

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ВПЛИВ БІОГЕННИХ ЧИННИКІВ НА МІКРОБІОМ ҐРУНТУ ТА
ВОДИ**

Допущено до захисту
«__»_____ 2025 р

Кваліфікаційна робота

студентки 4-го курсу кафедри
молекулярної біології та біотехнології
Кулешової Софії Петрівни

Завідувач кафедри
д.б.н., проф. Божков А.І.

Науковий керівник:
Старший викладач
Бондар Анастасія Юріївна

Науковий консультант:
Данцева Дарія Вікторівна

Голова ЕК _____
Оцінка «_____»
«__»_____ 2025 р

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Вплив біогенних чинників на мікробіом ґрунту та води».

Робота включає: 91 сторінку, 2 таблиці, 41 рисунок. Список використаних джерел містить 130 джерел, з них 130 іноземні.

Кваліфікаційна робота присвячена проблемі появи та поширення антибіотикорезистентності у навколишньому середовищі, в ґрунтових та водних екосистемах, у результаті впливу біогенних чинників, зокрема антибіотиків, що застосовуються у птахівництві.

У межах літературного огляду було проаналізовано механізми формування антибіотикорезистентності, основні шляхи потрапляння антибіотиків у довкілля, а також екологічні наслідки цього явища. У роботі досліджувалися наукові публікації та експериментальні роботи щодо впливу використання антибіотиків у птахівництві на формування та поширення антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів у ґрунтових та водних екосистемах, а також їхніх потенційних екологічних наслідків.

У ході роботи досліджені характеристики мікроорганізмів зразків ґрунту та води, відібраних поблизу птахофабрики, виявлено різноманітність мікроорганізмів, виділені чисті культури цих мікроорганізмів та проведено оцінку чутливості ізольованих культур до антибіотиків. Робота встановлює, що використання антибіотиків у промисловому птахівництві сприяє формуванню стійких мікроорганізмів. Пояснена необхідність додаткового очищення стічних вод та, можливо, їхньої утилізації, а також утилізації гною з сільськогосподарських підприємств, які використовують антибіотики, що дозволить зменшити ризики появи антибіотикорезистентності у природних популяціях.

Ключові слова: мікробіом, біогенні чинники, антибіотикорезистентність, ксенобіотики.

SUMMARY

Qualification work on the topic: “The influence of biogenic factors on the microbiome of soil and water”.

The paper includes: 91 pages, 2 tables, 41 figures. The list of references includes 130 sources, including 130 foreign sources.

The qualification work is devoted to the problem of the emergence and spread of antibiotic resistance in the environment, in soil and water ecosystems, as a result of the influence of biogenic factors, in particular antibiotics used in poultry farming.

The literature review analyzed the mechanisms of formation of antibiotic resistance, the main ways antibiotics enter the environment, and the environmental consequences of this phenomenon. The study examined scientific publications and experimental work on the impact of antibiotic use in poultry farming on the formation and spread of antibiotic resistance among microorganisms in soil and aquatic ecosystems, as well as their potential environmental consequences.

The study investigated the characteristics of microorganisms in soil and water samples collected near the poultry farm, identified a variety of microorganisms, isolated pure cultures of these microorganisms, and evaluated the sensitivity of isolated cultures to antibiotics. The work shows that the use of antibiotics in industrial poultry farming contributes to the formation of resistant microorganisms.

The necessity of additional wastewater treatment and, possibly, its utilization from agricultural enterprises that use antibiotics to reduce the risks of antibiotic resistance in natural populations is explained.

Keywords: microbiome, biogenic factors, antibiotic resistance, xenobiotics.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Глобальна проблема антибіотикорезистентності	9
1.2 Механізми формування та поширення антибіотикорезистентності	11
1.3 Вплив антибіотиків на мікробіом ґрунту	15
1.4 Вплив антибіотиків на водні екосистеми	17
1.5 Огляд інфекційних агентів, поширених у птахівництві.....	18
1.6 Визначення сучасного стану використання антибіотиків у птахівництві	25
1.7 Потенційні шляхи мінімізації проблеми антибіотикорезистентності.....	27
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....	34
2.1 Матеріали	34
2.2 Виділення мікробіомів ґрунту та води зі зразків	35
2.3 Висівання та вирощування мікробіомів ґрунту та води зі зразків	37
2.4 Метод штрихових посівів з метою ізоляції чистих культур	38
2.5 Створення фіксованих мазків та фарбування їх за Грамом	40
2.6 Метод дискової дифузії в агарі	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	46
3.1 Результати висівання та вирощування мікробіому ґрунту і води зі зразків	46
3.2 Результати ізоляції чистих культур	55
3.3 Результати створення фіксованих мазків та фарбування за Грамом .	59
3.4 Результати застосування методу дискової дифузії в агарі.....	60
3.5 Розробка рекомендацій з метою зниження біогенного впливу антибіотиків	63
ВИСНОВКИ.....	65
ДОДАТКИ.....	66
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	76

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- FDA – Управління з продовольства та медикаментів США;
- АБР – антибіотикорезистентність;
- АСР – антимікробні стимулятори росту;
- Г-КСФ – гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор;
- МЕБ – Всесвітня організація охорони здоров'я тварин;
- МРЗС – метицилін-резистентний золотистий стафілокок;
- МСК – мезенхімальні стовбурові клітини;
- НЧ – наночастинки;
- ОЕСР – Організація економічного співробітництва та розвитку;
- ПВ – проба води із позначенням розведення 10^0 ;
- ПВ1 – проба води із позначенням розведення 10^{-1} ;
- ПВ2 – проба води із позначенням розведення 10^{-2} ;
- ПВ3 – проба води із позначенням розведення 10^{-3} ;
- ПВк – контрольна проба води із позначенням розведення 10^0 ;
- ПВк1 – контрольна проба води із позначенням розведення 10^{-1} ;
- ПВк2 – контрольна проба води із позначенням розведення 10^{-2} ;
- ПВк3 – контрольна проба води із позначенням розведення 10^{-3} ;
- ПГ – проба ґрунту із позначенням розведення 10^0 ;
- ПГ1 – проба ґрунту із позначенням розведення 10^{-1} ;
- ПГ2 – проба ґрунту із позначенням розведення 10^{-2} ;
- ПГ3 – проба ґрунту із позначенням розведення 10^{-3} ;
- ПГк – контрольна проба ґрунту із позначенням розведення 10^0 ;
- ПГк1 – контрольна проба ґрунту із позначенням розведення 10^{-1} ;
- ПГк2 – контрольна проба ґрунту із позначенням розведення 10^{-2} ;
- ПГк3 – контрольна проба ґрунту із позначенням розведення 10^{-3} .

ВСТУП

Сьогодні проблема антибіотикорезистентності набула глобального масштабу, що викликає занепокоєння вчених та лікарів по всьому світу. Недоцільне та погано контрольоване використання антибіотиків у медицині та ветеринарії сприяє їхньому поширенню і разом із тим – формуванню та передачі генів стійкості у бактерій. Проте ці процеси загрожують не тільки здоров'ю та життю людей, але і стабільності мікробіомів ґрунтів та вод. Біогенний вплив, спричинений цими ксенобіотичними речовинами, здатний порушувати рівновагу біогеоценозів.

Актуальність даної роботи полягає у важливості дослідження взаємодії між біогенними чинниками, зокрема антибіотиками, та мікробіомами середовищ, до яких вони потрапляють.

Тому, **метою роботи** була оцінка впливу застосування антибіотиків на птахофабриках на формування резистентності мікроорганізмів у ґрунті та воді навколо таких підприємств, а також визначення ризиків поширення антибіотикорезистентності та потенційних екологічних наслідків цього процесу.

Предметом дослідження є резистентність виділених зі зразків культур до антибіотиків, що використовуються у практиці птахівництва.

Об'єктами дослідження є бактеріальні культури мікробіомів, виділені з відібраних зразків ґрунту та води поблизу птахофабрики та поодаль.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні **завдання**:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо впливу використання антибіотиків у тваринництві, зокрема на птахофабриках, на формування та поширення антибіотикорезистентності.

2. Визначити основні шляхи потрапляння антибіотиків та їх метаболітів із птахофабрик до навколишнього середовища (через стічні води, гній, залишки корму тощо).

3. Розробити методику відбору проб ґрунту та води для аналізу наявності антибіотиків, їх залишків і маркерів резистентності мікроорганізмів.

4. Провести лабораторний аналіз проб ґрунту та води в районах, прилеглих до птахофабрик, для виявлення поширення антибіотикорезистентних бактерій.

5. Порівняти отримані результати з контрольними ділянками, які не зазнали впливу птахофабрик, для встановлення відмінностей у мікробіологічних показниках.

6. Надати рекомендації щодо зменшення ризиків поширення антибіотикорезистентності від діяльності птахофабрик, включаючи покращення систем очищення стічних вод, утилізації відходів та скорочення використання антибіотиків у промисловому тваринництві.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Глобальна проблема антибіотикорезистентності

Антибіотикорезистентність (АБР) – це явище стійкості бактерій до антибіотиків. Дане поняття відгалужується від терміну «антимікробна резистентність», що узагальнює стійкість бактерій, вірусів та грибків до протимікробних препаратів [1]. Незважаючи на те, що великій кількості бактерій були властиві механізми захисту від впливу антимікробних засобів ще до початку застосування антибіотиків, активне та часто непослідовне їх використання наразі створює значний селективний тиск та призводить до утворення стійких ізолятів. Застосування антибіотиків не тільки у сфері охорони здоров'я, а також у тваринництві, птахівництві та рослинництві, не завжди із дотриманням встановлених норм (у силу слабого контролю або його повної відсутності) і призвело до глобальних масштабів даної проблеми [2].

Антибіотики як категорія лікарських засобів з'явилися трохи менше 100 років тому – в 1929 році завдяки Александру Флемінгу та його відкриттю антимікробних властивостей пеніциліну. Найбільшу ефективність новий препарат мав проти видів родів *Staphylococcus* та *Streptococcus*. Важливо ураховати, що ще до початку широкого застосування пеніциліну деякі види *Staphylococcus*, зокрема *Staphylococcus aureus*, мали потужний механізм стійкості у вигляді β -лактамаз [3]. Проте вже невдовзі після початку масового використання для боротьби з бактеріальними інфекціями, у 1940 році, було зафіксовано стрімкий процес формування резистентності. У відповідь на це в 1959 році було розроблено метицилін – напівсинтетичний β -лактамний антибіотик пеніцилінового ряду. Менш ніж за рік після початку його застосування було зафіксовано метицилін-резистентний штам (MR3C), що характеризувався зміненим пеніцилінзв'язуючим білком (PBP2a/c) і стійкістю до всіх пеніцилінів і, як виявилось пізніше, цефалоспоринів та карбапенемів. Це зробило β -

лактамний арсенал клінічно неефективним [4, 5]. На сьогоднішній день майже 99% клінічних штамів *S. aureus* резистентні до пеніциліну [3].

