



Голові спеціалізованої вченої ради Д 08.031.04

із захисту дисертацій на здобуття
наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.16 «Екологія»
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара,
доктору біологічних наук, професору,
Пахомову Олександрову Євгенійовичу

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора біологічних наук, професора,
професора кафедри загальної медицини з курсом фізичної терапії
Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара

Воронкової Ольги Сергіївни

на дисертацію Савенко Маріанни Вікторівни

на тему: «Антропогенне навантаження на мікробіоту водних екосистем в
умовах Закарпаття»,

подану до захисту на здобуття ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.16 Екологія

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження

Сучасне антропогенне навантаження на екосистеми стає все більш різноманітним та більш впливовим у плані згубної дії на стан довкілля та його мешканців і підвищує ризики негативних змін пов'язаних об'єктів. Ще донедавна антропогенне навантаження переважно охоплювало питання забруднення органікою та пластиком, важкими металами, накопичення сміття на звалищах, надмірний тепловий вплив. Цими проблемами активно займалися та шукали рішення, хоча впровадження заходів захисту довкілля й досі залишається відкритим питанням. На жаль, ці проблеми і зараз є актуальними і потребують контролю.

На додачу до перелічених факторів забруднення довкілля у останнє десятиріччя також гостро постала проблема поширення антибіотикорезистентності. Від початку ця проблема стосувалася медичних закладів і циркуляції всередині них стійких до антибіотиків штамів збудників хвороб. Поступово відбувся вихід резистентних штамів у зовнішній світ та стрімке поширення їх у довкіллі. Абсолютно всі люди є носіями мікроорганізмів і ця мікробна біота дуже гетерогенна. Більшість штамів є безпечними для організму, але трапляються і такі, що становлять ризики для здоров'я людини. Зокрема, практично у кожного можна знайти штами, що стійкі як мінімум до одного-двох антибіотиків і навіть більше. Бактерії у більшості не прив'язані жорстко до організму людини і можуть переходити у довкілля, виносячи із собою гени резистентності. Через стічні води вони потрапляють у гідробіоценози, де здатні опосередковувати поширення цих генів. Ще одним фактором ризику цих процесів є використання антибіотиків у тваринницькому комплексі сільського господарства, звідки гени резистентності також можуть поширюватися у довкілля. Обмін такими генами між мікроорганізмами є достатньо ефективним і дуже швидко природні популяції стають стійкими до антибіотиків, що потенційно може сприяти подальшому поширенню генів та формуванню нових стійких штамів, які надалі можуть інтегруватися до складу мікробіоти людини при вживанні контамінованих продуктів. Отже, цикл поширення антибіотикорезистентності замикається.

Зважаючи на це, тема антропогенного навантаження на мікробіоту водних екосистем є дуже актуальною і вимагає постійного моніторингу та широкого вивчення з метою розробки та впровадження дієвих заходів профілактики забруднення довкілля та боротьби з тим забрудненням, що вже має місце.

Зв'язок наукової роботи з науковими 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» (номер державної реєстрації 0115U003902, 2014-2019 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Формулювання мети та постановка задач є відповідними темі дисертаційного дослідження. Для вирішення поставлених задач обрані сучасні адекватні методи, інформативність яких дозволяє отримати повноцінні та достовірні результати. У роботі представлено широкий спектр польових та лабораторних методів дослідження, комплексне застосування яких забезпечує повноту та високий рівень надійності результатів. Зокрема, це методи відбору зразків, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, спектрофотометричні, фотометричні, фотоколориметричні, мас-спектрометричні методи. Використані статистичні методи підтверджують достовірність отриманих результатів.

Отримані результати мають наукову новизну та конкретне практичне значення, можуть бути рекомендовані до впровадження у санітарно-бактеріологічні дослідження з оцінки стану забруднення довкілля.

Всі висунуті на захист наукові положення та практичні рекомендації є обґрунтованими, висновки добре аргументовані та походять з суті проведених досліджень.

Структура дисертаційної роботи

Дисертаційну роботу викладено на 147 сторінках тексту, вона містить 8 таблиць та 56 рисунків. Текстова частина роботи включає розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи» та 3 розділи результатів власних досліджень, а також «Аналіз та узагальнення результатів» і «Висновки». Список використаної літератури включає 220 джерел, у тому числі 130 іноземних.

