гірській місцевості, в межах села Волосянка ( $48^{\circ}59'07.3''$  N,  $22^{\circ}50'01.7''$  E). Освоєння даної території обмежене через гірський рельєф та лісистість місцевості й найменше підпадає під антропогенний тиск.

Ділянка річки нижче за течією була визначена, як антропогенно–навантажена, через близьке розташування до Перечинського лісохімічного комбінату. Найбільш ймовірним джерелом забруднення на даній території є промислові стічні води які потрапляють до струмка Доморадж, який протікає біля лісохімічного комбінату й впадає в річку Уж [30] (рис.2.2.2).

Перечинський лісохімічний комбінат є одним з найбільших виробників деревновугільної продукції у Європі. На промисловому підприємстві також налагоджене виробництво етилацетату, а основою для виробництва продукції заводу служать карбамідо формальдегідні смоли.

Виробництво продукції хімічного походження вимагає дотримання екологічних стандартів з захисту довкілля, зокрема встановлення відповідних систем очищення води.



**Рис. 2.2.2** Техногенно–трансформована ділянка (місце впадіння струмка Доморадж у річку Уж)

Води струмка характеризуються неспецифічним різким запахом, кольором, розрідженим рослинним покривом на береговій лінії, низьким біорізноманіттям флори та фауни. Ряд численних досліджень свідчать про незадовільний екологічний стан територій розміщених навколо Перечинського лісохімічного комбінату [30, 32].

З метою визначення впливу антропогенного навантаження на водойму проби води та донних відкладів відбирали з трьох точок :

- до міста Перечин ( $48^{\circ}44'59.9''$  N,  $22^{\circ}30'53.1''$  E );
- в 100 м від місця впадіння струмка Доморадж в річку Уж ( $48^{\circ}44'59.9''$  N,  $22^{\circ}30'53.1''$  E);
- за містом Перечин ( $48^{\circ}43'37.1''$  N,  $22^{\circ}28'42.1''$  E) (рис.2.2.3).





**Рис. 2.2.3** Техногенно–трансформована двлянка (100 м від місця впадіння струмка Доморадж у річку Уж)

Територія в межах міста Ужгород була визначена, як урбанізована, зразки відбирали до міста Ужгород ( $48^{\circ}38'28.5''$  N,  $22^{\circ}20'48.5''$  E) та за його межами ( $48^{\circ}37'10.2''$  N,  $22^{\circ}15'26.4''$  E) (рис. 2.2.4).

Зростання густоти населення призводить до змін природних ландшафтів, а спричинений ним антропогенний тиск викликає зміни гідрологічного режиму водних об'єктів. Вплив урбанізаційних процесів негативно позначається на якості поверхневих вод, неконтрольоване водовідведення, скид господарсько–побутових та промислових стічних вод, засмічення берегових ліній водойм є основними забрудниками гідроекосистеми міста та прилеглих районів [5, 6].

Саме тому комплексний аналіз якості поверхневих вод до міста та за його межами дозволить визначити вплив урбанізації на стан гідроекосистеми в межах обласного центру Закарпаття.



**Рис. 2.2.4** Урбанізована ділянка (за м. Ужгород)

На території села Сторожниця, яке знаходиться за межами міста Ужгород, зосереджена значна кількість сільськогосподарських угідь та фермерських господарств, які знаходяться поблизу берегової лінії річки, що обумовило класифікувати її як ділянку з аграрним навантаженням (рис. 2.2.5).

Екстенсивна господарська діяльність призводить до надмірного навантаження на водні об'єкти — їх замулення, засмічення, виснаження, і як результат — деградацію [23]. Розміщення сільськогосподарських угідь поблизу водойм часто спричинює надмірне поступлення мінеральних добрив та пестицидів які разносяться з поверхневим стоком й підземними водами, що призводить до евтрофікації водойм [12]. Відбір проб на аграрній території здійснювали до села Сторожниця ( $48^{\circ}36'47.8''$  N,  $22^{\circ}15'16.8''$  E) та за селом ( $48^{\circ}36'11.7''$  N,  $22^{\circ}12'18.3''$  E).





**Рис. 2.2.5** Аграрна ділянка (с. Сторожниця)

### **2.3** Методика визначення гідрохімічних показників якості води та донних відкладів

*Визначення концентрацій металів, сполук азоту, фенолів загальних та формальдегіду в зразках води.* Відбір проб води проводили з поверхневого горизонту середини річки за допомогою пластикових пробовідбірників об'ємом 1 дм<sup>3</sup> згідно ДСТУ ISO 5667–2:2003. Донні відклади відбирали згідно з ГОСТ 17.1.5.01.80, з урахуванням морфології русла водойми. Забір проводили з 8-ми точок упродовж вегетативного періоду (1 раз в місяць) 2016, 2018 та 2020 років, аналізи проводили в день забору, зразки води не консервували. Експерименти проводили в чотирьох повторюваностях, за статистично достовірні приймалася різниця при рівні значимості  $p \leq 0,95$ . Дослідження проводили на базі лабораторії моніторингу вод Басейнового управління водних ресурсів річки Тиса спільно з керівником лабораторії моніторингу вод та ґрунтів Сенік Л.М.

Визначення концентрацій металів у зразках води та донних відкладах проводили методом атомно-абсорбційної спектроскопії на атомно-абсорбційному спектрометрі Analytik Jena ContrAA 300 (Німеччина), який оснований на поглинанні атомами випромінювання від зовнішнього світла [24]. Пілотні дослідження з визначення концентрації металів у зразках води та донних відкладів проводили на мас-спектрометрі з індуктивно-зв'язаною плазмою ICP–MS «Agilent 7700x» згідно ДСТУ ISO 11885:2005.

Нітрит–іони визначали діазотуванням реактивом Грісса з утворенням діазосполуки червоно–фіолетового кольору згідно КНД 211.1.4.023–95. При визначенні концентрації нітритів понад 0,3 мг/дм<sup>3</sup> у зразку – його розводили. До зразка води об'ємом до 50 мл додавали 2 мл розчину реактиву Грісса, перемішували й залишали на 40 хвилин, після чого фотометрували при довжині хвилі 520 нм. В якості контролю використовували розчин дистильованої води з реактивом Грісса. Концентрацію нітритів у зразках води вираховували за формулою:

$$X = \frac{C \cdot 50}{V}$$

C – це масова концентрація нітритів, мг/дм<sup>3</sup>; 50 – об'єм стандартного розчину, мл; V – об'єм проби, мл.

Нітрати визначали колориметричним методом з фенолдисульфокислотою за ГОСТом 18826–73. Для цього відбирали по 100 мл очищеного від хлоридів фільтрату, за допомогою сульфату срібла й випаровували на водяній бані до отримання сухого залишку. Охолоджували сухий залишок й додавали 2 мл розчину фенолдисульфатної кислоти й доводили до повного розведення, після чого додавали 5 мл розчину концентрованого аміаку та 20 мл дистильованої води. Отриманий розчин колориметрували, й визначали концентрацію за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_1}{V}$$

C – концентрація нітратів на шкалі стандартних розчинів, мг/дм<sup>3</sup>; V<sub>1</sub> – об'єм проби, 50 мл; V – об'єм проби взятої для дослідження.

В зразках води азот амонійний досліджували фотоколориметричним методом за якісною реакцією з реактивом Несслера згідно МВВ 081/12–0106–03. До

досліджуваного розчину додавали 1 мл реактиву Несслера, перемішували й через 3 хвилини визначали оптичну густина на спектрофотометрі Contr AA 300 при довжинах хвиль 410–430 нм. Концентрацію азоту амонійного визначають за градувальним графіком й вичисляють за формулою:

$$X = \frac{m \cdot 1000}{V}$$

$m$  – маса амонійного нітрогену в зразку води, мкг/л;  $V$  – об'єм досліджуваного розчину, мл. Водневий показник визначали згідно ДСТУ 4077–2001.

Для визначення концентрації фенолів загальних та формальдегіду відбір води проводили у скляні тари з темного скла об'ємом 1 дм<sup>3</sup>, упаковували в контейнери уникаючи потрапляння прямих сонячних променів. Проби не консервували, дослідження проводили в день забору зразків води. Кількісне визначення фенолів загальних у воді проводили за методикою яка базувалась на вилученні фенолу з води бутилацетатом й кінцевим визначенням концентрації полютантів флуорометричним методом на аналізаторі Флюорат 02 згідно методики МВВ 104–12–98. Вміст формальдегіду у пробах води визначали згідно ПНД Ф 14.1:2:4.187–02 на аналізаторі Флюорат 02.

## **2.4 Визначення мікробіологічних показників якості води**

Відбір зразків води для мікробіологічних досліджень проводили згідно ДСанПіН 2.2.4–171–10 «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною». Зразки води відбирали з глибини 15–20 см в стерильні скляні тари, закриті ватно–марлевою пробкою покритою зверху паперовим ковпачком в чотирьох повторюваностях. При транспортуванні проби охолоджували до 2°C використовуючи акумулятори холоду. Бактеріологічні дослідження виконували через 2 години після забору. Експеримент проводили навесні та в літній період 2016–2018–2020 років паралельно з визначенням гідрохімічних показників якості води.

Мікроорганізми які використовують органічні форми нітрогени (сапрофіти) визначали методом посіву на м'ясопептонний агар (МПА), та подальшим

культивуванням при температурі 37°C упродовж 24 годин. Результат виражали в КУО – колонієутворюючих одиницях в 1 см<sup>3</sup> проби.

Бактерії групи кишкових паличок (БГКП) визначали методом мембранної фільтрації, який оснований на фільтрації встановленого об'єму води через нітроцелюльозні мембранні фільтри й подальшому вирощуванні на диференційно–діагностичному середовищі, в якості якого ми використовували середовище Ендо виробництва «Фармактив». При дослідженні води невідомої якості рекомендовано фільтрувати незначні об'єми води, тому в ході експерименту було визначено що найкраще фільтрувати зразки води об'ємом 100 см<sup>3</sup>. Чашки з фільтрами інкубували при 37 °С протягом 24 годин. Виявлені на фільтрах колонії мікроорганізмів ідентифікували за культуральними та біохімічними властивостями, визначаючи таким чином їх приналежність до бактерій групи кишкової палички та розрахунку індексу в 1 дм<sup>3</sup> води згідно МВ 10.2.1–113–2005 Санітарно–мікробіологічний контроль якості питної води.

Мікроскопічні гриби визначали методом посіву 1 мл води на диференційно–діагностичне середовище Чапека–Докса виробництва «Фармактив» та на сусло агарі. Зразки культивували при 27°C протягом 7–ми днів. Результат виражали в КУО – колонієутворюючих одиницях в 1 см<sup>3</sup> проби.

Оліготрофи визначали на голодному агарі (ГА), мікроорганізми, які використовують мінеральні форми нітрогену на крохмале–аміачному агарі (КАА), целюльозоруйнівальні на середовищі Гетченсона з фільтрувальним папером, нітрифікувальні на середовищі Виноградського [10, 17].

Досліди проводили в трьох повторюваностях з двома паралельними постановками. Для оцінки достовірності різниці між статистичними даними постановок обчислювали коефіцієнт Стьюдента  $t$ , за достовірну приймалася різниця при рівні значимості  $p \leq 0,05$ .

## 2.5 Виділення ізолятів, їх ідентифікація та визначення чутливості до антибіотиків

При визначенні мікробного забруднення зразків води з річки Уж виділяли ізоляти з диференційно–діагностичного середовища Ендо та відсівали культури з мясо–пептонного агару які піддавали ідентифікації для визначення переважаючих груп мікроорганізмів у мікробіоценозі водойми. Подальшу ідентифікацію ізолятів проводили з висіванням на диференційно діагностичні середовища: агар Хотінгера, Полкірева, вісмут–сульфіт агар та хромогенні середовища UTI Agar, Modified (Himedia, Індія). Отримані ізоляти ідентифікували за морфологічними, тенкторіальними та біохімічними ознаками з використанням систем для ідентифікації мікроорганізмів "STARHY-test", "ENTERO-test", "STREPTO-test" виробництва "Erba Lachema" (Чеська республіка), приналежність мікроорганізмів до роду *Salmonella* проводили сироваткою Denka Seiken, (Японія), керуючись інструкцією до вказаних тестів та за рекомендаціями [36].

Антибіотикочутливість виділених ізолятів визначали диско–дифузійним методом Кірбі–Бауера згідно з Наказом МОЗ України №167 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» та EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Для постановки тесту на антибіотикочутливість готували мікробну суспензію з 24 годинної культури мікроорганізмів. На поверхню агару Мюлер–Хілтон висівали 100 мкл інокулюму що відповідав 0,5 стандарту МакФарланда. Оптичну густину визначали за допомогою денситометра Biosan. На поверхню середовища попередньо засіяну культурою поміщали стерильні диски з антибіотиками та інкубували 24 години при 37°C. Залежно від діаметра зон затримки росту навколо досліджуваного антибіотика чутливість ізолятів поділяли на чутливі, помірно–чутливі та стійкі до антибіотичних препаратів згідно з критеріями інтерпретації результатів антибіотикограм за Наказом МОЗ №167 від 05.04.2007.

Для проведення тесту на чутливість до антибіотиків використовували наступні диски з антибіотиками: ампіцилін (10 мкг), ампіцилін-сульбактам (10/10 мкг), цефтріаксон (30 мкг), офлоксацин (5 мкг), іміпенем (10 мкг), цефоперазон–сульбактам (75/30 мкг), цефуроксим (30 мкг), меропенем (10 мкг); амікацин (30 мкг); гентаміцин (10 мкг); ципрофлоксацин (5 мкг), левофлоксацин (5 мкг), гатифлоксацин (5 мкг), норфлоксацин (10 мкг), ломефлоксацин (30 мкг); тетрациклін (30 мкг), доксициклін (10 мкг) та азитроміцин (15 мкг) виробництва HiMedia (Індія) та Фармактив (Україна).

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.

## **2.6. Вивчення здатності мікроорганізмів до утворення біоплівки**

Вивчення здатності ізолятів до утворення біоплівок проводили спектрофотометрично у 96–лункових полістеролових планшетах (Greiner–BioOne, Austria), за методикою О’Тооле [33], яка базується на здатності барвника кристалічного фіолетового зв’язуватись з клітинами та матриксом біоплівки. Для експерименту використовували 48 годинну бактеріальну культуру, вирощену у поживному бульйоні (TSB, Himedia, India) при 37°C та суспензію з оптичною густиною  $5 \times 10^8$  КУО/мл (0,5 McFarland standard). Оптичну гуστину визначали на денситометрі (Biosan).

В ході експерименту суспензію бактерій вносили в лунки 96–лункового планшета по 200 мкл, використовуючи на один ізолят 6 лунок (Greiner–BioOne, Austria). За негативний контроль приймали лунки з 180 мкл бульйона Мюллера–Хінтона без бактеріальної суспензії. У якості контролю використовували штам з відомою здатністю до формування біоплівки *Staphylococcus aureus* ССМ 4223.

Інкубацію проводили протягом 48 годин при 37 °С, опісля планктонні форми видаляли шляхом 5 разового промивання дистильованою водою (200 мкл на 1 лунку).

Фарбування біоплівки проводили за допомогою внесення у лунки 200 мкл 0,1 % розчину кристалічного фіолетового і залишали на 30 хв. Після чого лунки промивали водою, використовуючи по 200 мкл води на одну лунку, промивання проводили в 4–кратному повторі. Екстракцію барвника із клітин проводили за наступною схемою: у лунки додавали по 200 мкл 33 % оцтової кислоти, експозиція складала 20 хв при кімнатній температурі.

Оптичну густина визначали за допомогою у спектрофотометра Synergy HT (Biotek, USA) для цього планшет поміщали в прилад та проводили вимірювання при довжині хвилі 550 нм. Інтерпретацію біоплівкоутворення ізолятів класифікували наступним чином: не біоплівкотвірні, слабка щільність утворення біоплівки, помірна та висока.

$OD(\text{ізолят}) \leq OD(\text{контроль}) =$  відсутність біоплівкоутворення;

$OD(\text{контроль}) \leq OD(\text{ізолят}) \leq 2OD(\text{контроль}) =$  слабе утворення біоплівки;

$2OD(\text{контроль}) \leq OD(\text{ізолят}) \leq 4OD(\text{контроль}) =$  помірне утворення біоплівки;

$4OD(\text{контроль}) \leq OD(\text{ізолят}) =$  висока здатність до утворення біоплівки [22, 31].

## **2.7 Визначення генотипових детермінант антибіотикорезистентності грамнегативних мікроорганізмів**

Гени стійкості визначали у фенотипово резистентних культур виділених зі зразків води. Дослідження проводили у 2018 році молекулярно–генетичним методом на базі приватної лабораторії «Medicover» м. Львів, яка є частиною європейського медичного холдингу «Medicover» спільно з завідувачем лабораторії Чорненькою О.І.

Бактеріальну ДНК виділяли методом лізису температури в буфері TE. Колонії добових культур досліджуваних мікроорганізмів поміщали в центрифужну пробірку з 500 мкл стерильної деіонізованої води, й суспендували за допомогою шейкера. Мікробні клітини осаджували центрифугуванням при 10 000 g протягом однієї



хвилини. Надосадову рідину видаляли, осад ресуспендували в 100 мкл буфера ТВЕ. Пробірки інкубували в твердотільному термостаті протягом 20 хв при 99°C, потім центрифугували при 10 000 g протягом однієї хвилини. 1 мл супернантанту використовували для проведення полімеразних ланцюгових реакцій [18].

Для визначення генетичних маркерів стійкості використовували набори «Літех» (Росія): набір «Резистентность к карбапенемам–2» для визначення гени стійкості до карбапенемів *bla*NDM; набір «Резистентность к карбапенемам–3» для визначення генів *bla*OXA48-like; набір «ТЕТРАПОЛ» для визначення резистеності тетрациклінів — *bla*Tet-M; набір «Резистентность к цефалоспорином–1» для визначення генів стійкості до цефалоспоринів — *bla*CTX-M. Реакційні компоненти вводили згідно з інструкціями виробника. Позитивний та негативний контроль були включені до наборів та виконувались відповідно до інструкцій виробника.

Генетичні маркери *bla*TEM, *bla*KPS та *bla*SHV визначали з використанням праймерів наведених у таблиці 2.6.1. Температури плавлення олігонуклеотидів коливалися в межах 55–60°C.

Кінцевий об'єм реакційної суміші для проведення ПЛР становив 25 мкл й містив 1,5 μL досліджуваної ДНК, DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США), 0,8 μmol/L кожного праймера. *E. coli* ATCC 25922 використовували як негативний контрольний. Для позитивного контролю використовували штами носії генів стійкості: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (*bla*KPS), *K. pneumoniae* ATCC 5103 (*bla*TEM), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (*bla*SHV).

Полімеразно–ланцюгову реакцію проводили за допомогою детектора DTPrime Amplifier («ДНК Технологія», Росія) з використанням наступної програми: початкова точка 94°C протягом 3 хв, потім 30 циклів по 95 °C протягом 1 хв, 40 сек при 55°C, 50 сек при 60°C та 72°C протягом 50 сек з кінцевим продовженням при 72 °C протягом 5 хв.



Таблиця 2.6.1.

## Праймери використані у полімеразній ланцюговій реакції

Гени	Нуклеотидна послідовність праймерів 5'–3'	Розмір праймера, bp	Посилання
<i>blaKPC</i>	5'–GCGGAACCCCTATTTG–3' (F) 5'–CTTGTCATCCTTGTTAGGCG–3' (R)	798	[35]
<i>blaTEM</i>	5–GCGGAACCCCTATTTG–3 5–ACCAATGCTTAATCAGTGAG–3	964	[34]
<i>blaSHV</i>	5'–TTATCTCCCTGTTAGCCACC–3' (F) 5'–GATTTGCTGATTTTCGCTCGG–3' (R)	795	[29]

Отримані продукти візуалізували електрофорезом (0,5–кратний буфер TE) у 2% агарозному гелі, що містить бромід етидію, з подальшим переглядом в УФ–просвічувачі.

*Визначення генетичних маркерів стійкості з метагеномної ДНК зразків води.* Зразки води (500 мл –1000 мл) фільтрували через стерилізований мембранний фільтр (Millipore, США) з розміром пор 0,22 мкм. Тотальну ДНК екстрагували з мембранного фільтра за допомогою модифікованого методу з гексадецил триметил бромідом амонію (СТАВ) згідно з методикою Андронова [2]. Виділену метагеномну ДНК води досліджували за допомогою полімеразно ланцюгової реакції на наявність генів стійкості використовуючи набори реагентів «Літех» (Росія) для визначення наступних генетичних детермінант: карбапенеми *blaNDM*; *blaOXA48-like*; тетрацикліни — *blaTet-M*; цефалоспорини — *blaCTX-M*. Тестування проводили з використанням детектуючого ампліфікатора DTPRIME Amplifier («ДНК Технологія») згідно з інструкціями виробника.

### *Методи статистичної обробки матеріалів*

Отримані числові результати досліджень підлягали статистичній обробці за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програм Statistica 6 та Microsoft Excel 2010. Розраховували середні значення показників та їхню стандартну помилку,  $\bar{x} \pm s$ . Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за Тьюкі тестом та критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ).

Визначення взаємозалежностей між двома змінними проводили за допомогою лінійного коефіцієнта кореляції Пірсона ( $r$ ). Зв'язок вважали слабким при коефіцієнті менше ніж 0,025, якщо  $r$  був більше ніж 0,025, але менше як 0,075 то такий зв'язок розцінювався як помірний. При  $r$  більшому або рівному 0,75 кореляційний зв'язок вважався сильним. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

### ***Висновки до розділу:***

У розділі наведено коротку гідроекологічну характеристику водоюм Закарпатської області. 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 з визначення генетичних детермінант стійкості до антибіотиків у зразках води з поверхневих вод та джерел водопостачання.

### ***Перелік посилань:***

1. Адаменко, О.М., Ковальчук, І.П. (1997). Регіональний еколого – геоморфологічний аналіз. *Інститут українознавства*, 1997, 444.
2. Андронов, Е.Е., Пинаев, А.Г., Першина, Е.В., Чижевская, Е.П. (2011). Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. *Санкт-Петербург, ВНИИСХМ РАСХН*, 23.

3. Бекетов, Є. О., Степанець, Л. Ф., Семенова, О. І., Степанець, І. Ф., Летицька, О. М. (2015). Проблеми використання водних ресурсів Закарпатської області (на прикладі басейну річки Латориця) *Харчова промисловість* 17,74–78
4. Бриндзя, І.В. (2011). Оцінка якості поверхневих вод Прикарпаття за її фізико-хімічними показниками. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету. Серія Біологія*, 2 (47), 7–11.
5. Васюков, О.Є. (2012). Аналітична хімія. Кількісний аналіз об'єктів довкілля. *Вода:практикум*, ХНАУ,58.
6. Величко, С., Дупляк, О. (2022). Методи боротьби з пластиковими відходами в водних об'єктах, огляд світового досвіду. *Проблеми водопостачання, водовідведення та гідравліки*, (40), 4–15.
7. Габчак, Н. Ф. (2004). Еколого–геоморфологічні та гідроекологічні проблеми річкових систем Закарпаття. *Вісник Львівського університету, серія географічна* , 30, 40–45.
8. Габчак, Н. Ф. (2008). Прогнозна оцінка забруднення вод басейну Тиси в межах Закарпатської області. Матеріали міжнародної інтернет–конференції "Розвиток України в ХХІ ст.: економічні, гуманітарні та правові проблеми", *Тернопіль*, 26–31.
9. Гуда, О. (2012). Порівняння факторів формування селевих процесів в басейні річки Тиса (Закарпаття). *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Геологія*, 56, 8–12.
10. Гудзь, С.П., Гнатуш, С.О., Яворська, Г.В., Білінська, І.С., Борсукевич, Б.М. (2014). *Практикум з мікробіології: підручник. Львів: ЛНУ імені Івана Франка*, 436.
11. Іваненко, О. Г., Катинська, І. В. (2008). Розрахунок винесення нафтопродуктів поверхневим стоком річки Латориці. *Вісник Одеського державного екологічного університету*, 5, 150–154.
12. Калетник, К. В. (2017). Лімітуючі фактори антропогенної евтрофікації малої річки Замчисько. *Студентський вісник НУВГП*, (2 (8)), 42–45.

13. Козак, О. (2013). Зміна флористичних характеристик гірських екосистем басейну р. Латориця (Закарпаття) за умов їх деградації. *Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія*, 142, 66–75.
14. Копча, Ю. Р., Стельмахович, Г. Д. (2015). Екологічні проблеми басейну річки Тиса. *Екологічні проблеми природокористування та охорона навколишнього середовища*, 95–96.
15. Кричевська, Д., Брусак, В. (2006). Орографічні і гідрологічні особливості Ужанського Національного Парку. *Проблеми геоморфології і палеогеографії Українських Карпат і прилеглих територій*, 163–172.
16. Круглов, І. С. (2002). Підготовчий проект програми сталого розвитку басейну річки Тиса. *Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія*, 4, 35–39.
17. Кузнецов, С. И., Дубинина, Г. А. (1989). Методы изучения водных микроорганизмов. *Наука*, 288.
18. Лагун, Л.В., Жаворонок, С.В. (2012). Молекулярно–генетическая технология выявления резистентности энтеробактерий к бета–лактамным антибиотикам на основе геноиндикации бета–лактамаз расширенного спектра. *Лабораторная диагностика*, 2 (02), 74–85.
19. Левчак, О.Ю., Лета, В.В., Осійський, Е.Й. (2013). Гідроекологічна характеристика Верхньої Тиси (в межах Закарпатської області). *Наук. вісник Ужгородського університету, Серія: Географія. Землеустрій. Природокористування*, 2, 13–20.
20. Ніколайчук, В. І., Вакерич, М. М., Шпонтан, Ю. М., Карпюк, М. К. (2015). Сучасний стан водних ресурсів Закарпаття. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Екологія*, (23 (2)), 116–123.
21. Ободовський, О.Г., Онищук, В.В, Розлач, З.В. (2012) Латориця: гідрологія, гідроморфологія, руслові процеси. *Київ*, 63 –65.
22. Окулич В.К, Кабанова А.А, Плотников Ф.В. (2017) Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ.; 300.
23. Первачук, М. В., Мушинська, В. І. (2016). Оцінка стану ґрунтового покриву басейну річки Згар. *Сільське господарство та лісівництво*, (3), 226–234.

24. Пупишев А. А. (2009). Атомно-абсорбційний спектральний аналіз. М.: *Техносфера*, 55.
25. Роман, Л. Ю., Чундак, С. Ю. (2017). Оцінка якості вод річки Визниця у межах села Кольчино Мукачівського району Закарпаття. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Хімія*, 2, 120–124.
26. Семаль, В.І (2014). Доповідь про стан навколишнього середовища Закарпатської області за 2013 рік. Департамент екології та природних ресурсів Закарпатської облдержадміністрації, Ужгород Retrieved from [URL www.ecozakarp.at.gov.ua/wp-content/uploads/2012/02/Закарпатська\\_регдоповідь\\_2014.pdf](http://www.ecozakarp.at.gov.ua/wp-content/uploads/2012/02/Закарпатська_регдоповідь_2014.pdf) (дата звернення: 07.05.2021)
27. Скоблей, М. П., Линник, П. М. (2018). Порівняльна оцінка зміни концентрації окремих компонентів хімічного складу води транскордонної ділянки р. Тиси в сучасних умовах. *Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія*, (2), 16–26.
28. Хільчевський, В. К., Лета, В. В. (2016). Комплексна оцінка якості води р. Чорна Тиса. *Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія*, 3, 50–56.
29. Arlet, G., Rouveau, M., Philippon, A. (1997). Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *FEMS microbiology letters*, 152(1), 163–167.
30. Kryvtsova, M., Bobrik, N., Sabov, M., Sabov, M. (2017). Microbiological Indication of Soils in Zone of Influence of Perechin Timber and Chemical Plant. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, (1).
31. Muslima J, Abuhena Md, Kalam AA, Mohammad MK. (2018) *In vitro* antibacterial and antibiofilm activity of selected medicinal plants and spices extracts against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 7(3): 2114–2121.
32. Nikolaichuk, V., Kryvtsova, M., Bobrik, N. (2014) Biological activity of Transcarpathian soils in zone of anthropogenic pollution. *British Journal of Science, Education and Culture*, №1(5), 64–74.
33. O'Toole GA. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments*, 30; (47): 24–37.

34. Olesen, I., Hasman, H., Møller Aarestrup, F. (2004). Prevalence of  $\beta$ -lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial drug resistance*, 10(4), 334–340.
35. Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 70,119–23.
36. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer Science & Business Media, Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*.

## РОЗДІЛ 3. ОЦІНКА ЯКОСТІ ВОДИ ЗА ГІДРОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ

### 3.1 Вміст металів у системі «вода–донні відклади» річки Уж

Річки відіграють основну роль в забезпеченні населення питною водою та багатьох видів екосистемних послуг. Завдяки швидкій індустріалізації та урбанізації водні екосистеми дедалі більше підпадають під вплив техногенного забруднення [29].

Одним з найістотніших забруднювачів водних об'єктів є підвищені концентрації важких металів, які володіють найбільшим кумулятивним ефектом. Надходження важких металів до водойм відбувається двома основними шляхами: природним і антропогенним. Природне забруднення здебільшого спричинене протіканням геохімічних процесів: ерозією, вулканічною діяльністю, вивітрюванням гірських порід та мінералів тощо [25]. Техногенний вплив супроводжується перенасиченням водних об'єктів промисловими та комунальними стоками, забрудненими атмосферними опадами, надмірною хімізацією сільськогосподарських полів, нагромадженням великої кількості твердих побутових відходів, видобутком корисних копалин і багатьма іншими факторами, які викликають руйнування природного стану водних екосистем.

Під час оцінювання екологічного стану водойм особливої уваги варті дослідження донних відкладів річок, які дозволяють визначити ділянки акумуляції поллютантів, а також виявити джерела їх надходження у водойми. Накопичуючи пріоритетні забруднювачі навколишнього середовища, донні відклади характеризують вплив техногенезу на водні екосистеми. Вони є своєрідною «пам'яттю», яка визначає особливості накопичення забруднюючих речовин у водному середовищі [9]. Комплексні дослідження в системі «вода – донні відклади» повноцінно відображають порушення рівноваги у гідроекосистемі, що дозволяє адекватно оцінити екологічний стан водойми.

Інтенсифікація антропогенного навантаження в сукупності з природно–кліматичними факторами викликає значні зміни у структурі гідроекосистем, які

супроводжуються порушенням гідрологічного та гідрохімічного режимів, біотрансформацією екотоксикантів та їх акумуляцією в ланцюгах живлення, кінцева ланка яких – людина та тварини [21, 23, 24, 28]. Накопичуючись у донних відкладах, важкі метали можуть мігрувати через харчовий ланцюг до організму людини [19, 27]. Здатність важких металів до біоаккумуляції часто спричинює незворотні зміни як на організмовому, так і на клітинному рівні [20, 23]. За дії підвищених концентрацій важких металів знижується репродуктивна здатність гідробіонтів, уповільнюється їх ріст та підвищується рівень захворюваності [31]. Тривалий токсичний вплив важких металів викликає структурні перебудови у гідробіологічній системі, змінюється видовий склад мікроорганізмів, порушуються механізми природного самоочищення водою [33, 34]. Доведена і їх участь у формуванні антибіотикорезистентності у водних екосистемах [30].

*Поверхневі води.* За результатами аналізу зразків води річки Уж, проведеного протягом весни–літа 2016–2018–2020 років, встановлені перевищення нормативних значень концентрацій важких металів. Дослідження, проведені упродовж трьох років, показали значне коливання концентрацій купруму на моніторингових ділянках №3 та №4. Так, найвищі значення були зафіксовані навесні 2016 року і перевищують ГДК<sub>риб</sub> у 10 разів (таб. 3.1.1), у 2018 році їх вміст дещо знижується, перевищуючи норми у 8,6 разів, а у 2020 році знову підвищується до попередніх значень, перевищуючи ГДК в 9,8 разів (моніторингова ділянка №3).

Порівняно з фоновими значеннями динаміка до підвищення концентрацій купруму характерна тільки для техногенно–трансформованої ділянки. Подібна тенденція свідчить про регулярне надходження поллютанту в поверхневі води, джерелом якого можуть бути неконтрольовані скиди промислових та комунально–побутових стічних вод. Тоді, як на аграрній та урбанізованій територіях спостерігається незначне підвищення  $Cu$ , з перевищенням нормативних значень 2–3 рази. Варто зазначити, що час проведення досліджень співпав із періодом активної хімізації сільськогосподарських земель, тому внесення мінеральних добрив, а



особливо використання засобів по боротьбі зі шкідниками, могли призвести до підвищення концентрацій міді у поверхневих водах.