З 1940-х років стрімкий розвиток фармацевтичної сфери відбувався в першу чергу через необхідність розширення арсеналу доступних антимікробних засобів для боротьби з різноманітними мікроорганізмами, які паралельно надзвичайно ефективно до цих нових речовин пристосовувалися. Виділення та впровадження у 1940-х роках у широкий вжиток антибіотиків широкого спектру дії, таких як стрептоміцин, тетрациклін та хлорамфенікол, стало початком нового етапу для людства – антимікробної хіміотерапії інфекційних захворювань [2]. На проміжок між 1940-ми та 1970-ми припала золота ера антибіотиків [6]. З середини 1980-х років темпи розробки нових антимікробних лікарських препаратів поступово сповільнювалися, частково через зміщення фокусу на препарати, які є більш високовартісними або необхідними для підтримання хронічних станів, а також через напрацювання певної кількості ефективних антибіотиків [7]. З того часу антибіотичні засоби змогли врятувати мільйони життів, проте наразі АБР становить велику загрозу для досягнень медицини та належить до головних ризиків для громадського здоров'я на думку ВООЗ.

Резистентність до антибіотиків формується шляхом генетичних змін і є природним процесом, проте через відсутність систематизованого серйозного контролю над антимікробною стійкістю підсилюється її поширення як в регіональних, так і глобальних масштабах. Недостатнє фінансування досліджень, відсутність епідагляду, а також локальна відсутність вільного доступу до вакцин, є критичними факторами, які сприяють поширенню резистентності в країнах, що розвиваються [8]. Проблема набула глобального характеру: АБР спричинила 1,27 млн смертей у 2019 році, а загальне число смертей до 2019 року включно зводиться до 4,95 млн. За даними Огляду антимікробної резистентності, виконаного на замовлення уряду Великобританії у 2016 році, кількість смертей через АБР зросте до 10 млн на рік до 2050 року. ВООЗ та інші групи дослідників згодні

з цим прогнозом, і, хоча він усе одно зазнав певної критики, у загальному наукова спільнота сходиться в думці, що АБР потребує системного скоординованого глобального підходу для вирішення [9]. Окрім медичних наслідків, АБР також несе за собою економічні втрати: за оцінками Світового банку, зробленими у 2017 році, АБР може призвести до 1 трлн доларів США додаткових витрат на охорону здоров'я до 2050 року [10]. Таким чином, пом'якшення ситуації вимагатиме застосування цілісної концепції «One Health» («Єдине здоров'я»), яка об'єднує у собі поняття здоров'я людей, тварин і задовільний стан навколишнього середовища. У глобальному контексті концепція «One Health – One World» («Єдине здоров'я – єдиний світ») об'єднує молекулярні епідеміологічні аспекти, які сприяють розумінню еволюції або генетичного зв'язку АБР у патогенах/переносниках, хазяїні (людина/тварина) та пов'язаному середовищі в глобальному масштабі. Соціально-економічні чинники, такі як світова торгівля, конфлікти, переміщення, подорожі, міграція людей і тварин, є важливими факторами глобального поширення АБР. Тоді як на місцевому рівні концепція підкреслює важливість географічно близьких екосистем, які відіграють вирішальну роль у виникненні та поширенні АБР [11].

1.2 Механізми формування та поширення антибіотикорезистентності

Стійкість до антибіотиків є спадковою характеристикою бактерій, тобто зумовленою генетично. Необхідність адаптації до антибіотиків як до несприятливого фактору спричинена потребою виживання та розмноження. Таким чином за різних умов можуть виникати певні генетичні модифікації, що призводять до формування механізмів захисту.

Стійкість до антибіотиків формується відповідно до таких стратегій:

1. Обмеження проникності клітинної мембрани для антибіотиків.
2. Виведення антибіотиків за допомогою механізму ефлюксного насосу.

3. Інактивація антибіотиків шляхом їхньої модифікації або деградації.

4. Виникнення цільових мутацій, спрямованих на зміну мішені або включення антибіотиків у метаболічні процеси [12].

Серед форм антибіотикорезистентності виділяють дві, а саме природну та набуту.

Природна резистентність поділяється на внутрішню (тобто ту, що виявляється в мікроорганізмі першопочатково) та індуковану, коли бактерія несе ген, відповідальний за резистентність, проте він активується тільки після антибіотичного впливу [13]. Внутрішню резистентність можна визначити як ознаку, яка є універсальною для бактеріального виду, не залежить від попереднього впливу антибіотиків і не пов'язана з горизонтальним переносом генів. Найпоширенішими бактеріальними механізмами, залученими до внутрішньої резистентності, є знижена проникність зовнішньої мембрани (зокрема, ліпополісахариду у грамнегативних бактерій) і природна активність ефлюксних насосів. Поширеним механізмом індукованої резистентності також є мультипрепаратні ефлюксні насоси [14].

Набута ж резистентність може з'явитися внаслідок процесів трансформації, кон'югації та трансдукції, що є механізмами горизонтального переносу генів (а саме мобільних генетичних елементів та хромосомної ДНК), а також мутацій у нуклеоїдній ДНК [13]. Набуття генетичного матеріалу, що несе резистентність, може носити тимчасовий або постійний характер. Найпоширенішим способом набуття чужорідного генетичного матеріалу є опосередкована плазмідами передача генів резистентності [14].

Бактеріальна трансформація – це процес, в якому ознака, що належить одному штаму бактерій, може бути придбана іншим штамом шляхом прямого поглинання екзогенного генетичного матеріалу бактерій донорського штаму [15].

Бактеріальна кон'югація – це механізм переносу генів від бактерії-донора до бактерії-реципієнта за допомогою контакту двох клітин (прямого або опосередкованого пілями) [16].

Бактеріальна трансдукція – це процес перенесення генів (як хромосомної, так і плазмідної ДНК) від бактерії-донора (в даному випадку інфікованої клітини) до бактерії-реципієнта, опосередковане бактеріофагами [17].

Щодо набуття АБР шляхом мутацій, інсерційні (вставні) послідовності можуть переміщувати внутрішні фрагменти генетичного матеріалу. При цьому найпоширенішими факторами стресу, що спричиняють мутації, є УФ-випромінювання, недостача поживних речовин та вплив хімічних агентів [14]. За різними даними, середня частота мутацій у бактерій становить 1 на кожні 10^6 - 10^9 клітинних поділів; переважна частина цих мутацій є шкідливими для клітин [18]. З усіх мутацій, що можуть виникнути, ті, що сприяють стійкості до антибіотиків, зазвичай відбуваються в обмеженій кількості типів генів. До них відносять гени, що кодують мішені антибіотиків; гени, що кодують транспортери антибіотиків до клітини; гени, що кодують регулятори транспортерів антибіотиків та гени, що кодують ферменти-модифікатори антибіотиків [19]. Крім того, багато мутацій, що формують резистентність, можуть завдавати шкоду бактеріям, до прикладу, при набутті резистентності до метициліну у *Staphylococcus aureus* швидкість росту бактерій значно знижується [14].

Поширення та підвищення резистентності індукується використанням навіть малих і дуже малих доз антибіотиків, що може призводити до селекції високого рівня резистентності в наступних поколіннях бактерій; формування та відбору бактерій, які є гіпермутаційними штамами; збільшення здатності набувати резистентність до інших антимікробних агентів і сприяння переміщенню мобільних генетичних елементів [14].

Птахівництво як галузь сільського господарства має свій вплив на поширення антибіотиків та АБР у навколишньому середовищі (ґрунті, воді

та повітрі). Це відбувається в першу чергу за рахунок неможливості повного метаболізму антибіотичних препаратів (та інших лікарських засобів). Відсоток метаболізованої кількості засобу для різних речовин коливається від 10% до 70%, а решта виводиться з організму в першопочатковому вигляді [20]. Таким чином за неналежного зберігання та/або утилізації гною та/або недостатньої очистки води, що використовується на фермах, велика кількість антибіотиків потрапляє в довкілля, де формується стійкість різних бактерій до них. Наприклад, удобрення ґрунтів курячим послідом є прямим шляхом до забруднення угідь фармацевтичними препаратами. Також поширення може відбуватися посередництвом інших відходів, таких як підстилка та навіть просто пил із пташників. Водойми є резервуарами, що містять у собі гени стійкості до антибіотиків, отож ці умови можуть сприяти поширенню резистентності [20]. Важливо зазначити, що навіть попри відповідне очищення деякі антибіотики не повністю розкладаються або затримуються в очисних спорудах, що показують різні дослідження [21-24], а самі очисні споруди є місцем, де активно накопичуються бактерії (часто у формі біоплівки) та є можливим переніс генів резистентності [25].

Час розкладання антибіотиків, що потрапляють до ґрунтового середовища з різних джерел, залежить від абіотичних та біотичних факторів впливу, а також від їхньої молекулярної будови. До абіотичних факторів у першу чергу відносять рівень рН, вміст органічних речовин, вологість, температуру, кисневий статус. Ці речовини, зокрема, піддаються процесам деградації (гідролізу, фотодеградації, відновної та окисної трансформації), сорбції-десорбції, метаболізації мікроорганізмами тощо. Зважаючи на різноманітну будову різних груп антибіотиків та чинники впливу, за певними оцінками періоди напіврозпаду коливаються від менше ніж 1 дня до 3466 днів. Цікаво, що навіть фармацевтичні препарати однієї групи можуть значно відрізнятися за даним показником, що, як очікується, залежить у тому числі від відмінностей у складі ґрунту та умов, заданих під час дослідження. Проте наразі на основі наявних даних можна зробити

висновок, що макроліди, тетрацикліни та фторхінолони мають високі періоди напіврозпаду [26].