У розділі «Вступ» описані ключові позиції дисертаційної роботи, окреслено актуальність питання, представлено дані про взаємозв'язок з програмами та

темами наукових досліджень, є мета та завдання роботи, коротко подано основні тези про новизну та практичне значення отриманих результатів. Наводиться інформація про апробацію роботи та особистий внесок здобувача.

В Огляді літератури представлено відомості, пов'язані з темою дослідження, що дозволяє сформуванню уявлення про сучасний стан вивчення питання та визначити відкриті для досліджень напрями. Зокрема, наведено дані про основні чинники забруднення гідроекосистем та їх вплив на зміну мікробіоти води. Аналіз стану водних ресурсів досліджуваного регіону (Закарпаття) та загальні дані по різних регіонах України є ґрунтовними та дозволяють сформуванню чіткого уявлення про поточний стан проблеми. Інформація актуальна. Її представлення здійснено у логічній послідовності, що дозволяє вповні оцінити стан питання. Значна увага також приділяється аналізу відомостей про мікробне забруднення водою та його наслідки, що напряду пов'язано з досліджуваними здобувачем питаннями. Окремо розглядається роль водного середовища у збільшенні ризиків поширення антибіотикорезистентності, що, зокрема, пов'язано зі здатністю мікроорганізмів до утворення біоплівки.

Розділ 2 присвячений опису методів дослідження. Він містить детальний опис об'єктів досліджень та всіх застосованих методів, зокрема наведено інформацію про точки відбору зразків для дослідження та надана їх вичерпна характеристика. Окремо описані методи визначення гідрохімічних показників, які свідчать про рівень якості води. Зокрема, наведені методики для визначення концентрацій сполук азоту, фенолів загальних та формальдегіду. Методи бактеріологічного аналізу та визначення чутливості до антибіотиків описані повно, що дозволяє відтворення експерименту. Для статистичної обробки даних обрані коректні методи. Всі використані методи адекватні поставленим завданням і дозволяють отримання достовірних результатів.

У третьому розділі представлені результати досліджень здобувача, що представляють собою оцінку якості води за гідрохімічними показниками. Зокрема, представлено інформацію щодо вмісту важких металів у системі «вода-донні відклади» річки Уж. Наведено деталізовану характеристику зон, що

піддавалися антропогенному впливу та проаналізовано відмінності між ними. Зокрема, показано, що найбільшим у воді вміст важких металів є безпосередньо поблизу точок скиду промислових вод, а нижче за течією концентрації нормалізуються, у тому числі і за рахунок виведення іонів через водну біоту. Так, показано, що більшу загрозу становить забруднення купрумом, хромом та цинком у зонах річки, що зв'язані з техногенною трансформацією, у той час як у пониззі річки Уж концентрації важких металів хоча і вище за фонові, але не виходять за межі гранично допустимих показників. На відміну від проточної води, у донних відкладеннях вміст важких металів вищий, що пов'язано з високою швидкістю осадження та низькою міграційною активністю у біоту. Також показано, що пікові концентрації спостерігаються у літні місяці.

Сполуки азоту також виступали у якості забруднювачів на техногенно-трансформованих ділянках ріки (ділянка №3), але мало місце і значне підвищення їх концентрації у зоні сільськогосподарських угідь (ділянка №8). В останньому випадку відмічено тенденцію до збільшення забруднення під час сезону збору врожаю. Фенольне та формальдегідне забруднення також пов'язано з точкою №3 (деревообробний комбінат), яка загалом є зоною найбільшого забруднення за всіма показниками. Показано, що фенольне забруднення найбільше навесні, а формальдегідне – на початку літа-навесні.

Основним практичним результатом даного розділу можна вважати підтвердження того, що безперервний скид забруднювальних речовин у водотік призводить до незакінченості процесів самоочищення водних ресурсів, що становить постійні ризики для екосистем та здоров'я людини як потенційного споживача води та гідробіонтів, і це потребує розробки та вживання дієвих методів моніторингу забруднення та боротьби з ним.

Четвертий розділ дисертаційної роботи також пов'язаний з експериментальними дослідженнями. Він репрезентує результати вивчення складу мікробіоценозів гідроекосистем річки Уж в умовах антропогенного навантаження. Зважаючи на те, що мікробні маркери забруднення водою добре відомі, практична цінність представлених результатів полягає у наданні

грунтового аналізу складу мікробіоти у зв'язку з наявним забрудненням. Так, найбільш чіткі результати показані для взаємозв'язку забруднення органічними формами нітрогену, що показують тенденцію до збільшення протягом останніх років. Також показано, що інтенсивність цього типу забруднення більша на ділянках сільськогосподарського призначення.