Таблиця 3.1.1

Середні концентрації важких металів у воді річки Уж на ділянках із різним характером антропогенного навантаження 2016 р. ( $M \pm m$ ;  $n=4$ ) (мкг/дм<sup>3</sup>)

Показник	Місяці	Пункти відбору проб води							
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Pb	IV–V	3,1 ± 0,75	2,2 ± 0,20	7,1 ± 0,31	5,3 ± 0,08	5,2 ± 0,14	1,9 ± 0,27	3,3 ± 0,34	5,1 ± 0,32
	VI– VII	3,2 ± 0,22	2,8 ± 0,11	9,8 ± 0,13	6,0 ± 0,20	5,8 ± 0,19	8,3 ± 0,14	7,8 ± 0,33	7,3 ± 0,52
Cr	IV–V	1,2 ± 0,10	0,7 ± 0,11	5,2 ± 0,15	2,2 ± 0,14	2,1 ± 0,24	1,6 ± 0,24	2,1 ± 0,24	4,3 ± 0,34
	VI– VII	1,2 ± 0,20	1,3 ± 0,16	7,1 ± 0,35	3,7 ± 0,23	1,2 ± 0,10	1,4 ± 0,14	1,3 ± 0,16	1,2 ± 0,17
Ni	IV–V	5,2 ± 0,10	6,3 ± 0,20	6,5 ± 0,15	7,2 ± 0,17	6,2 ± 0,17	4,8 ± 0,26	3,1 ± 0,45	4,7 ± 0,38
	VI– VII	4,3 ± 0,23	5,7 ± 0,21	9,2 ± 0,21	8,5 ± 0,16	7,4 ± 0,18	6,8 ± 0,29	4,3 ± 0,24	3,6 ± 0,33
Cu	IV–V	1,0 ± 0,10	0,9 ± 0,13	10 ± 1,37	2,3 ± 0,21	2,4 ± 0,35	2,0 ± 0,23	3,8 ± 0,36	5,1 ± 0,27
	VI– VII	1,1 ± 0,11	1,0 ± 0,10	5,1 ± 0,27	2,5 ± 0,20	2,0 ± 0,13	2,4 ± 0,17	2,7 ± 0,27	3,2 ± 0,20
Zn	IV–V	10,3 ± 1,0	12 ± 1,49	41 ± 1,75	15 ± 1,08	8,3 ± 0,25	1,9 ± 0,36	2,7 ± 0,42	4,5 ± 0,35
	VI– VII	8,9 ± 0,70	8,0 ± 2,04	45 ± 2,04	11 ± 1,47	5,2 ± 0,29	2,3 ± 0,18	2,5 ± 0,34	2,8 ± 0,16
As	IV–V	2,1 ± 0,13	0,8 ± 0,10	2,5 ± 0,14	3,2 ± 0,19	2,0 ± 0,14	4,5 ± 0,57	2,6 ± 0,34	7,5 ± 0,27
	VI– VII	2,5 ± 0,15	2,4 ± 0,20	4,6 ± 0,36	4,0 ± 0,28	3,5 ± 0,36	4,9 ±0,31	5,3 ± 0,30	6,8 ± 0,36
V	IV–V	0,7 ± 0,12	0,6 ± 0,10	1,9 ±0,12	1,4 ± 0,23	2,0 ± 0,29	1,5 ± 0,14	1,9 ± 0,13	1,6 ± 0,10
	VI– VII	0,8 ± 0,10	0,9 ± 0,13	0,9 ± 0,12	0,9 ± 0,14	0,9 ± 0,10	0,8 ± 0,15	0,8 ± 0,14	0,9 ± 0,16

Вміст цинку характеризувався схожим до міді просторовим розповсюдженням, наднормативні значення металу зафіксовані в літній період в зоні промислового напруження, де перевищують ГДК<sub>рнб.</sub> від 1,1 до 4,5 раза (створи №4, №3) в 2016 році, в 3,8 рази в 2018 році (таб. 3.1.2), та у 4,8 рази в 2020 році.

Таблиця 3.1.2

Середні концентрації важких металів у воді річки Уж на ділянках із різним характером антропогенного навантаження 2018 р. ( $M \pm m$ ;  $n=4$ ) (мкг/дм<sup>3</sup>)

Показник	Місяці	Пункти відбору проб води							
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Pb	IV–V	2,4 ± 0,43	2,0 ± 0,41	6,0 ± 0,21	5,4 ± 0,08	4,3 ± 0,23	1,6 ± 0,24	2,9 ± 0,08	4,4 ± 0,20
	VI– VII	3,0 ± 0,06	2,2 ± 0,10	7,7 ± 0,25	4,6 ± 0,81	4,4 ± 0,62	7,5 ± 0,38	5,2 ± 0,25	6,2 ± 0,75
Cr	IV–V	0,9 ± 0,04	0,6 ± 0,14	4,9 ± 0,47	2,1 ± 0,14	1,9 ± 0,13	0,85 ± 0,18	2,0 ± 0,20	3,7 ± 0,30
	VI– VII	1,6 ± 0,18	0,9 ± 0,14	6,6 ± 0,38	3,0 ± 0,05	0,8 ± 0,25	1,8 ± 0,22	0,8 ± 0,28	0,7 ± 0,25
Ni	IV–V	4,6 ± 0,17	5,6 ± 0,32	4,8 ± 0,13	7,4 ± 0,17	5,5 ± 0,17	3,6 ± 0,13	2,5 ± 0,28	1,8 ± 0,21
	VI– VII	4,1 ± 0,06	4,8 ± 0,14	7,8 ± 0,78	7,6 ± 0,45	6,5 ± 0,46	6,7 ± 0,35	2,9 ± 0,24	3,5 ± 0,21
Cu	IV–V	0,9 ± 0,13	0,6 ± 0,07	8,6 ± 0,97	2,1 ± 0,21	2,0 ± 0,14	1,2 ± 0,10	3,6 ± 0,10	4,8 ± 0,23
	VI– VII	1,5 ± 0,09	1,5 ± 0,26	4,3 ± 0,54	2,3 ± 0,12	2,3 ± 0,23	1,5 ± 0,17	2,1 ± 0,09	3,2 ± 0,25
Zn	IV–V	7,5 ± 0,75	9,3 ± 0,95	34,1 ± 0,59	15 ± 1,08	6,3 ± 0,29	1,2 ± 0,32	2,9 ± 0,21	5,0 ± 0,23
	VI– VII	8,6 ± 0,28	1,2 ± 0,57	39 ± 0,91	10,3 ± ±0,75	3,7 ± 0,47	2,2 ± 0,30	2,7 ± 0,27	4,5 ± 0,86
As	IV–V	2,0 ± 0,02	0,9 ± 0,37	2,9 ± 0,41	3,2 ± 0,19	1,3 ± 0,24	4,0 ± 0,28	2,5 ± 0,24	7,5 ± 0,21
	VI– VII	1,9 ± 0,40	2,0 ± 0,17	3,2 ± 0,49	3,6 ± 0,40	3,8 ± 0,29	3,8 ± ±0,49	4,4 ± 0,41	7,7 ± 0,47
V	IV–V	0,7 ± 0,09	0,6 ± 0,12	1,8 ± ±0,16	1,6 ± 0,23	1,5 ± 0,10	1,4 ± 0,07	1,8 ± 0,11	1,6 ± 0,39
	VI– VII	0,8 ± 0,12	0,9 ± 0,19	0,8 ± 0,11	0,6 ± 0,20	0,6 ± 0,17	0,5 ± 0,14	0,8 ± 0,11	1,2 ± 0,09

Підвищення концентрацій елемента зафіксоване на незначній відстані від місця впадіння струмка в річку, тож можна припустити, що основним джерелом його поступлення служать стічні води лісохімічного комбінату, які поступають у водотік зі струмка Доморадж, що регулярно поповнюється відходами заводу.

На урбанізованій та аграрній територіях, що розміщені нижче за течією річки, вміст цинку зменшується до допустимих значень. Найнижчі показники виявлені за межами населених пунктів, що, скоріш за все, пов'язано зі зростанням вмісту органічних речовин у цих ділянках через скид комунально-побутових стічних вод (до 85 тис. м<sup>3</sup>/добу), що, ймовірно, спричиняє зв'язування металу у комплекси [15]. Кращому засвоєнню мікроелемента сприяє й перехід до низинних територій зі сповільненою течією та інтенсивно розвиненою рослинністю [13]. Улітку можна спостерігати зменшення цинку у воді по всій протяжності річки Уж, що пояснюється активним споживанням мікроелемента водною біотою.

Відносно нормативних значень для водойм господарсько–побутового користування перевищення концентрацій Cr не зафіксовано, проте встановлено незначні перевищення ГДК<sub>риб</sub> в 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.

У порівнянні з фоновими показниками спостерігається подібна тенденція на моніторинговій ділянці №3, де вміст хрому був у 5,9 раза вище фонових значень у 2016 році, у 4,1 раза в 2018 році та у 5,0 раза в 2020 році. В межах урбанізованої та аграрної територій концентрації металу не перевищували фонових значень у значних межах.

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 відносно норм для водойм господарсько–побутового користування та зростає в 10 разів відносно фонових показників (рис.3.1.3). Підвищений вміст даного елемента зафіксований і в межах урбанізованої території, де протягом 2016 та 2018 років відмічається перевищення фонових показників в 2,5 рази, а в 2020 році у 8 разів.

Таблиця 3.1.3

Середні концентрації важких металів у воді річки Уж на ділянках із різним характером антропогенного навантаження 2020 р. ( $M \pm m$ ;  $n=4$ ) (мкг/дм<sup>3</sup>)

Показник	Місяці	Пункти відбору проб води							
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Pb	IV– V	1,6 ± 0,22	1,7 ± 0,11	6,8 ± 0,28	5,0 ± 0,36	5,1 ± 0,07	2,1 ± 0,27	3,5 ± 0,32	5,3 ± 0,25
	VI– VII	1,1 ± 0,29	3,0 ± 0,33	10,3± 0,57	8,0± 0,25	6,5 ± 0,27	8,8 ± 0,17	8,6 ± 0,43	8,1 ± 0,8
Cr	IV– V	1,3 ± 0,36	0,9± 0,12	5,5 ± 0,66	2,3 ± 0,13	2,2 ± 0,18	1,8 ± 0,26	2,8 ± 0,09	4,5 ± 0,34
	VI– VII	1,5 ± 0,36	1,8 ± 0,11	7,6 ± 0,30	4,5 ± 0,45	1,6 ± 0,19	1,9 ± 0,1	2,2± 0,34	1,6 ± 0,37
Ni	IV– V	5,0 ± 0,04	4,7 ± 0,14	5,7 ± 0,18	6,5 ± 0,24	6,5 ± 0,34	5,4 ± 0,21	3,8 ± 0,32	5,0 ± 0,37
	VI– VII	5,3 ± 0,12	6,2 ± 0,36	9,4 ± 0,22	9,4 ± 0,30	8,2 ± 0,25	8,1 ± 0,31	4,6 ± 0,23	4,0 ± 0,40
Cu	IV– V	1,2 ± 0,37	0,7 ± 0,08	9,8 ± 0,82	3,3 ± 0,17	2,8 ± 0,09	2,3 ± 0,14	4,1± 0,41	6,5 ± 0,59
	VI– VII	1,6 ± 0,36	1,6 ± 0,21	5,6 ± 0,23	2,7 ± 0,14	2,4 ± 0,22	3,1 ± 0,29	3,4 ± 0,30	3,2 ± 0,25
Zn	IV– V	10,1± 0,94	9,3 ± 0,80	39,6± 0,44	14,7± 0,43	8,4 ± 0,21	2,3 ± 0,52	3,7 ± 0,26	5,3 ± 0,55
	VI– VII	6,1 ± 0,40	12,2± 0,94	48,5± 0,28	13,7± 0,85	5,7 ± 0,27	3,4 ± 0,56	3,3 ± 0,62	3,8 ± 0,46
As	IV– V	2,3 ± 0,47	0,7 ± 0,30	2,6 ± 0,08	3,6 ± 0,42	2,4 ± 0,19	5,2 ± 0,51	3,1 ± 0,28	7,8 ± 0,16
	VI– VII	2,8 ± 0,05	2,9 ± 0,41	4,9 ± 0,42	4,4 ± 0,25	4,3 ± 0,42	4,3 ±0,78	6,2 ± 0,27	6,8± 0,36
V	IV– V	0,6 ± 0,12	0,4 ± 0,05	1,6 ±0,22	1,4 ± 0,17	2,1 ± 0,20	1,5 ± 0,51	2,4 ± 0,30	2,1 ± 0,27
	VI– VII	1,2 ± 0,25	1,1 ± 0,18	1,3 ± 0,22	1,5 ± 0,28	1,3 ± 0,28	1,1 ± 0,09	1,3 ± 0,21	1,6 ± 0,23

Вміст арсену зростає в напрямку до пониззя річки і сягає максимальних значень в межах аграрної території, й у порівнянні з фоновими значеннями збільшується в 3–4 рази в протягом досліджуваного періоду.

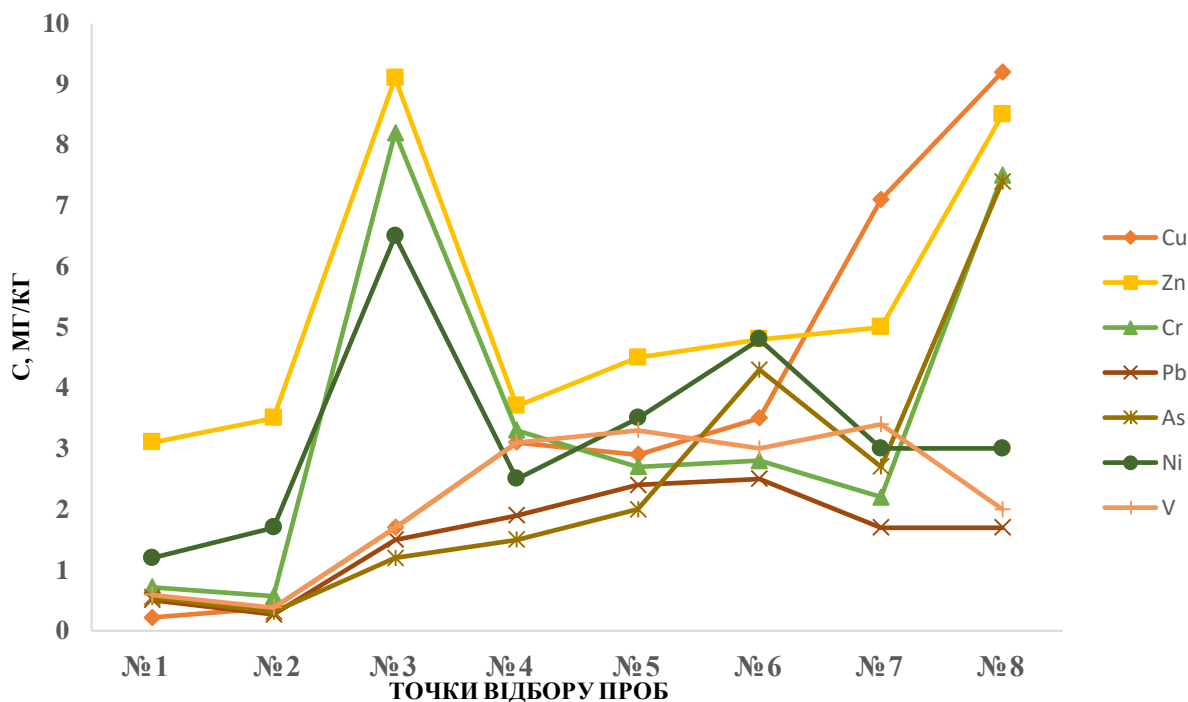
Впродовж досліджень вміст ванадію у поверхневих водах коливався в незначних межах, хоч дещо і перевищував ГДК<sub>риб.</sub>. Літературні дані свідчать про стабільно підвищений вміст ванадію в ґрунтах Закарпатської області, який становить

82 мг/кг в гірській місцевості та 100 мг/кг на рівнинних територіях [5, 17]. Збільшення концентрацій ванадію у воді та донних відкладах у весняну пору, ймовірно, пов'язане з вимиванням елементу з ґрунтоутворюючих порід, високий вміст якого зосереджений, зокрема, у магматичних гірських породах. Цілком імовірно й техногенне надходження елементу, оскільки відомо, що ванадієві солі часто використовуються як фунгіциди, інсектициди та інші дезінфікуючі засоби. Улітку концентрації металу суттєво знизились як у воді, так і в донних відкладах, що пов'язано зі зменшення водності та швидкості течії річки, а, відповідно, і винесення елементу з порід.

Вищезазначені результати дозволяють припустити, що найбільш антропогенно враженою значними концентраціями важких металів є техногенно трансформована територія, де зафіксовані перевищення ГДК<sub>риб.</sub> та фонових значень серед таких поллютантів, як Cu, Cr, Zn. Допустимі концентрації металів V, Cu та As відносно нормативних значень, проте підвищені порівняно з фоновими, виявлено у воді упродовж досліджуваного періоду в напрямі до пониззя річки.

*Донні відклади.* Вміст важких металів у донних відкладах дозволяє виявити найбільш пріоритетні забруднювачі гідроекосистеми. Протягом досліджуваного періоду 2016–2018–2020 років середній вміст валових форм важких металів у відібраних зразках намулу коливався в значних межах, перевищуючи фонові значення.

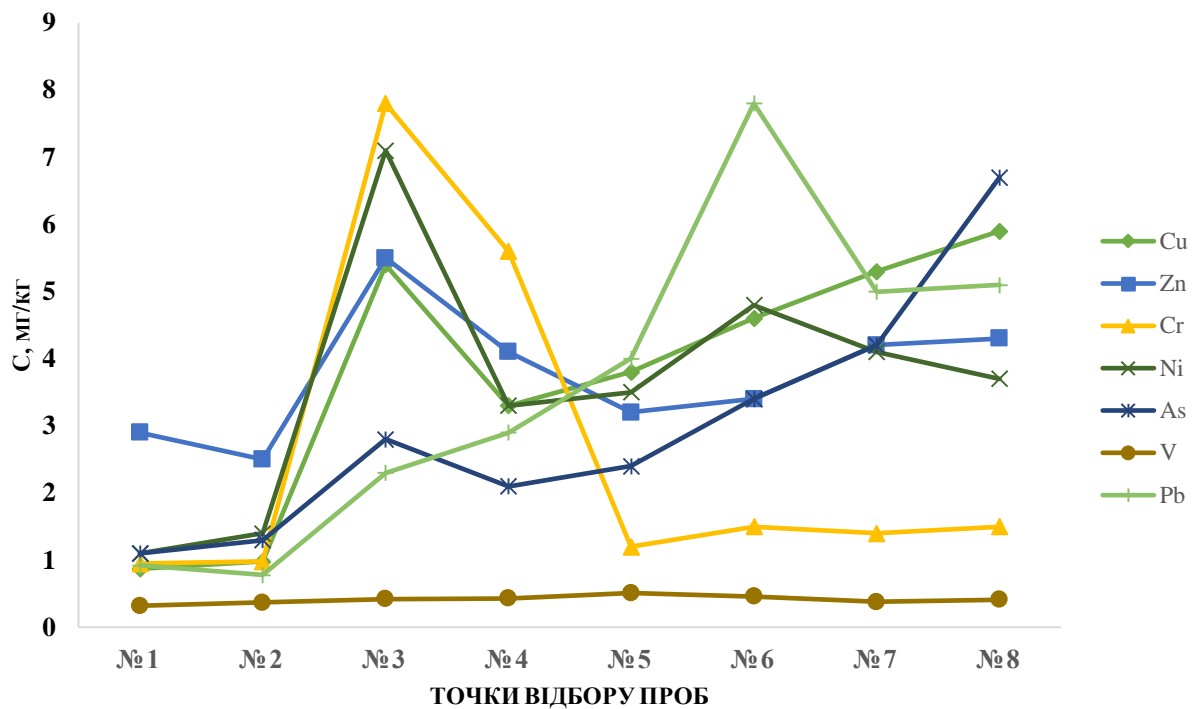
Високі показники металів виявлено в межах техногенно трансформованої території, а саме на моніторинговій ділянці №3, де зафіксовані порівняно високі концентрації Cr, Ni та Pb у вегетативні періоди 2016 та 2020 років. Концентрації Cr зростають у 11,3 та у 15,4 раза навесні та влітку 2016 року у порівнянні з фоновими показниками на ділянці №3, щодо нікелю спостерігається подібна тенденція зі зростанням в 5,4 раза навесні та 6 разів влітку 2016 (рис.3.1.1; рис.3.1.2).



**Рис. 3.1.1** Середній вміст важких металів у донних відкладах річки Уж (весняний період 2016 року)

В літню пору, а саме в меженний період, зростання концентрацій хрому в районі техногенно трансформованої території спричинено зменшенням швидкості течії та перемішування водних мас. Незначні підвищення хрому зафіксовано упродовж весняного періоду в пониззі річки, що пов'язано з високим рівнем урбанізації басейну на цих територіях, а також надходженням поллютантів з поверхневим стоком та комунально-побутовими стічними водами. З віддаленням від техногенно трансформованої території акумуляція металу у донних відкладах зменшується. Подібне просторове розповсюдження хрому можна пояснити його низькою міграційною здатністю або ж тривалим забрудненням поллютантом в межах техногенно трансформованої території, що призводить до його накопиченням в даній місцевості, а за оптимальних умов переміщенням по течії водойми.

Вміст нікелю в донних відкладах виявився порівняно вищим ніж у поверхневих водах, що може бути зумовлене більш давнім забрудненням території, внаслідок якої відбулося осадження металу.



**Рис. 3.1.2** Середній вміст важких металів у донних відкладах річки Уж (літній період 2016 року)

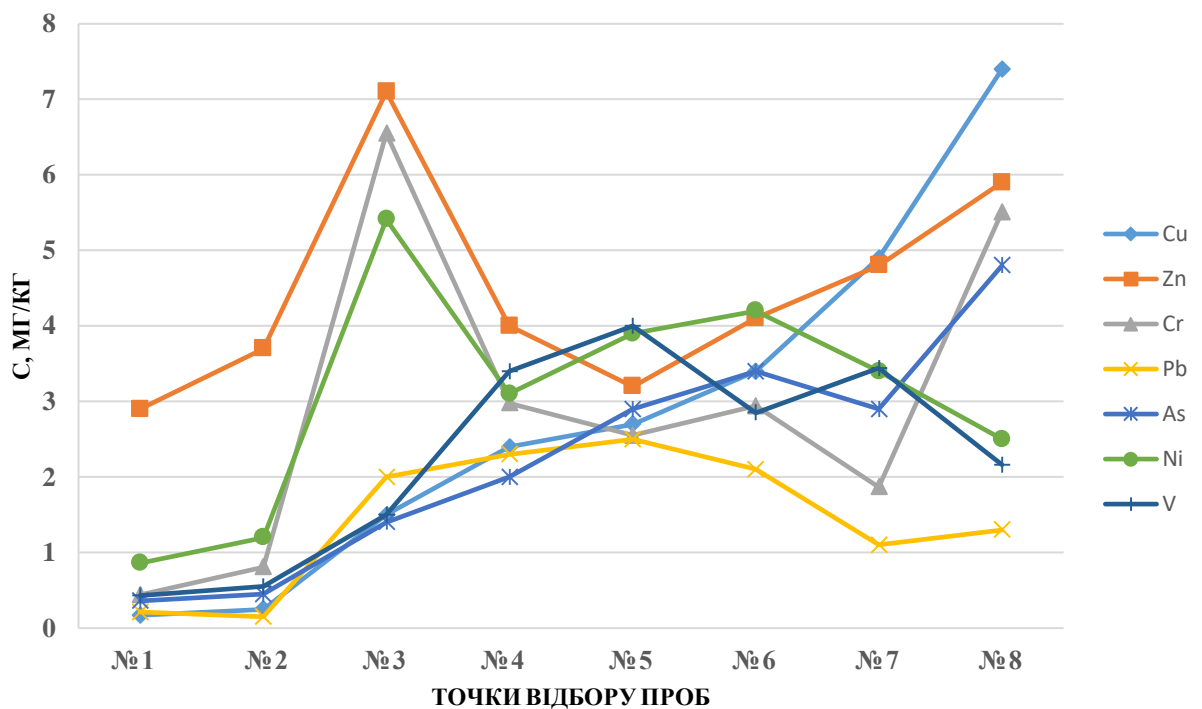
У 2020 році кількісний вміст металів у донних відкладах зростає порівняно з показниками 2016 року, так, вміст Cr на моніторинговій ділянці №3 перевищує фонові значення в 17,6 рази навесні та у 18,8 рази влітку, а Ni у 6 разів навесні та у 7 в літню пору.

Узагальнюючи отримані результати по динаміці вмісту важких металів у донних відкладах техногенно–трансформованої території відмічаємо високий вміст хрому та нікелю у порівнянні з іншими досліджуваними ділянками.

Урбанізована територія характеризується підвищеним умістом Pb у зразках намулу. По всій протяжності річки Уж відмічається зростання свинцю в донних відкладах, та найбільший його вміст зафіксований за межами міста Ужгород, навесні 2016 року концентрації плюмбуму тут перевищують фонові показники у 4,9 рази, в 2018 році —у 10 разів, а у 2020 у 5,7 рази.

В літній період показники металу зростають, й перевищують фонові значення у 10,8 рази в 2016 році, у 9,3 рази у 2018 році та у 13,2 рази в 2020 (рис.3.1.3; рис.3.1.4).

Подібне зростання вмісту елемента у водоймі відбувається внаслідок збільшення техногенного навантаження в районі урбанізованої території, де джерелом свинцю, перш за все, виступають викиди автотранспорту, проте ймовірним джерелом можуть бути і техногенні стічні води лісохімічного комбінату.



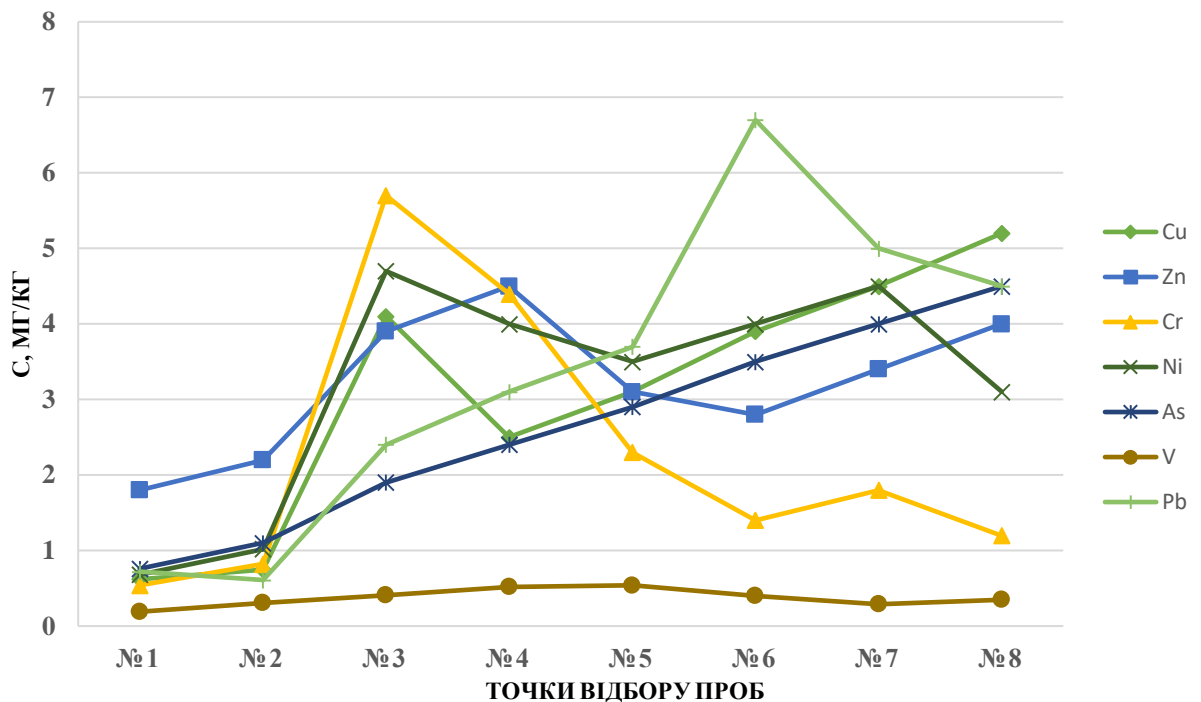
**Рис. 3.1.3** Середній вміст важких металів у донних відкладах річки Уж (весняний період 2018 року)

Слід зазначити, що викид забруднюючих речовин автотранспортом та залізничним транспортом зріс за останні десятиріччя, що пов'язано зі збільшенням кількості автотранспорту, який експлуатується в місті або ж щодня перетинає досліджувану територію через західний транспортний коридор у напрямі до Європи [2,3].

Результати досліджень з вмісту важких металів у пробах ґрунту м.Ужгород вказують на підвищені концентрації свинцю поблизу автомобільних доріг з перевищенням ГДК ґрунтів в трьох точках від 1,1 до 1,5 раза, що вказує перш за все на зростання кількості автотранспорту, в порівнянні з дослідженням ґрунтів на вміст важких металів проведеним в 1996 році перевищень ГДК не відмічалось [5].



Тривале накопичення важких металів в ґрунтах може слугувати джерелом забруднення навколишнього середовища, зокрема і водойм русла яких розташовані поблизу автомагістральних доріг.

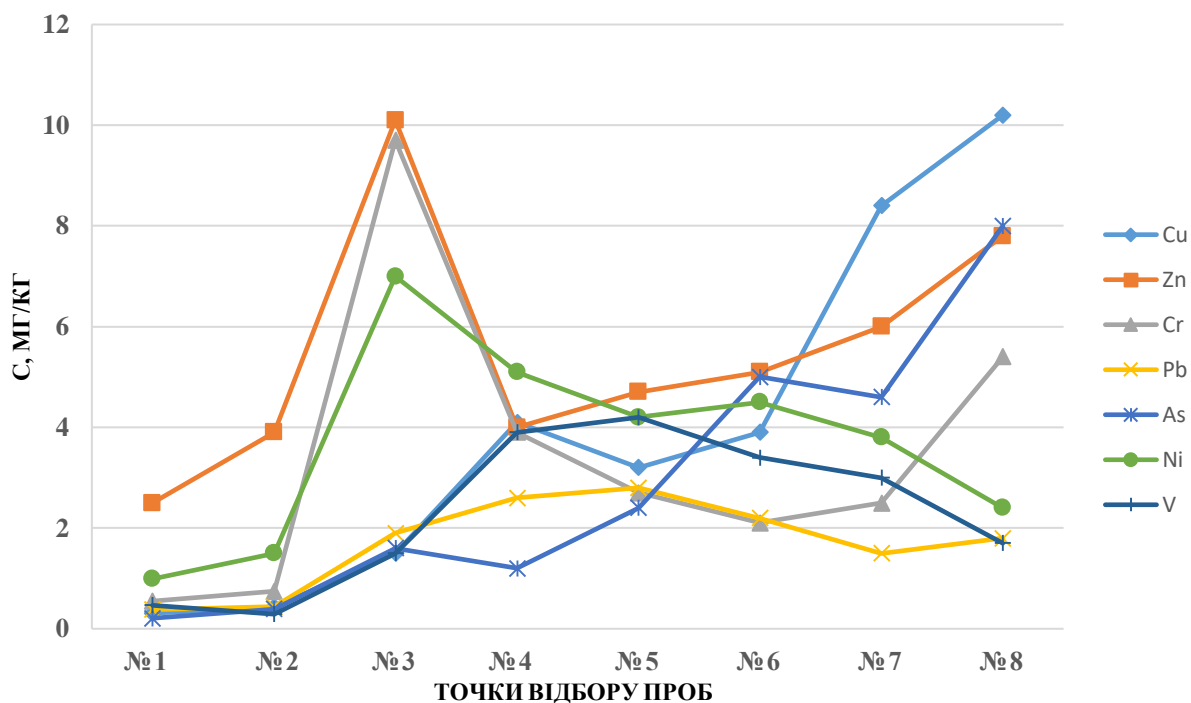


**Рис. 3.1.4** Середній вміст важких металів у донних відкладах річки Уж (літній період 2018 року)

Донні відклади аграрної території характеризувалися підвищеним вмістом Cu та As порівняно з іншими зонами водойми. У пониззі річки акумуляція міді весною сягала максимуму, перевищуючи фонові значення в 41,8 разів у 2016 році, у 43,5 разів — у 2018 та в 32,9 разів у 2020 році. Улітку показники Cu зменшилися й перевищували фоновий вміст у 6,7, 8,3 та 6,1 разів відповідно у 2016–2018–2020 роках. Накопичення міді може носити як природній, так і техногенний характер. У даній місцевості річка тече по рівнинній місцевості, і після весняних дощів на рівнинній території з водними масами переноситься значна кількість органічних речовин природного походження, залишки рослин та рештки відмерлих тварин, які утворилися ще у зимовий період. Це сприяє зростанню закомплексованих форм міді і в результаті – накопиченню у донних відкладах. Техногенне забруднення донних відкладів найімовірніше спричинене змивом токсикантів із прилеглих територій, особливо в період весняних паводків,

коли значна кількість забруднювачів мігрує з ґрунтів у донні відклади. Улітку вміст міді у донних відкладах рівнинних територій дещо знижується, що зумовлено певними гідрохімічними особливостями досліджуваної річки або ж зменшенням антропогенного тиску.

Найвищі концентрації миш'яку встановлені на аграрній території, так у весняний період 2020 року їх вміст перевищував фоновий у 38,9 разів, у 2018 — в 13,3 раза та у 2016 році — у 12,7 раза. Влітку вміст As в намулі дещо знизився його концентрації відносно фонових у 6,09 разів перевищували у 2016 році, у 5,9 — в 2018 та в 6,4 — у 2020 році (ри.3.1.5; рис.3.1.6).