Мікробіом ґрунту також впливає на деградацію антибіотиків. Різними дослідними групами було зафіксовано, що різні штами, що належать до родів *Microbacterium*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Labrys*, *Ochrobactrum* та *Escherichia*, здатні розщеплювати сульфаметазин, пеніцилін G, тетрациклін, еритроміцин та доксициклін у рідких культурах відповідно [27, 28, 29, 30, 31, 32]. Провідна роль мікроорганізмів у розкладанні антибіотиків була підтверджена завдяки проведенню досліджень у стерильних та нестерильних пробах ґрунтів [26].

1.3 Вплив антибіотиків на мікробіом ґрунту

Ґрунтове середовище виступає місцем накопичення генів антибіотикорезистентності, які потрапляють із різних джерел. Мікроорганізми, що живуть у ґрунті, є його невід'ємною складовою частиною та спричиняють перебіг різноманітних процесів, зокрема обмін речовин та стабілізацію структури. Попадання залишків антибіотиків та генів АБР у ґрунт найчастіше відбувається разом із гноєм та відпрацьованою водою з ферм. Крім того, до середовища також потрапляють важкі метали та пластик, які є коселективними агентами та прямим чи опосередкованим чином впливають на стійкість до антибіотиків [33]. Надходження антибіотиків до ґрунтового середовища може пригнічувати ріст деяких мікроорганізмів, що впливає на склад мікробіоти, порушення рівноваги та змін в екологічній функціональності ґрунту [26]. Бактерії, що стають резистентними внаслідок такого впливу, можуть займати домінуючі позиції в ґрунтовому мікробіомі та поширювати стійкість за допомогою горизонтального переносу генів, тим самим створюючи цикл позитивного зворотного зв'язку поширення АБР [34].

Достатня кількість різних досліджень описує вплив антибіотиків на окремі мікробні популяції та цілих спільнот. Для оцінки впливу

використовують велику кількість параметрів, зокрема мікробну масу, її активність, дихання, оборот органічної речовини у ґрунті, а також нітрифікацію, денітрифікацію, активність деяких ферментів тощо. Окрім селекційного тиску показано, що антибіотики у ґрунтового середовищі також спричиняють зміну чисельності різних груп мікроорганізмів, їхнього генетичного, функціонального та структурного різноманіття, загальної мікробної активності, активності ферментів, а також можуть впливати на мінералізацію вуглецю та кругообіг азоту [26].

У роботі, що розглядала поширення АБР бактерій у наземних екосистемах, зафіксовано, що ґрунту із високим вмістом антибіотичних засобів властива висока чисельність оліготрофної та спороутворюючої мікробіоти. Крім того, це дослідження продемонструвало негативний вплив антибіотиків на кількість аеробних азотфіксуючих мікроорганізмів, що може мати негативний довгостроковий вплив на ріст рослин та сільське господарство загалом [35]. Роботи інших наукових груп також демонструють зменшення чисельності мікроорганізмів, що є корисними для рослин і займають важливу позицію з забезпеченні обігу поживних речовин [36, 37].

Існує думка, що антибіотики можуть впливати на мікробіом ґрунту шляхом поширення генів стійкості, тим самим порушуючи стабільність на стійкість ґрунту та взаємодій у мікробних асоціаціях. Це цілком імовірно, проте тема потребує подальших досліджень, особливо в розрізі впливу на здоров'я людини. Для зменшення потенційних ризиків для здоров'я людини та тварин пропонується проводити ретельний моніторинг поширення генів резистентності через ґрунтового середовище [35]. Антибіотики також впливають на мікробіом рослин, який також може набувати гени резистентності за посередництва ґрунтових бактерій. Знання питання наразі є дуже поверхневими, проте існує можливість поширення АБР через харчові ланцюги з участю рослин із таким мікробіомом [38].

1.4 Вплив антибіотиків на водні екосистеми

Водне середовище є резервуаром накопичення залишків фармацевтичних препаратів та генів стійкості до антибіотиків, розширення якого відбувається в тому числі за рахунок внесення гною, стічних вод фермерських господарств [25]. Таким чином, вода є своєрідним «біореактором», що сприяє обміну генами між патогенними та непатогенними бактеріями. Прикладами найпоширеніших господарів добре відомих генів стійкості до антибіотиків є представники родини *Enterobacteriaceae* (зокрема, роди *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Raoultella*) або роди *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* та деякі інші [39]. Хоч і кількість досліджень впливу антибіотиків на водні екосистеми є значно меншою, імовірно, через нижчу концентрацію антибіотиків за рахунок великого розведення та нижчу щільність водного мікробіому порівняно з ґрунтовим, менш виражені ефекти не означають слабший вплив даних ксенобіотиків на цей вид середовища [40]. Вплив антибіотиків може призвести до зміни складу мікробного співтовариства, що напряду впливає на біогеохімічні цикли, а саме на розщеплення органічної речовини, метаногенез, транспорт азоту тощо [41], а також резистому в сторону збільшення кількості конкретних генів АБР [42].

Зміни екологічних функцій водного середовища, викликані антибіотиками, досліджувалися в деяких роботах. Процес трансформації азоту вивчався з 1960-х років. У дослідженні Tomlinso et al. 1966 року стрептоміцин у кількості 400 мг/л був необхідний для досягнення 75% інгібування окислення аміаку в активному мулі за 2-4 години. Навпаки, ампіцилін (0,250 мг/л), бензилпеніцилін (0,250 мг/л), новобіоцин (0,150 мг/л), окситетрациклін (0,250 мг/л) і хлорамфенікол (0,50 мг/л) не показали впливу ні на біомасу, ні на виробництво нітратів у стабілізованому нітрифікаційному мулі протягом 80 годин [43]. Було також показано, що такі антибіотики, як окситетрациклін, пригнічують процес нітрифікації в

поверхневих водах [44]. Однак у деяких випадках, коли складна суміш бактерій піддається дії антибіотиків, може спостерігатися підвищена нітрифікаційна активність, причина якої ще не зрозуміла [45]. В іншому дослідженні, проведеному на послідовних реакторах періодичної дії (установках для очистки стічних вод), хоча явних змін у видаленні азоту чи фосфору при безперервному впливі залишкової кількості еритроміцину (100 г/л) не спостерігалось, структури мікробного співтовариства значно змінилися, як це було проаналізовано за допомогою мікрочипів високої щільності (Phylo-Chip) [40, стор. 934].

1.5 Огляд інфекційних агентів, поширених у птахівництві

Птахівництво як галузь сільського господарства страждає від різноманітних патогенних мікроорганізмів, які спричиняють значні втрати продуктивності, економічні збитки та зоонозний вплив на співробітників. Захворювання, викликані збудниками, мають здатність передаватися прямим та непрямим шляхом, тобто є заразними. Класифікуючи патогени за біологічною природою, можна виділити бактерій, віруси, гриби, найпростіших та паразитів. Кожен із мікроорганізмів також класифікується за величиною вірулентності, здатністю поширюватися серед людей (зоонозним потенціалом), захворюваністю та летальністю – за комплексом цих характеристик Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (МЕБ) складає та регулярно оновлює список хвороб птахів, що вимагають моніторингу [46, 47]. З огляду на тематику роботи, нижче буде розглянуто саме бактеріальні агенти.

Основними захворюваннями, викликаними бактеріальними інфекціями, є сальмонельоз, колібактеріоз, кампілобактеріоз, пастерельоз, мікоплазмоз [46].

Інфекційні хвороби, викликані *Salmonella* spp.. Два нерухомих види, *Salmonella pullorum* (*Salmonella enterica* підвид *enterica* серовар *Gallinarum* біовар *Pullorum*) і *S. gallinarum* (*Salmonella enterica* підвид *enterica*, серовар

Gallinarum, біовар Gallinarum), спричиняють хворобу пулороз (гостре системне захворювання курчат, дорослих курей, а також інших домашніх птахів, що характеризується ураженням кишківника та паренхіматозних органів) і тиф курей (гостре септицемічне захворювання, яке найчастіше вражає дорослих птахів), відповідно. Ці мікроорганізми, як вважається, характеризуються мінімальними зоонозними ризиками [48, 49, 50].

Велика кількість інших сероварів *Salmonella* (тобто паратифних сальмонел) є рухливими та можуть інфікувати широкий спектр хазяїв, включаючи безхребетних і хребетних диких тварин, домашніх тварин і людей. Хоча паратифні інфекції домашньої птиці є поширеними, вони рідко викликають гострі клінічні захворювання, за винятком зараження високо сприйнятливих молодих птахів, які перебувають у стресових умовах [48, стор. 719]. Паратифні інфекції здатні передаватися горизонтально (серед птахів у зграї або між різних зграй) посередництвом прямого контакту, а також контакту із зараженим кормом, водою, фекаліями, підстилкою та навіть пилом у повітрі [48].

Доцільність та ефективність лікування сальмонельозу антибіотиками є дискусією багатьох років. Протягом останніх років практика лікування даної інфекції не покладається на стандартні антибіотики через питання щодо ефективності і переживання щодо формування резистентності через невибіркове їхнє використання [48]. Обмежена ефективність антибіотиків для контролю сальмонельозних інфекцій у свійської птиці неодноразово була задокументована. У деяких випадках застосування антибіотиків фактично підвищило сприйнятливість до сальмонельозної інфекції, можливо, через пригнічення росту іншої конкурентної або інгібіторної мікрофлори [48, стор. 737]. Так як детермінанти стійкості до антибіотиків можуть накопичуватися протягом часу, були повідомлення про дуже високі рівні резистентності серед ізолятів *Salmonella* на птахофабриках [51, 52].

Інфекційні хвороби, викликані *Escherichia coli*. Колібактеріоз (ешеріхіоз, колісептицемія, або коліінфекція птахів) – це локалізоване або

системне захворювання птиці, яке викликається патогенним для птахів штамом *Escherichia coli* [48]. Синдроми захворювання включають колісептицемію, геморагічну септицемію, колігранульому, хворобу дихальних мішків, синдром опухлої голови, венеричний колібактеріоз, целюліт, перитоніт, сальпінгіт, остеомієліт, інфекцію жовткового мішка та ентерит [46, стор. 29].

Хоча *E. coli* є типовою представницею мікрофлори для всіх теплокровних і в загальному вважається умовно-патогенною, штами, виявлені в шлунково-кишковому тракті, є опортуністичними за умов послабленого або пригніченого імунного стану та порушення бар'єрів тракту. Крім того, існують певні штами *E. coli*, які є патогенними для птахів і викликають велику кількість критичних станів [53]. Наразі прийнято вважати, що штами *E. coli*, патогенні для птахів, можуть бути не тільки вторинним (таким, що інфікує організм, який вже є зараженим іншим мікроорганізмом або подразнений фактором стресу), а й первинним патогеном [48].