Окремо показано переважання умовно-патогенних мікроорганізмів у воді урбанізованих територій, що найбільш помітно у весняно-літній період.

Встановлено вплив забруднення на олігонітрофільні мікроорганізми, найвища кількість яких виявлялася в урбанізованих ділянках, а найменша у зразках з зони промислового забруднення, де багато фенолів та формальдегіду. Також підтверджено зниження кількості цієї групи бактерій порівняно з іншими протягом 6-тирічної динаміки відстеження.

Показано також зміни кількості мікроміцетів у досліджуваних точках. Так, пікові їх значення відмічаються у весняний період, а потім спостерігається поступове їх зниження та формування домінування бактерій, особливо з груп пов'язаних з перетворенням сполук азоту. Встановлено залежність чисельності мікроміцетів від вмісту важких металів: найменша кількість грибів була у зразках з техногенно-трансформованих ділянок, а найбільша у зразках, вилучених з точок, де провадиться аграрна трансформація.

Загалом за результатами досліджень зроблено висновок, що існує прямий зв'язок між зростанням кількості бактерій та хімічних сполук на техногенно-трансформованій ділянці річки Уж, особливо це стосується сполук азоту. На урбанізованій та аграрній території виявлено варіативність зв'язку між чисельністю бактерій та забрудненням нітратами, у той час як по відношенню до забруднення нітритами та амонієм кореляційний зв'язок залишається незмінним. Подібне ж стосується мікроміцетів та умовно-патогенної біоти, чисельність яких збільшується в умовах зростання концентрації біогенного азоту.

Окреме дослідження різноманіття ентеробактерій дозволило встановити переважання представників роду *Escherichia* у зразках з техногенно-трансформованих територій, у той час як у зразках з урбанізованих та

сільськогосподарських територій видовий спектр представників родини *Enterobacteriaceae* був значно ширшим.

У п'ятому розділі представлено результати вивчення антибіотикорезистентності умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених з води річки Уж. Найбільшого поширення явище резистентності має на техногенно-трансформованій та аграрній територіях. Крім того, показники стійкості зростають нижче за течією річки з переважанням за межами населених пунктів, де багато побутових скидів, та в місці скиду стічних вод заводу. Найбільш часто виявляли стійкість до β -лактамів та до тетрациклінів, також виявлені мультирезистентні форми та випадки стійкості до карбапенемів та «захищених» β -лактамів.

Відмічено також, що більшість з досліджених штамів ентеробактерій мали активну здатність до формування біоплівки, що може бути пов'язано з підвищенням стійкості до дії факторів довкілля, у тому числі до забруднень різних видів, зокрема, антибіотиків.

Показано наявність та переважання генетичних детермінант стійкості до пеніцилінів та тетрациклінів у мультирезистентних штамів, найбільше з яких виявлено на техногенно-трансформованих територіях, у той час як у джерелах водозабору на високірних територіях цих генів виявлено не було.

Встановлено, що найбільш істотний взаємозв'язок забруднення та стійкості до антибіотиків існує для іонів цинку. Так, виявлено сильний позитивний кореляційний зв'язок на техногенно-трансформованій території між вмістом Zn^{2+} та антибіотиками, які є інгібіторами синтезу нуклеїнових кислот. Слабкий зв'язок показаний для іонів нікелю. Високий позитивний зв'язок антибіотикорезистентності також виявлено для нітратного забруднення на урбанізованих та аграрній територіях

Висновки лаконічні, походять з суті проведених досліджень, є повністю обґрунтованими матеріалами розділів експериментальної частини та вповні

відображають їх зміст, дозволяють у логічний спосіб побачити комплексність дослідження, його новизну та практичне значення.

Достовірність та наукова новизна отриманих результатів

Дисертаційне дослідження є комплексним, охоплює всі аспекти дослідженої проблеми та має наукову новизну і практичне значення. Дисертантка вперше зробила системний аналіз відомостей про взаємозв'язок забруднення водою та антибіотикорезистентності мікроорганізмів, що може бути покладено в основу розробки методологічних підходів до додаткових методів аналізу санітарно-бактеріологічного аналізу якості води.