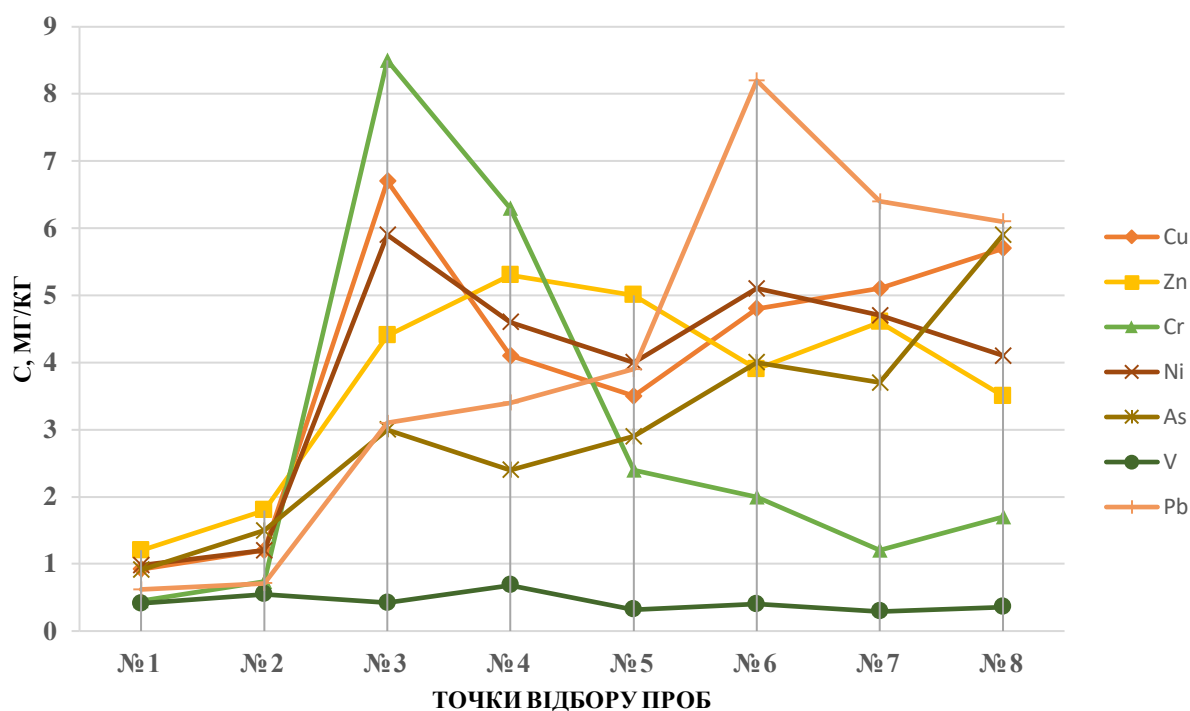
**Рис. 3.1.5** Середній вміст важких металів у донних відкладах річки Уж (весняний період 2020р.)

До того ж на даній ділянці встановлено перевищення ГДК для ґрунтів у 4 рази, яке було зафіксовано навесні 2020 року.

Найвірогідніше, що підвищений вміст металу на аграрній території спричинений інтенсифікацією використання сільськогосподарських отрутохімікатів, які містили сполуки арсену [11]. У донних відкладах накопичення екотоксиканту зростає вже з наближенням до урбанізованої території, збільшуючись у напрямі до гирла річки. У цих районах річка протікає поблизу приватних секторів, тому

основним джерелом забруднення тут можуть слугувати неконтрольовані скиди побутових стічних вод, що містять значну кількість миючих засобів, а деякі з яких, як відомо, вміщують у своєму складі миш'як.

Найвищий показник акумуляції металу спостерігали упродовж квітня–травня в межах аграрної території, що пов'язуємо з піком обробки сільськогосподарських рослин. Одними з потенційних джерел надходження елементу тут можуть слугувати як арсеновмістні пестициди, так і десиканти, використання яких за останні роки зросло.



**Рис. 3.1.6** Середній вміст важких металів у донних відкладах річки Уж (літній період 2020 року)

Таким чином, отримані дані вказують на значне накопичення хрому та нікелю в донних відкладах техногенно трансформованої території, а також купруму, цинку та арсену в районі аграрної території, що свідчить про потенційну небезпеку забруднення водойми даними металами.

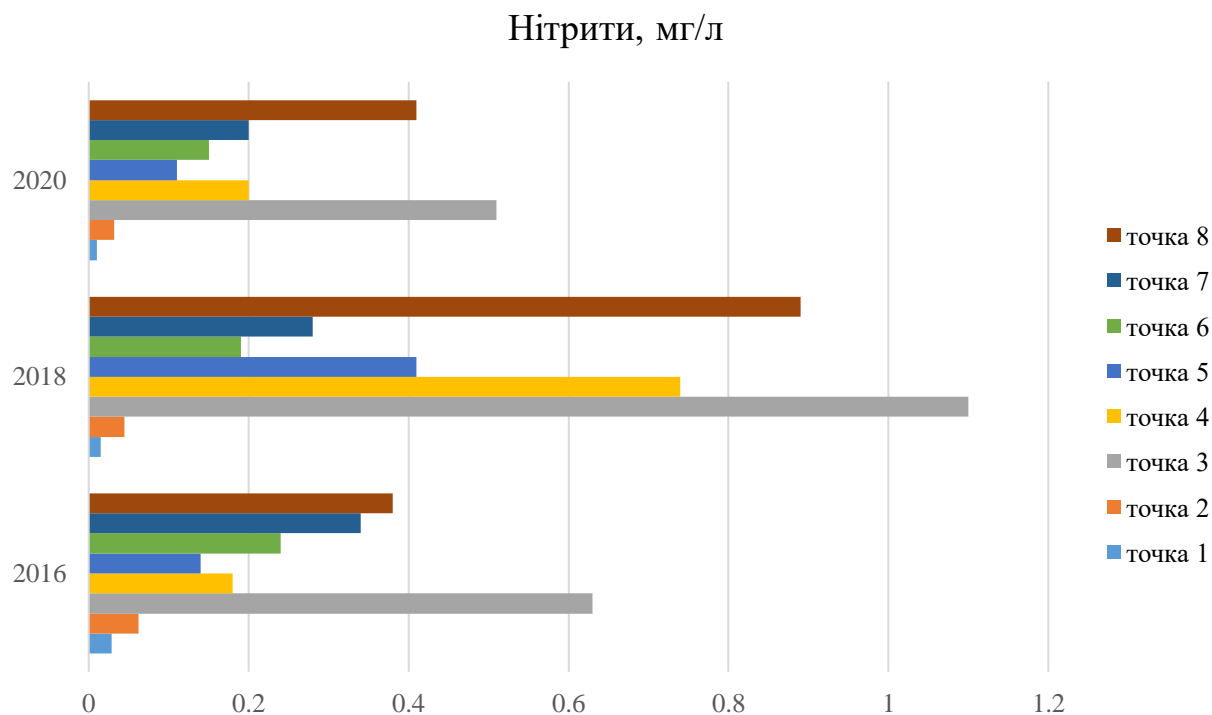
### 3.2. Вміст сполук азоту та летких органічних сполук у воді річки Уж

Підвищений вміст сполук азоту у водних екосистемах служить своєрідним індикатором антропогенного навантаження [10]. Природними компонентами гідроекосистем є нітрогеновмісні сполуки, які при перевищенні природних концентрацій перетворюються на потенційні забрудники водних систем [7].

Отримані результати гідрохімічних аналізів поверхневих вод річки Уж порівнювали з нормативами для водойм рибогосподарського призначення № 12–04–11, культурно–побутового та рекреаційного призначення СанПН 4630/88, а також з фоновими показниками [4].

В результаті проведених досліджень протягом 2016–2018–2020 років, виявлено що найбільш забрудненою територією сполуками азоту є техногенно–трансформована та аграрна.

Вміст нітритів сягав високих значень на моніторинговій ділянці №3 перевищуючи фонові значення в 73,3 раза, а ГДК<sub>риб</sub> в 13,7 рази в літній період (рис.3.2.1).



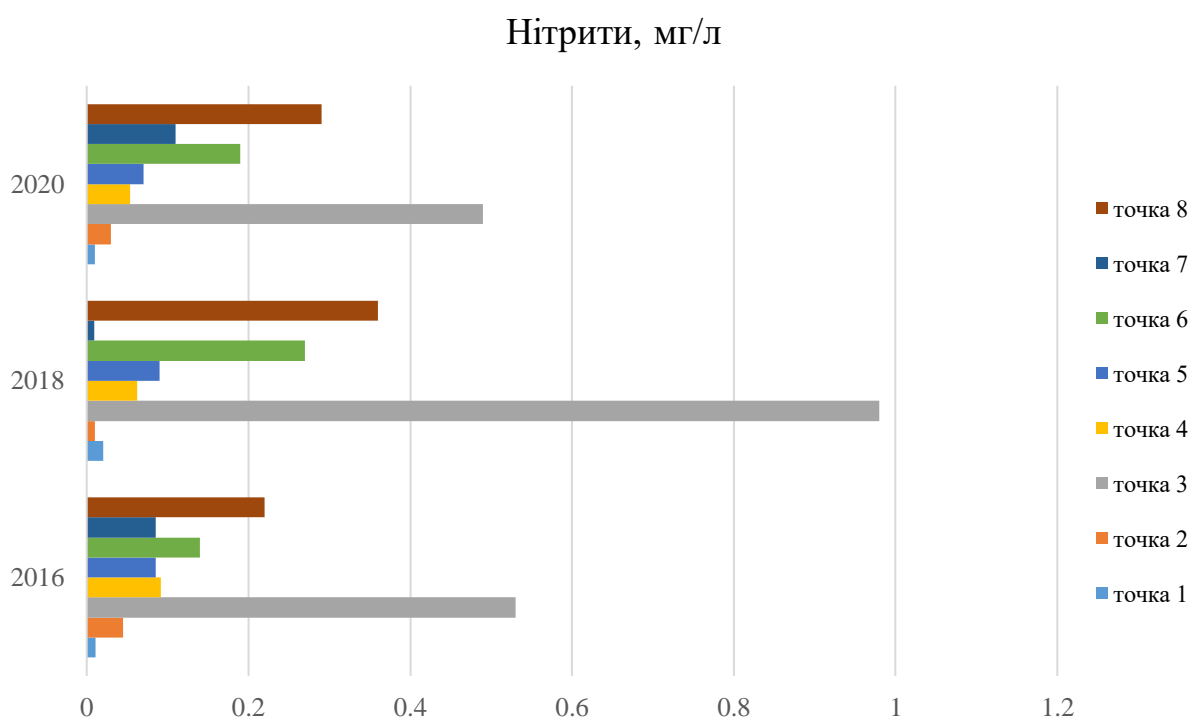
**Рис. 3.2.1** Середній вміст нітрит–іонів у зразках води річки Уж (літній період)

\*n=4;  $\delta = \pm (10-25)\%$ ; P=0,95

Навесні 2018 року відмічалось перевищення фонових значень нітрит-іонів у 49 разів, а нормативних в 12,2 раза. За межами техногенно-трансформованої території концентрації нітритів дещо знижуються, проте в пониззі річки знову зростають, перевищуюючи фоновий показник на ділянці №8 в 18 разів в 2018 році (рис.3.2.2).

Нітрити характеризуються зростанням концентрацій навесні та влітку й поступовим зниженням восени та мінімальним вмістом взимку. Підвищення вмісту нітритів у воді напряду свідчить про забруднення водойми, із зростанням концентрацій нітритів збільшується інтенсивність розкладу органічних речовин й відбувається затримка окислення нітритів до нітратів.

Концентрації нітритів збільшуються при потраплянні до водойми свіжого забруднення [12].



**Рис. 3.2.2** Середній вміст нітрит-іонів у зразках води річки Уж (весняний період)

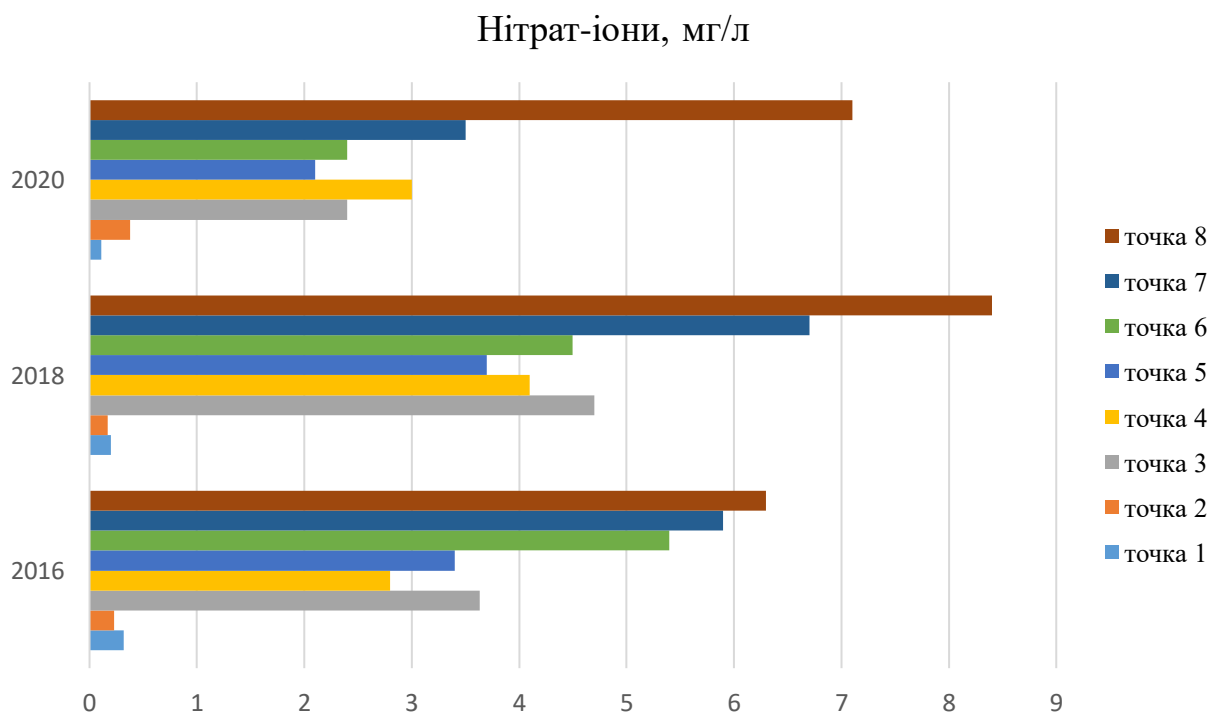
\*n=4;  $\delta = \pm (10-25)\%$ ; P=0,95

Підвищений рівень нітратів зафіксований в 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 (рис.3.2.3). Дана територія характеризується значними площами сільськогосподарських угідь та розвиненим агрокомплексом, що в свою

чергу, провокує забруднення прилеглих ділянок серед яких територія басейну річки Уж.

Через безперервну хімізацію рослинництва у природних водоймах підвищуються концентрації мінеральних сполук азоту, наслідком чого є втрата фізіологічного балансу нітрогеновмісних сполук у природних водах та формування токсичного впливу [7].

Концентрації нітратів у природних водоймах змінюються в залежності від сезону, так мінімальні спостерігаються у весняний період, збільшуються восени досягаючи максимуму взимку, саме в зимовий період проходить розкладання органічних речовин і азот переходить з органічних форм у мінеральні. Зростання концентрацій нітрат іонів у водних об'єктах може бути спричинене рядом причин, серед яких як внутрішньоводоймні процеси, так і забруднення промисловими та господарчо–побутовими стічними водами [6].

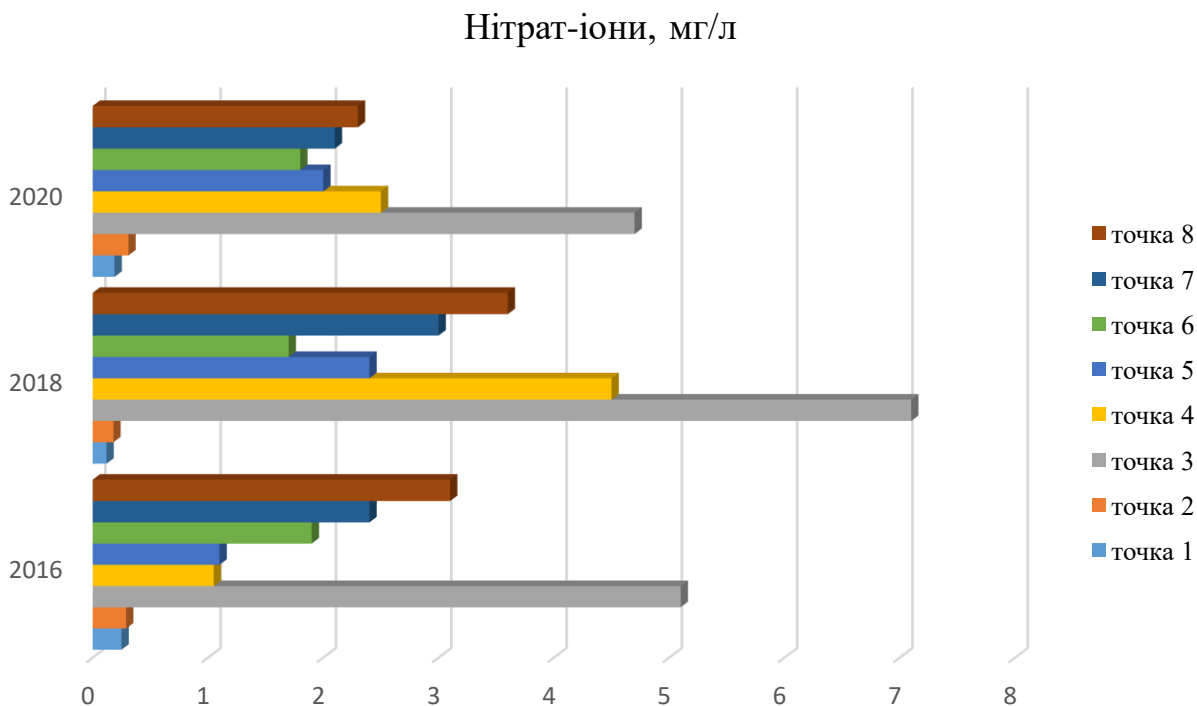


**Рис. 3.2.3** Середній вміст нітрат–іонів у зразках води річки Уж (весняний період)

\*n=4;  $\delta = \pm (10-25)\%$ ; P=0,95

В літній період 2018 року виявлені найвищі концентрації нітратів у воді техногенно–трансформованої території, що переважають над фоновими в 59,1 раза, у межах аграрної ділянки зафіксовані перевищення фонових значень у 30 разів, урбанізованої місцевості — у 20 разів. Значення отримані у 2020 році виявились дещо нижчими, так концентрації нітратів на моніторинговій ділянці №3 перевищували фонові значення у 24,7 раза, в точці №4 в 13,1 раза, на урбанізованій території концентрації знизилась перевищуючи фонові показники в 10,5 раза та у 12,1 раза на аграрній території (рис 3.2.4).

Результати досліджень з визначення концентрації нітратів у зразках води річки Уж свідчать про значне поступлення поллютантів у навколишнє середовище в межах протікання водойми через техногенно–трансформовану територію, забруднення якої найбільш ймовірно і є причиною зростання концентрацій нітратів у зразках води. Оскільки максимальні значення нітратів зафіксовані у зразках води в літню пору, а саме в період межені, то можемо припустити що їх надходження відбувалося через підземний стік.

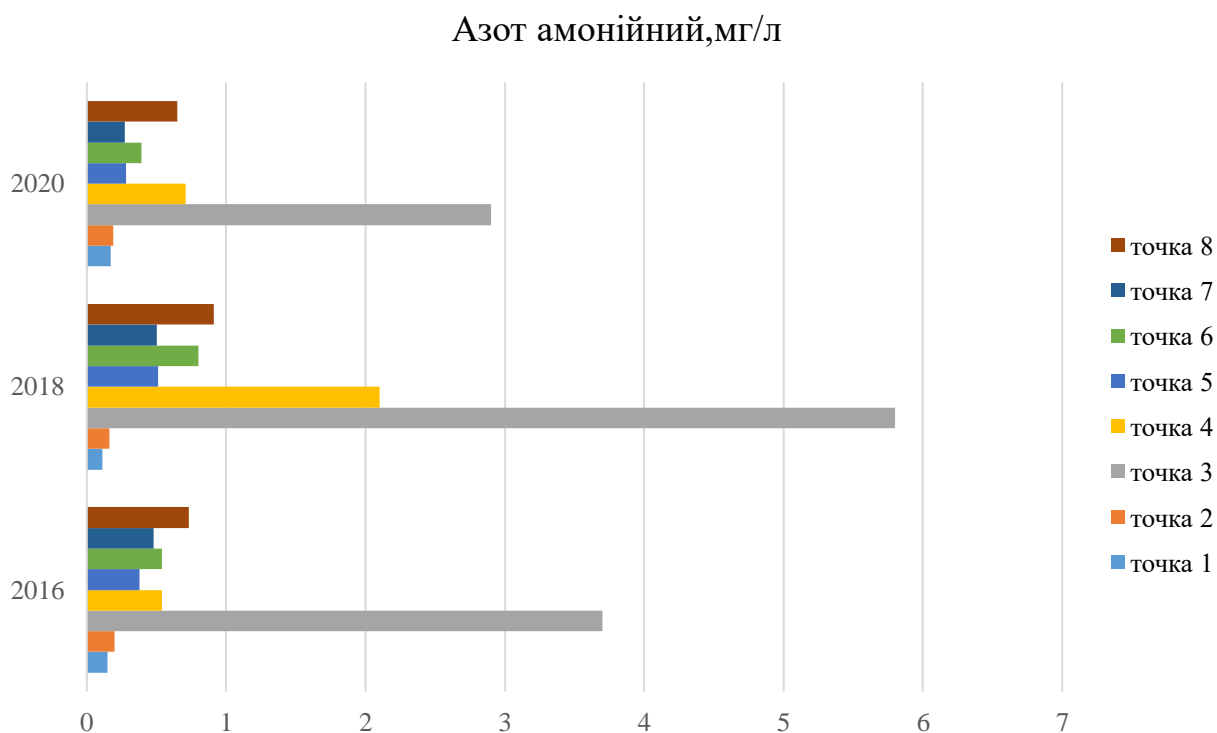


**Рис. 3.2.4** Середній вміст нітрат–іонів у зразках води річки Уж (літній період)

\*n=4;  $\delta = \pm (10-25)\%$ ; P=0,95

За період досліджень концентрація азоту амонійного у поверхневих водах річки зростала на техногенно–трансформованій території та поступово знижувалась в напрямку до пониззя водойми, а саме до ділянки річки в межах аграрного впливу.

Так, в межах моніторингової ділянки №3 техногенно–трансформованої ділянки вміст азоту амонійного перевищував ГДК<sub>риб</sub> у 26,8 разів, а фонові значення у 52,7 рази навесні 2018 році (рис.3.2.5).



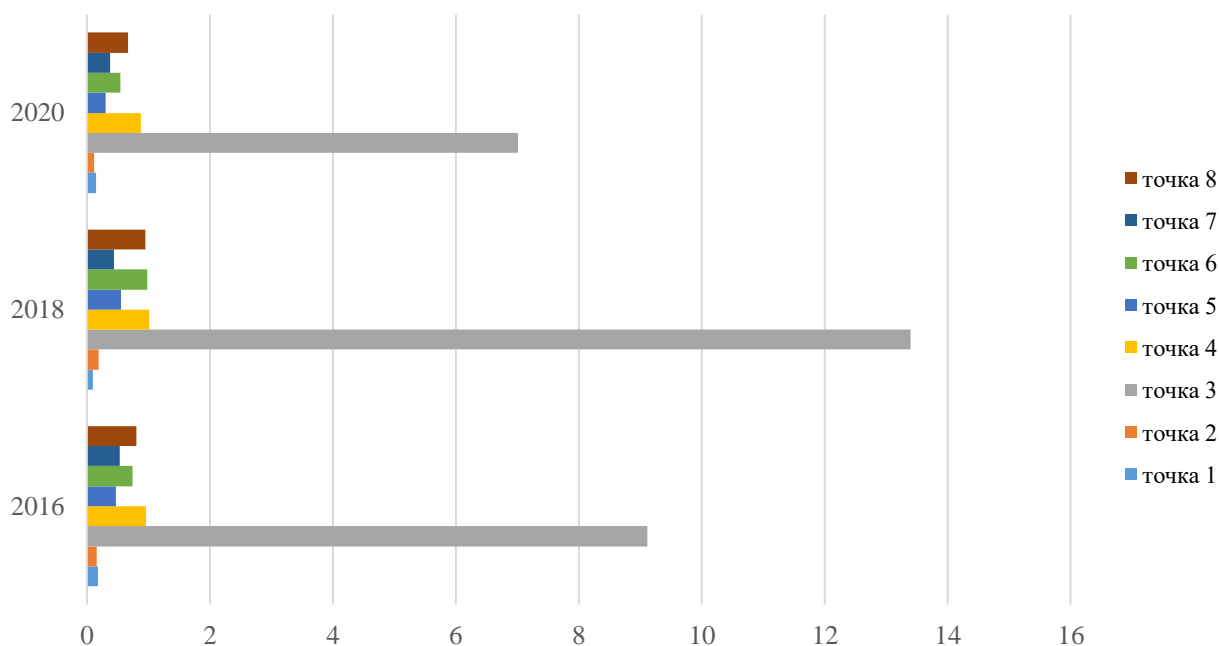
**Рис. 3.2.5** Середній вміст азоту амонійного у зразках води річки Уж (весняний період)

\*n=4;  $\delta = \pm (10-25)\%$ ; P=0,95

Влітку 2018 року концентрації забруднювача зростали й перевищували фоновий вміст в 70,5 рази (рис.3.2.6).



## Азот амонійний, мг/л



**Рис. 3.2.6** Середній вміст азоту амонійного у зразках води річки Уж (літній період)

\*n=4;  $\delta = \pm (10-25)\%$ ; P=0,95

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

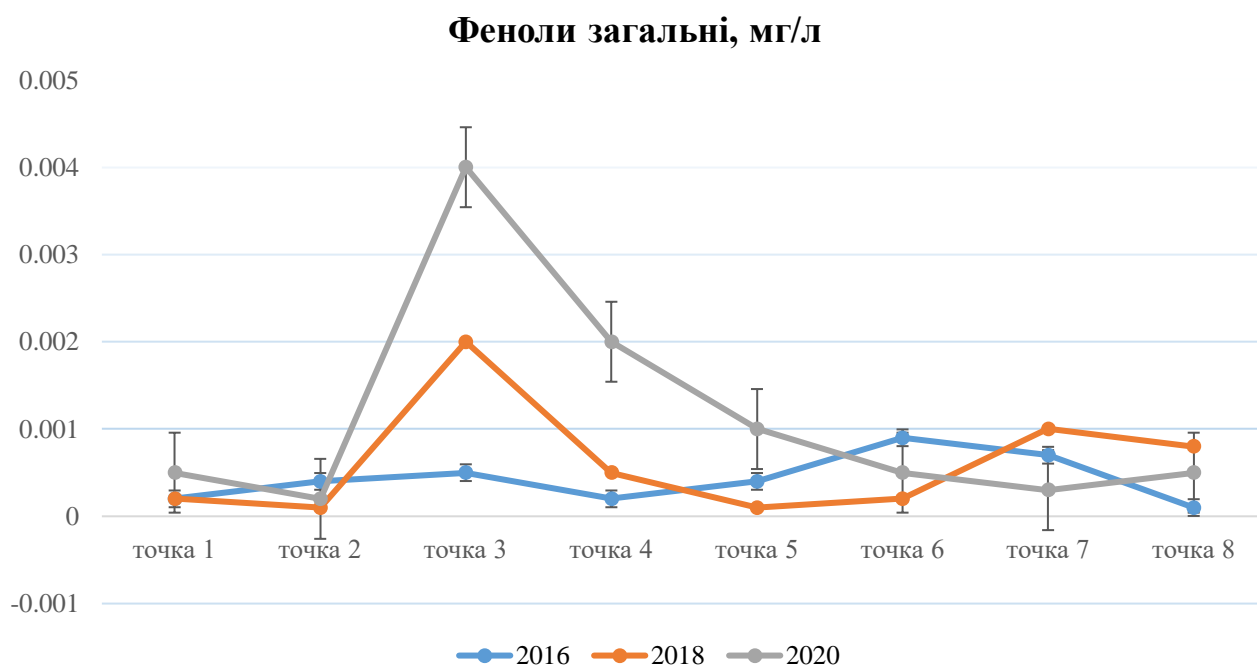
Збільшення концентрації токсикантів в межах міста Перечин в котре доводить можливість розглядати води струмка Доморадж потенційно небезпечними для навколишнього середовища. За межами техногенно–трансформованої ділянки спостерігається зменшення рівня забрудненості водойми, що вказує на самоочисну здатність водойми, оскільки дана територія належить до передгірських та характеризується швидкісною течією й кам'янистим дном, яке тільки підвищує самоочисні процеси.

Менш забрудненою виявилася урбанізована територія, де зафіксовані незначні концентрації сполук азоту, а вміст нітратів знаходився в допустимих межах. Вищі

концентрації сполук азоту, у порівнянні з урбанізованою місцевістю, виявлено на аграрній території, ймовірними джерелами поступлення органіки могли стати сільськогосподарські угіддя та фермерські господарства які розташовані на берегах річки.

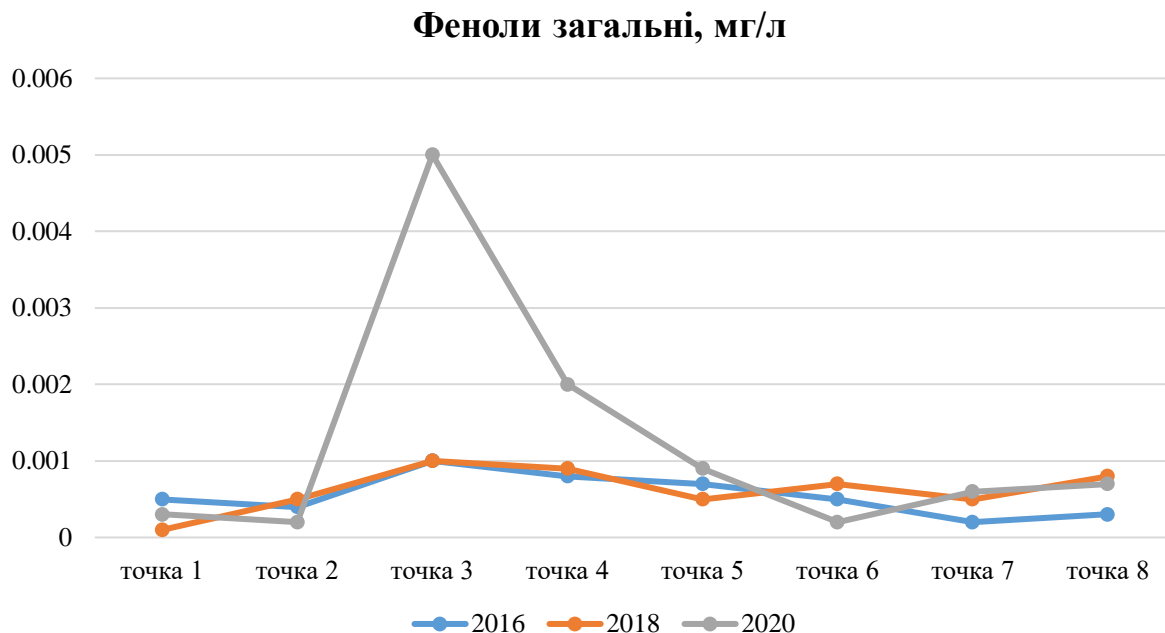
За період експерименту найвищі концентрації сполук азоту на досліджуваних ділянках річки встановлені у 2018 році, найнижчі — у 2016 році. Зростання вмісту сполук азоту у зразках води протягом 2018 року може бути спричинене підвищеним рівнем водності в період досліджень, і як наслідок — змивом поллютантів з прилеглих ділянок водойми, де зосереджені сільськогосподарські угіддя та фермерські господарства.

Вміст фенолів у зразках води річки Уж коливався в межах норми протягом трьох років, проте на техногенно–трансформованій території виявлені незначні перевищення ГДК<sub>риб.</sub> Навесні 2020 року вміст фенолів перевищував допустимі значення в 4 рази на моніторинговій ділянці №3 та в 2 рази на ділянці №4, в межах урбанізованої території концентрації фенолів знижуються до допустимих норм (3.2.7).



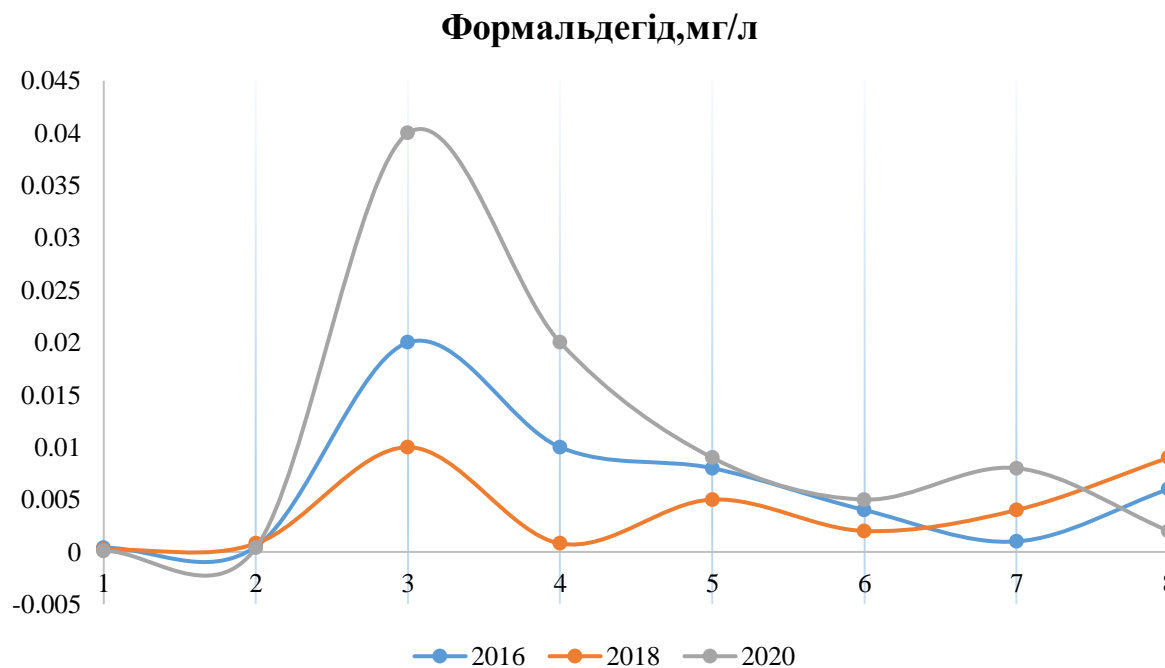
**Рис. 3.2.7** Середній вміст фенолів у зразках води річки Уж (весняний період)

В літній період 2020 року концентрації фенолів перевищували ГДК<sub>риб</sub> у 5 разів в точці №3 (рис.3.2.8).