Протимікробні препарати для лікування колібактеріозу використовуються з середини 1950-х років. З часів введення у лікувальну практику тетрациклінів спостерігається стимулювання формування резистентності [48]. Було виявлено, що шлунково-кишковий тракт птахів є середовищем, придатним для перенесення детермінант резистентності тетрацикліну від стійких до чутливих бактерій [54]. Через розвиток резистентності до наявних антибіотиків, проте відсутність нових більш підходящих розробок на початку 2000-х у США та ряді інших країн стали доступними до використання фторхінолони – група синтетичних протимікробних препаратів, що кожен з представників якої має у 6 положенні хінолового ядра атом фтору. Вони виявилися ефективними в лікуванні колібактеріозу, проте поява резистентних штамів паралельно з їхнім використанням як для курчат, так і для індиків, а також розвиток перехресної резистентності серед різних хінолонів та загалом важливість

цієї групи препаратів для людей призвели до відмови від їхнього застосування [48, 55, 56].

Важливим є дослідження чутливості ізоляту під час підбору антибіотику для лікування. Крім того, необхідно застосовувати грамотно підібрані дози: навіть високоефективний препарат у заниженому дозуванні може не призвести до покращення стану організму, проте стати поштовхом до формування стійкості [48]. Наразі відомо, що штами *E. coli*, патогенні для птахів, часто стійкі до тетрациклінів, сульфаніламідів, ампіциліну та стрептоміцину [48, стор. 807]. У 2000 році було повідомлено про визначення генів стійкості в ізолятах *E. coli* від курей до антибіотиків флорфеніколу та хлорамфеніколу, які ніколи офіційно не застосовувалися у птахівництві в США [57]. Доволі перспективним вважається застосування кокцидіостатиків, які також мають протимікробну дію, наприклад, монензину – поліетерного іонофорного антибіотику та антикокциду [48].

Інфекційні хвороби, викликані *Campylobacter* spp.. Кампілобактеріоз – це інфекційне захворювання, що викликається термофільними видами *Campylobacter*, і проявляється у формі ентериту, інтоксикації та септицемії. *C. jejuni* та *C. coli* є поширеними колонізаторами кишківника курей і зазвичай вважаються комменсалами птахів, адже рідко призводять до захворювань або значних патологічних уражень. Проте вірулентність цих штамів змінюється: деякий час тому вібріонний гепатит, пов'язаний з *C. jejuni* та *C. coli*, був малопоширеним захворюванням, а зараз викликає занепокоєння через поширення смертельного ураження курей на вільному вихулі. Виявлено, що цей «новий» стан, названий плямистою хворобою печінки, пов'язаний із мікроорганізмом *C. hepaticus*. Також повідомляється про запалення кишківника та діарею конкретних порід бройлерів, спричинені *C. jejuni* [48]. Вважається, що деякі породи є більш сприйнятливими до розвитку кампілобактеріозу та вібріонного гепатиту і має місце певний фактор схильності [58]. Поширення патогену найчастіше відбувається горизонтально з доквілля до пташників [48].

Campylobacter spp. не є значущими патогенами для птахів, проте вони є серйозними зоонозними загрозами [48]. Інфекції, спричинені *Campylobacter* spp., займають не останнє місце в актуальних проблемах громадського здоров'я: зараз цей збудник став основною бактеріальною причиною харчового гастроентериту у людей у всьому світі [59]. *C. jejuni* є відповідальним за більшість випадків кампілобактеріозу людини, але його також можуть спричиняти *C. coli* і рідко *C. lari*. Крім того, інфекція *Campylobacter* пов'язана з синдромом Гієна–Барре, постінфекційним аутоімунним захворюванням, що характеризується гострим і прогресуючим нервово-м'язовим паралічем [48].

Дослідження щодо лікування кампілобактеріозу демонструють декілька підходів, зокрема антибіотикотерапію та фаготерапію, проте остання має деякі труднощі, які заважають практичному впровадженню [48]. Антибіотики класу макролідів (еритроміцин), фторхінолонів, тетрациклінів та аміноглікозидів (гентаміцин) використовуються проти кампілобактеріозу [60]. Незважаючи на ці дані, різні дослідження, проведені по всьому світу, повідомляють про формування стійкості різних ступенів до таких груп антибіотиків як тетрацикліни, макроліди, кетоліди, лінкозаміди, фторхінолони, хінолони та амфеніколи (а саме до хлорамфеніколу) [61-63].

Пастерельоз (пташина холера, геморагічна септицемія птахів). Холера птахів спричинена бактерією *Pasteurella multocida* і визнана висококонтагіозною хворобою, яка вражає широке коло птахів і викликає високу смертність. До симптомів пастерельозу відносять лихоманку, анорексію, скуйовджене пір'я, виділення з рота, слиз, прискорене дихання та діарею [64]. Хвороба може варіюватися від гострої септицемії до хронічних і локалізованих інфекцій. Легенева система і тканини, пов'язані з опорно-руховим апаратом, часто є осередками хронічної інфекції (МЕБ, 2021). Вважається, що можливим є тільки горизонтальне поширення хвороби фекально-оральним або повітряно-крапельним шляхом [64].

Інфікування людей *P. multocida* не є рідкістю, тож збудник можна вважати зоонозом, проте повідомлення про випадки зараження найчастіше стосуються перенесенням патогену посередництвом укусів або подряпин тварин (переважно собак та котів) [65]. Вважається, що ізоляти холери птахів *P. multocida*, не мають зооозного потенціалу, оскільки пташині ізоляти, як правило, непатогенні для ссавців, якщо потрапляють орально або підшкірно (МЕБ, 2021).

Антибіотики широко використовуються для лікування пастерельозу, проте ефективність не є стабільною і потребує постійного проведення тестів на чутливість та оперативності в застосуванні. Наразі велика кількість ізолятів *P. multocida* піддається лікуванню традиційними препаратами як амоксицилін, пеніцилін і тетрацикліни [48].

Інфекційні хвороби, викликані *Mycoplasma* spp.. Сукупність хвороб, що викликані бактеріями роду *Mycoplasma*, носить назву мікоплазмозу птахів. Хвороби, що викликаються *Mycoplasma* spp., передаються як горизонтально, так і вертикально. Мікоплазми відносяться до класу Mollicutes та характеризуються відсутністю клітинної стінки та малими розмірами. Загалом дані прокаріоти колонізують слизові оболонки і не становлять небезпеки, проте деякі види, а саме *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* та *M. meleagridis*, вважаються патогенними для птахів. Клінічні ознаки різняться в залежності від виду, що викликає захворювання, проте загалом з мікоплазмозом пов'язують проблеми з дихальними шляхами, респіраторні хронічні стани, синовіт, низьку активність, деформації скелета та загибель ембріонів [48].

У силу своєї будови мікоплазми нечутливі до антибіотиків, що спрямовані на інгібування синтезу клітинної стінки, однак застосування тетрациклінів, макролідів, тіамуліну та комбінованих антибіотиків лінкоміцин-спектиноміцину як правило має ефективність [66].

Інфекційні хвороби, викликані *Clostridium* spp.. *Clostridium* spp. – великий рід грам-позитивних бактерій, що є анаеробними

спороутворюючими паличками. Переважна кількість з них – непатогенні мікроорганізми, що колонізують навколишнє середовище (воду, ґрунт тощо), проте деякі з них існують у шлунково-кишковому тракті людей та тварин [48].

Патогенні види клостридій передаються горизонтально та виробляють кілька токсинів, відповідальних за ураження та клінічні ознаки, тому клостридіальні захворювання поділяють на 3 основні групи на основі активності токсинів:

1. Ті, що впливають на нейротрансмітери, такі як *C. botulinum* і *C. tetani*.
2. Штами клостридій, що проліферують у кишечнику та викликають ентерит і токсемічний шок, такі як *C. perfringens* типи А, С та G і *C. difficile*.
3. Клостридії, локалізовані в печінці та м'язах – гістотоксичні клостридії: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* тип А, *C. novyi* тип В, *C. perfringens* тип А, *C. sordelli* та *C. haemolyticum* [67].

Захворюваннями, які найчастіше виникають через *Clostridium* spp., є некротичний ентерит (*C. perfringens*), виразковий ентерит (*C. colinum*), ботулізм (*C. botulinum*) та гангренозний дерматит (*C. septicum*) [48].

Некротичний ентерит, спричинений продукованими *C. perfringens* токсинами, викликає пошкодження тонкої кишки, ураження печінки та високу смертність [48]. Захворюваність на некротичний ентерит пов'язують зі схильністю курей інфікуватися кокцидозом (наприклад, кокцидіями *Eimeria maxima* або *E. acervuline*). Також такі фактори стресу як неякісний корм або зависокий вміст клітковини у ньому можуть створювати більш сприятливе середовище для розмноження *C. perfringens*. Терапія захворювання полягає в застосуванні антикокцидних препаратів та контролі стресових факторів [48, 68].

Виразковий ентерит, що викликається *C. colinum*, є запаленням слизової оболонки тонкого кишківника, що може набувати гострого або

хронічного станів. Лікують дане захворювання введенням стрептоміцину ін'єкційно або у склад корму та/або води [48].

Ботулізм – це захворювання, спричинене ботулічними нейротоксинами, що виробляються *C. botulinum*, та здатне вражати людей та тварин. Більшість випадків у птахів спричинені *C. botulinum* типу С або мозаїчного типу С/D, зоонозність цих типів не є доведеною [48]. Клінічними ознаками ботулізму є параліч лап, крил та шиї, а також дихальна недостатність [69]. Практика лікування захворювання включає в себе застосування β -лактамів (пеніциліну, амоксициліну), а також стрептоміцину, бацитрацину та хлортетрацикліну [48, 69].

1.6 Визначення сучасного стану використання антибіотиків у птахівництві

На сьогодні використання антибіотиків у птахівництві поділяється на субтерапевтичне, тобто таке, що використовується для підвищення добового приросту маси та придушення інфекцій на їхніх початкових стадіях, і терапевтичне, необхідне безпосередньо для лікування. Субтерапевтичне лікування реалізується лише додаванням антибіотиків до корму та/або води, і хоч воно демонструє зменшення впливу бактеріальних інфекцій, проте здатне чинити селекційний тиск, тому існує занепокоєння з приводу формування резистентності [70].