Представлені матеріали ретельно оброблені за допомогою методів статистичного аналізу, що дозволяє пересвідчитися у їх достовірності.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів

Результати дисертаційної роботи мають вагомим теоретичне і практичне значення, адже проблема забруднення води є актуальною не лише на регіональному рівні та в Україні в цілому, а й для усього світу. У роботі є відомості про впровадження результатів у групу моніторингових досліджень поверхневих вод в Ужгородській філії ДУ «Закарпатський обласний центр контролю та профілактики хвороб МОЗ України».

Крім того, результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес для викладання дисциплін «Санітарна мікробіологія», «Екологія мікроорганізмів», «Загальна мікробіологія», «Гігієна і санітарія».

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях

За темою дисертації опубліковано 18 наукових робіт, у тому числі 8 статей у фахових виданнях (4 у вітчизняних фахових виданнях, 4 в міжнародних виданнях, що входять до наукометричних баз даних Web of Science та Scopus), 10 тез доповідей та матеріалів конференцій.

Оцінка змісту дисертації

Дисертаційна робота містить всі частини, які повинні бути відповідно до вимог її оформлення, а саме: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати експериментальних досліджень (3 підрозділи), висновки і додатки. Представлені анотації українською та англійською мовами, які містять короткий виклад основних результатів дослідження та не містять даних, які були б відсутні в основному тексті роботи. Оформлення анотацій також відповідає діючому Порядку присудження наукових ступенів.

З аналізу змісту дисертації мною, як офіційним опонентом, відмічається дотримання норм академічної доброчесності в повному обсязі. Робота містить посилання на згадані у тексті джерела інформації, автором дотримано вимоги норм законодавства про авторське право, надано повну інформацію про результати наукової діяльності, а також використані методи досліджень.

Дискусійні положення, запитання та побажання щодо змісту дисертації

До викладених у дисертаційній роботі матеріалів, їх аналізу та сформульованих висновків принципових зауважень немає, але до дисертантки є ряд запитань та невеликих зауважень. В рамках дискусії хотілося би отримати відповіді на запитання:

1. Є згадка, що «гени антибіотикорезистентності виділені з води». Чи дійсно досліджували екстрацелюлярну ДНК або все ж таки вивчали виділену з клітин бактерій?

2. Які групи мікроорганізмів можна визначити як найбільш показові в плані оцінки забруднення, а які в плані ризику поширення генів антибіотикорезистентності? Чи є якась «універсальна» група бактерій, яку б можна було включити у тестування якості води?

3. Чи проводилися розрахунки вартості включення в аналітичну процедуру додаткових тестів? Які переваги нададуть ці дослідження при оцінці якості води порівняно з попередньою схемою?

4. Чи є безпосередньо методичні матеріали з рекомендаціями щодо переліку методик та порядку їх виконання для включення у санітарно-бактеріологічне дослідження?

Серед зауважень можна відмітити, що у тексті роботи зустрічаються технічні орфографічні помилки. Також трапляються випадки застосування посилань на вже недіючі стандарти. У таблицях розділу 3 незручна для сприйняття шапка і в рисунках подекуди відсутні ознаки статистичної обробки. Перший підрозділ матеріалів та методів більш логічним було б віднести до оглядової частини роботи. Жодне з перелічених зауважень не носить принципового характеру, не стосується концепції дисертаційного дослідження і не впливає на його загальну високу оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Савенко Маріанни Вікторівни «Антропогенне навантаження на мікробіоту водних екосистем в умовах Закарпаття» є самостійним, завершеним науковим дослідженням.

Актуальність обраної теми, обґрунтованість наукових положень, висновків та запропонованих рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота їх викладу в опублікованих працях свідчать про високий рівень підготовленої роботи. У роботі теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено можливості застосування відомостей про антибіотикорезистентність для судження про якість води та рівень забруднення поверхневих вод, а також для опосередкованої оцінки та припущень про можливі забруднюючі фактори.

Вважаю, що дисертаційна робота Савенко Маріанни Вікторівни «Антропогенне навантаження на мікробіоту водних екосистем в умовах Закарпаття» оформлена відповідно до вимог наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», відповідає вимогам Порядку присудження та позбавлення

наукового ступеня кандидата наук, затвердженого постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197, а її автор Савенко Маріанна Вікторівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук з наукової спеціальності 03.00.16 «Екологія».

В.о. декана факультету медичних технологій
діагностики та реабілітації,
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри загальної медицини
з курсом фізичної терапії
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара

О.С. ВОРОНКОВА

Підпис засвідчую:

Вчений секретар Дніпровського національного
університету імені Олеся Гончара



Т.В. ХОДАНЕН