**Рис. 3.2.8** Середній вміст фенолів у зразках води річки Уж (літній період)

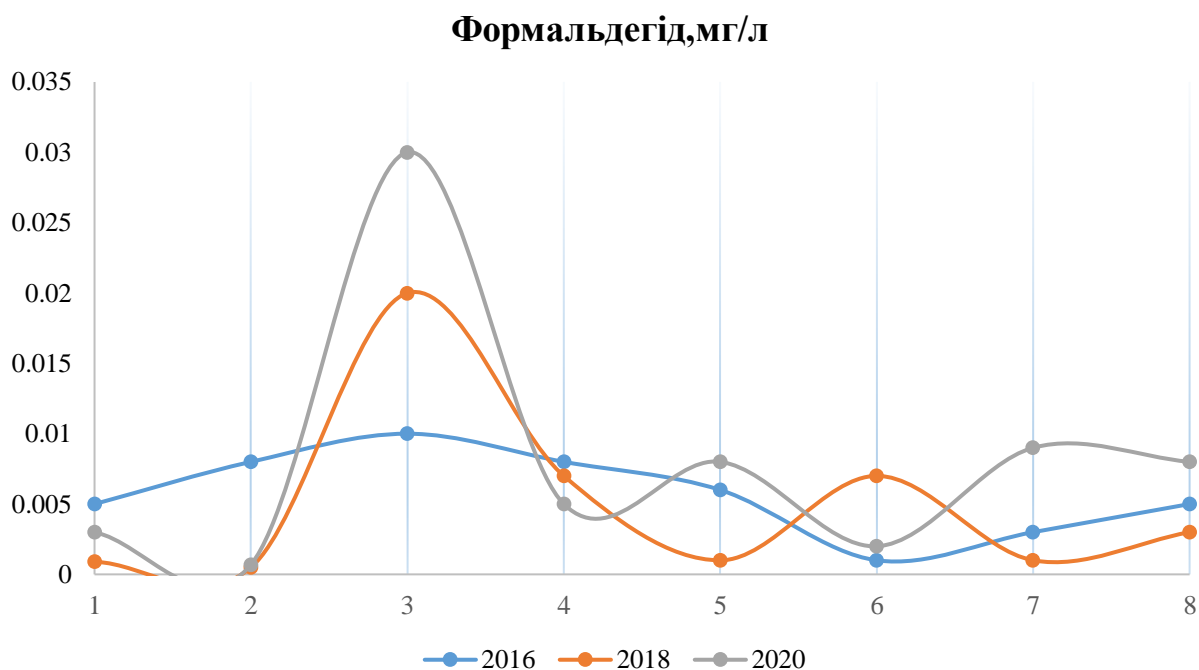
Подібною виявилася тенденція щодо коливання концентрацій формальдегіду в зразках води, вміст якого зростав на моніторинговій ділянці №3 та незначно перевищував ГДК<sub>риб</sub>. Так, влітку 2020 року зафіксоване перевищення в 4 рази (рис.3.2.9), а навесні того ж року в 3 рази (рис.3.2.10).



**Рис. 3.2.9** Середній вміст формальдегіду у зразках води річки Уж (літній період)

Згідно отриманих результатів відображених на цій діаграмі максимальні показники концентрацій формальдегідів зафіксовані на моніторинговій точці №3, нижче за течією в точці №4 вміст токсиканта знижується вдвічі влітку та 6 разів навесні, така динаміка зміни концентрацій формальдегіду пов'язана із водністю річки.

Підвищений вміст фенолів загальних та формальдегіду у воді техногенно–Фенольні сполуки є надзвичайно небезпечними для живих організмів, при потраплянні в організм вони здатні викликати важкі наслідки, зокрема добре відомий руйнівний вплив фенолів на нирки і головний мозок [16].



**Рис. 3.2.10** Середній вміст формальдегіду у зразках води річки Уж (весняний період)  
\*пункти відбору проб води №1–№8;

Аналізуючи експериментальні дослідження з визначення концентрацій фенолів у поверхневих водах найбільших річок України варто відмітити динаміку до зростання фенольного забруднення водою розташованих в індустріальних районах. Аналіз екологічного стану поверхневих вод Придністров'я показав підвищений вміст фенолів, у водах басейну річки Дніпра концентрації забруднювача перевищували

ГДК в 5–7 разів [1]. Для поверхневих вод Дунаю також характерні підвищені концентрації фенолів, які за результатами досліджень у 88,8 % досліджених проб води переважали норми ГДК рибогосподарського [8]. Експериментальні дослідження з вивчення вмісту фенолів у водоймах Закарпаття є обмеженими або відсутніми взагалі, тому це неабияк підвищує актуальність проведення даних досліджень.

Річка Уж належить до транскордонних водотоків її екологічний стан підпадає під міжнародний моніторинг. Проведений ряд гідрохімічних досліджень дозволив нам визначити «критичні» частини басейну річки та основні забруднювальні речовини водойми.

Перетинаючи кордони України річка Уж впадає в річку Лаборець що території Словаччини, яка в свою чергу також характеризується підвищеним вмістом Cu, Zn та Ni, які за проведеними дослідженнями вказують на середній ступінь забруднення водойми [32].

Отримані результати з визначення концентрацій сполук азоту в поверхневих водах річки Уж також вказують на підвищений вміст поллютантів в районі техногенної трансформованої та аграрної територій, варто зазначити, що за межами аграрної території річка перетинає кордон, що створює потенційні ризики із перенесення забруднюючих речовин. Ретроспективний моніторинг зміни концентрацій сполук азоту в річках Словаччини: Попрад, Лаборець та Ториса вказує на підвищений вміст нітритів в річці Лаборець [26]. Подібна тенденція може бути наслідком спільних джерел забруднення

Аналогічні тенденції спостерігали в ході експериментів проведених зі зразків поверхневих вод малих річок Рівненщини де в межах техногенно навантаженої території виявляли підвищений уміст сполук азоту з переважанням забруднення високими концентраціями нітритів [6]. В порівнянні з отриманими результатами досліджень техногенно–трансформованої території річки Уж серед досліджених

сполук азоту переважали концентрації амонію, що свідчить про недостатнє біологічне зв'язування сполук, однією з причин якого може бути слабкий рослинний покрив.

Результати гідрохімічного аналізу води річки Уж вказують на безперервний скид забруднювальних речовин у водотік, оскільки високі концентрації даних поллютантів свідчать про незакінчені процеси нітрифікації та неспроможність водної екосистеми до повноцінного самоочищення.

### ***Висновки по розділу:***

- 1) Найвищі концентрації важких металів (Cu, Cr, Zn) у зразках води річки Уж виявлені в межах території м. Перечин, яка умовно визначена, як техногенно–навантажена. Уміст металів у воді перевищує ГДК<sub>риб</sub> для Cu у 10 разів, Zn в 4,8 раза, Cr в 7,5 разів. У донних відкладах даної місцевості встановлений підвищений уміст Cr та Ni, концентрації хрому у 2020 році перевищували фонові показники у 17,6 разів навесні та у 18,8 рази влітку, подібна динаміка характерна і для нікелю, вміст якого зростає в 6 разів навесні та у 7 разів в літню пору.
- 2) На рівнинній частині річки (урбанізована, аграрна т–рії) встановлений підвищений уміст Cu, V та As у зразках води, які в незначних межах перевищували нормативні та фонові показники. У зразках намулу урбанізованої території зафіксований підвищений уміст Pb протягом літнього періоду, який перевищує фонові значення у 10,8 раза в 2016 році, у 9,3 раза у 2018 році та у 13,2 раза в 2020 на моніторинговій ділянці №6 .
- 3) На аграрній території виявлений підвищений уміст Cu та As в зразках донних відкладів. Акумуляція міді у зразках намулу перевищувала фонові значення в 41,8 рази, 43,5 та в 32,9 раза відповідно у період квітня–травня 2016–2018–

2020 років. Концентрації As коливались в значних межах, найвищі виявлено в точці №8, де у весняний період 2020 року їх вміст перевищував фоновий у 38,9 разів, у 2018 — в 13,3 раза та у 2016 році — у 12,7 раза.

- 4) Концентрації формальдегіду та фенолів загальних у зразках води річки Уж знаходились в допустимих межах на всіх досліджуваних ділянках, окрім техногенно–трансформованої території, де спостерігається підвищений вміст поліютантів протягом досліджуваного періоду та перевищення ГДК<sub>риб</sub> в 3–5 разів протягом 2020 року.
- 5) Концентрації сполук азоту у воді виявилися найвищими на техногенно–трансформованій та аграрній територіях, значне зростання вмісту поліютантів встановлене в 2018 році: нітрити – перевищення ГДК<sub>риб</sub> у 13,7 разів (ділянка №3), азот амонійний – перевищення ГДК<sub>риб</sub> у 26,8 разів (ділянка №3), нітрати– перевищення фонових показників у 42 рази (ділянка №8).

*Основні публікації дисертанта за матеріалами розділу*

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

Білкей М.В., Ніколайчук В.І. (2017). Розподіл вмісту важких металів у системі «вода – донні відкладення» транскордонної річки Уж. *Biosystems Diversity*, 25 (2), 145–153.

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: тези доповідей, Ужгород, 27–28 квітня 2017 р., 102.

Ніколайчук В.І., Вакерич М.М., Білкей М.В., Чечуй О.Ф., Волощук І. (2016). Можливі екологічно обґрунтовані шляхи збереження та розвитку Українських Карпат. *Вісник Дніпропетровського університету, Біологія. Екологія.*, Вип. 24(1), 157–163.

***Перелік посилань:***

1. Анісімова, Л.Б., Вичужаніна, Т.Ф., Кокошко, А.І. (2010). Аналіз екологічного стану поверхневих вод Придніпров'я. *Екологія і природокористування*, (13), 27–31.
2. Бобрик Н.Ю. (2015). Поширення та акумуляція важких металів у ґрунтах призалізничних територій. *Вісник Дніпропетровського університету, Біологія, Екологія*, 23(2), 183–189.
3. Габчак Н. (2007). Транспортна мережа, її стан і вплив на природне середовище Закарпаття. *Наукові записки, Географія*, 2, 172–178.
4. Гранично допустимі значення показників якості води для рибогосподарських водойм. Загальний перелік ГДК і ОБРВ шкідливих речовин для рибогосподарських водойм: [№ 12–04–11 чинний від 09–08–1990].– К: Міністерство рибного господарства СРСР, 1990, 45.
5. Гомонай, В. І., Богоста, А.С., Лобко В.Ю. (2010) Забруднення ґрунтів деяких населених пунктів Закарпатської області. *Науковий вісник Ужгородського університету: Серія: Хімія*, Ужгород: Вид-во УжНУ «Говерла», №. 23–24, 73–76
6. Грюк, І., Суходольська, І. (2012). Вміст сполук нітрогену у воді малих річок як показник рівня антропогенного навантаження територій. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (60), 227–238.



7. Гуменюк, Г. Б., Волошин, О. С., Хоменчук, В. О., Зіньковська, Н. Г. (2019). Динаміка вмісту нітрогеновмісних сполук у гідроекосистемах річок Прип'ять та Турія. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.*, 2019, № 2 (76), 58–63.
8. Лозовіцький, П.С. (2014). Специфічні речовини токсичної дії у воді річки Дунай. *Екологічні науки*, 6, 21–34.
9. Мадж С.М., Александрова А.С. (2016) Визначення потенційної небезпеки донних відкладів гідроекосистем з інтенсивним техногенним навантаженням. *Наукоємні технології*, №3, 331–334.
10. Маслова, М. О., Прожорина, Т. И., Якунина, Н. И. (2014). Эколого–аналитическая оценка качества вод рекреационных зон ближнего Подворонежья. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология*, (4), 48–56.
11. Луцкіна, І. В. Деструктивні види природокористування в межах прибережної смуги Джарилгацької та Каркінітської заток / І. В. Луцкіна // Матер. XI Всеукр. наук.–практ. інтернет–конф. "Вітчизняна наука на зламі епох: проблеми та перспективи розвитку": зб. наук. праць. – Переяслав–Хмельницький, 2015. – Вип. 11. – С. 59–64.
12. Назима, В. П., Касьяненко, Г. Я. (2012). Порівняльний аналіз хімічного складу поверхневих вод річок Псел та Сироватка. *ББК 20я43 П77*, 202.
13. Прокопчук І.О., Грубінко В.В. (2016). Важкі метали у малих річках Тернопільщини з різним рівнем антропогенного навантаження. *Вісник Дніпропетровського університету, Біологія. Екологія*, 24(1), 173–181.
14. Романюк, О. І., Шевчик, Л. З., Жак, Т. В., Боруцька, Ю. З., Сахнюк, І. І., Ощাপовський, І. В., Жак, О. В. (2019). Закономірності забруднення природних вод фенолами в районах нафтовидобутку. *Екологічні науки*, 2(25), 94–98.
15. Симканич О. І., Кундрик О.І., Глух О.С., Сухарев С.М. (2015). Розподіл вмісту важких металів у донних відкладах річки Уж у межах міста Ужгорода. *Науковий вісник Ужгородського університету, Хімія*, 1, 72–76.

16. Сиротенко Є., Даус М. (2021). Оцінювання екологічної обстановки та якості води у пониззі річки Дунай (на прикладі м. Рені). *Матеріали міжнародної науково–практичної конференції "Екологія. Людина. Суспільство"*, 326–329.
17. Фатєєв А.І., Пащенко Я.В. (2003). Фоновий вміст мікроелементів у ґрунтах України. *ННЦ Харків*, 118.
18. Чабан, В. О. (2014). Нові перспективи біологічного очищення стічних промислових відходів за допомогою ейхорнії товстоножкової. *Наукові праці. Екологія*, 232(220), 89–91.
19. Ahmad, K., Muhammad, S., Ali, W., Jadoon, I. A.K, & Rasool, A. (2020). Occurrence, source identification and potential risk evaluation of heavy metals in sediments of the Hunza River and its tributaries, Gilgit–Baltistan. *Environmental technology & innovation*, 18.
20. Al–Shami, S. A., Rawi, C. S. M., Ahmad, A. H., & Nor, S. A. M. (2012). Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short–term exposure. *Toxicology and Industrial Health*, 28(8), 734–739.
21. Bo, L., Wang, D., Li, T., Li, Y., Zhang, G., Wang, C., & Zhang, S. (2015). Accumulation and risk assessment of heavy metals in water, sediments, and aquatic organisms in rural rivers in the Taihu Lake region, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 6721–6731.
22. Brygadyrenko, V., & Ivanyshyn, V. (2015). Changes in the body mass of *Megaphyllum kievense* (Diplopoda, Julidae) and the granulometric composition of leaf litter subject to different concentrations of copper. *Journal of Forest Science*, 61(9), 369–376.
23. Cirillo, T., Amodio Cocchieri, R., Fasano, E., Lucisano, A., Tafuri, S., Ferrante, M. C., Isani, G. (2012). Cadmium accumulation and antioxidant responses in *Sparus aurata* exposed to waterborne cadmium. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62(1), 118–126.
24. Götze, S., Bose, A., Sokolova, I. M., Abele, D., Saborowski, R. (2014). The proteasomes of two marine decapod crustaceans, European lobster (*Homarus gammarus*) and Edible

- crab (*Cancer pagurus*), are differently impaired by heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162, 62–69.
25. Grba, N., Neubauer, F., Sajnovic, A., Stojanovic, K., & Jovancicevic, B. (2015). Heavy metals in neogene sedimentary rocks as a potential geogenic hazard for sediment, soil, surface and groundwater contamination (Eastern Posavina and Lopare Basin, Bosnia and Herzegovina). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 80(6), 827–838
26. Harbul'áková, V. O., Zeleňáková, M., Rysulová, M., Repel, A., & Simonová, D. (2016). Evaluation of ecological flow and concentrations of pollutants in selected river basin in Eastern Slovakia. *Procedia engineering*, 162, 98–105.
27. Jewel, A. S., Haque, A., Amin, R., Hasan, J., Mondal, S., & Ahmed, S. (2020). Heavy Metal Contamination and Human Health Risk Associated with Sediment of Ganges River (Northwestern Bangladesh). *Nature Environment and Pollution Technology*, 19(2), 783–790.
28. Kul'bachko, Y. L., Didur, O. O., Loza, I. M., Pakhomov, O. E., & Bezrodnova, O. V. (2015). Environmental aspects of the effect of earthworm (Lumbricidae, Oligochaeta) tropho–metabolic activity on the pH buffering capacity of remediated soil (steppe zone, Ukraine). *Biology Bulletin*, 42(10), 899–904.
29. Li, Y., Chen, H., Teng, Y. (2020). Source apportionment and source–oriented risk assessment of heavy metals in the sediments of an urban river–lake system. *The Science of the total environment*, 737, 140310.
30. Marathe, N. P., Pal, C., Gaikwad, S. S., Jonsson, V., Kristiansson, E., Larsson, D. (2017). Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. *Water research*, 124, 388–397
31. Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., & Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental research*, 137, 246–255.
32. Singovszka, E., Pavliková, P., & Balintova, M. (2017). Monitoring heavy metals in bottom sediments on east of Slovakia and their comparison with current

legislation. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 17, 681–687.

33. Yu, C., Zhang, J., Wu, L., Liu, Y., & Ge, G. (2015). Effects of heavy metal and nutrients on benthic microbial communities in freshwater sediment of Poyang Lake (China). *Journal of Residuals Science and Technology*, 12(2), 105–111.
34. Zhu, J., Zhang, J., Li, Q., Han, T., Xie, J., Hu, Y., & Chai, L. (2013). Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediment contaminated with multiple heavy metals from the Xiangjiang River in China. *Marine pollution bulletin*, 70(1–2), 134–139.

## РОЗДІЛ 4. СКЛАД МІКРОБОЦЕНОЗІВ ГІДРОЕКОСИСТЕМ ТА ЇХ СТАН В УМОВАХ АНТРОПОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ

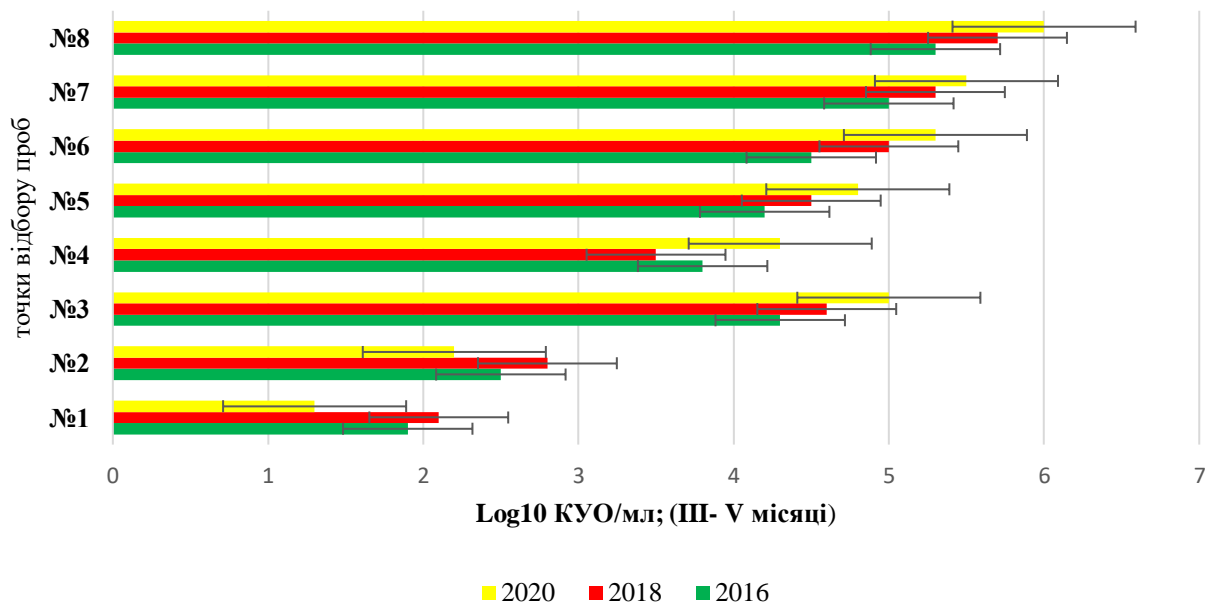
### 4.1. Розподіл мікробних угруповань річки Уж в умовах антропогенного навантаження

Мікробіоценози є одним з найбільш чутливих маркерів антропогенного впливу на екосистему [10]. Беручи участь у біогеохімічних циклах та процесах трансформації речовини й енергії, мікроорганізми першими реагують на екологічні зміни [9]. За даними звітної доповіді Департаменту екології та природних ресурсів Закарпатської ОДА «Про стан навколишнього середовища Закарпатської області» (2017) за останній рік у водні об'єкти Закарпатської області було скинуто 33,93 млн м<sup>3</sup> недостатньо очищених та очищених зворотних вод. Це свідчить про необхідність комплексного вивчення гідроекологічних процесів водойми в умовах антропогенного навантаження. Визначення розподілу автохтонної та алохтонної мікробіоти є невід'ємною частиною комплексного моніторингу природних екосистем.

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. Серед представників бактеріофлори, які засвоюють органічні форми азоту, найчастіше зустрічаються роди *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* та ін [7]. Потрапляння до водойми значної кількості транзиторних мікроорганізмів є результатом антропогенного забруднення природної екосистеми [1].

За межами контрольної точки чисельність сапрофітів зростає, особливо, на техногенно трансформованій території в 100 м від впадіння струмка Доморадж в річку Уж та на аграрній місцевості (ділянка №8), де протягом трьох років відмічаються високі титри мікроорганізмів —  $10^5$ – $10^6$  КУО/мл (рис.4.1.1).

### Мікроорганізми які засвоюють органічні форми нітрогену

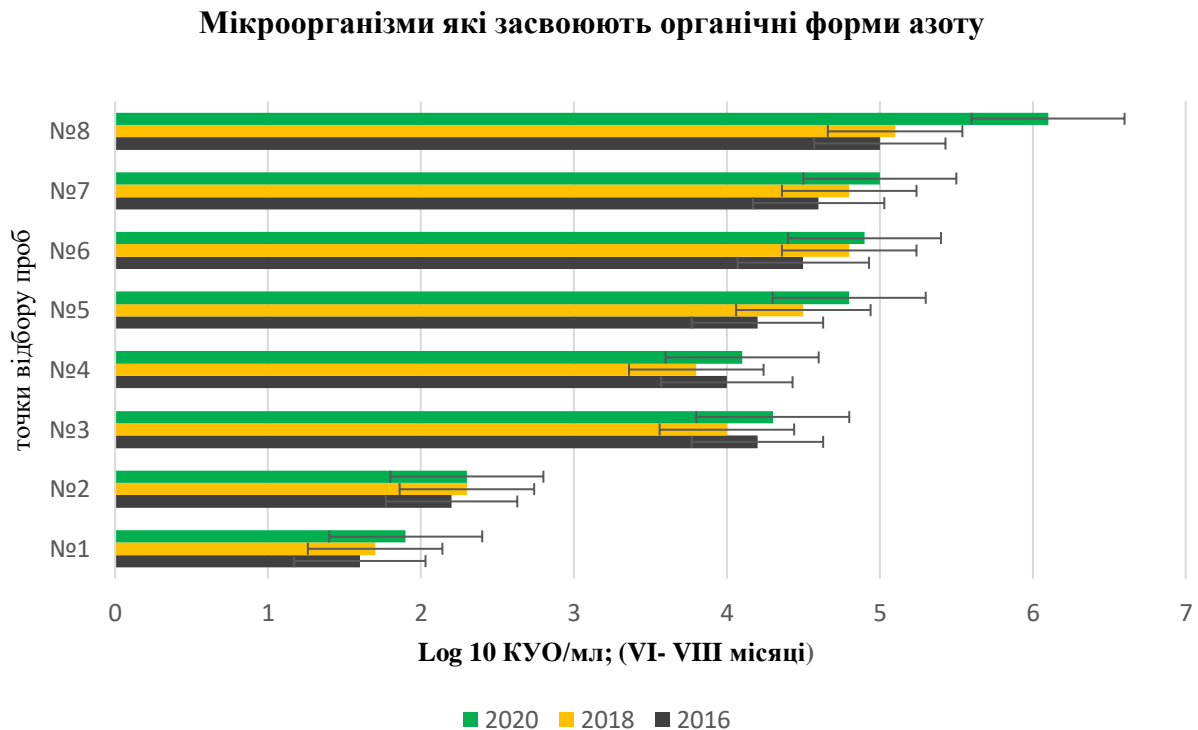


**Рис. 4.1.1.** Динаміка чисельності мікроорганізмів які засвоюють органічні форми азоту на територіях з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)

У порівнянні з фоновими показниками кількість сапрофітів на аграрній території зростає в тисячі разів, так у весняний період 2020 року на моніторинговій ділянці №8 титр мікроорганізмів що засвоюють органічні форми азоту, перевищує фонові значення в 7200 разів, що вказує на бактеріальне забруднення водойми в межах даної ділянки.

Порівнюючи міжсезонну динаміку мікроорганізмів відмічаємо зростання титру сапрофітів навесні, та їх зниження в літній період, до прикладу, на техногенно-трансформованій території — моніторингова ділянка №3 навесні 2020 року встановлений титр мікроорганізмів які засвоюють органічні форми азоту в значенні у 33,8 раза більше ніж в літні місяці (рис.4.1.2). Подібна динаміка зміни числа мікроорганізмів які засвоюють органічні сполуки азоту може бути пов'язана зі зміною водності водойми, так навесні річка повноводна через поступлення дощових, талих і підземних вод, які переносять транзиторну мікрофлору. В літній період характерне зменшення водності річки, яке впливає на фізико-хімічні показники водойми, і як

результат, створює несприятливі умови для збільшення числа мікроорганізмів що засвоюють органічні форми азоту.



**Рис. 4.1.2.** Динаміка чисельності мікроорганізмів які засвоюють органічні форми азоту на територіях з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)

Аналогічні тенденції спостерігались при дослідженні сезонної динаміки санітарно-мікробіологічних показників поверхневих вод Дніпра, де загальне число сапрофітів навесні збільшувалось у 2–3 рази в порівнянні з показниками отриманими в літній період [6].

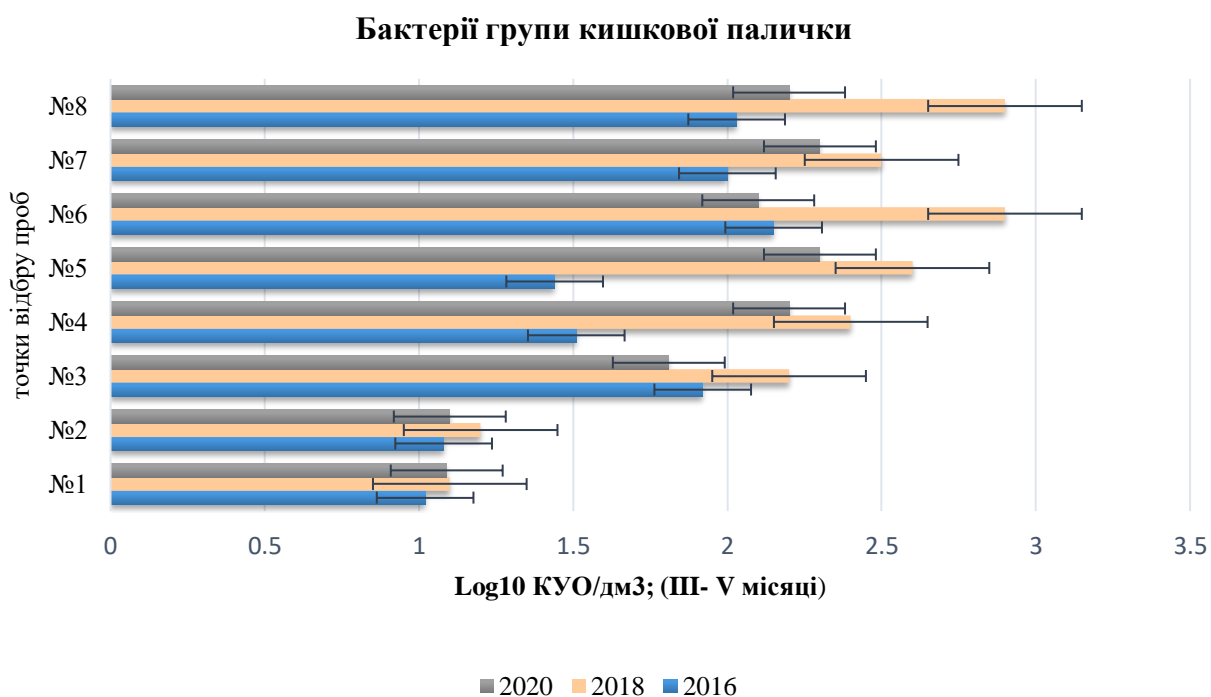
До основних чинників зростання числа транзиторної мікробіоти належить зміна внутрішньорічного гідрологічного режиму річки, яка характеризується, зростанням числа мікроорганізмів, що використовують органічні форми нітрогену, в період весняного повноводдя та в період літньої межени, а також надходженням значної кількості біогенних речовин з антропогенних джерел забруднення, якими являються стічні води лісохімічного комбінату та сільськогосподарські стоки.

Вплив щільної міської забудови відображається на результатах бактеріологічного забруднення водойми в межах міста Ужгород.

До бактерій групи кишкових паличок належать мікроорганізми роду *Enterobacteriaceae* серед яких зустрічаються представники умовно-патогенної та патогенної мікрофлори, які є збудниками інфекційних захворювань, в тому числі й тих, які передаються через воду.

Забруднення річкової води бактеріями групи кишкових паличок становить епідеміологічну небезпеку оскільки серед даних груп мікроорганізмів можуть зустрічатися патогенні штами які є збудниками інфекційних захворювань (Єсипова та Жежеря, 2008).

Найбільше це проявляється за змінами індексу бактерій групи кишкових паличок, який зростає за межами міста і сягає максимальних значень перевищуючи контрольні показники у 13,3 рази протягом весняних місяців 2016 року та в 82,1 рази у літній період 2018 року (рис.4.1.3).



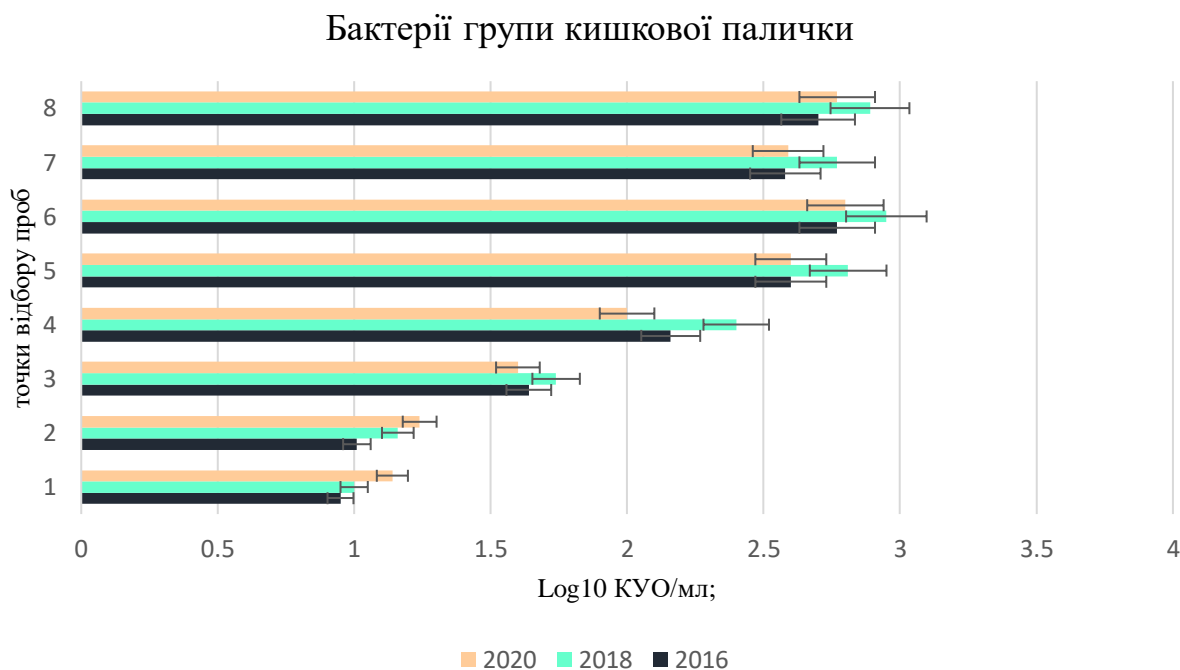
**Рис. 4.1.3.** Динаміка чисельності бактерій групи кишкових паличок на територіях з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)



З підвищенням температури індекс бактерій групи кишкової палички зростає, так в літній період 2016 року на моніторинговій ділянці №6 кількість мікроорганізмів зростає в 4,2 раза у порівнянні з показниками отриманими навесні (рис.4.1.4).