У 2006 році Регламент Європейського Союзу № 1831/2003 обмежив використання протимікробних препаратів у годівлі тварин за винятком лікування кокцидіостатиками та гістомоноостатиками [71, 72]. У 2013 році, відповідно до Керівництва для промисловості № 213, Управління з продовольства та медикаментів США (FDA) обмежило використання антимікробних стимуляторів росту (АСР), важливих для медицини, у тваринництві [72]. Пізніше, у 2014 році, канадський уряд сформулював заборону на окремі АСР на основі політики FDA [72, 74]. Різні країни Організації економічного співробітництва та розвитку (ОЕСР) ввели заборони на АСР (наприклад, Мексика, Південна Корея, Нова Зеландія),

тоді як вони залишаються дозволеними в інших країнах-членах (наприклад, у Японії) та більшості країн, що є провідними виробниками м'яса птиці, але не входять до ОЕСР [72, 73]. Проте оцінити об'єктивний стан речей щодо використання АСР доволі складно за рахунок відсутності якісних статистичних даних за межами лише деяких із так званих країн із високим рівнем доходу або навіть нелегального використання заборонених антибіотиків [72, 73]. У контексті країн із високим рівнем доходу та їхніх оптимізованих виробничих систем спостерігається мінімальний економічний вплив від заборони АСР. У країнах з середнім та низьким рівнями доходів заборона АСР потенційно оцінюється як більш впливова з економічної точки зору за рахунок менш розвинених систем санітарії та біозахисту [73]. Обмеження використання АСР у таких країнах також може призвести до спалахів бактеріальних хвороб, адже субтерапевтичне застосування антибіотиків також заміняє належну гігієну і здатне запобігати розвитку більш важких інфекційних процесів [75].

Використання антимікробних засобів (як у медицині, так і у ветеринарії) – важливий показник, що стосується антибіотиків, який аналізується, зокрема, Фондом Флемінга. Ці дані є допоміжними у інтерпретації показників щодо антимікробної антибіотикотерапії, прогнозуванні тенденцій АБР, використання традиційних та альтернативних шляхів її подолання (МЕБ, 2015); у більш глибокому розумінні концепції «One Health – One World» («Єдине здоров'я – єдиний світ»). Таким чином разом із інформацією, отриманою з інших джерел (фармацевтичних компаній, оптових та роздрібних продавців, ветеринарних асоціацій, митниць тощо), дані від фермерів напряду можуть доповнювати повну картину ситуації як локально, так і глобально [76].

Моніторинг використання антимікробних засобів навіть у країнах ЄС, де з 2009 року існує Європейський нагляд за споживанням ветеринарних антимікробних препаратів, є дуже складним завданням, адже кількість проданих засобів не відображає особливостей дозування та цілей

застосування [77]. Наразі дослідницькі групи по всьому світу проводять комплексні дослідження з метою вивчення практик використання антимікробних засобів, їх кількісного та якісного визначення, визначення рівнів АБР на птахофермах та їхніх впливів на довкілля та здоров'я людини; крім того ці роботи дозволяють визначати дотримання законодавчих обмежень щодо певних антибіотиків [77-81]. Очікується, що дані дослідження допоможуть сформуванню свідоме використання лікарських засобів серед фермерів, а також у майбутньому визначити та каталогізувати рівні ефективності застосування тих чи інших антибіотиків за певних умов.

Для більш ефективного контролю використання антимікробних засобів є доцільним створення мережі наднаціонального моніторингу на рівні застосування для окремих тварин, стад та ферм (зокрема такий підхід розглядається для країн ЄС, проте глобальний підхід до питань використання антимікробних засобів та АБР є ще більш доцільним) [77, 82, 83].

1.7 Потенційні шляхи мінімізації проблеми антибіотикорезистентності

Зважаючи на безупинне формування АБР, вичерпання списку критично важливих антибіотиків для людської медицини і відсутність принципово нових розробок нагальною є потреба пошуку альтернатив лікування бактеріальних хвороб. Наразі серед перспективних підходів виділяють фагову терапію, застосування пробіотиків, пребіотиків та синбіотиків, а також органічних кислот; крім того, особливу увагу в подоланні АБР не тільки у ветеринарії, а й у медицині приділяють нанобіотикам, протимікробним пептидам, отриманим із мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), застосуванню технології CRISPR-Cas для видалення генів АБР та використанню імунотерапевтичних агентів [84, 85]. Також доцільним є застосування біоремедіаційних технологій для очищень уже забруднених ґрунту та води. Нижче буде наведено коротку характеристику кожного з підходів, їхні основні переваги та недоліки.

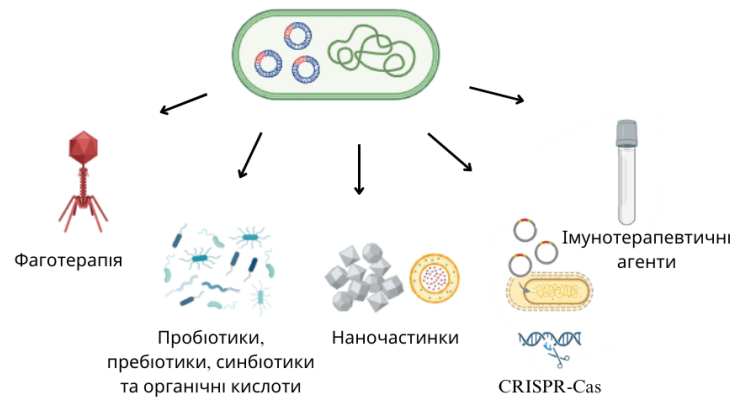


Рис. 1.1. Сучасні підходи до боротьби з антибіотикорезистентністю [117]

Фагова терапія – це лікування бактеріальних захворювань за допомогою спеціально підібраних вірулентних штамів бактеріофагів. Бактеріофаги – це віруси, здатні до ураження певних бактеріальних клітин. Таким чином, фагова терапія заснована на особливості літичного життєвого циклу бактеріофагів: здатності до руйнування клітинної стінки – лізису бактерій. У цьому процесі беруть участь білки холіни, які в запрограмований час утворюють отвори в плазматичній мембрані та дають змогу ендолізінам (муралітичним ферментам, що розщеплюють пептидоглікани клітинної стінки) почати процес руйнування [86, 87]. Ці ферменти також становлять інтерес у їхньому застосуванні як нові антибактеріальні агенти [86, 88, 89].

Бактеріофаги як протимікробні засоби є набагато більш вузькоспеціалізованими за антибіотики як лікарську категорію: під кожний окремий вид бактерії (іноді навіть штам) необхідно підібрати підходящого фага [86]. Через це поширеним підходом є створення так званих «коктейлів» із різних бактеріофагів з метою забезпечення більш широкого спектру дії. З огляду на таку вузьку направленість важливим є факт відсутності впливу фагової терапії на мікрофлору організму [90]. Проте ця їхня особливість також може розглядатися як недолік. Обмежувачими факторами також виступають недостатнє розуміння біології цих вірусів, питання щодо їхньої імуногенності та швидке формування резистентності до них [86, 91].

Різними дослідницькими групами було проведено різноманітні експериментальні роботи, що акцентували увагу саме на ефективності даного методу. Таким чином було продемонстровано, що наразі фаготерапія має переваги в профілактичному застосуванні до зараження птахів. Введення фагів різними способами, залежно від патогену, демонструє переважно зниження кількості бактерій з подальшим відновленням чисельності і незначне зниження смертності [92-94]. Проте новіші дослідження можуть змінити уявлення та вдосконалити протоколи лікування.

Пробіотики – це живі бактеріальні клітини, які є корисними для організму господаря, до таких відносять зокрема *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* і *Streptococcus*. Штами, що є пробіотичними, мають бути непатогенними, стійкими до умов шлунково-кишкового тракту, не нести генів стійкості до антибіотиків та мати низький потенціал до обміну генетичним матеріалом; крім того, важливою є здатність до продукування певних корисних метаболітів. Наразі досі не є встановленим механізм ефективності пробіотиків, проте існують деякі гіпотези, що намагаються це пояснити. Імовірно, пробіотичні штами здатні витіснити інші патогенні бактерії (принцип конкурентного витіснення) або продукувати поживні речовини, зокрема поліненасичені жирні кислоти та коротколанцюгові жирні кислоти, вітаміни, які модулюють вплив інших корисних бактерій мікрофлори на патогенні штами [95, 96]. Також вважається, що пробіотики сприяють активації вроджених та набутих імунних реакцій [97]. Застосування пробіотичних препаратів також впливає на приріст маси та коефіцієнт конверсії корму, збільшуючи їх [95].

Пребіотики – це вибірково ферментовані речовини, котрі можуть спричиняти зміни в складі та активності мікрофлори шлунково-кишкового тракту на користь організму-хазяїна [98]. Вони необхідні для забезпечення вищої продуктивності корисних бактерій, отже до пребіотиків відносять вітаміни, речовини з антиоксидантними властивостями, полісахариди та

олігосахариди [95]. Відомо, що пребіотики не можуть бути перетравлені бройлерами, проте кишкова мікрофлора здатна до їхньої метаболізації з подальшим отриманням коротколанцюгових жирних кислот. Було продемонстровано зниження чисельності *Campylobacter* завдяки застосуванню пребіотиків [99].

Синбіотики визначають як суміш пробіотиків та пребіотиків, що є корисною для підтримки мікрофлори шлунково-кишкового тракту завдяки великій кількості поживних речовин та бактерій, що здатні формувати сприятливе оточення у кишківнику [100]. Очікується, що комплексне застосування підсилює ефект. Наприклад, було продемонстровано, що метаболіти пробіотичної бактерії *L. casei* за присутності пребіотикоподібних речовин у вигляді фрагментів какаобобів та арахісу мають кращу здатність до виміщення *Salmonella*, *Listeria* та патогенної *E. coli* [96, 101]. Також значна увага дослідників сконцентрована на визначенні впливів синбіотиків, різних за складом та концентрацією – наслідком застосування цих засобів є підвищення кількостей корисних бактерій, пригнічення росту патогенних мікроорганізмів та присутність метаболітів, що мають позитивний вплив, а також з результатів випливає вища ефективність застосування синбіотиків, ніж пробіотиків або пребіотиків окремо [101-103].

Можливо, органічні кислоти можна включати до складу синбіотиків з метою досягнення ще кращого засвоювання поживних речовин за рахунок зниження рН у кишківнику птахів. Деякі дослідження повідомляють про зниження кількостей патогенних бактерій, зокрема *Salmonella* та *E. coli* на стінках кишківника [104].

Наночастинки (НЧ) – це частинки речовин, що мають властивості, відмінні від властивостей мікрочастинок та макрочастинок, а їхній діаметр складає 1-100 нм (проте іноді до них відносять і більші частинки з діаметром до 500 нм, нановолокна та нанотрубки) [105].

Наноматеріали, зокрема НЧ, пропонують новий підхід до боротьби із бактеріями за рахунок відсутності розвинутих механізмів захисту. Терапевтичний ефект наноматеріалів значною мірою походить від нанорозмірного обмеження, що поєднується з багатовалентними взаємодіями та високим співвідношенням поверхні до об'єму [106, стор. 2]. Різноманітність НЧ, а саме їхнього хімічного складу та їхніх властивостей, забезпечують відмінні між собою механізми протимікробної дії [106]. У класифікації НЧ найчастіше виділяють неорганічні, органічні та вуглецеві [107].

Неорганічні НЧ – це зазвичай НЧ металів, оксидів металів та квантові точки; так як ця група дуже різноманітна (включає оксиди або НЧ Au, Ag, Cu, Si, Al тощо), частинки відрізняються між собою за формою, стабільністю та розчинністю за різних фізичних умов навколишнього середовища [106]. Велика кількість нових робіт присвячена саме дослідженню протимікробних характеристик НЧ Ag та Au: показано, що НЧ срібла здатні утворювати пори у мембрані бактерій завдяки взаємодії із мембранними білками, впливати на продукування активних форм кисню, призводячи до загибелі клітини, а також проникати у бактеріальні біоплівки під впливом зміни кислотності середовища та накопичуватися у них [108, 109]. НЧ золота також здатні індукувати лізис клітини бактерії завдяки впливу електростатичних сил і пригніченню активності ферментативних реакцій [110, 111].

До органічних НЧ відносять в першу чергу ліпосоми та полімерні міцели. Ці сферичні везикули, що побудовані з двох фосфоліпідних шарів, можуть слугувати транспортними системами для доставки гідрофобних та гідрофільних протимікробних засобів [106].

Сили, що є домінуючими на нанорівні, а саме електростатичні, Ван-дер-Ваальса, гідрофобні та рецептор-ліганд взаємодії, є визначними у взаємодії із бактеріальними клітинами та механізмами їх знищення [106].

Антимікробні пептиди, отримані з МСК є багатообіцяючим терапевтичним засобом. Було виявлено, що МСК людини здатні продукувати певні фактори, що можуть руйнувати бактеріальні клітини (зокрема посередництвом інгібування синтезу клітинної стінки) [112, 113, 114]. Також продемонстровано ефективність даних пептидів проти МРЗС штамів [84]. Вірогідно, що даний підхід потребує подальших досліджень щодо перспектив отримання протимікробних секретів з МСК інших організмів з метою здешевлення.

Цікавим напрямком є поєднання властивостей бактеріофагів, плазмід та системи CRISPR-Cas з метою селективного видалення генів резистентності із бактерій. Таким чином, після впливу фагеміди, що несе CRISPR-Cas, бактеріальна популяція стає чутливою до впливу антибіотиків. За деякими даними, повторно сенсibiliзовані штами можуть бути наділені селективною перевагою. Незважаючи на перспективність підходу, значними обмеженнями є індукування змін у мікробному оточенні, ризик розвитку стійкості до системи CRISPR-Cas та обмежена кількість векторів для транспортування [84].

Імунотерапевтичні агенти – це біомолекули, які мають здатність формувати імунний захист проти інфекційних агентів, найпоширенішим із таких є гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ). Наразі даний глікопротеїн активно використовується для пацієнтів, які проходять хімотерапію, з метою підвищення різко зниженої кількості нейтрофілів – це дозволяє імунній системі справлятися з патогенами. У ветеринарії поширеним є використання бичачого Г-КСФ для великої рогатої худоби переважно для підтримки імунітету перед пологоми [84].

Що стосується біоремедіаційних підходів, вони є доцільними для покращення вже наявної ситуації. Найбільш підходящим є використання біологічних агентів (таких як гриби, бактерії тощо), адже це потребує відносно низьких фінансових та енергетичних витрат. Мікоремедіація, яка є зокрема цікавою, – це тип біоремедіації, суть якого полягає у використанні

грибів як агентів, що розщеплюють забрудники. Гриби здатні до біoadсорбції, біотрансформації, біодеградації та біомінералізації антибіотиків завдяки їхнім неспецифічним, нестереоселективним ферментативним системам [118, 119].

Компостування гною з ферм перед внесенням до ґрунту вважається підходящою практикою для видалення генів АБР, проте деякі з них зберігаються. Суть процесу полягає у впливі високих температур, що руйнують залишки антибіотиків; крім того, є можливим підвищення ефективності за рахунок регулювання рН, вологості та температури [38]. Проте перетворення гною у біовугілля шляхом піролізу вважається ще більш продуктивним у звільненні від генів АБР. Внесення отриманого пористого матеріалу і композитів на його основі дозволяє скоротити поширення набуття генів стійкості до рослинного мікробіому, що може бути пов'язано з обмеженням транспортування антибіотиків та важких металів, що можуть бути коселективними агентами [118, 120].

Очищення стічних вод з метою видалення генів АБР проводять за допомогою різних методів, зокрема флоакуляції, коагуляції, піщаної фільтрації, а також хлорування, озонування, ультрафіолетового опромінення, гетерогенного фотокаталізу, що спричиняють руйнування генів АБР активними формами кисню [38]. Хоч ці методи можуть бути недостатньо ефективними, сучасні дослідження не завжди відображають поширення АБР до ґрунтового середовища через зрошення угідь очищеними стічними водами [25, 121]. Імовірно, цей напрямок потребує додаткових досліджень.

- термостат;
- поживний агар;
- карболовий розчин генціан фіолетового;
- розчин Люголя;
- основний фуксин Циля;
- імерсійна олія;
- світловий мікроскоп Carton Micro Systems CM200 Series із максимальним збільшенням 400x та імерсійним об'єктивом;
- антибіотики (ампіцилін, стрептоміцин, рифампіцин).

Поживний агар є базовим універсальним середовищем, придатним для широкого застосування в лабораторних дослідженнях. Відсутність інгібіторів забезпечує ріст більшості бактерій. Склад поживного агару виробника ТОВ «Фармактив»:

- пептон ферментативний – 10 г/л;
- агар мікробіологічний – 10 г/л;
- натрій хлорид – 5 г/л;
- дріжджовий екстракт – 3 г/л.

2.2 Виділення мікробіомів ґрунту та води зі зразків

Для виділення мікробіомів з ґрунту та води було застосовано метод послідовних розведень із подальшим висіванням на чашки Петрі із поживним агаром. Поживний агар було обрано за рахунок його універсальності та доступності.

У ході виділення культур із ґрунту було зважено по 1 г ґрунту з обох зразків. До двох відповідно позначених пробірок, що містили по 10 мл 0,9% стерильного розчину NaCl, було додано підготовані наважки. Далі пробірки енергійно стряхували з метою ретельного перемішування та утворення суспензій. Після цього з кожної із двох пробірок було перенесено по 500 мкл до двох окремих позначених стерильних мікроцентрифужних пробірок. Таким чином, було отримано початкові розчини зразків (10^0). Ці

мікроцентрифужні пробірки також були ретельно струшені з метою запобігання осідання бактеріальних клітин.

Після цього було підготовано по три мікроцентрифужні пробірки, що містили по 900 мкл 0,9% стерильного розчину NaCl, для кожного зразка. Це було необхідно для проведення послідовних розведень із метою зменшення кількості мікроорганізмів перед посівом, адже 1 г ґрунту може містити до 10^{10} бактеріальних клітин [116].

Отже, за допомогою автоматичного дозатора зі стерильним наконечником було відібрано 100 мкл розчину із розведенням 10^0 і перенесено його в мікроцентрифужну пробірку із 900 мкл 0,9% стерильного розчину NaCl із позначкою 10^{-1} . Після цього отриманий розчин ретельно ресуспендували за допомогою автоматичного дозатора протягом 30 с. Процес послідовних розведень продовжували, приготувавши зразки з вмістом аналіту 10^{-2} та 10^{-3} . У результаті даних маніпуляцій було отримано по 4 мікроцентрифужні пробірки, що містили відповідні послідовні розведення (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) основного та контрольного зразків ґрунту. Дані мікроцентрифужні пробірки мали такі позначки: ПГ, ПГ1, ПГ2, ПГ3 – проба ґрунту із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; ПГк, ПГк1, ПГк2, ПГк3 – проба ґрунту контроль із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

Протокол для виділення культур зі зразків води є майже аналогічним. Попередньо бутелі зі зразками було ретельно струшено з метою рівномірного розподілу мікроорганізмів в об'ємі. По 1 мл води обох зразків було розведено у двох пробірках, що містили 9 мл 0,9% стерильного розчину NaCl, таким чином отримано розчини із розведенням 10^0 . 500 мкл кожного із цих розчинів було перенесено у дві відповідно позначені мікроцентрифужні пробірки. Після цього було підготовано по три мікроцентрифужні пробірки, що містили по 900 мкл 0,9% стерильного розчину NaCl, для кожного зразка.