Підвищення температури у водоймі сприяє зростанню частки біогенних речовин, розмноженню бактерій даної групи та розростанню водоростей.

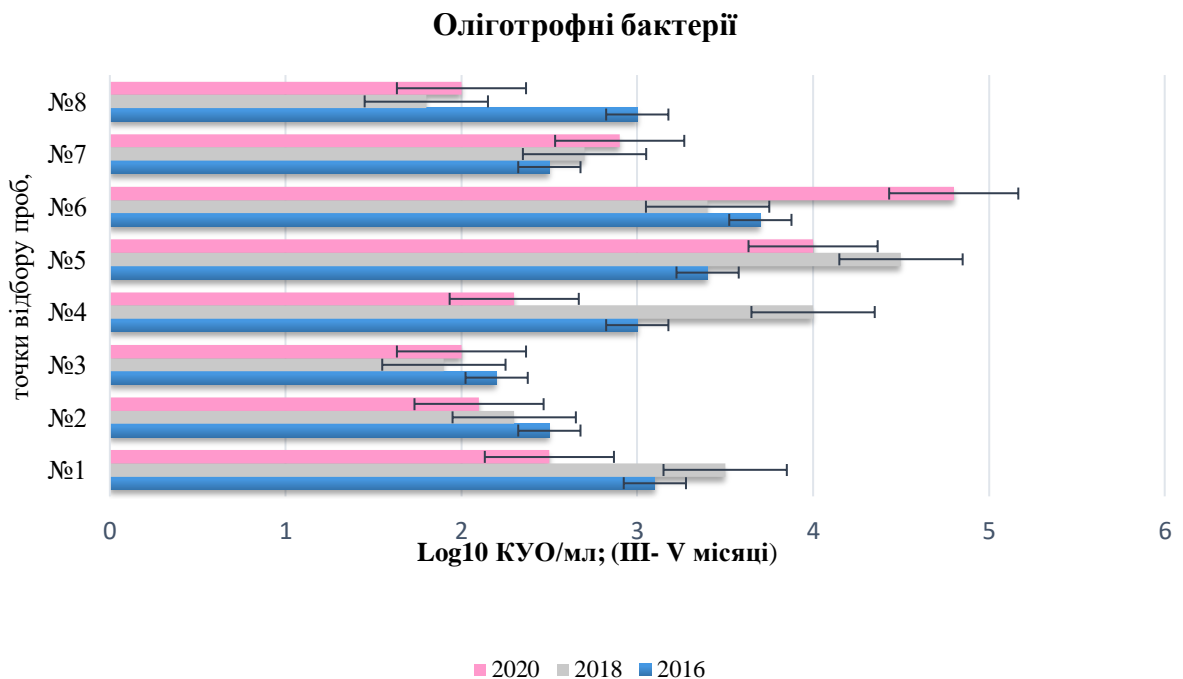
За даними досліджень, проведених у 2020 році, стан водних ресурсів річок України залишається напруженим за мікробіологічними показниками. Відповідно до даних Міністерства екології та природних ресурсів України, середня кількість колі-фільтруючих ентеробактерій у воді річок України перевищує гігієнічно допустимі норми. Наприклад, у 2020 році у межах Харківської області виявлено значне забруднення води річок, серед яких Донець, Оскіл, Мжа, Желтий Ташлик, Медведиця та інші, з коефіцієнтом забруднення води, що перевищує гігієнічно допустиму норму. Також, високий рівень забруднення води відзначається у багатьох інших регіонах України, включаючи Чернігівську, Київську, Львівську, Закарпатську області та інші [4].



**Рис. 4.1.4.** Динаміка чисельності бактерій групи кишкових паличок на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)

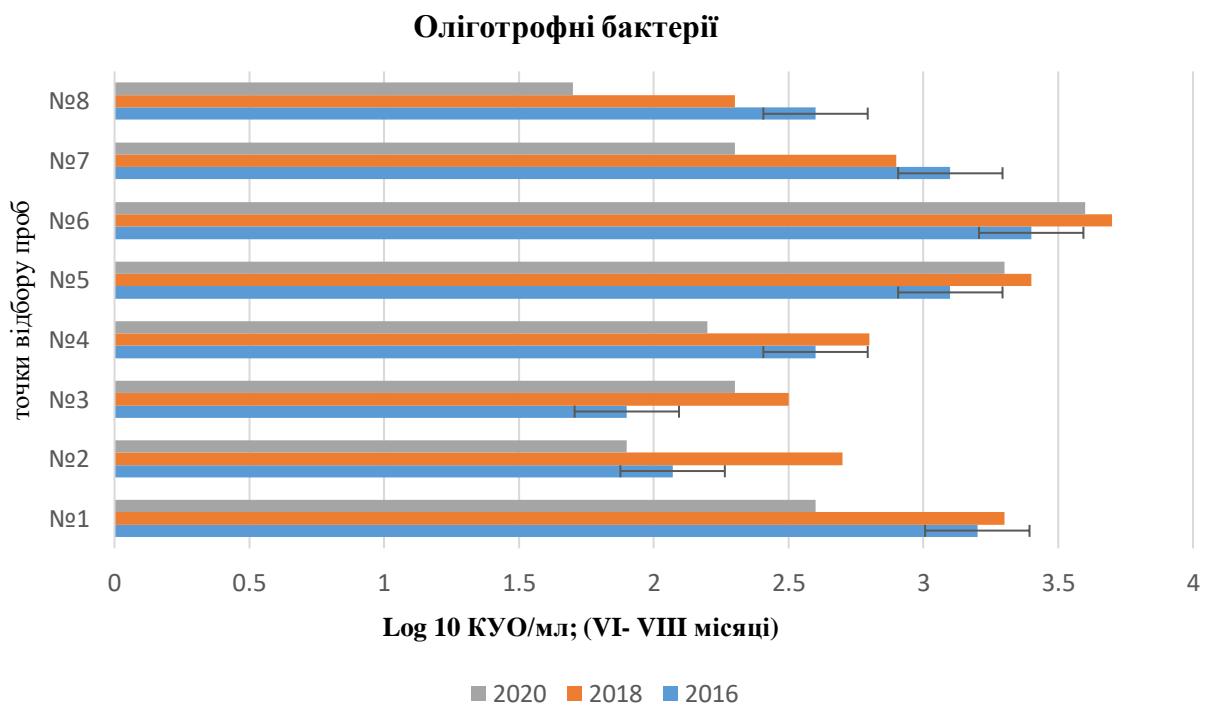
Забруднення води бактеріями групи кишкової палички пояснюється нерегульованим скидом неочищених або ж недостатньо очищених стічних вод, до того ж можна припустити, що підвищення температури та характер водності водойми, а саме обміління річки в цей період, веде до збільшення концентрацій забруднюючих речовин.

Найбільш часто зустрічаємими представниками олігонітрофільних мікроорганізмів у водоймах є мікроорганізми родів *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Derxia*, *Clostridium*, *Azotomonas*. У досліджуваній водоймі вміст оліготрофних бактерій коливався в значних межах, найменші значення зафіксовані на аграрній та техногенно–трансформованій території  $10^3$ – $10^4$  КУО/мл (рис.4.1.5). У весняні місяці рівень олігонітрофілів в точці №3 зменшувався порівняно з контрольною точкою у 8,3 рази у 2016 році та у 43,7 рази у 2018 році. Позаяк популяції даних мікроорганізмів здатні рости тільки за низьких концентрацій хімічних сполук, регулярне надходження комунально–побутових та промислових стічних вод могли зіграти роль лімітуючого чинника [5].



**Рис. 4.1.5.** Динаміка чисельності олігонітрофільних бактерій на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)

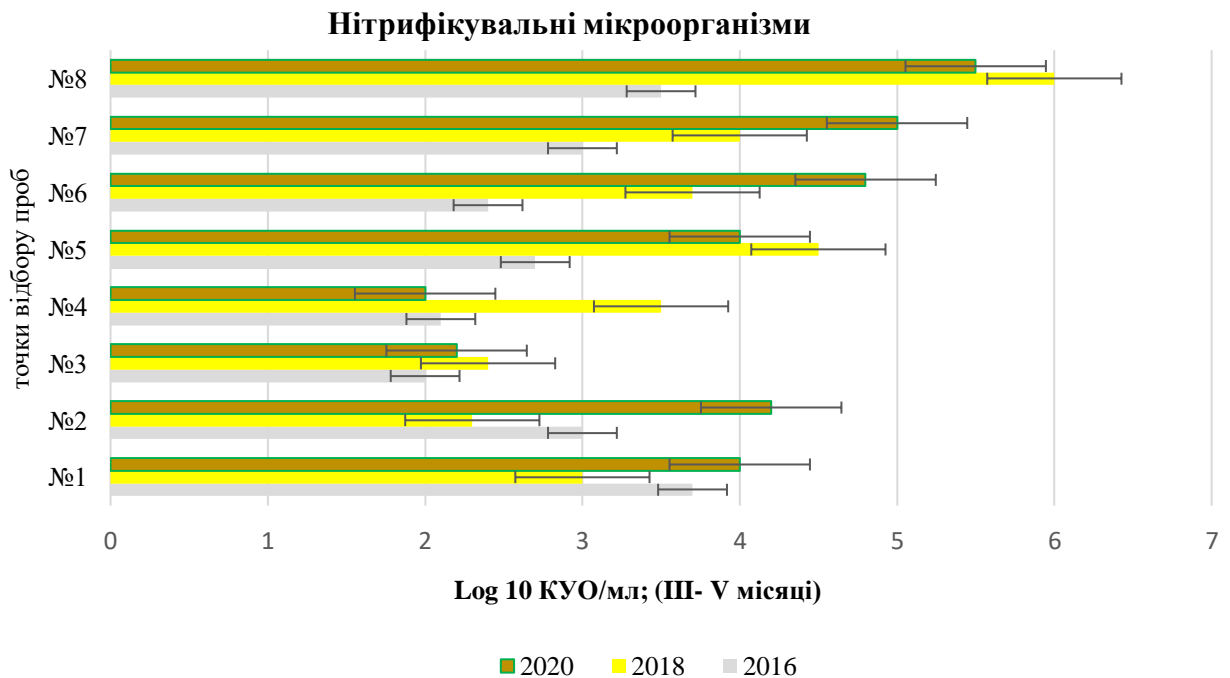
В літній період 2018 року відмічалось зменшення кількості олігонітрофілів на техногенно–трансформованій території (моніторингова ділянка №3) в 10,2 раза у порівнянні з показниками отриманими навесні, що може бути наслідком зниження водності річки й становлення несприятливих умов для розвитку даних мікроорганізмів (рис. 4.1.6). Одним з таких факторів може бути зниження рівня кисню у воді, оскільки більшість олігонітрофільних мікроорганізмів є аеробними то для їх оптимального розвитку необхідна достатня кількість  $O_2$ , рівень якого в умовах забруднення та зростання температури навколишнього середовища знижується. Не менш вагомим чинником може бути й зміна рівня рН води, який є сприятливим для олігонітрофільних мікроорганізмів в межах від 6,5 до 8,0.



**Рис. 4.1.6.** Динаміка чисельності олігонітрофільних бактерій на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)

Інтенсифікація процесів трансформації сполук азоту у водоймі відбувається при наявності нітрифікувальних бактерій до яких належать роди *Nitrosococcus*, *Nitrospina*, *Nitrosolobus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosospira* та ін.

Нітрифікувальні бактерії переважали в контрольній ділянці та на аграрній території, їх зменшення в зоні техногенної та урбанізованої території протягом досліджуваного періоду 2016–2018–2020 років ймовірно спричинене підвищеним вмістом важких металів та органічних сполук (фенолів, формальдегіду), які, як відомо, можуть спричиняти інгібуючий ефект, навіть, коливаючись в межах гранично допустимих концентрацій (Кирсанов, 2017). Пригнічувати розвиток даних мікроорганізмів можуть і знижені концентрації кисню у водному середовищі. Проте навесні 2018 році відмічається зростання даних мікроорганізмів і в районі техногенного впливу в 2,1 рази порівняно з 2016 роком, що пояснюється збільшенням водності річки в даний період та підвищенням самоочисної здатності водоюми (рис.4.1.7).

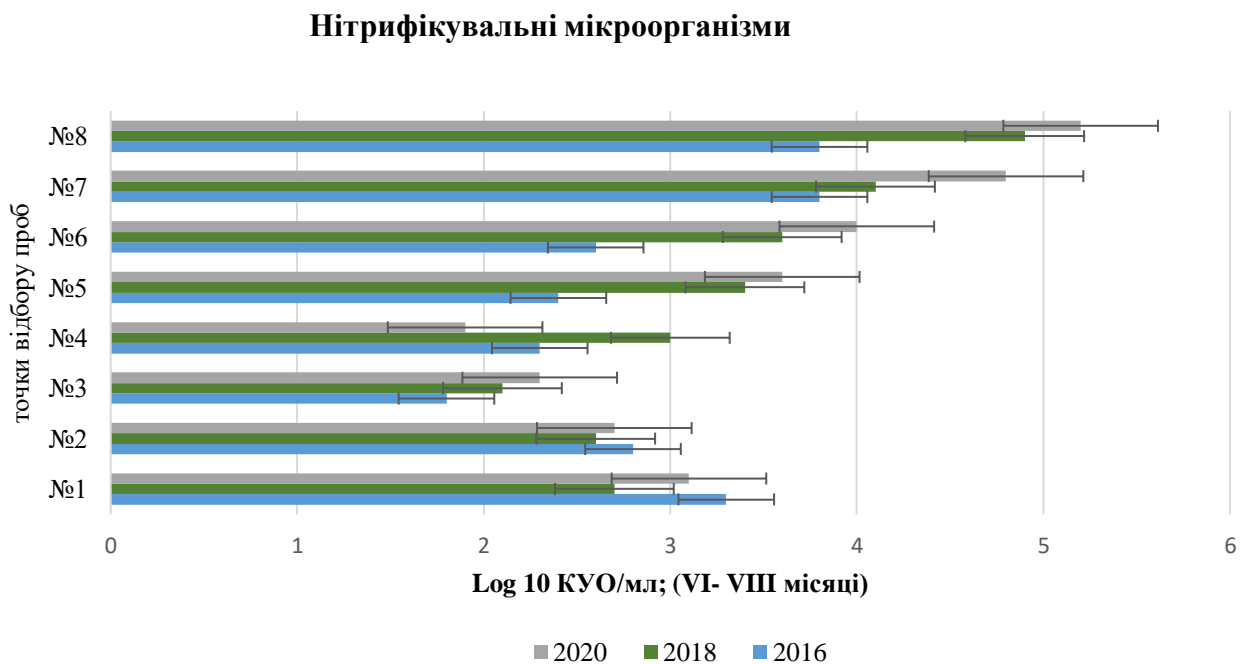


**Рис. 4.1.7.** Динаміка чисельності нітрифікувальних бактерій на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)

Влітку динаміка нітрифікувальних мікроорганізмів залишається незмінною, проте їх титр дещо знизився, до прикладу, кількість виділених нітрифікувальних мікроорганізмів влітку 2018 року знизилась в 11 разів порівняно з показниками отриманими навесні, що може бути пов'язано зі зменшенням частоти внесення

органічних добрив, зокрема зниженню концентрацій амонію який є основним джерелом живлення даної групи мікроорганізмів, а також зниженням рівня кисню у воді та зміною рН (рис.4.1.8).

Важливим фактором який може впливати на зміну чисельності нітрифікувальних бактерій у поверхневих водах річки є збільшення чисельності інших бактерій у літній період які створюють конкурентні умови у споживанні поживних речовин та кисню [12].

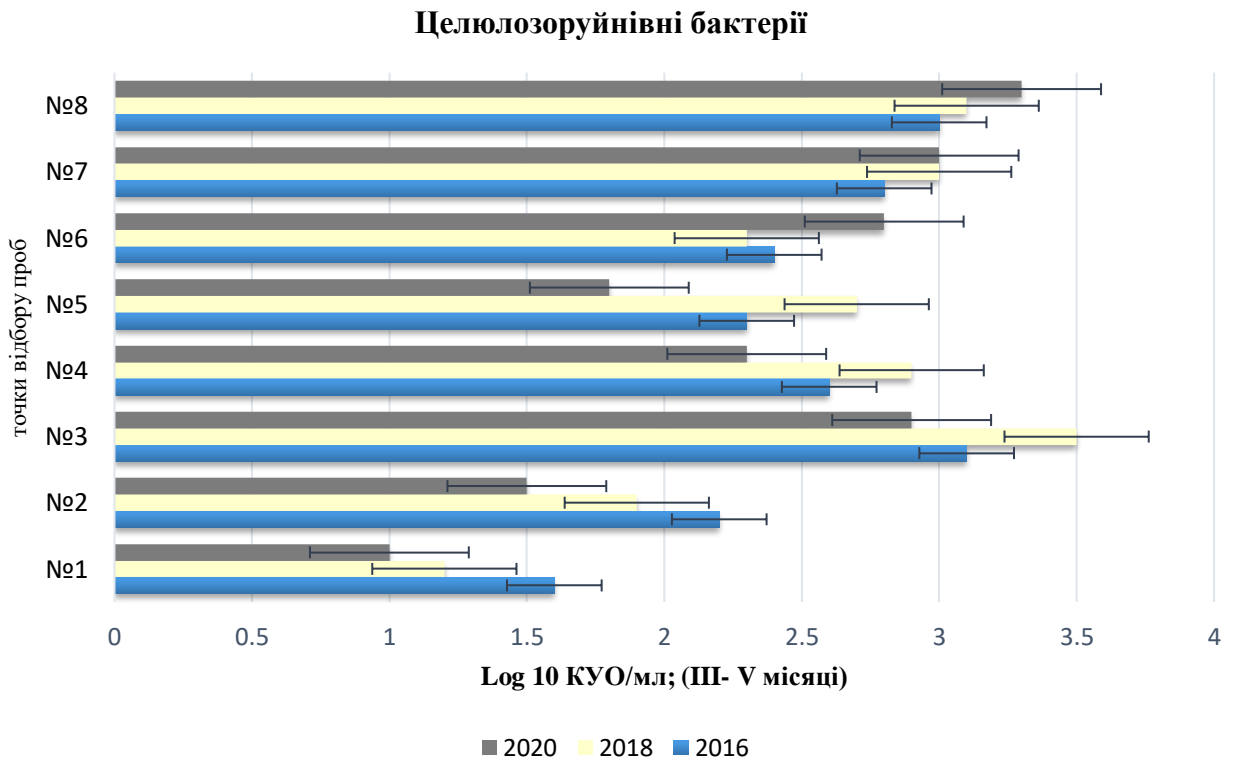


**Рис. 4.1.8.** Динаміка чисельності нітрифікувальних бактерій на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)

Целюлозоруйнівні бактерії беруть участь в колообігу карбону у водних екосистемах [12], які здебільшого здійснюють бактерії родів *Cellvibrio*, *Vibrio*, *Cellulomonas*, *Polyangium*, *Pseudomonas*, *Sporocytophaga*, *Cytophaga*, *Cellfalcicula*, *Sporangium*, *Archangium*, *Clostridium*.

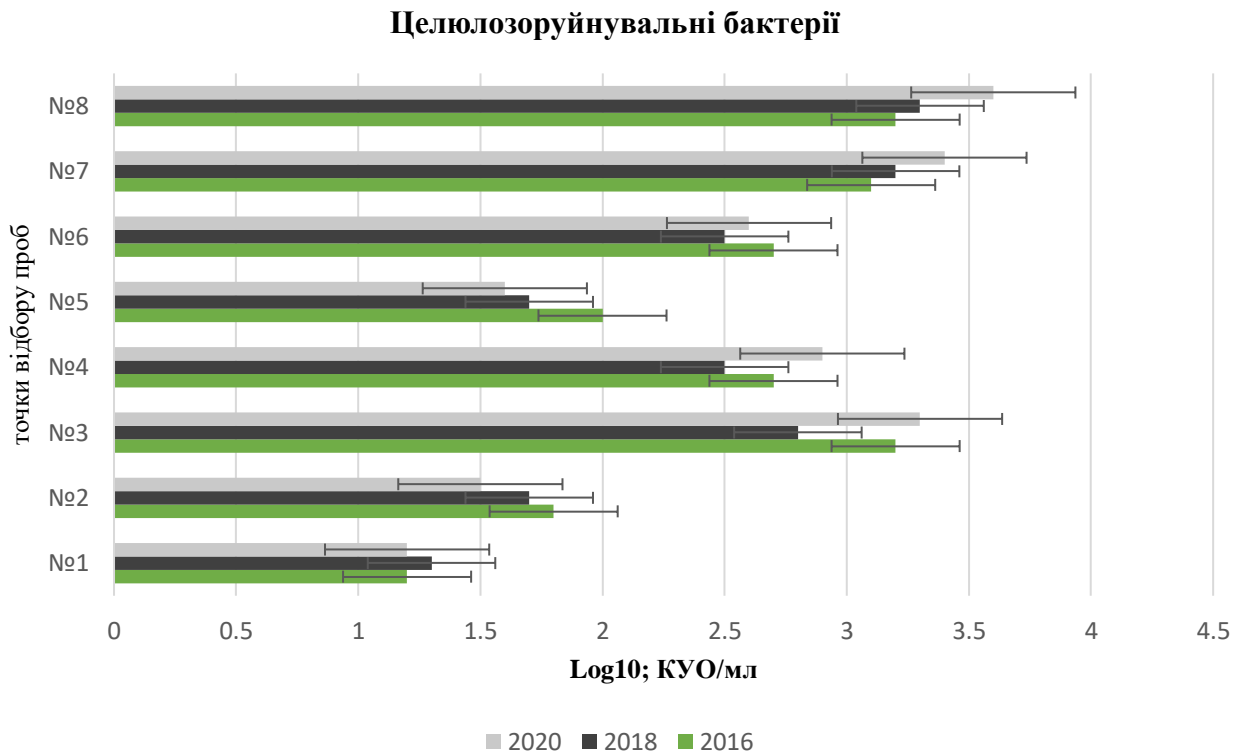
За результатами проведених досліджень дана група мікроорганізмів виявилися найбільш поширеною в межах аграрної та техногенно–трансформованої території, так на ділянці №3 спостерігається перевищення фонових значень в 29 разів, а на ділянці №8 в 20 разів навесні 2016 року (рис.4.1.9). Установлено, що

целюльозоруйнівні бактерії переробляють органічну речовину забезпечуючи динамічну рівновагу гідроекосистем. Зростання кількості целюльозоруйнівних мікроорганізмів у період весни може бути пов'язаний із збільшенням кількості органічних речовин у водоймі, замуленням та надходженням забруднювальних речовин, що найбільш характерно для моніторингової ділянки в межах техногенно-трансформованої території.



**Рис. 4.1.9.** Динаміка чисельності целюльозоруйнівних бактерій на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)

Влітку кількість целюльозоруйнівних бактерій зростає, на аграрній території (моніторингова ділянка №8) зафіксоване зростання у 2,3 раза в літні місяці 2020 року (рис.4.1.10) Відомо, що їх збільшення є свідченням забруднення водойми, здебільшого сполуками карбону та нітратами [7].

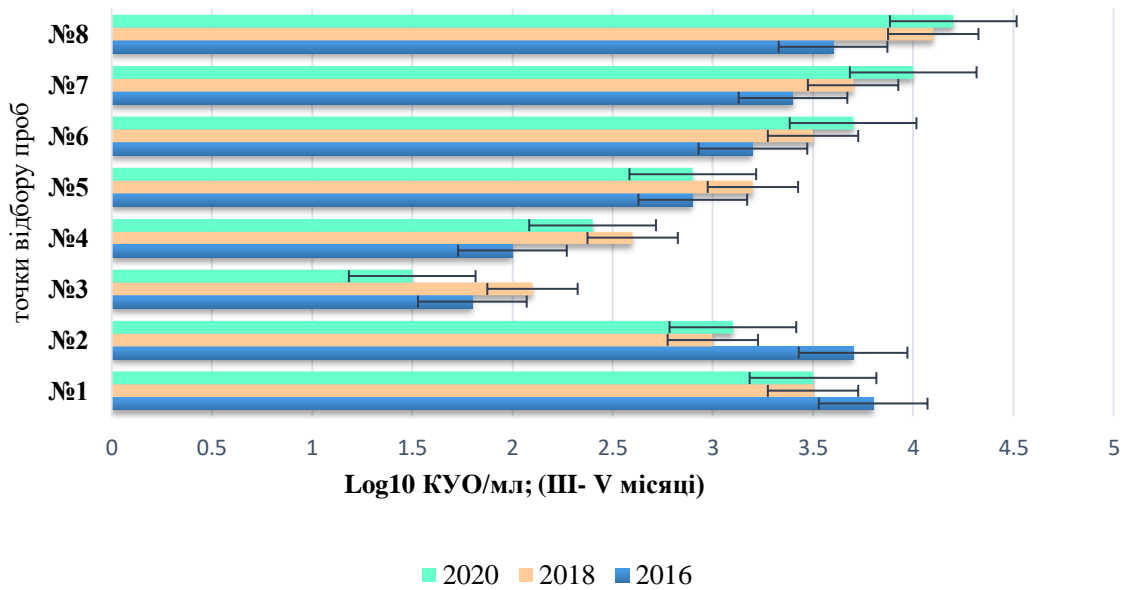


**Рис. 4.1.10.** Динаміка чисельності целюлоруйнівних бактерій на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)

Мікроорганізми, які трансформують мінеральні форми азоту відіграють важливу роль в самоочисній здатності водойм. До основних груп бактерій, які засвоюють мінеральні форми нітрогену належать роди *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Escherichia* та актинобактерії *Salinibacterium*, *Solwaraspora*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Streptosporangium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Thermoactinomyces*, *Dietzia*, *Salinispora*, *Marinophilus*.

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 разів (рис.4.1.11). Найменша чисельність досліджуваних бактерій зафіксована на техногенно–трансформованих територій, вірогідно це пов'язано з неналежними умовами сформованими під впливом техногенного екотопу.

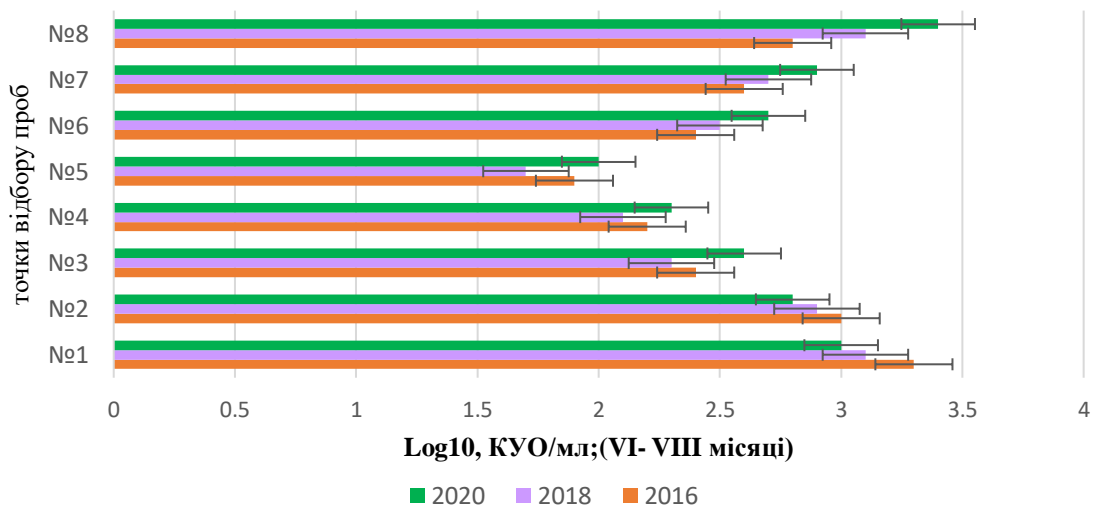
### Мікроорганізми які засвоюють мінеральні форми нітрогену



**Рис. 4.1.11** Динаміка чисельності бактерій, які засвоюють мінеральні форми азоту на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)

В літній період титр даних мікроорганізмів по всій протяжності водойми знижується, проте у порівнянні з даними отриманими навесні їх кількість зростає на техногенно–трансформованій території та знижується в точці №5 в 1,8 раза у 2018 році(рис.4.1.12).

### Мікроорганізми які засвоюють мінеральні форми нітрогену

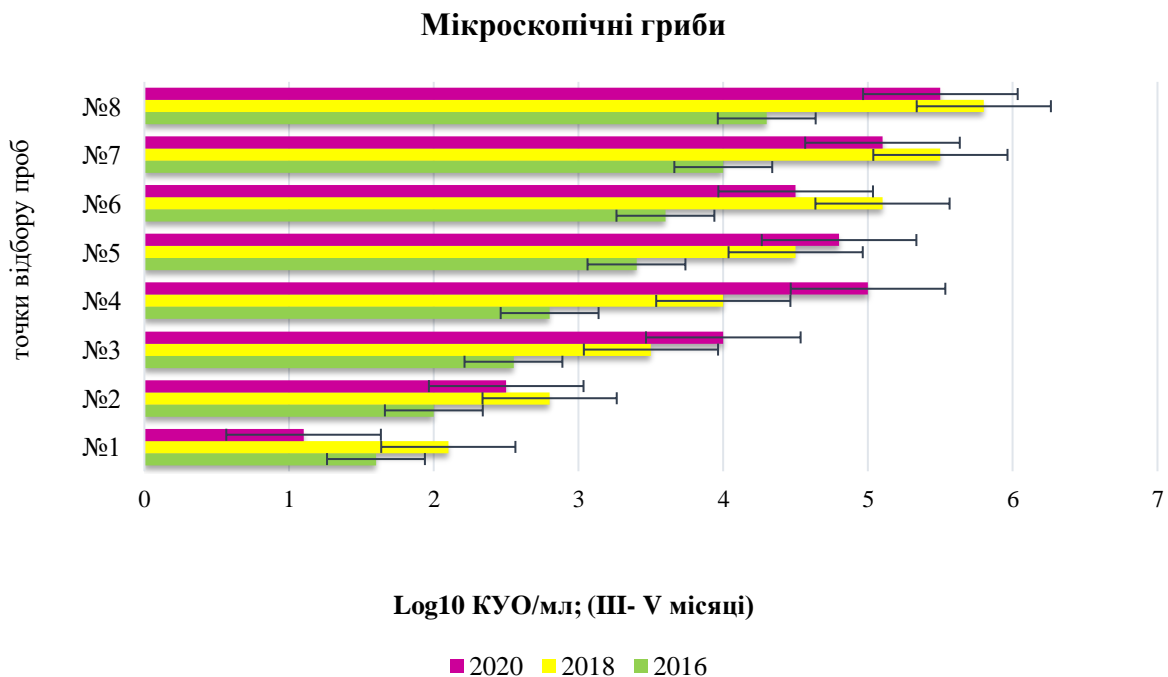


**Рис. 4.1.12.** Динаміка чисельності бактерій, які засвоюють мінеральні форми азоту на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)



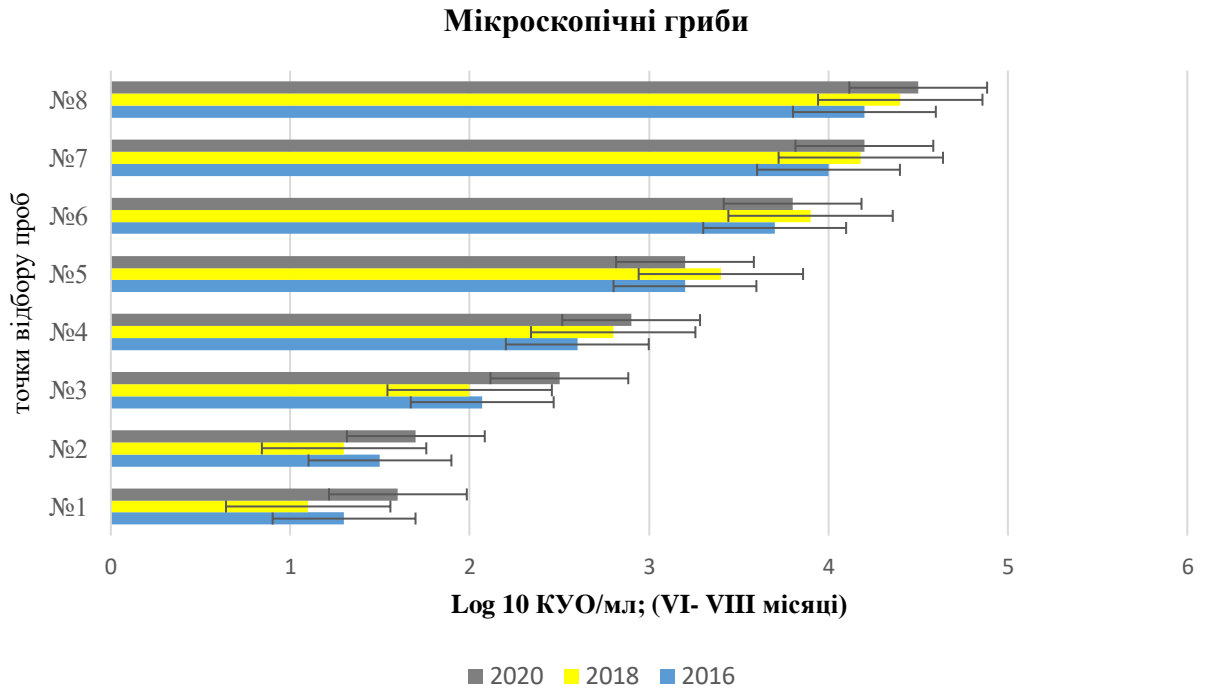
Мікроміцети є важливим компонентом гідроекосистем і характеризуються багатим видовим різноманіттям. Найчастіше у водних екосистемах зустрічаються представники родів *Aspergillus*, *Ogataea*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Candida*, *Penicillium* та ін [3].