За допомогою автоматичного дозатора зі стерильним наконечником було відібрано 100 мкл розведеного розчину із розведенням 10^0 і перенесено його в мікроцентрифужну пробірку із 900 мкл 0,9% стерильного розчину NaCl із позначкою 10^{-1} . Після цього отриманий розчин ретельно перемішували за допомогою автоматичного дозатора протягом 30 с. Процес серійних розведень продовжували, приготувавши зразки з вмістом аналіту 10^{-2} та 10^{-3} . У результаті даних маніпуляцій було отримано по 4 мікроцентрифужні пробірки, що містили відповідні послідовні розведення (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) основного та контрольного зразків води. Дані мікроцентрифужні пробірки мали такі позначки: ПВ, ПВ1, ПВ2, ПВ3 – проба води із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ; ПВк, ПВк1, ПВк2, ПВк3 – проба води контроль із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

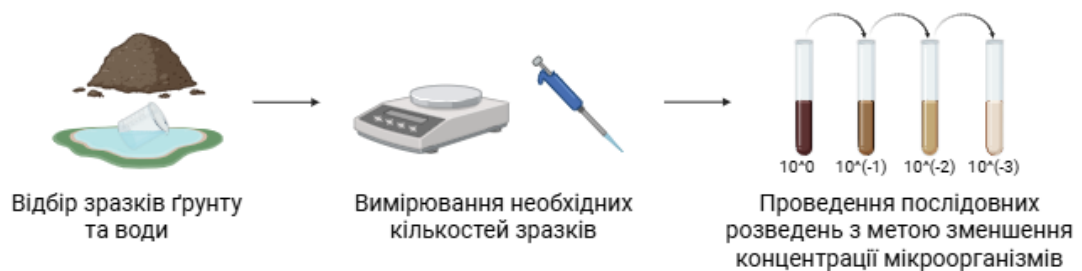


Рис. 2.2. Виділення мікробіомів ґрунту та води зі зразків [117]

2.3 Висівання та вирощування мікробіомів ґрунту та води зі зразків

Наступним етапом було приготування поживного агару для вирощування виділених культур. Було зважено 8,96 г поживного агару із розрахунку, що на заливку 16 чашок Петрі необхідно використати об'єм 320 мл. У попередньо стерилізований за допомогою скороварки (режим «пароварка», 60 хв, тиск «максимальний») бутель було додано складові середовища (суху зважену суміш та відміряну воду), після чого за допомогою поступового нагрівання мікрохвильовою піччю без допущення закипання увесь агар було розчинено. Далі поживний агар було стерилізовано з використанням скороварки протягом 60 хв. Показником

якісно проведеного процесу слугувала індикаторна стрічка для парової стерилізації.

Поки поживний агар вистигав до кімнатної температури, було проведено підготовку ламінарного боксу з метою розливу середовища по чашках у стерильних умовах. Для цього ламінарний бокс було протерто із використанням 70% спирту, далі було внесено всі необхідні для подальшого використання матеріали. Після висування фронтальної панелі було увімкнено УФ-лампу всередині на 10 хв. По завершенню циклу УФ опромінення було ввімкнено ламінарний потік повітря для того, аби перешкодити потраплянню контамінантів всередину боксу. Поживний агар було розлито по одноразових чашках Петрі, які потім було підписано відповідними позначками із зазначенням дати.

Наступним етапом було проведено висівання підготованих розведених розчинів зразків. Для цього по 100 мкл вмісту кожної мікроцентрифужної пробірки було перенесено за допомогою автоматичного дозатора на відповідно позначену чашку Петрі і розподілено штриховими рухами за допомогою одноразової петлі. Засіяні чашки було поміщено в термостат за температури 30 °C на дві доби. По завершенню культивування отримані культури було сфотографовано та охарактеризовано (додаток А).

2.4 Метод штрихових посівів з метою ізоляції чистих культур

Метод штрихових посівів (в англійській літературі – streak plate method) – це мікробіологічний метод, який застосовують з метою ізоляції чистих культур. Даний підхід було застосовано до обраних колоній (колоній інтересу) з чашок, вирощених на попередньому етапі роботи. Для цього попередньо було підготовано 15 чашок Петрі із поживним агаром за такими розрахунками: 8,4 г середовища було розчинено та зварено у 300 мл дистильованої води. Чашки Петрі були відповідно підписані позначкою зразка (ПГ, ПГк, ПВ, ПВк) та умовними характеристиками колоній, що були обрані для ізоляції. Посів проводили наступним чином: обрану колонію

інтересу набирали одноразовою стерильною петлею і розподіляли на $\frac{1}{4}$ чашки від краю до центру швидкими штриховими рухами. Далі чашку обертали проти годинникової стрілки на 90° , ставили ту саму петлю край попередніх штрихів і продовжувати робити штрихові рухи від краю до центру. Цю процедуру розподілу інокуляту продовжували з метою заповнення усіх третього сектору чашки. Під час заповнення четвертого квадранта було зроблено декілька менш щільних штрихів з метою забезпечення більшого простору між ними для формування окремих колоній.

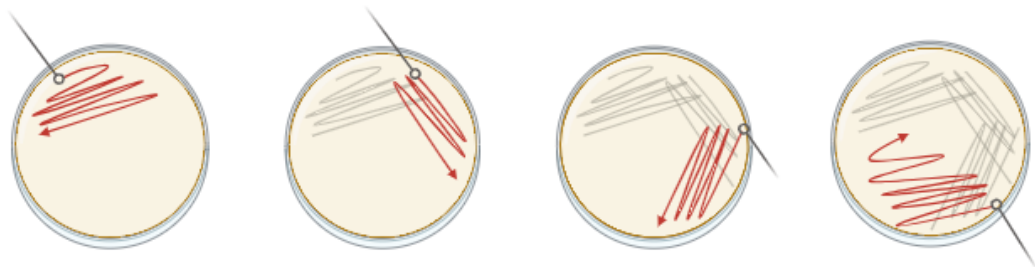


Рис. 2.3. Послідовність виконання методу штрихових посівів з метою ізоляції чистих культур [117]

Засіяні чашки були поміщені в термостат за температури 30°C на дві доби. Фотофіксацію задля характеристики динаміки росту проводили кожні 12 годин протягом двох діб (додаток Б).

За фото ізольованих культур, отриманими протягом культивування, за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.52k було визначено площу росту виділених бактеріальних культур. Далі швидкість приросту культури клітин підраховували за формулою:

$$\text{Швидкість приросту} = \frac{S_{\text{кінц}} - S_{\text{поч}}}{T}, [\text{мм}^2/\text{год}],$$

де $S_{\text{кінц}}$ – кінцева площа на момент закінчення культивування (48 год), яку займає бактеріальна культура, $[\text{мм}^2]$;

$S_{\text{поч}}$ – початкова площа, яку займає бактеріальна культура на момент першої фотофіксації (12 год), $[\text{мм}^2]$;

T – час культивування, $[\text{год}]$.

2.5 Створення фіксованих мазків та фарбування їх за Грамом

З метою ідентифікації бактерій, отриманих у вигляді ізольованих культур, було створено та пофарбовано мазки. Створення фіксованих мазків відбувалося наступним чином: предметне скло знежирювали, підписували, після чого наносили краплю дистильованої води за допомогою піпетки Пастера об'ємом 3 мл, у цій краплі за допомогою одноразової стерильної петлі розчиняли колонію, відібрану з чашки з ізольованою культурою. Після розчинення предметне скло висушували природним шляхом за кімнатної температури. Після висихання мазок фіксували за допомогою полум'я газового пальника, проводячи лицьовою стороною мазка крізь вогонь по декілька разів. Температуру нагрівання скла контролювали, прикладаючи його тильним боком до тильної поверхні кисті. Таким чином, отримували термічно фіксовані мазки, готові до фарбування.

Фарбування за Грамом проводилося за допомогою комерційного набору реагентів ТОВ «ВФ Сіместа». Перед проведенням фарбування було підготовано пробірку зі спиртом та дистильованою водою, а також приготовано робочий розчин фуксину Пфейфера згідно з інструкцією. Для цього 100 мкл концентрованого розчину основного фуксину Ціля було розведено у 900 мкл дистильованої води. Після завершення підготовчого етапу переходили безпосередньо до фарбування: на мазок клали смужку фільтрувального паперу і наносили 2-3 краплі карболового розчину генціана фіолетового, який витримували 2 хв. Далі фільтрувальний папір видаляли та наносили 2-3 краплі розчину Люголя в якості фіксатора, що витримували 1 хв. Залишки первинного барвника та розчину Люголя зливали, після чого проводили знебарвлення за допомогою 96% розчину етилового спирту протягом 45 с. Далі мазок промивали дистильованою водою та покривали 2-3 краплями підготованого попередньо водного розчину основного фуксину Ціля, що виступає контрбарвником, його витримували протягом 2 хв. Опісля залишки барвника зливали, мазки ретельно промивали дистильованою водою та висушували на повітрі. У результаті було

отримано фіксовані фарбовані мазки, де грампозитивні бактерії мали синьо-фіолетове забарвлення, а грамнегативні – рожево-червоне.

Після цього було проведено мікроскопування із використанням світлового мікроскопу Carton Micro Systems CM200 Series із максимальним збільшенням 400x та імерсійним об'єктивом.

2.6 Метод дискової дифузії в агарі

Метод дискової дифузії в агарі широко застосовується у лабораторній практиці з метою встановлення протимікробної активності антибіотиків стосовно конкретних штамів. Цей підхід є простим, економічно вигідним та робить можливим порівняльний аналіз із використанням декількох антибіотиків одночасно. Аналіз є якісним та за використання стандартизованого протоколу дозволяє отримувати відносно узгоджені результати, що полегшує порівняння даних із різних досліджень та лабораторій [122].

Антибіотики ампіцилін, стрептоміцин та рифампіцин були обрані через їхнє застосування у практиці птахівництва з метою профілактики та лікування інфекційних хвороб, а також різні механізми їхньої дії. Ампіцилін є напівсинтетичним β -лактамним антибіотиком групи пеніцилінів, що має ефективність як проти грамнегативних, так і грампозитивних бактерій, зокрема *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp. Суть його дії заснована на пригніченні синтезу клітинної стінки, тому ампіцилін не є дієвим проти мікроорганізмів, що продукують β -лактамазу [123, 124]. Стрептоміцин відноситься до групи аміноглікозидів першого покоління, що пригнічує синтез білків за рахунок зв'язування з 30S субодиницею рибосоми. Він є ефективним проти *Mycobacterium tuberculosis*, більшості грамнегативних бактерій, як *E. coli*, *Salmonella* spp., а також деяких грампозитивних мікроорганізмів, як *Staphylococcus* spp. [125, 126]. Рифампіцин – це антибіотик, що належить до групи рифаміцинів; механізм його дії полягає в інгібуванні ДНК-залежної РНК-полімерази бактерії через

зв'язування з її β -субодиницею, що пригнічує подовження ланцюга РНК і перешкоджає процесу транскрипції. Рифампіцин застосовують для боротьби з широким спектром грампозитивних коків, в тому числі *Clostridium difficile*, а також специфічних грамнегативних бактерій [127, 128].

Для реалізації методу дискової дифузії в агарі було попередньо підготовано 15 чашок Петрі з поживним агаром, для чого було зважено 8,4 г середовища та відміряно 300 мл дистильованої води. Ці складові було змішано у попередньо простерилізованому бутелі та приготовано із застосуванням мікрохвильової печі. Опісля готове середовище стерилізували за допомогою скороварки протягом 60 хв (режим «пароварка», тиск «максимальний»). Показником якісно проведеного процесу слугувала індикаторна стрічка для парової стерилізації. Поживний агар було розлито по чашках в асептичних умовах ламінарного боксу, який було підготовано обробкою 70% етиловим спиртом та УФ-опроміненням протягом 10 хв.