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 території  $10^2$ – $10^3$  КУО/мл, що зумовлено посиленою сонячною інсоляцією у високогірних районах [11]. В поверхневих водах з низьким рівнем потоку лімітуючим фактором могли слугувати і підвищені концентрації важких металів в районі скиду стічних вод лісохімічного комбінату. Найбільша кількість мікроміцетів  $10^6$  КУО/мл виявлена в межах аграрної місцевості й перевищує контрольні значення у 250 разів у весняні місяці 2018 році, дана місцевість характеризується підвищеним вмістом біогенних речовин, які створюють сприятливі умови для розвитку мікроскопічних грибів (рис.4.1.13).



**Рис. 4.1.13.** Динаміка чисельності мікроскопічних грибів на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (весняний період)

В літній період кількість мікроскопічних грибів зменшилась по всій протяжності водойми й сягала найнижчих значень на рекреаційній та техногенно–трансформованій території –  $10^1$ – $10^2$  КУО/мл (рис.4.1.14).



**Рис. 4.1.14** Динаміка чисельності мікроскопічних грибів на ділянках з різним рівнем антропогенного навантаження (літній період)

Результати дослідження розподілу різних груп мікроорганізмів у водних середовищах свідчать про якісні та кількісні зміни у структурі мікробних спільнот під впливом антропогенного навантаження [5]. На ділянках водойм, які піддаються антропогенному тиску, відмічено зменшення автохтонних грампози–тивних груп мікроорганізмів і зростання кількості алохтонних грамнегативних мікробів [2].

Під впливом хімічних сполук змінюється чисельність і співвідношення мікроорганізмів. Зокрема, проведені дослідження зразків води озера Яворівське, забрудненого сполуками сульфуру, свідчать про формування нового мікробіоценозу, в якому переважають сіркоокислювальні бактерії, і відмічається збіднення видової різноманітності бактерій [7].

Наднормові концентрації важких металів у водоймах пригнічують ріст міксоміцетів, тим самим порушуючи рівновагу в екосистемі. Зі свого боку така динаміка

кількісного зниження мікроскопічних грибів може слугувати індикаторним показником забруднення водного об'єкта [8].

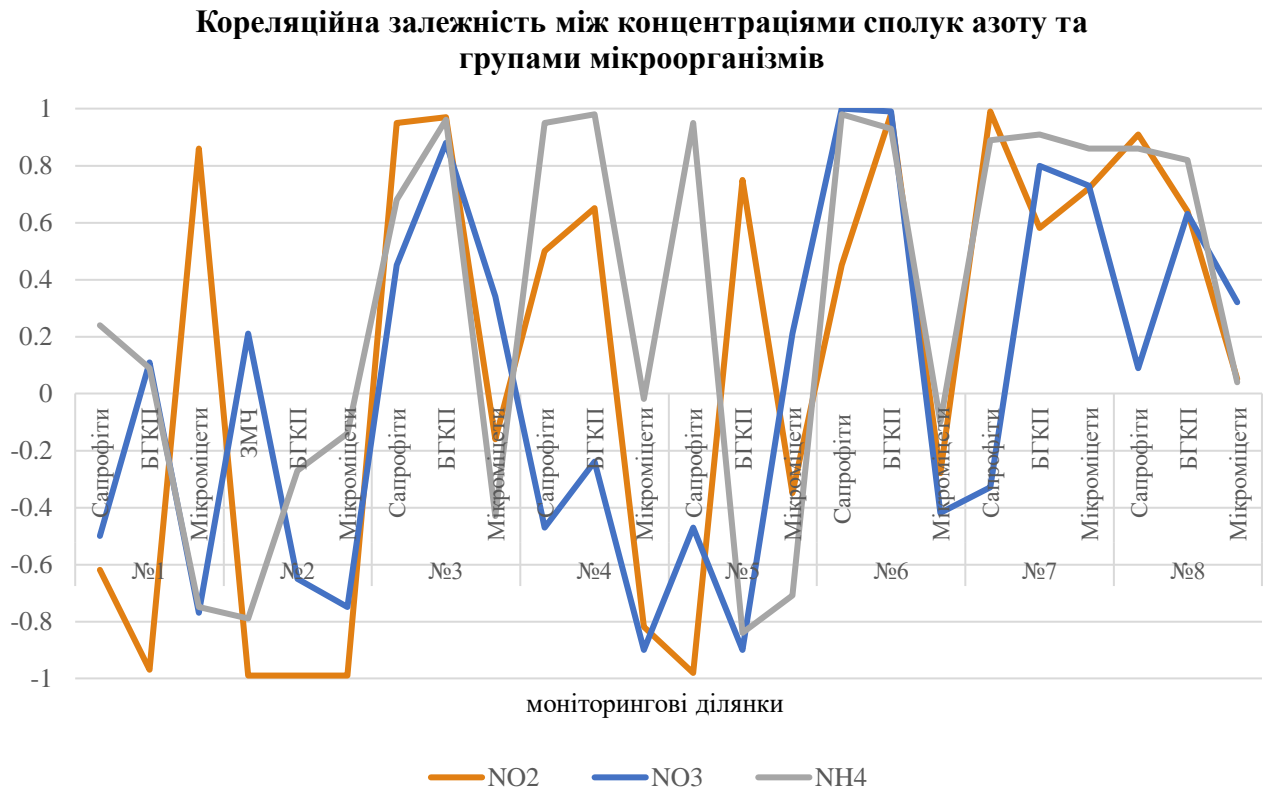
Отримані результати вказують на нерівномірний розподіл мікроорганізмів різних фізіологічних груп залежно від територіального розміщення. Порівняльна характеристика співвідношення та чисельності представників мікробіоценозу вказує що найбільш несприятлива екологічна ситуація характерна для техногенно–трансформованої території, де під впливом тривалого забруднення спостерігається адаптивна відповідь мікроорганізмів на неналежні умови існування, що призводить до сукцесійних змін мікробного ценозу. Для території поблизу с. Сторожниця, яка знаходиться в зоні впливу сільськогосподарської діяльності, також характерні перебудови в структурі мікробіоценозу, які вказують на безперервне надходження забруднюючих речовин до водойми.

Таким чином, встановлено що бактеріоценоз річки Уж потерпає від впливу забруднюючих речовин, на локальних зонах з підвищеним умістом поллютантів знаходиться на стадії трансформації, проте гідролого–морфологічні умови, притаманні для лотичних екосистем дозволяють перебувати компонентам гідроценозу в умовах флуктуаційних змін підтримуючи рівновагу екосистеми.

#### **4.2. 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.4.2.1).

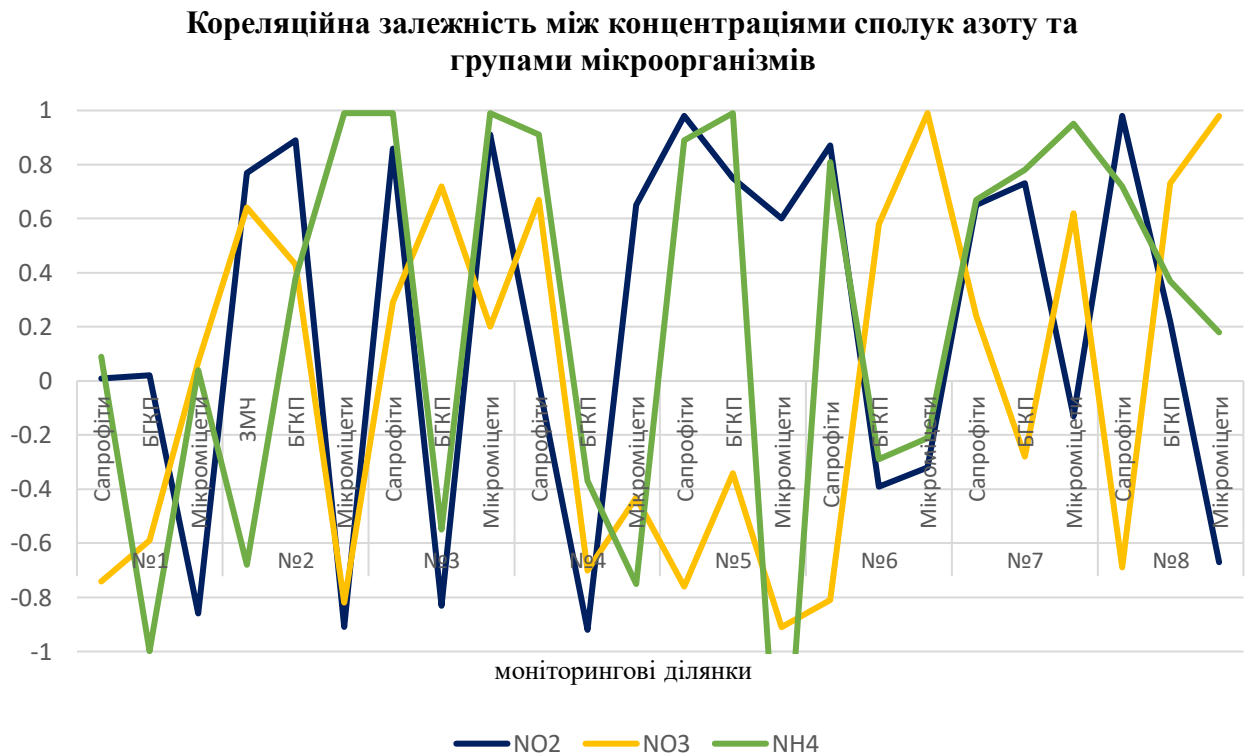


**Рис.4.2.1** Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами виділеними з води річки Уж (весна, 2016 р.)

*Примітка:*  $p \leq 0,05$ .

На урбанізованій та аграрній територіях зв'язок між NO<sub>3</sub> та сапрофітами варіює від слабкого до оберненого протягом трьох років, в той час, як по відношенню до NO<sub>2</sub> та NH<sub>4</sub> кореляційний зв'язок залишається незмінним, що свідчить про спільне джерело надходження біогенних речовин та мікроорганізмів (рис.4.2.2). На даних територіях найбільш ймовірним джерелом надходження токсикантів можуть бути комунально-побутові стоки.

У витoku річки також встановлена чітка обернена залежність між динамікою зміни чисельності бактерій та вмісту сполук азоту у воді, що може свідчити про здійснення меншого антропогенного впливу на цю ділянку водойми.



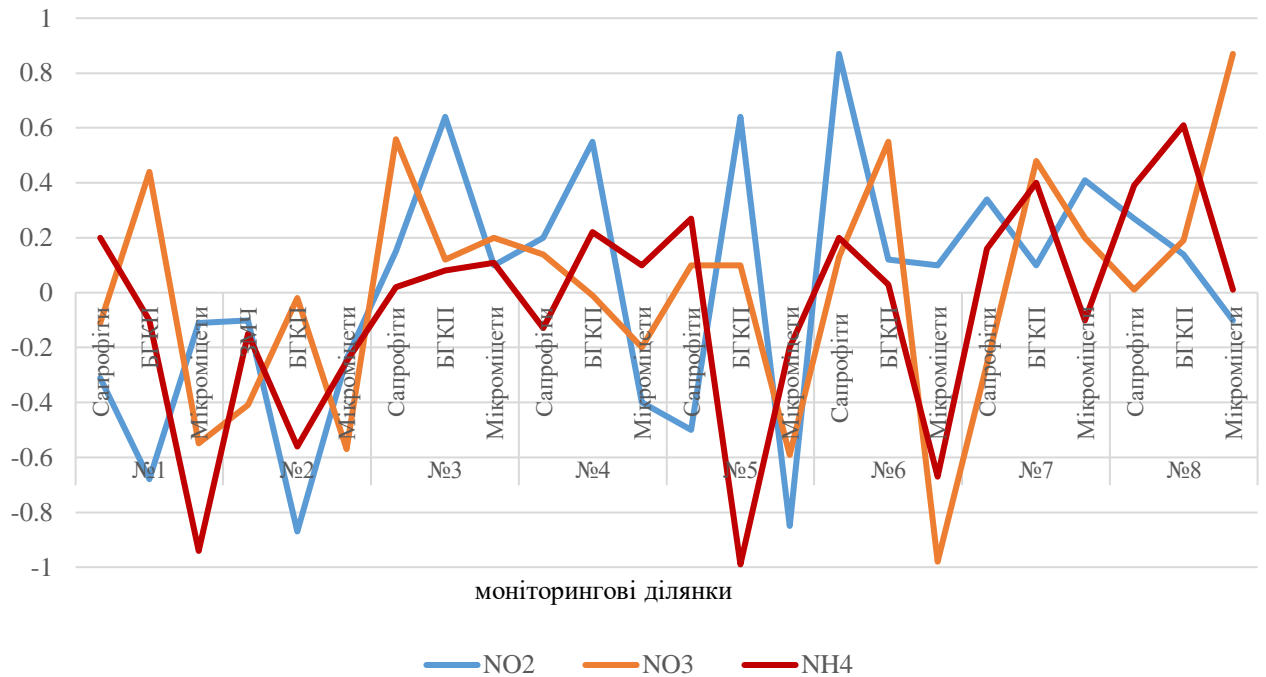
**Рис.4.2.2** Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами виділеними з води річки Уж (літо, 2016 р.)

*Примітка:*  $p \leq 0,05$

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 (рис 4.2.3).

Позитивний зв'язок між збільшенням кількості титру мікроміцетів та концентрацій сполук азоту у зразках води моніторингової ділянки №8 може бути пов'язаний зі становленням сприятливих умов для розвитку мікроскопічних грибів зі зростанням концентрацій біогенних речовин завдяки зміні геоморфологічних особливостей водойми на даній території, а саме із замулюванням річки та сповільненням течії в межах села Сторожниця (рис.4.2.4).

### Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та групами мікроорганізмів



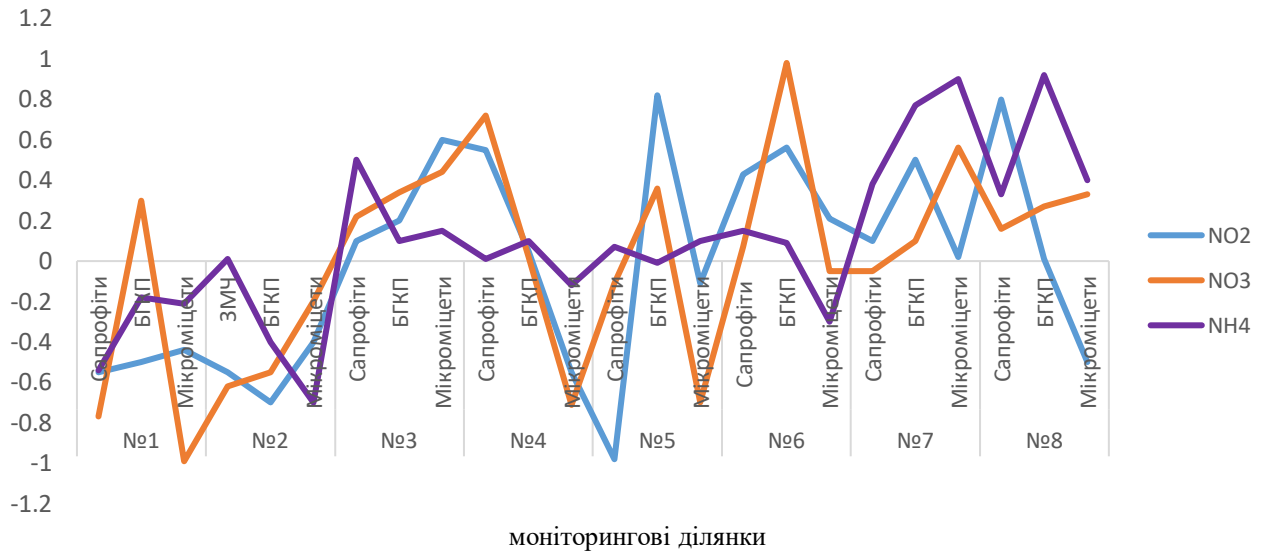
**Рис.4.2.3** Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами виділеними з води річки Уж (весна, 2018 р.)

*Примітка:*  $p \leq 0,05$

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 проявляється на урбанізованій території, за містом Ужгород, між зростанням вмісту нітратів та даних мікроорганізмів (точка №6  $\text{NH}_4$ –0,74;  $\text{NO}_3$ –0,65), що є наслідком надходження забруднюючих речовин до водойми разом з скидом несанкціонованих стічних вод та змивами з прилеглих територій (рис.4.2.5; рис.4.2.6).

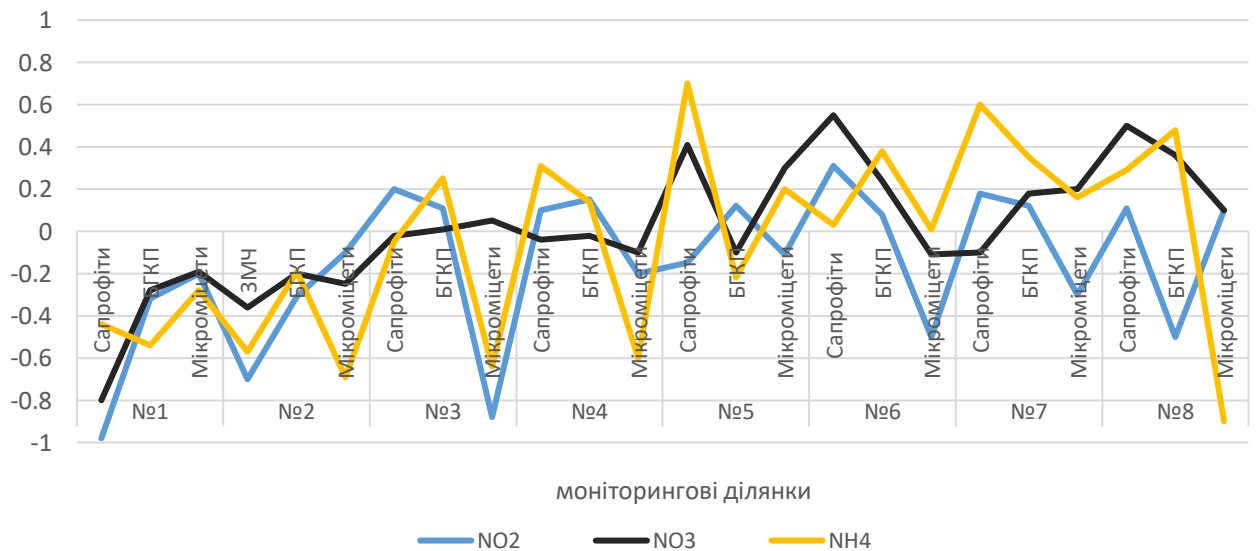
**Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та групами мікроорганізмів**



**Рис. 4.2.4** Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами виділеними з води річки Уж (літо, 2018 р.)

Примітка:  $p \leq 0,05$

**Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та групами мікроорганізмів**



**Рис. 4.2.5** Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами виділеними з води річки Уж (весна, 2020 р.)

Примітка:  $p \leq 0,05$

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, дані території належать до екологічно чистих та малозаселених (4.2.6).



**Рис. 4.2.6** Кореляційна залежність між концентраціями сполук азоту та мікроорганізмами виділеними з води річки Уж (літо, 2020 р.)

Примітка:  $p \leq 0,05$

Отримані результати дозволяють визначити вплив сполук азоту на формування мікробіоценозу річки та встановити їх роль в забрудненні водойми.

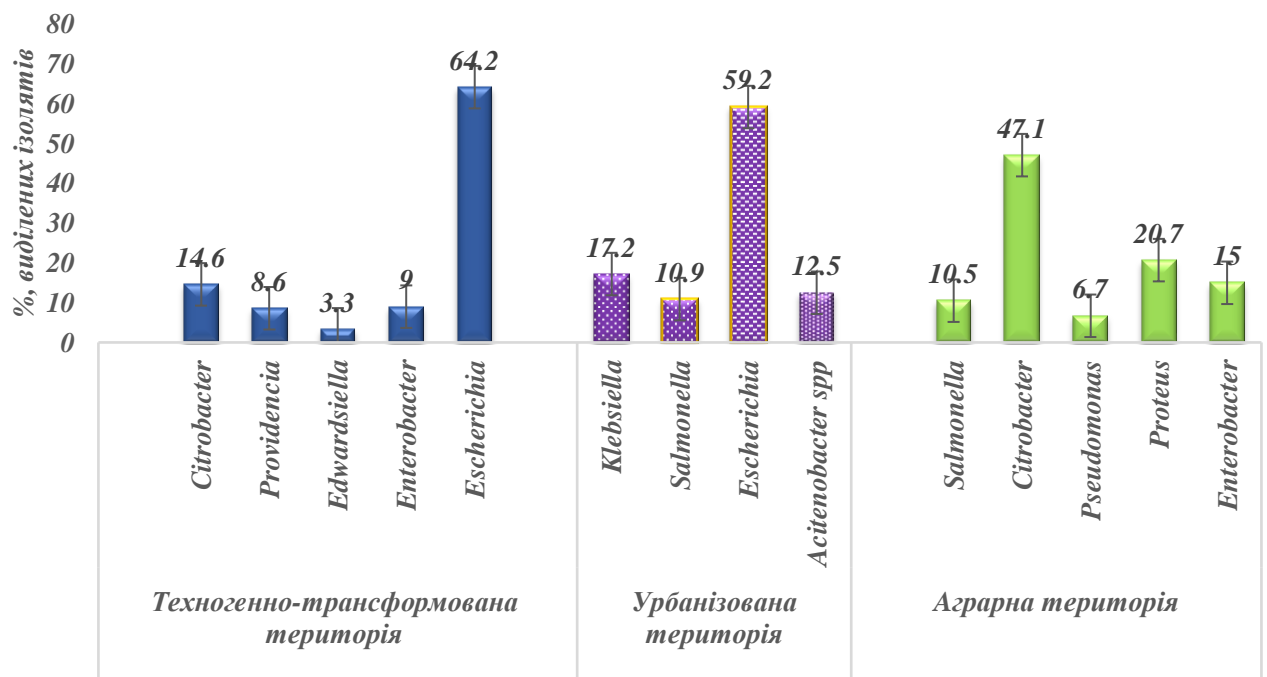
### 4.3. Видове різноманіття домінуючих представників мікробних спільнот річки Уж

Під час проведення просторового моніторингу мікробіологічних показників річки Уж визначено що 38,1 % з виділених штамів належали до грампозитивних 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. Найбільш часто зустрічаємими представниками грамнегативної мікробіоти водойми були мікроорганізми роду *Escherichia*, які виділяли із досліджуваних зразків по всій протяжності річки Уж. В кількісному співвідношенні представники роду *Escherichia* spp переважали на техногенно–трансформованій території (64,2 %), в меншій кількості зустрічалися роди *Citrobacter* spp (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 %). В 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 %) (рис.4.3.1).



**Рис.4.3.1** Спектр умовно–патогенних мікроорганізмів виділених із зразків води річки Уж

Зростання грамнегативних груп мікроорганізмів у водних екосистемах є свідченням надходження значної кількості алохтонної мікрофлори та порушенням

екологічної рівноваги гідроекосистеми. Водночас, на прикладі річки Уж, спостерігається збільшення циркуляції патогенної та умовно–патогенної мікрофлори, що є наслідком техногенного та антропогенного впливу на водойму.

### ***Висновки до розділу:***

- 1) Серед виділених представників алохтонної та автохтонної мікробіоти річки Уж переважаючою групою мікроорганізмів були бактерії, які використовують органічні форми азоту. В найвищому титрі  $10^5$ – $10^6$  КУО/мл зустрічалися в межах техногенно–трансформованої та аграрної територій у 2016 та 2020 роках. Урбанізована територія характеризувалась зростанням кількості мікроорганізмів групи кишкових паличок (моніторингова ділянка №6), які перевищували контрольні показники у 13,3 навесні 2016 року та у 82,1 рази у літній період 2018 року, аграрна — зростанням кількості мікроміцетів до  $10^6$  КУО/мл.
- 2) Порівняльна характеристика різних фізіологічних груп мікроорганізмів виділених із води вказує на найбільші перебудови у складі мікробіоценозу в районі техногенно–трансформованої території через значне зростання чисельності сапрофітів, целюльозоруйнівних мікроорганізмів й зменшення кількості представників автохтонної мікробіоти (нітрифікувальних бактерій, мікроміцетів, мікроорганізмів що використовують мінеральні форми азоту) що є наслідком трансформації екосистеми під впливом несприятливих умов.
- 3) За результатами кореляційного аналізу між змінами концентрацій сполук азоту та кількістю сапрофітів виділених з води річки Уж встановлено позитивний зв'язок на техногенно–трансформованій території ( $\text{NO}_2$ –0,95;  $\text{NO}_3$ –0,45;  $\text{NH}_4$ –0,68 2016р.), нижче за течією спостерігається послаблення залежності між досліджуваними показниками. Зміна кількості бактерій групи кишкової палички корелювала з динамікою зміни концентрації

сполук азоту, сильний позитивний зв'язок встановлений на урбанізованій території ( $\text{NO}_2$ –0,98;  $\text{NO}_3$ –0,99;  $\text{NH}_4$ –0,93) навесні 2016 року.

- 4) Чисельність мікроскопічних грибів у воді знаходилось у зворотній залежності зі зростанням концентрацій сполук азоту. При зростанні концентрацій хімічних сполук кількість мікроміцетів зменшувалась на всіх дослідних ділянках, крім аграрної території. В межах села Сторожниця підвищення концентрацій сполук азоту позитивно корелювало зі збільшенням числа мікроміцетів ( $\text{NO}_3$ –0,98,  $\text{NH}_4$ –0,18–2016 р.).
- 5) У мікробній спільноті річки Уж переважають грамнегативні мікроорганізми –61,9% що вказує на порушення екологічної рівноваги у водній екосистемі. Встановлено, що домінантна група грамнегативної мікробіоти річки Уж належить до родини *Enterobacteriaceae*.

*Основні публікації дисертанта за матеріалами розділу:*

Савенко М.В., Кривцова М.В., Федурця О.І. (2021). Вплив антропогенного навантаження на структуру мікробіоценозу річки Уж (Україна). *Екологічні науки*. 4(37), 52–59.

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.

Bilkei M., Kryvtsova M. (2018). Facultative microbiota of the river Uzh as an indicator of structural alterations of the hydro ecosystem in anthropogenic conditions // III International Scientific Conference: Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century. Kyiv, 2018; 27–28.

Білкей М.В. (2014). Показники мікробіологічного забруднення води. Проблеми збереження біорізноманіття Українських Карпат: Матеріали регіональної VII конференції молодих вчених та студентів: тези доповідей, Ужгород, 24 квітня 2014 р., 84.

**Перелік посилань:**

1. Абдюкова, Э. А., Кулагин, А. Ю., Рашитова, Г. С., Абдюкова, Г. М. (2011). Экологическая оценка воздействия агропромышленного комплекса на состояние малых рек Башкортостана. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, (73), 370–381.
2. Анганова Е. В., Савилов Е. Д., Духанина А. В. (2011) Характеристика микробного сообщества реки Ангары (Иркутская область). Проблемы здоровья и экологии. № 2 (28), 201–205.
3. Гасанова, Г. М., Амирова, Р. А. (2019). Видовой состав и частота встречаемости микромицетов в воде некоторых рек Азербайджана. *ТОМ–III*, 117.
4. Запольський, А. К., & Шумигай, І. В. (2015). Охорона питних вод від виснаження і забруднення. *Агроекологічний журнал*, (3), 6–16.
5. Калитина Е. Г., Михайлик Т. А., Семкин П. Ю., Барабанщиков Ю. А., Зорин С. А. (2015). Особенности микробиологического состава вод реки Раздольной (Южное Приморье). Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно–исследовательского рыбохозяйственного центра) №180. С. 187–197.
6. Наконечний І.В., Павлова Ю.В. (2012) Санітарно–мікробіологічні показники води дельтової зони Дніпра в сезонній динаміці. Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції «Проблеми відтворення та охорони біорізноманіття України». Полтава: Астроя, 108–110.
7. Тарабас, О., Мороз, О., Гнатуш, С., Яворська, Г., Звір, Г., Ковальчук, М. (2017). Еколого–трофічні групи мікроорганізмів води озера Яворівське. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, (76), 166–178.
8. Терехова В.А. (2007) Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. Москва: Наука, 215.
9. Узбек, І. Х. (2011). Циклічність розвитку мікроорганізмів у товщі техноекосистем. *Вісник Дніпровського аграрного університету*, №1, 47–50.

10. Фомина, И. А., Саванина, Я. В., Барский, Е. Л., Лобакова, Е. С. (2018). Оценка санитарного состояния водотоков с использованием диализной культуры цианобактерий. *Здоровье населения и среда обитания*, (2), 299.
11. Babič, M., Gunde-Cimerman, N., Vargha, M., Tischner, Z., Magyar, D., Veríssimo, C., Brandão, J. (2017). Fungal Contaminants in Drinking Water Regulation? A Tale of Ecology, Exposure, Purification and Clinical Relevance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 636.
12. Sholiak, K., Hnatush, S., Peretyatko, T., & Gudz, S. (2013). Microbiocenoses of Lviv sewage at various stages of purification. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 4(2), 76–80.

## РОЗДІЛ 5. ЧУТЛИВІСТЬ МІКРОБНИХ ПОПУЛЯЦІ ВОДОЙМИ ДО АНТИБІОТИКІВ

### 5.1. Чутливість умовно–патогенних мікроорганізмів річки Уж до антибіотиків

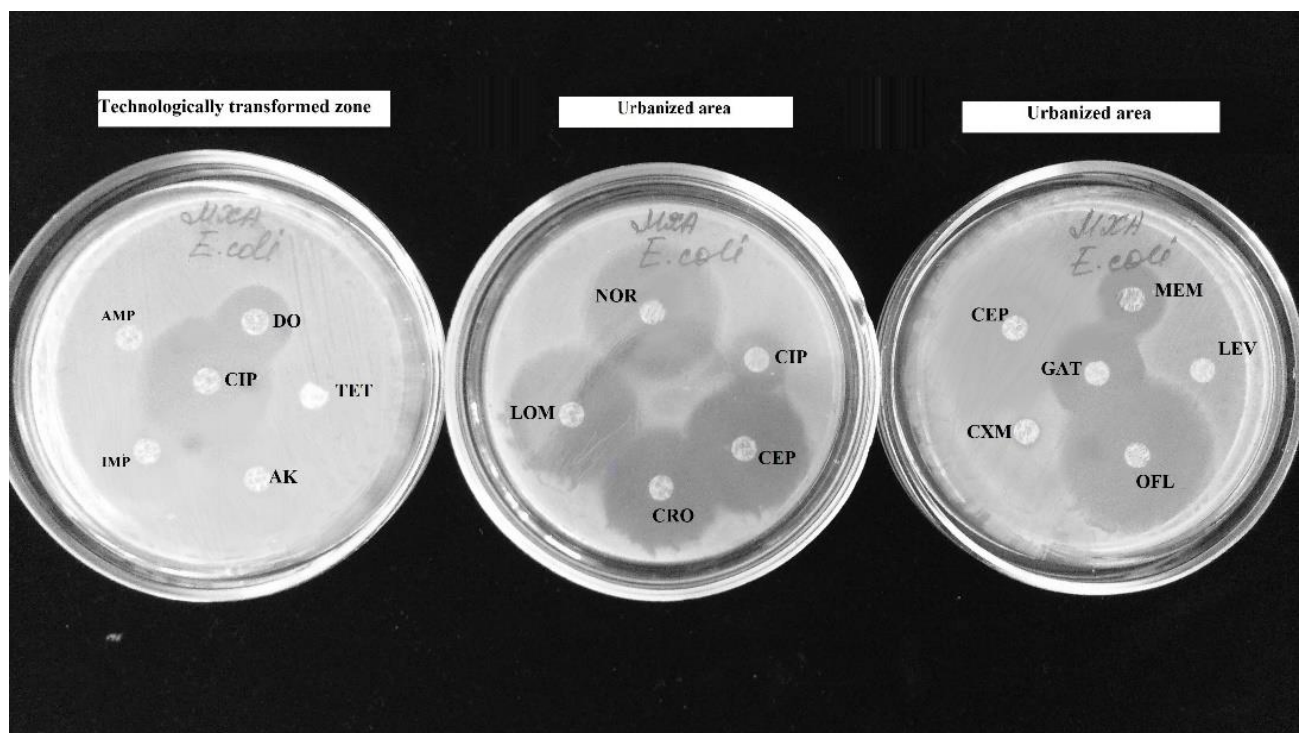
Швидкі темпи розвитку резистентності до протимікробних препаратів наблизили людство до початку постантибіотичної ери. За проведеним аналізом у 76 країнах споживання антибіотиків протягом 2000–2015 років зросло на 36 % [8], сучасні тенденції під впливом пандемії коронавірусної інфекції COVID–19 тільки посилюють розвиток антибіотикостійкості та підвищують поріг резистентності до препаратів останньої лінії захисту [11].

Причиною виникнення резистентності збудників до антибіотиків є не лише їхнє нераціональне використання, але значна кількість досліджених даних щодо особливостей життєвого циклу мікроорганізмів, їхніх структурних і фізіологічних особливостей, здатності до контактного та дистанційного спілкування, взаємозв'язків з макроорганізмом. Численні дослідження свідчать що основну небезпеку інфекційних захворювань з важким перебігом (62%) викликають грамнегативні мікроорганізми [17].

В ході роботи із зразків води річки Уж було виділено мікроорганізми, з яких найчисленніша група належала до родини *Enterobacteriaceae*. За останнє десятиріччя представників грамнегативної мікробіоти все більше характеризують як «супербактерії», тобто мікроорганізми, які мають здатність швидко набувати резистентність до антибіотиків та розповсюджувати її [19]. До так званих ESCAPE патогенів відносять наступні штами: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, та *Enterobacter spp* [14, 15], які є первинною ланкою для розвитку інфекцій, що й обумовлює важливість дослідження чутливості до антибіотиків даних штамів за умови їх виділення в природних водоймах.

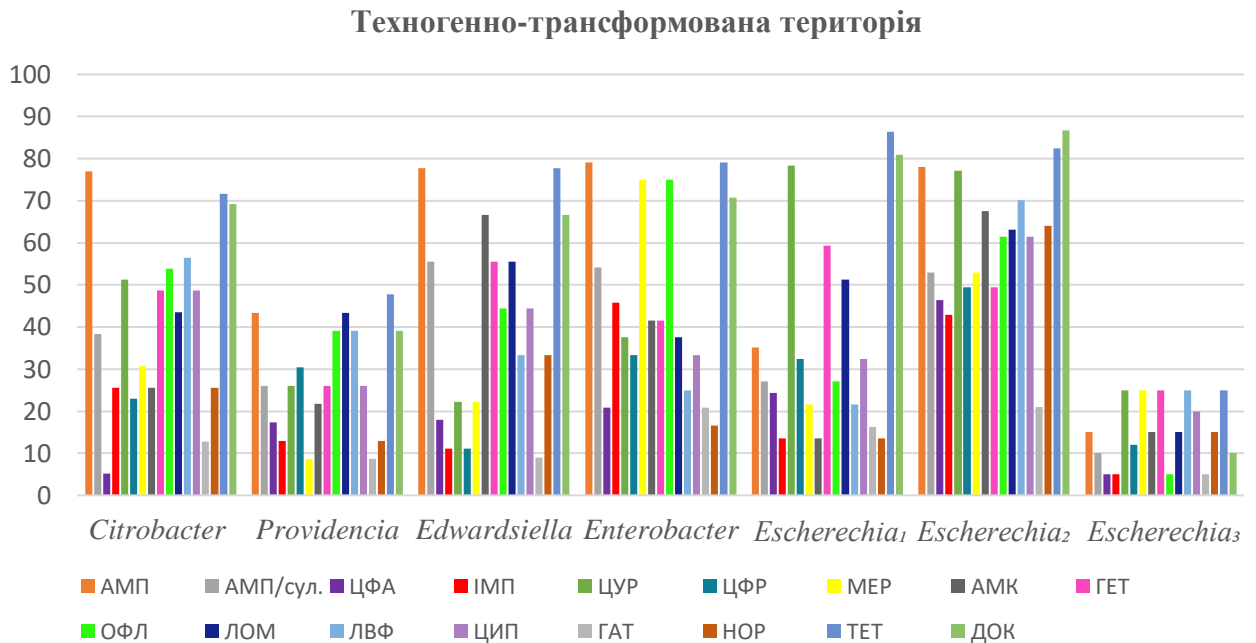
Так, з огляду на потенційну небезпеку грамнегативних мікроорганізмів виділених із зразків води проведено дослідження на чутливість до антибіотиків різних груп.

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  $\beta$ -лактамів та до тетрациклінів. У порівнянні з іншими територіями зростає кількість мультирезистентних форм та стійкість до карбапенемів та «захищених» антибіотиків (ампіцилін сульбактам, цефоперазон сульбактам) (рис.5.1.1).



**Рис.5.1.1** Чутливість *E. coli* до антибіотиків різних груп

Територія за межами заводу забруднена важкими металами та сполуками азоту що може бути основним фактором зростання рівня антибіотикостійкості (рис.5.1.2). Відомо, що високі концентрації важких металів сприяють поширенню та накопиченню генів антибіотикорезистентності [12].



**Рис. 5.1.2** Антибіотикорезистентність мікроорганізмів виділених з техногенно–трансформованої ділянки

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

Нижче за течією річки, в межах міста, спостерігається дещо вищий ступінь чутливості до антибіотиків ніж на антропогенно навантаженій ділянці (рис.5.1.3), проте зберігається тенденція до порівняно високого рівня резистентності до тетрациклінів та пеніцилінів. Цьому найбільше сприяє неконтрольований скид стічних вод у річкову систему. Проте однією з причин може бути й природна резистентність, сформована під дією різних факторів навколишнього середовища [6].

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) (рис.5.1.4).



Урбанізована територія

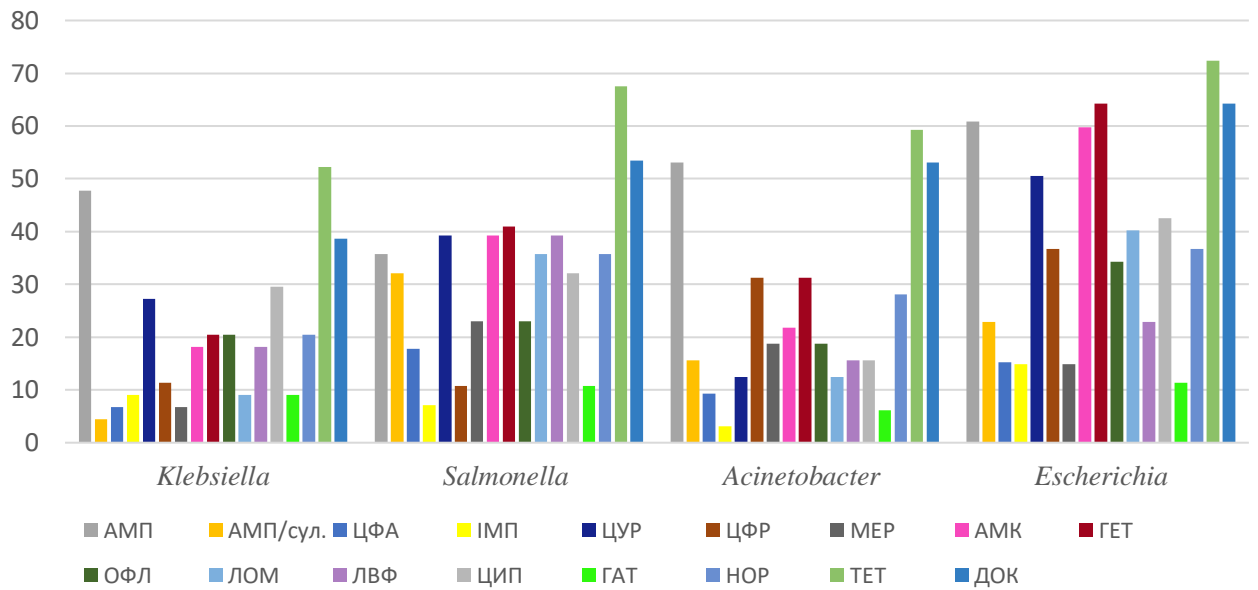


Рис.5.1.3. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів виділених з урбанізованої ділянки

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

Аграрна територія

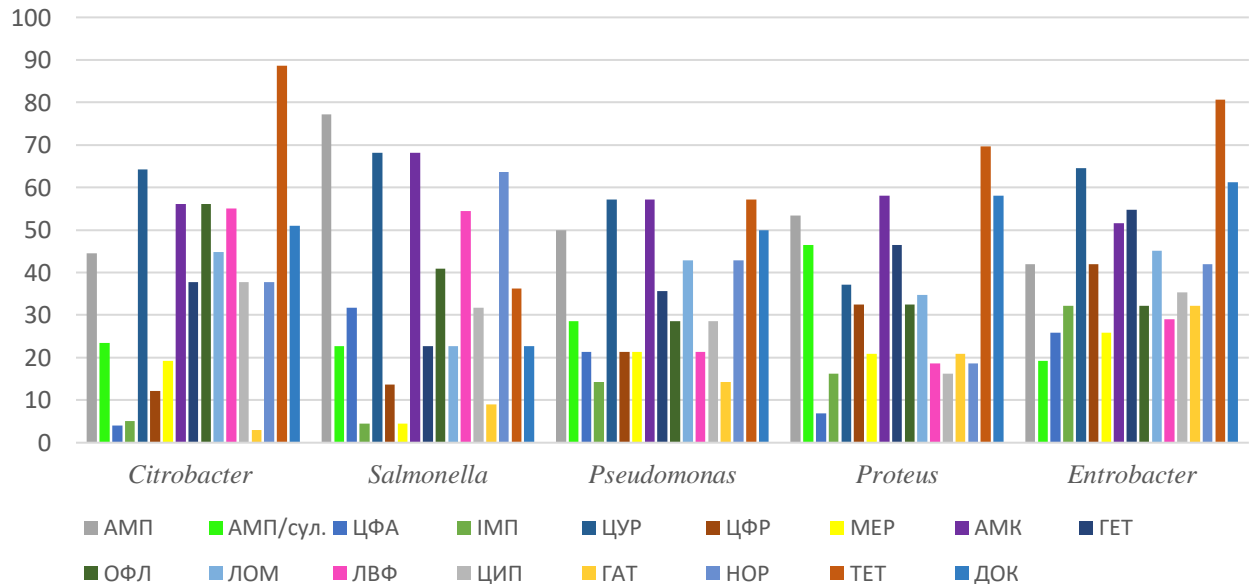


Рис.5.1.4 Антибіотикорезистентність мікроорганізмів виділених з аграрної ділянки

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

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

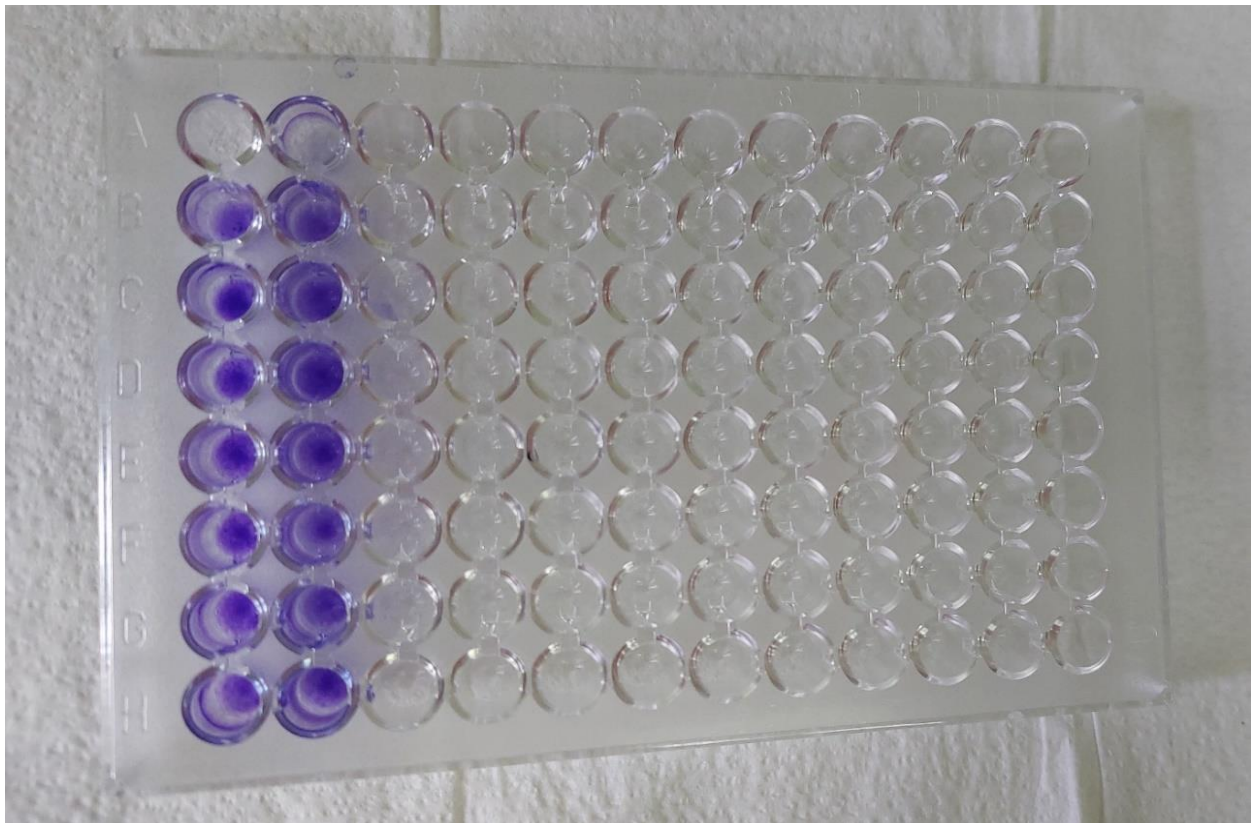
## **5.2 Вивчення здатності до біоплівкоутворення ізолятів роду *Escherichia* виділених із зразків води**

Одним з факторів які сприяють виживанню мікроорганізмів у навколишньому середовищі, а зокрема у поверхневих водах є формування біоплівок. У складі біоплівок можуть існувати, як непатогенні, так і патогенні форми мікроорганізмів, що створює ризики передачі механізмів патогенності та резистентності бактерій до фармацевтичних препаратів.

Біоплівкотвірним мікроорганізмам характерна множинна стійкість до антибіотичних речовин, в свою чергу множинна резистентність може бути одним з чинників подальшого розвитку стійкості до антибіотиків на генетичному рівні.

Резистентні фенотипи у генетично неоднорідній популяції становлять екологічну небезпеку в розповсюдженні мультирезистентних мікроорганізмів у довкіллі [111].

В ході проведення досліджень з визначення чутливості виділених мікроорганізмів зі зразків води встановлено що бактерії роду *Escherichia* характеризувалися резистентністю до двох і більше антибіотиків що спонукало до вивчення їх здатності до утворення біоплівки. Проведені дослідження показали що найбільшу здатність до біоплівкоутворення проявляли штами роду *Escherichia* виділені з техногенно–трансформованої території – 38 ізолятів та урбанізованої місцевості –17 ізолятів. На рисунку 5.2.1 продемонстровано формування біоплівок штамами *E.coli* виділеними на техногенно–трансформованій території (моніторингова ділянка №3).



**Рис. 5.2.1.** Формування біоплівки бактеріями роду *Escherihia*, які ізольовані із зразків поверхневих вод річки Уж на техногенно–трансформованій ділянці (ряд А – негативний контроль; ряд В позитивний контроль штам *S. aureus* ССМ 4223; ряди С–D ізоляти *E.coli* виділені з різних моніторингових точок техногенно–трансформованої т–рії)

За результатами аналізу щільності до біоплівкоутворення встановлено що більшість штамів формували біоплівку високої щільності, тобто з усіх протестованих штамів 28 % (34 ізоляти) було властивим формування щільної біоплівки. Найбільш щільність формування біоплівки була властива ізолятам виділеним з техногенно–трансформованої території 20% (24 ізоляти) (таб. 5.2.1; 5.2.2).

Таблиця 5.2.1

Формування біоплівок бактеріями роду *Escherihia*, які ізольовані із зразків поверхневих вод річки Уж на техногенно–трансформованій ділянці , n=72

Мікроорганізми	Необлівкотвірні	Кількість мікроорганізмів, які формували біоплівку зі щільністю		
		низька	помірна	висока
<i>E.coli</i>	34	2	12	24

Таблиця 5.2.2

Щільність формування біоплівок бактеріями роду *Escherihia*, які ізольовані із зразків поверхневих вод річки Уж на техногенно–трансформованій ділянці , n=72

Мікроорганізми	Щільність утворення біоплівки, в од.опт.густ.		
	низька	помірна	висока
<i>E.coli</i>	1,1 ± 0,04	2,02 ± 0,02	4,01 ± 0,30

Виділені ізоляти з урбанізованої території проявляли менший ступінь біоплівкоутворення та характеризувались нижчою щільністю формування біоплівки (таб.5.2.3; 5.2.4). Така тенденція може бути пов'язана зі ступенем екологічного забруднення моніторингової ділянки, за результатами проведених гідрохімічних досліджень урбанізована територія виявилась менш забрудненою різними типами полютантів в порівнянні з техногенно–трансформованою ділянкою. Високі концентрації забруднювальних речовин створюють несприятливі умови для існування за яких мікроорганізми здатні трансформуватися в різні форми та набувати нових ознак з метою виживання в навколишньому середовищі.

Таблиця 5.2.3

Формування біоплівок бактеріями роду *Escherihia*, які ізольовані із зразків поверхневих вод річки Уж на урбанізованій ділянці, n=50

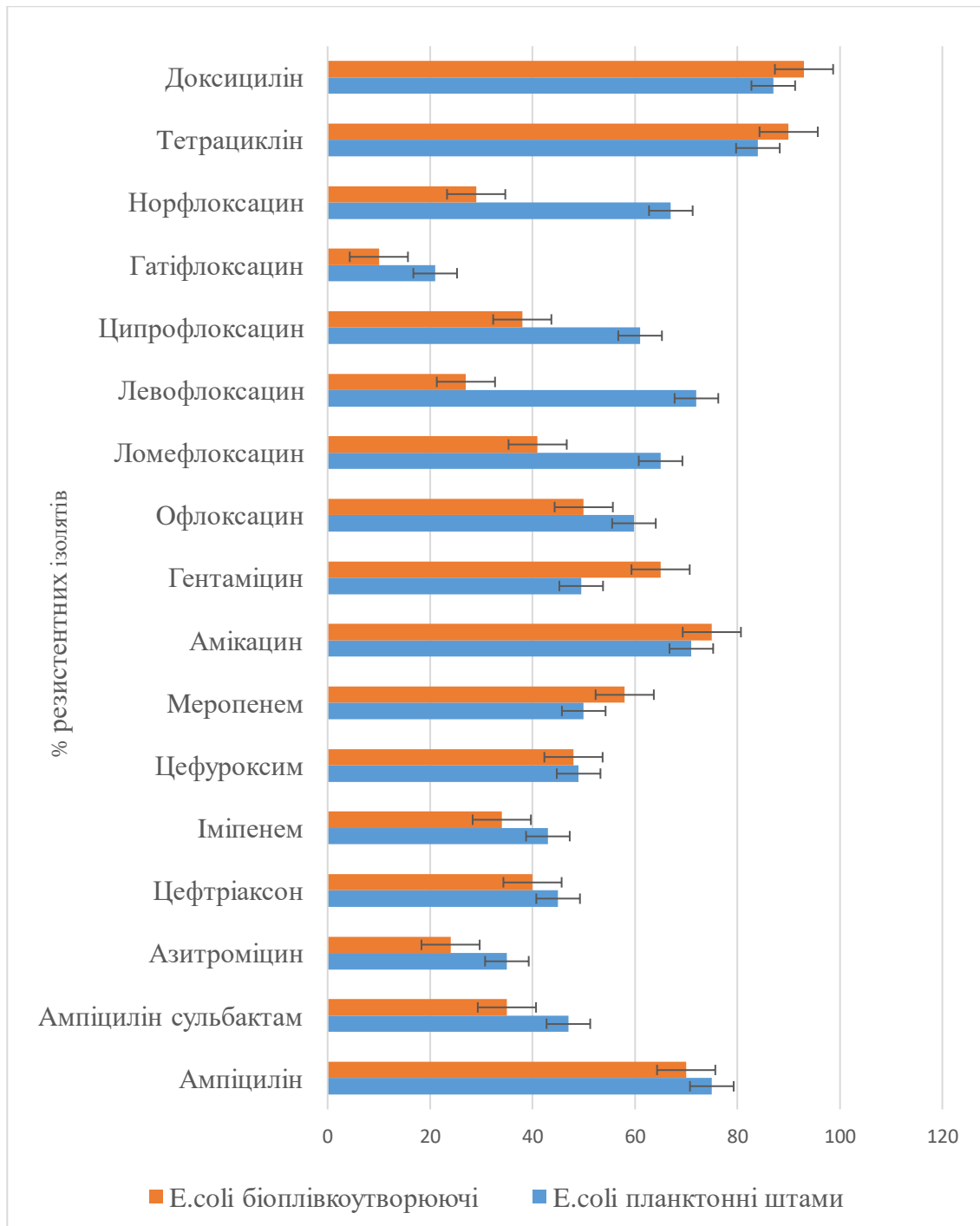
Мікроорганізми	Небіоплівкотвірні	Кількість мікроорганізмів, які формували біоплівку зі щільністю		
		низька	помірна	висока
<i>E.coli</i>	26	2	5	10

Таблиця 5.2.4

Щільність формування біоплівок бактеріями роду *Escherihia*, які ізольовані із зразків поверхневих вод річки Уж на урбанізованій ділянці, n=50

Мікроорганізми	Щільність утворення біоплівки, в од.опт.густ.		
	низька	помірна	висока
<i>E.coli</i>	1,0 ± 0,05	2,8 ± 0,04	4,42 ± 0,16

Виділені ізоляти роду *Escherihia* які проявляли біоплівкотвірні властивості характеризувалися найвищим рівнем резистентності до таких антибіотиків, як ампіцилін, тетрациклін, гентаміцин та доксициклін рис. (5.2.2)

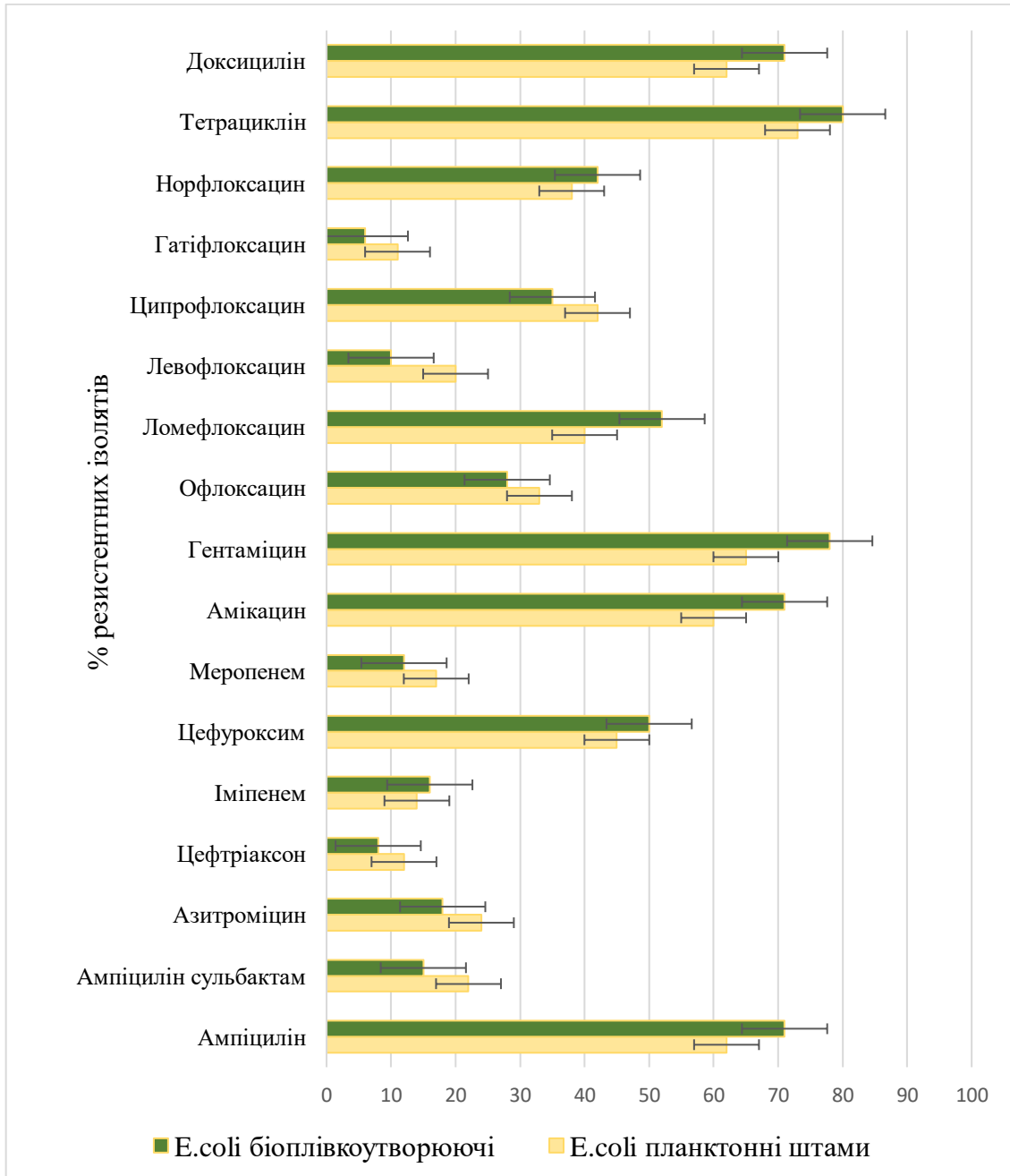


**Рис. 5.2.2** Порівняльна характеристика антибіотикорезистентності планктонних та біоплівкотвірних ізолятів *E.coli* виділених із зразків поверхневих вод річки Уж (техногенно–трансформована ділянка)

Поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів здатних до утворення високоорганізованих спільнот, таких як, біоплівки є надзвичайно небезпечним для довкілля та охорони здоров'я в цілому. Наукові дослідження доводять роль біоплівок

у виникненні інфекційних захворювань, які потребують ретельного підбору антибіотикотерапії й мають високу частоту рецидивів [1].

Для біоплівкотвірних мікроорганізмів виділених в межах урбанізованої території характерна стійкість до доксицикліну, тетрацикліну, гентаміцину, амікацину та ампіциліну (рис.5.2.3).



**Рис. 5.2.3** Порівняльна характеристика антибіотикорезистентності планктонних та біоплівкотвірних ізолятів *E. coli* виділених із зразків поверхневих вод річки Уж (урбанізована ділянка)

Виділені біоплівкотвірні штами мікроорганізмів *E.coli* проявляли найбільшу резистентність до антибіотиків природного походження та аміноглікозидів II покоління. Порівняльний аналіз резистентності планктонних мікроорганізмів показав найбільшу чутливість до фторхінолонів IV покоління та карбапенемів. Аналогічні закономірності виявлені й серед мікроорганізмів здатних утворювати біоплівку. Проведені дослідження вказують на значний рівень розповсюдження мультирезистентних біоплівкотвірних бактерій у водному середовищі.

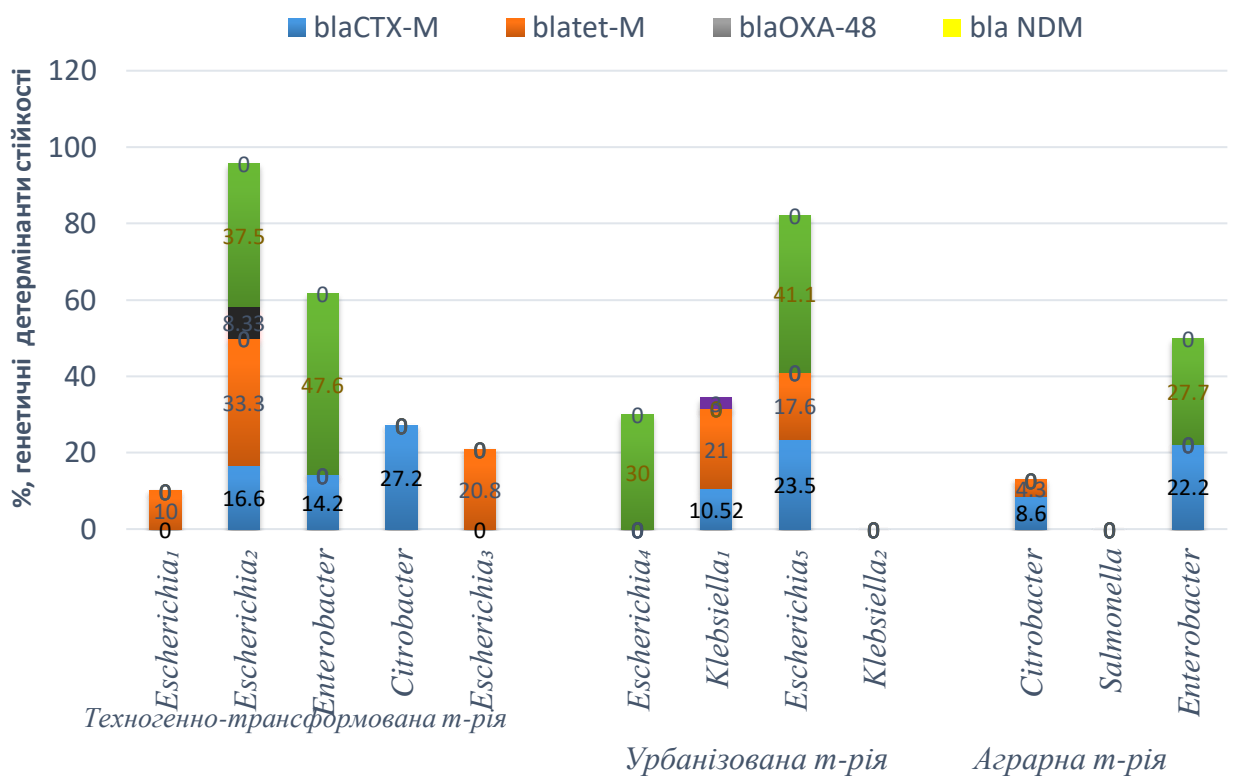
### **5.3. Генотипові детермінанти антибіотикорезистентності мікробних популяцій річки Уж**

Розвиток генетичного антибіотикорезистентного в навколишньому середовищі становить високі ризики зростання рівня антибіотикостійкості в цілому, оскільки відіграє ключову роль в циркуляції генетичних детермінант резистентності. За останні роки проблема розвитку резистентності патогенних мікроорганізмів до основних груп антибактеріальних препаратів переросла з медичної у вагому соціально-економічну. Можливість набуття патогенними мікроорганізмами резистентності до основних груп антибактеріальних препаратів пов'язана зі здатністю бактерій набувати нової генетичної інформації. Основними шляхами запобігання антибіотикорезистентності та її подолання вважають запобігання поширенню антибіотикорезистентних збудників та раціональне застосування антибіотиків. [3].

Для визначення генетичних детермінант стійкості (*bla<sub>tet</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*) були обрані мультирезистентні грамнегативні мікроорганізми, які домінували в мікробіомі досліджуваних територій. У мікроорганізмів виділених в зоні розташування лісохімічного заводу, серед яких переважали представники роду *Escherichia* виявлено наявність генів стійкості до тетрациклінів (*bla<sub>tet</sub>*–33%) та β–лактамаз (*bla<sub>TEM</sub>*–37,5%). Протестовані мікроорганізми виявляли й високий рівень фенотипової стійкості до відповідних груп антибіотиків (рис.5.3.1).



Крім того на цій території були виділені гени кодуєчі карбапенези (*bla*KPC–8,33%), вони рідше зустрічаються в природних середовищах і є більш небезпечними, оскільки провокують поступову появу загальної резистентності до лікарських засобів [2]. Водночас за даними останніх досліджень карбапенем–резистентні гени все частіше зустрічаються на території Європи [13].



**Рис. 5.3.1.** Генетичні детермінанти резистентності виділені в фенотипово стійких штамів на ділянках з різним характером антропогенного навантаження \**Escherichia*<sub>1</sub> –до м. Перечин; *Escherichia*<sub>2</sub>, *Enterobacter*, *Citrobacter*<sub>1</sub> –в межах с.Доморадж, *Escherichia*<sub>3</sub> –за м.Перечин; *Escherichia*<sub>4</sub>, *Klebsiella*<sub>1</sub> –до м.Ужгород; *Escherichia*<sub>5</sub>; *Klebsiella*<sub>2</sub> –за м.Ужгород; *Salmonella*, *Enterobacter* –до с.Сторожниця; *Citrobacter* – за с.Сторожниця.

В межах урбоекосистеми 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 [4]. Ймовірним джерелом генів резистентності в даній місцевості є комунально–побутові стоки, які, як відомо, можуть виступати резервуарами резистентних форм мікроорганізмів та генетичних детермінант стійкості, а також визначальним фактором у формуванні екологічної резистентності. Важливим наслідком значного поширення генів ESBL може стати розвиток різних механізмів резистентності, серед яких і можливість надавати стійкість до карбапенему внаслідок подальших хромосомних мутацій порину [11].

На території що підпадає під вплив агросектору виділено ESBLs, найбільша частка з яких припадає на гени типу *blaCTX–M*, які кодують резистентність до хінолонів. Результати мікробіологічних досліджень також вказують на зростання резистентності до фторхінолонів другого та третього поколінь на даній дослідній ділянці.

У даному дослідженні було виявлено появу більш ніж однієї  $\beta$ –лактамази в одному й тому ж ізоляті, гени *blaTEM* зустрічалися як поодинці так і в комбінації з *blatet*, генами. Це свідчить про еволюціонування мікроорганізмів до стійкості до протимікробних препаратів.

#### **5.4. Розповсюдження генетичних детермінант стійкості в природних водах та джерелах водопостачання**

Розповсюдження генетичних детермінант стійкості у джерелах централізованого та децентралізованого водопостачання становить особливу небезпеку потрапляння генів стійкості в харчовий ланцюг. Через недосконалі технології водопідготовки гени резистентності можуть потрапляти в організм людини разом з питною водою [7].

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 було проведено тестування зразків води з джерел централізованого та децентралізованого водопостачання на наявність генетичних детермінант резистентності. Так, відбір зразків водопровідної проводили з 2-ох моніторингових ділянок в м.Ужгород розташованих в різних частинах міста (48°37'57.3"N 22°17'01.3"E; 48°37'20.0"N 22°15'02.9"E), та 3-ох джерел децентралізованого водопостачання (криниць) розміщених в селі Великий Березний (48°53'07.0"N 22°27'10.0"E), за містом Перечин (48°43'45.8"N 22°26'54.0"E) та в селі Сторожниця (48°36'01.2"N 22°14'19.2"E). Зі зразків води було виділено метагеномну ДНК методами молекулярно-генетичної діагностики та протестовано на наявність генів резистентності до антибіотиків.

Встановлено, що в пробах води з криниці с.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 *bla<sub>tet</sub>*. Наявність генетичних детермінант резистентності в криничній воді могли спровокувати безліч причин, серед яких неналежне санітарне облаштування колодязя, забруднення прилеглих територій, нехтування періодичним знезаражування згідно санітарно вимог або ж неправильне його проведення. Відомо, що метод дезінфекції води з використанням хлору може виконувати роль тригера посилюючи розвиток резистентності до лікарських засобів [10].

В зразках криничної води села Сторожниця виділено гени типу *bla<sub>CTX-M</sub>*, територія на які розташована дана криниця знаходиться густонаселенішому районі в порівнянні з попередніми, а також розміщена з порушенням санітарних вимог, перш за все, не вище течії ґрунтових вод, що зумовлює її періодичне забруднення.

У пробах води відібраних з джерел централізованого водопостачання генетичних детермінант резистентності не виявлено.

Отримані результати доводять значне поширення генетичних детермінант резистентності у питній воді, що використовується для господарсько-побутових потреб.

### 5.5. Визначення взаємозв'язків між рівнем антропогенного навантаження та ступенем антибіотикостійкості мікроорганізмів

Вперше стійкість до протимікробних препаратів була виявлена в клінічних зразках, згодом у ветиренарії та відносно нещодавно у навколишньому природному середовищі. Розвиток стійкості до антибіотиків у природних об'єктах не поступається темпам їх поширення у медичній практиці.

Набуття мікроорганізмами резистентності в об'єктах довкілля супроводжується як природними, так і антропогенними факторами. Наукові дослідження свідчать, що зростання антропогенного навантаження може сприяти не тільки розповсюдженню генів стійкості, а й появі нових [5]. Такі забруднювачі, як важкі метали та миючі засоби, в навколишньому середовищі можуть сприяти горизонтальній передачі генів стійкості до антибіотиків. Досліджуючи вплив субінгібіторних концентрацій Cu (II), Ag (I), Cr (VI) та Zn (II) на бактерії *E.coli* доведено, що вони сприяли перенесенню генів стійкості шляхом кон'югації до антибіотиків між штамми кишкової палички [20].

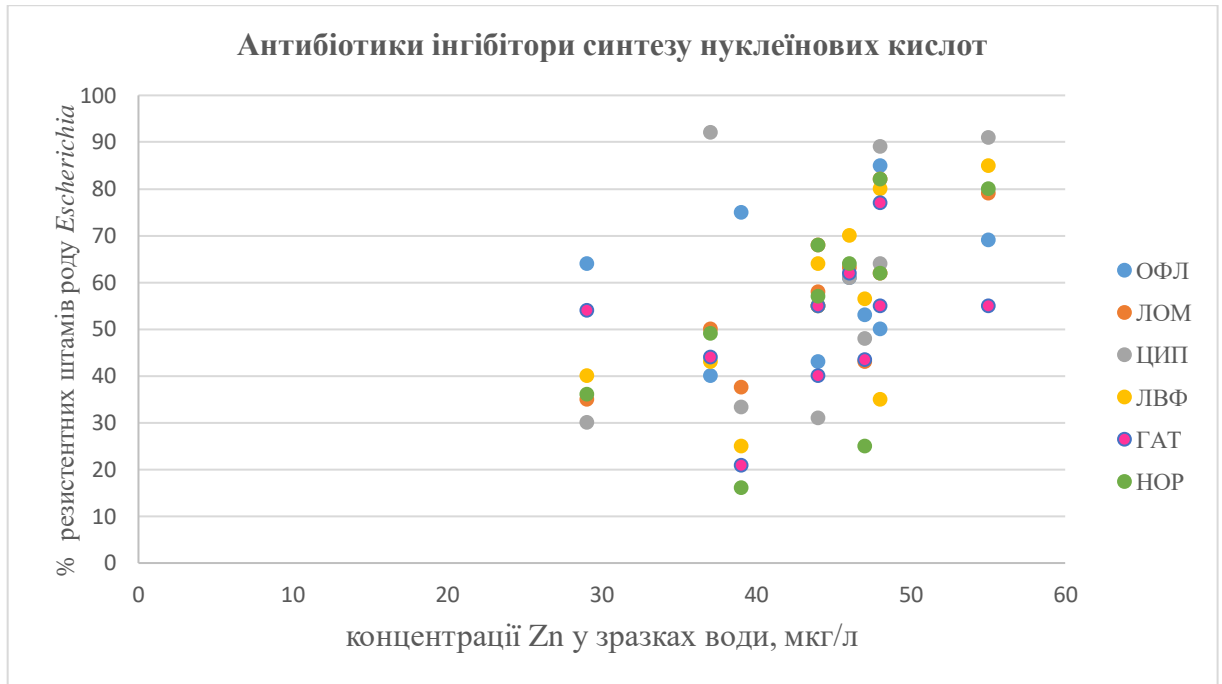
Тож на основі отриманих нами результатів гідрохімічних та мікробіологічних досліджень якості води проведено аналіз взаємозв'язків між концентраціями важких металів (Cu, Ni, Zn, Cr), сполук азоту ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  та  $\text{NH}_4$ ) та ступенем антибіотикорезистентності мікроорганізмів, виділених з поверхневих вод річки Уж. Наявність взаємозалежностей визначали за допомогою лінійного коефіцієнту кореляції Пірсона ( $r$ ). Для визначення зв'язку між показниками хімічного забруднення та ступенем антибіотикорезистентності мікроорганізмів, обрано домінантні групи мікроорганізмів виділених 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).

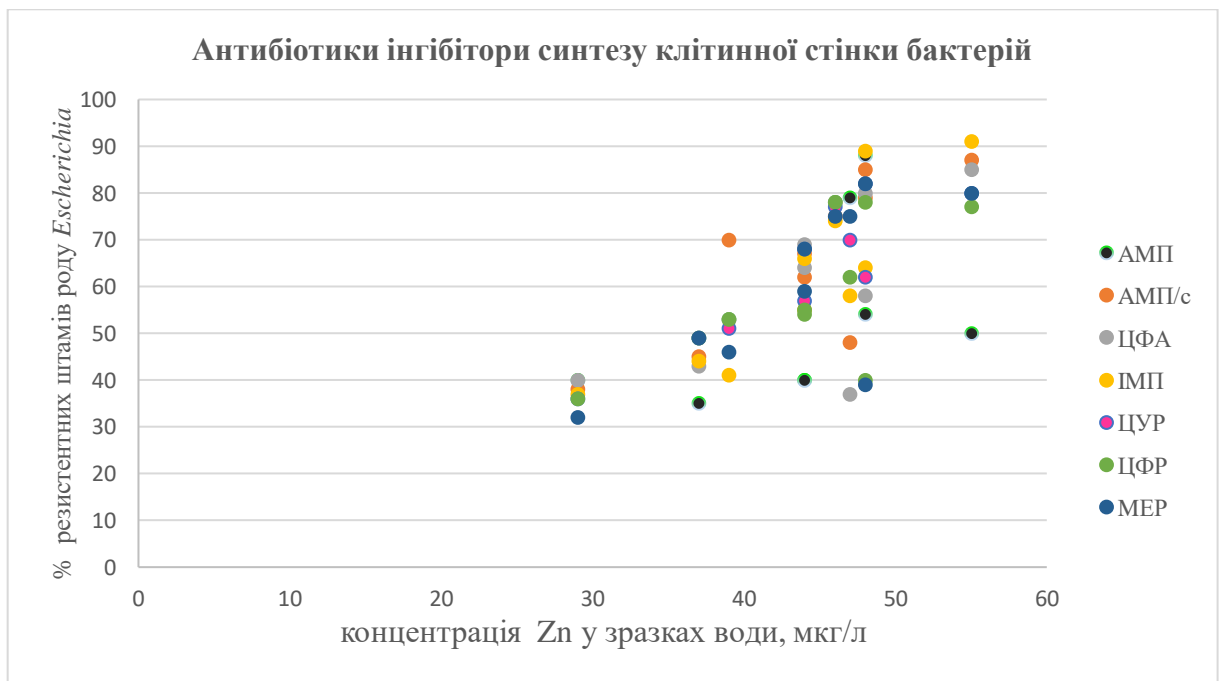
Для проведення аналізу обрано ділянки, які підпадали під найбільший антропогенний вплив: техногенно–трансформована – (100 м від впадіння струмка Доморадж, знаходиться в межах міста Перечин, де розміщений Перечинський лісохімічний комбінат, (48°43'37.1" N, 22°28'42.1" E).; урбанізована – (територія за містом Ужгород, (48°37'10.2" N, 22°15'26.4" E)) та аграрна (розташована в кінці села Сторожниця, де зосереджена значна кількість сільськогосподарських угідь і фермерських господарств, (48°36'11.7" N, 22°12'18.3" E)).

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. 5.5.1) та інгібіторами синтезу клітинної стінки бактерій (рис.5.5.2).

Можна припустити що катіони Zn впливають на активність РНК–полімерази, заміщуючи іони мангану в активному центрі ферменту, у такий спосіб впливаючи на рівень транскрипції генів бактеріальної клітини у разі надлишку цих іонів [18]. Так, культивування *E.coli* в хіміостатах на середовищах з низьким вмістом неорганічного фосфату, сприяло максимальній біодоступності цинку та з додаванням підвищених концентрацій цинку дало змогу визначити вплив цинку на регуляцію експресії 64 генів у відповідь на стресову реакцію, серед яких були й оперони, відповідальні за формування антибіотикостійкості [9].



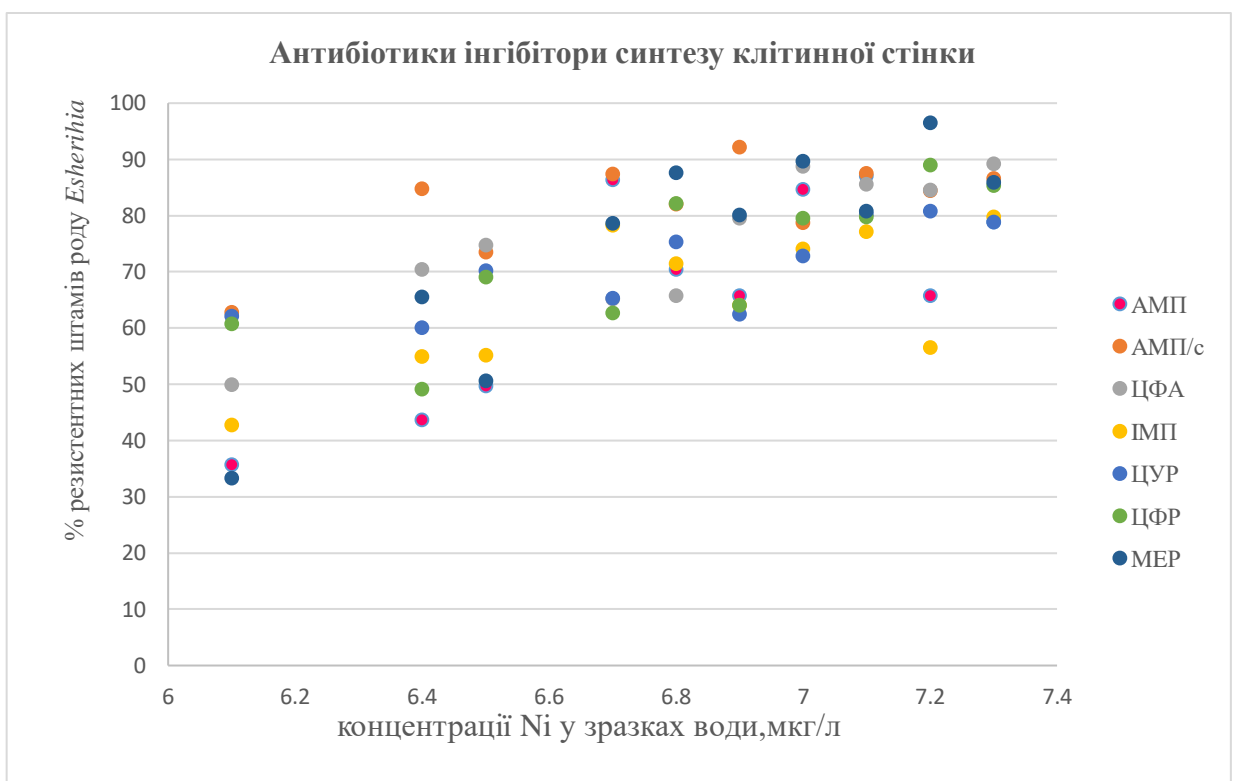
**Рис. 5.5.1.** Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Zn та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот (техногенно–трансформована територія); (n=10;  $p < 0,05$ ).



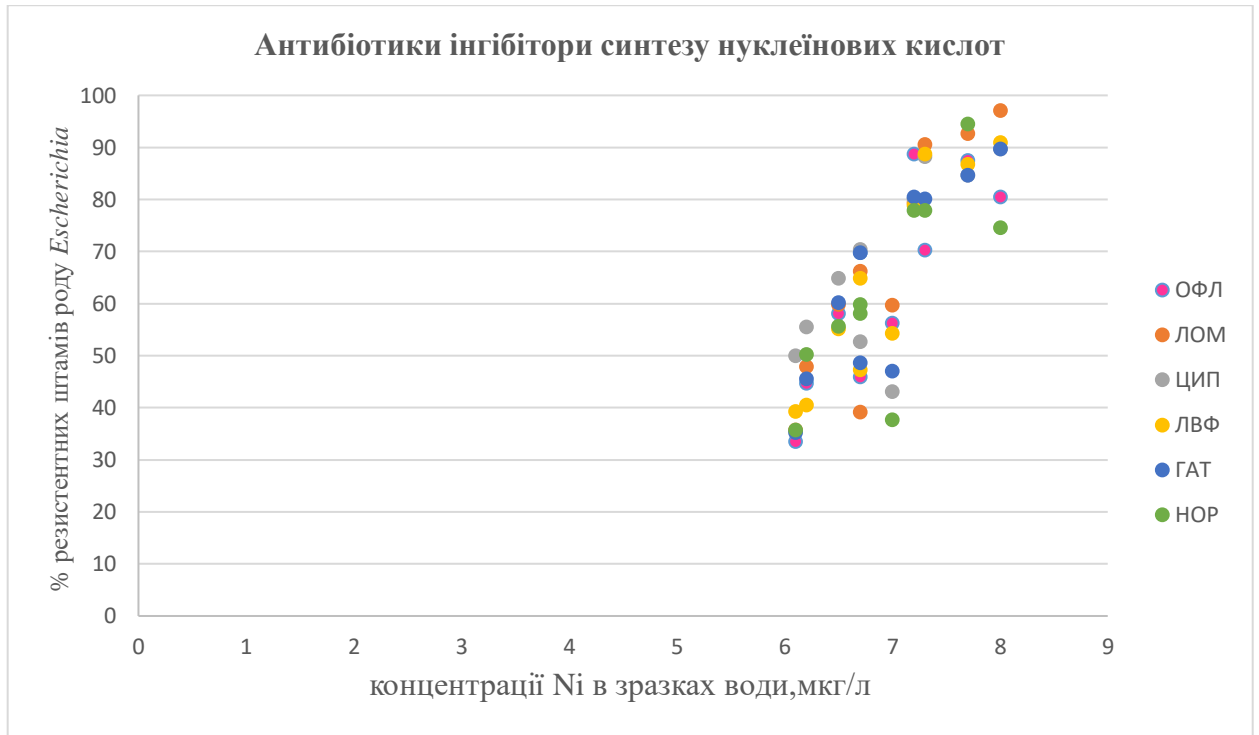
**Рис. 5.5.2.** Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Zn та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій, (техногенно–трансформована ділянка); (n=10;  $p < 0,05$ )

Виявлено слабкий зв'язок з Ni на досліджуваних територіях, крім урбанізованої ділянки, де концентрації Ni тісно корелюють з показниками резистентності до антибіотиків які інгібують синтез бактеріальної стінки (рис.5.5.3) та нуклеїнових кислот бактерій (рис. 5.5.4).

Підвищені концентрації нікелю активують адаптаційні механізми в бактерій, до прикладу в бактерій *E.coli* сприяють утворенню біоплівки, що формується внаслідок індукції транскрипції відповідних генів [16]. Однак виявлено і негативну кореляцію, відносно Cu, Cr та Pb, що може бути наслідком як безпосереднього впливу так і комплексної взаємодії в гідроекосистемі.



**Рис.5.5.3** Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Ni та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій, (урбанізована ділянка); (n=10; p<0,05)

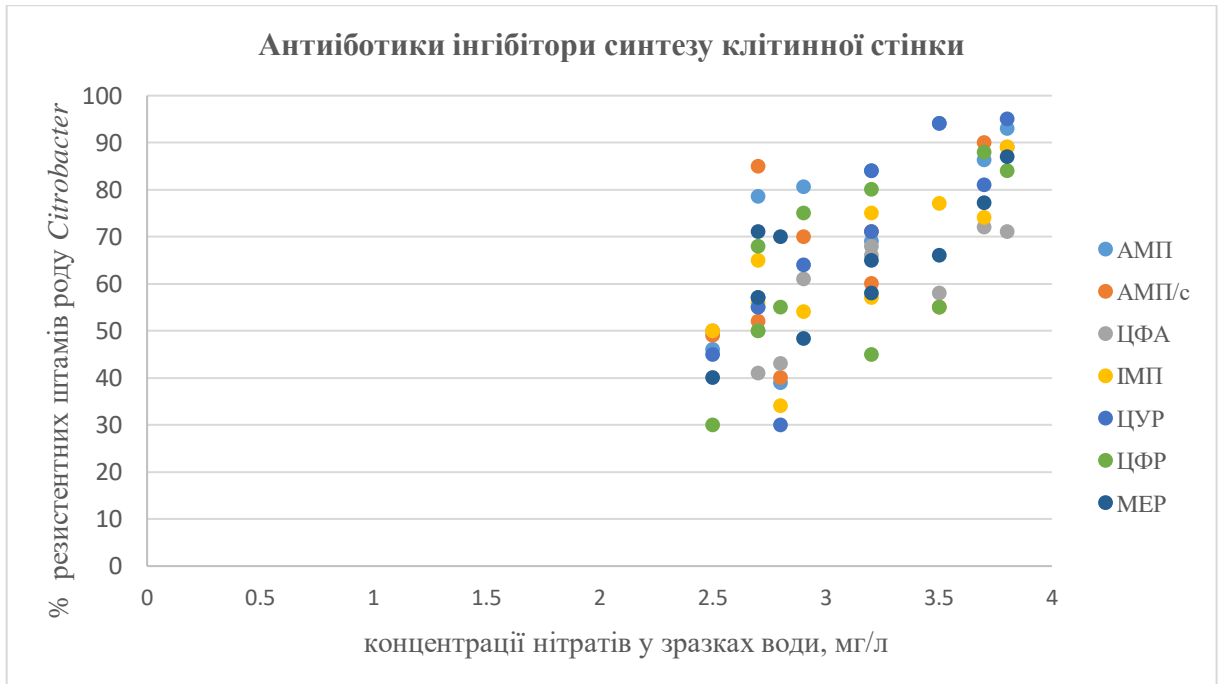


**Рис.5.5.4** Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Ni та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот бактерій, (урбанізована ділянка); (n=10; p<0,05)

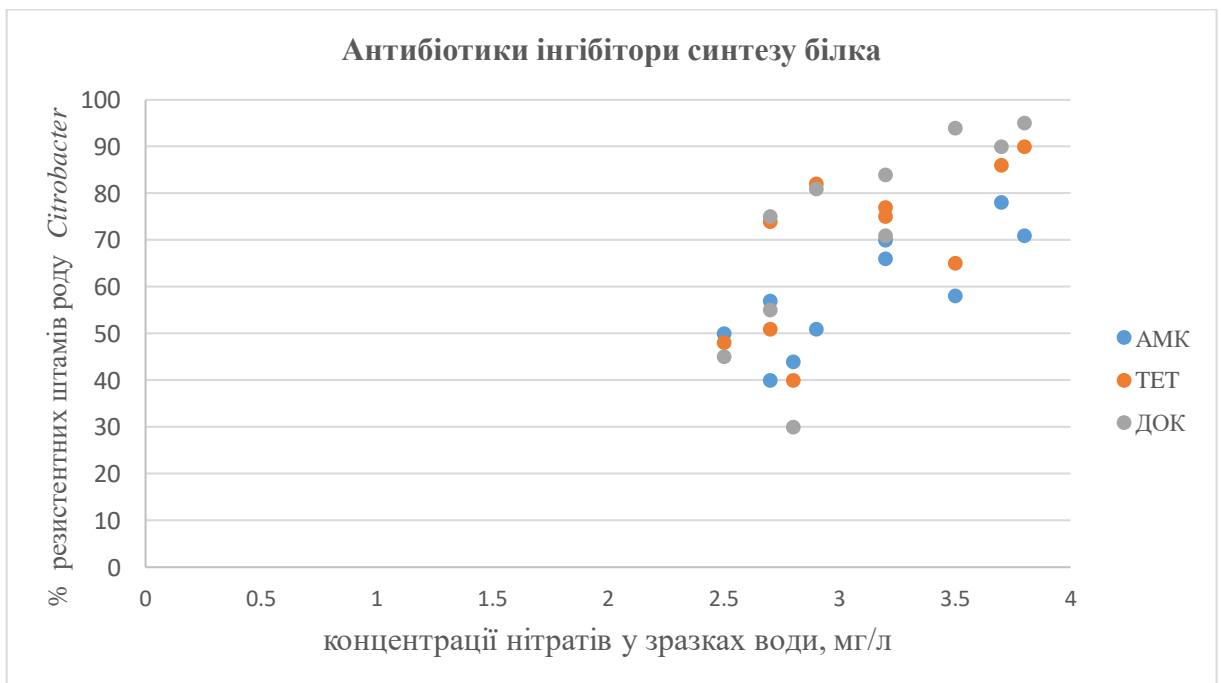
Серед досліджених показників сполук нітрогену (нітрати, нітрити, нітрогену амонійного) виявлено високі кореляційні зв'язки між концентраціями нітратів і ступенем антибіотикорезистентності досліджуваних мікроорганізмів на урбанізованих та аграрній території.

Значні зв'язки спостерігали на аграрній ділянці між концентраціями нітритів, азоту амонійного й штамів, стійких до антибіотиків інгібіторів синтезу бактеріальної стінки (рис.5.5.5) та інгібіторів синтезу білка (рис.5.5.6). За результатами наших досліджень на даній ділянці водойми фіксували найвищі концентрації сполук азоту.





**Рис.5.5.5.** Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями нітрат-іонів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій, (аграрна ділянка); (n=10; p<0,05)



**Рис.5.5.6.** Кореляційні взаємозв'язки між концентраціями нітрат-іонів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу білка; (аграрна ділянка); (n=10; p<0,05)

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

### **Висновки до розділу:**

1. За результатами дослідження представники родини *Enterobacteriaceae* виділені із зразків води проявили значну стійкість до антибіотиків природного походження, таких як тетрациклін, ампіцилін та гентаміцин, чутливими ізоляти виявилися до карбапенемів (іміпенем, карбапенем) та цефалоспоринів третього покоління (цефтріаксон).
2. Мікроорганізми води річки Уж виділені в районі антропогенно–навантаженої території проявляли найбільшу стійкість до антибіотиків та вирізнялися збільшенням мультирезистентних штамів, що свідчить про зміни антибіотикорезистентності під впливом несприятливих умов зумовлених забрудненням даної території.
3. Вивчення здатності виділених мікроорганізмів роду *Escherichia* до біоплівкоутворення показало високий рівень поширення біоплівкотвірних мікроорганізмів резистентних до широкого спектра антибіотиків у природному середовищі. З техногенно–трансформованої ділянки виділено 38 біоплівкотвірних ізолятів (52%) та урбанізованої місцевості –17 ізолятів (34%).
4. Встановлено генотипову стійкість до антибіотиків серед штамів домінантного мікробіому водойми, мікроорганізми виділені в районі лісохімічного заводу є носіями генів резистентності типу *bla<sub>tet</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* та *bla<sub>KPC</sub>*, штами виділені в межах урбоєкосистеми та агросектору несуть стійкість до *ESBLs*, таких як *bla<sub>TEM</sub>* та *bla<sub>CTX-M</sub>*.
5. За результатами молекулярно–генетичного аналізу встановлено наявність генетичних детермінант стійкості в зразках метагеномної ДНК виділеної з

води криниці с.Сторожниця – *blaCTX-M* та м.Перечин – *bla<sub>TEM</sub>*. В зразках води централізованого постачання м.Ужгород генів стійкості не виявлено.

- б. Встановлено кореляційні взаємозв'язки між зростанням концентрації важких металів (Zn, Ni), сполук азот (нітрат-іони) й збільшенням ступеня антибіотикорезистентності мікроорганізмів водойми, що свідчить про безпосередній вплив токсикантів на розвиток стійкості до лікарських препаратів.

*Основні публікації дисертанта за матеріалами розділу:*

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).

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 (Warsaw, Poland: 1960), 75(4 pt 2), 987–992.*

Savenko M.V., Kryvtsova M.V., Hanych T.T. (2022). Phenotypic and genotypic characterization of microorganisms in the human–drinking water system. IV International Scientific Conference: Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century, Kyiv, September 22–23, 2022, 48.

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 біології, медицини та спорту.* 6; 3 (31), 232–237.

Savenko M.V., Kryvtsova M.V. (2021). Urban aquatic ecosystems as a factor of the spread of antibiotic resistant microorganisms and resistance genes. *Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res.* (23)3, 1–12.

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, Afyon, 26–28 february 2021, 395.

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: I Міжнародної науково–технічна конференція: тези доповідей, Тернопіль, 20–21 травня 2021 р., 72–73.

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.

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.

Білкей М.В., Кривцова М.В. (2018). Поширення антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів у природних водах. «Раціональне використання антибіотиків», I Міжнародний конгрес "Antibiotic resistance STOP!": тези доповідей, Київ, 15–16 листопада 2018 р., 30–32.

Білкей М.В., Кривцова М.В., Співак М.Я. (2018). Циркуляція антибіотикорезистентних штамів у системі «людина–водне середовище». Науково–практична конференція «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, профілактика. біологічна безпека», Київ, 11–12 жовтня, 27–28.

**Перелік посилань:**

1. Мальцев, С.В., Мансурова С.В., Мансурова Г.Ш. (2011). Что такое биопленка? /Практическая медицина, №53, 7–10.
2. Adegoke, A.A., Fatunla, O.K. & Okoh, A.I. (2020). Critical threat associated with carbapenem-resistant gram-negative bacteria: prioritizing water matrices in addressing total antibiotic resistance. *Ann Microbiol* 70, 43.
3. Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 42(1), fux053.
4. Brolund, A., & Sandegren, L. (2016). Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infectious diseases (London, England)*, 48(1), 18–25.
5. Bueno, I., Williams-Nguyen, J., Hwang, H., Sargeant, J. M., Nault, A. J., & Singer, R. S. (2017). Impact of point sources on antibiotic resistance genes in the natural environment: a systematic review of the evidence. *Animal health research reviews*, 18(2), 112–127.
6. Finley R. L., Collignon P., Larsson D. J., McEwen S. A., Li X. Z., Gaze W. H., Topp E., 2013 – The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical infectious diseases*, 57(5): 704–710.
7. Gu, X., Zhai, H., & Cheng, S. (2021). Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes in home water purification systems. *Water research*, 190, 116762.
8. Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), E3463–E3470.

9. Lee L.J., Barrett J.A., Poole R.K. (2005). Genome–Wide Transcriptional response of chemostat–cultured *Escherichia Coli* to zinc. *Journal of Bacteriology*, 187.3: 1124 – 1134.
10. Liu, S. S., Qu, H. M., Yang, D., Hu, H., Liu, W. L., Qiu, Z. G., Hou, A. M., Guo, J., Li, J. W., Shen, Z. Q., & Jin, M. (2018). Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full–scale wastewater treatment plant. *Water research*, 136, 131–136.
11. Lutgring, J. D., & Limbago, B. M. (2016). The Problem of Carbapenemase–Producing–Carbapenem–Resistant–Enterobacteriaceae Detection. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), 529–534
12. Martins, V. V., Zanetti, M. O., Pitondo–Silva, A., & Stehling, E. G. (2014). Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environmental science and pollution research international*, 21(9), 5873–5878.
13. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase–producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, 17(10), 1791–1798.
14. Rice L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*, 197(8), 1079–1081.
15. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067.
16. Sheng H., Xue Y., Zhao W., Hovde C.J., Minnich S.A. (2020). *Escherichia Coli* O157:H7 curli fimbriae promotes biofilm formation, epithelial cell invasion, and persistence in cattle. *Microorganisms*, 8.4: 580.
17. Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Epic II Group of Investigators. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*, 302(21), 2323–2329, (49), 992–993.
18. Waldron K.J., Robinson N.J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol.*, 7(1): 25–35.

19. 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>  
(дата звернення: 07.05.2021)
20. Zhang, Y., Gu, A. Z., Cen, T., Li, X., He, M., Li, D., Chen, J. (2018). Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 237, 74–82.

## ВИСНОВКИ

1) В зразках води річки Уж виявлені підвищені концентрації важких металів, які значно перевищують допустимі норми ГДК<sub>риб</sub> (Cu у 10 разів, Cr в 7,5 раза, Zn у 4,8 раза) в межах техногенно–трансформованої території, на рівнинній частині (урбанізована й аграрна території), встановлений підвищений вміст Cu, V та As. У донних відкладах техногенно–трансформованої ділянки відмічається зростання концентрацій важких металів у порівнянні з фоновими значеннями: Cr у 18,8 разів 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 рази.

2) Найвищий вміст сполук азоту у зразках води встановлений на аграрній та техногенно-трансформованій ділянці; максимальні концентрації політантів виявлені у 2018 році, з перевищенням нітритів ГДК<sub>риб</sub> у 13,7 разів (ділянка №3), азоту амонійного у 26,8 разів (ділянка №3), в той час, як нітрати не перевищували ГДК<sub>риб</sub> й були більше фонових показників у 42 рази (ділянка №8). У зразках води феноли загальні та формальдегід знаходились в 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 зустрічалися 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 навесні 2016 року та у 82,1 рази 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 з 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 доміантними 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 у виділених мультирезистентних мікроорганізмів роду *Escherichia* здатність формування біоплівки (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 доміантних полі– та мультирезистентних мікроорганізмів виявлено генетичні детермінанти стійкості *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX–M</sub> та *blatet–M*. Досліджувані ізоляти виділені з екологічного напружених ділянок водойми. У воді децентралізованого водопостачання міста Ужгород та Ужгородського району виявлено генетичні детермінанти стійкості *bla*<sub>CTX–M</sub> та *blatet–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 (NO<sub>3</sub>) та зростанням резистентності до антибіотиків різних груп. Розроблено рекомендації щодо розширення спектра гігієнічного моніторингу якості питної води з 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 навколишньому середовищі доцільно проводити дослідження на чутливість антибіотичних препаратів мікроорганізмів виділених в 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.

## ДОДАТОК

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор

Ужгородської філії ДУ  
"Закарпатський обласний центр  
контролю та профілактики хвороб  
Міністерства охорони здоров'я України"



Пшеничний О.Г.

2021р.

## АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції, що підлягає впровадженню:** Спосіб визначення санітарно-екологічного стану гідроекосистем з використанням показника антибіотикорезистентності, як індикатора антропогенного навантаження.
2. **Ким та коли впроваджений:** кафедра генетики, фізіології рослин і мікробіології ДВНЗ «Ужгородський національний університет», асп.Савенко М.В.
3. **Джерело інформації:**
  1. Savenko M.V., Kryvtsova M.V. (2021). Urban aquatic ecosystems as a factor of the spread of antibiotic resistant microorganisms and resistance genes. *Transylv. Rev. Syst. Ecol. Res.* (23)3, 1-12.
  2. Savenko M.V., Kryvtsova M.V. (2020). Anthropogenic impact on the development of resistance to antibiotics in microorganisms of the Uzh river (Ukraine). *Biol.Stud.*, 14(3),79-90.
4. **Установа, яка проводить впровадження:** Ужгородська філія ДУ "Закарпатський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України»
5. **Термін впровадження:** липень 2021- продовжує впроваджуватися
6. **Форма впровадження:** Результати досліджень мікробіологічних показників поверхневих вод водних екосистем Закарпатської області враховані та впроваджені в моніторингові дослідження : Ужгородської філії ДУ "Закарпатський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України»

в.о. Зав.мікробіологічної лабораторії

Федурця О.І.