Для підготовки тест-дисків завчасно були підготовані стокові розчини даних антибіотиків у таких концентраціях: ампіцилін – 100 мг/мл, стрептоміцин – 100 мг/мл, рифампіцин – 50 мг/мл. Таким чином, для приготування 5 мл розчину ампіциліну концентрацією 100 мг/мл було зважено 500 мг ампіциліну, які розчинили у 5 мл дистильованої води. Після того розчин було стерилізовано за допомогою шприцевого фільтру з розміром пор 0,22 мкм та розподілено по декількох відповідно підписаних мікропробірках з гвинтовими кришками. Для приготування 5 мл розчину стрептоміцину концентрацією 100 мг/мл було зважено 500 мг стрептоміцину, які розчинили у 5 мл дистильованої води. Після того розчин було стерилізовано за допомогою шприцевого фільтру з розміром пор 0,22 мкм та розподілено по декількох відповідно підписаних мікропробірках з гвинтовими кришками. Для приготування 5 мл розчину рифампіцину концентрацією 50 мг/мл було зважено 250 мг рифампіцину, які розчинили у

5 мл дистильованої води. Після того розчин було стерилізовано за допомогою шприцевого фільтру з розміром пор 0,22 мкм та розподілено по декількох відповідно підписаних мікропробірках з гвинтовими кришками.

Далі зі стокових розчинів були підготовані робочі розчини антибіотиків за даними EUCAST [129, 130]. Було обрано такі концентрації для застосування на тест-дисках: 1 мг/мл для ампіциліна (по 10 мкг на один тест-диск), 2,5 мг/мл для стрептоміцину (по 25 мкг на один тест-диск), 0,5 мг/мл для рифампіцину (по 5 мкг на один тест-диск). Для приготування робочих розчинів було проведено розрахунки за формулою розведень $C_1V_1=C_2V_2$. Таким чином, для просочування тест-дисків розчином ампіциліну, що містить 10 мкг речовини у об'ємі 10 мкл, було взято 20 мкл стокового розчину ампіциліну (100 мг/мл) та 1980 мкл дистильованої води. Розчин ресуспензували, після чого повторно стерилізували за допомогою шприцевого фільтру з розміром пор 0,22 мкм. З метою просочування тест-дисків розчином стрептоміцину, що містить 25 мкг речовини у об'ємі 10 мкл, було взято 20 мкл стокового розчину стрептоміцину (100 мг/мл) та 780 мкл дистильованої води. Розчин ресуспензували, після чого повторно стерилізували за допомогою шприцевого фільтру з розміром пор 0,22 мкм. Для просочування тест-дисків розчином рифампіцину, що містить 5 мкг речовини у об'ємі 10 мкл, було взято 20 мкл стокового розчину рифампіцину (50 мг/мл) та 1980 мкл дистильованої води. Розчин ресуспензували, після чого повторно стерилізували за допомогою шприцевого фільтру з розміром пор 0,22 мкм.

Тест-диски діаметром 6 мм, зроблені з фільтрувального паперу за допомогою діркопробивача, схематично позначали (Amp – ампіцилін, Strep – стрептоміцин, Rif – рифампіцин) та просочували відповідними робочими розчинами антибіотиків. Готові тест-диски сушили в асептичних умовах ламінарного боксу. Залишки стокових та робочих розчинів антибіотиків зберігали у морозильній камері для майбутніх експериментальних робіт.

Далі раніше виділені ізолювані культури пересівали. Для цього у стерильних умовах ламінарного боксу для кожної чистої культури готували інокулят, розчиняючи у 2 мл 0,9% стерильного розчину NaCl 3-4 колонії середнього розміру з чашки за допомогою одноразових стерильних петель. Далі цей посівний матеріал висівали на підготовані чашки Петрі за допомогою стерильних бавовняних аплікаторів щільними штриховими рухами у трьох напрямках; процес реалізовували у ламінарному боксі, чашки підписували.

Тест-диски розміщували на засіяних чашках за допомогою пінцету. Пінцет протирали 70% розчином етилового спирту після завершення викладання тест-дисків, просочених кожним окремим антибіотиком. Чашки було поміщено у термостат за температури 35 °С, де вони культивувалися протягом 20 год (додаток В).

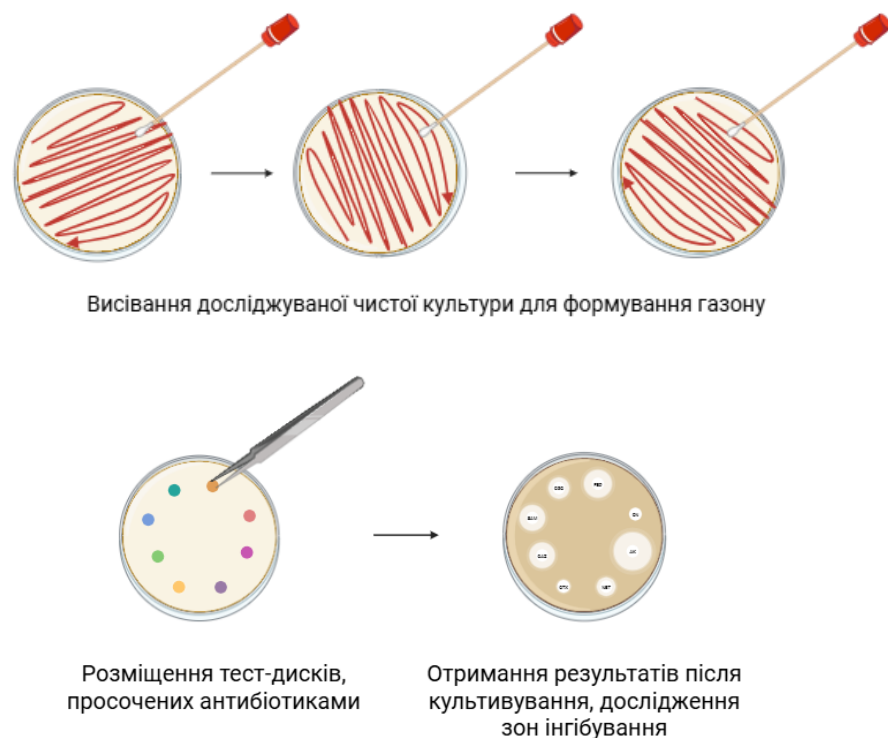


Рис. 2.4. Метод дискової дифузії в агарі [117]

По завершенню культивування при оцінці антибактеріальної активності застосовували такі критерії:

- відсутність зони затримки росту мікроорганізмів навколо диска вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до препарату або концентрації застосованого антибіотика;
- зона затримки росту діаметром 5-8 мм вказує на низьку чутливість культури до випробуваної концентрації антимікробної речовини;
- зона затримки росту діаметром 9-14 мм розцінюється як показник чутливості мікроорганізму до застосованої концентрації випробовуваної речовини;
- зона затримки росту, діаметр якої перевищує 15 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваної концентрації протимікробної речовини.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Результати висівання та вирощування мікробіому ґрунту і води зі зразків

У результаті культивування протягом 48 годин за температури 30 °С було отримано культури зі зразками відповідних послідовних розведень 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (додаток А). Для надання характеристики з метою демонстрації різноманіття мікробіомів ґрунту та води було обрано чашки, що містили культури із найбільшим розведенням (10^{-3}).

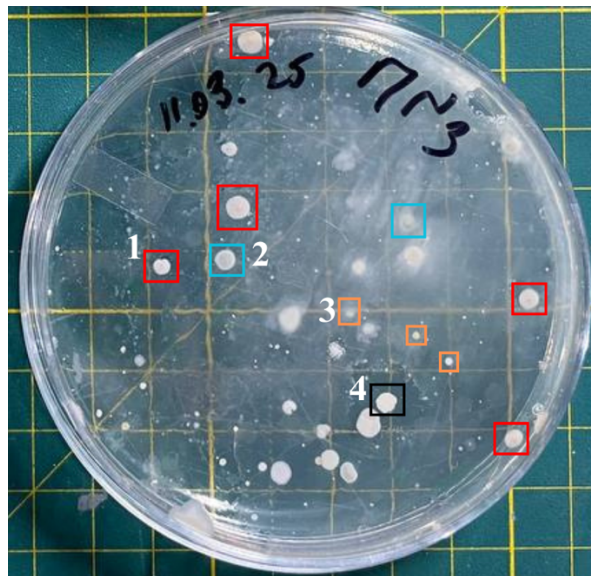


Рис. 3.1. Фото чашки з мікробіомом ґрунту із розведенням 10^{-3} , де 1 вказує на морфологічно ідентичні колонії, обведені червоними квадратами, 2 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені блакитними квадратами, 3 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені помаранчевими квадратами, 4 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені чорними квадратами

Зразок ППЗ демонструє ріст поодиноких колоній мінімум трьох різних видів бактерій, а також, імовірно, ріст дріжджів суцільною напівпрозорою плівкою без чітко виражених колоній. Нижче наведено характеристику колоній, позначених на рис. 3.1.

Колонії 1 (обведені червоними квадратами) є білими колоніями правильно круглої форми середніх та великих розмірів (від 3 до 5 мм), їхній

рельєф плаский, поверхня гладка, блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї хвилясті, структура гомогенна, консистенція слизова.

Колонії 2 (обведені блакитними квадратами) є молочними колоніями правильної круглої форми середніх розмірів (~2,5–3 мм), їхній рельєф плаский, поверхня округла з валиком по краю, блискуча; дані колонії є напівпрозорими, їхні краї вийчасті, структура крупнозерниста, консистенція тістоподібна.

Колонії 3 (обведені помаранчевими квадратами) є жовтуватими колоніями правильної круглої форми дрібних розмірів (1–2 мм), їхній рельєф опуклий, поверхня гладка та блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї рівні, структура гомогенна, консистенція суха.

Колонія 4 (обведена чорним квадратом) є білою колонією амебоподібної форми середнього розміру (~3,5 мм), її рельєф кратероподібний, поверхня звивиста, тьмяна; ця колонія непрозора, її краї рівні, структура дрібнозерниста, консистенція суха. Цікаво, що дана колонія інгібувала ріст, імовірно, дріжджів, що покривали більшу частину площі чашки.

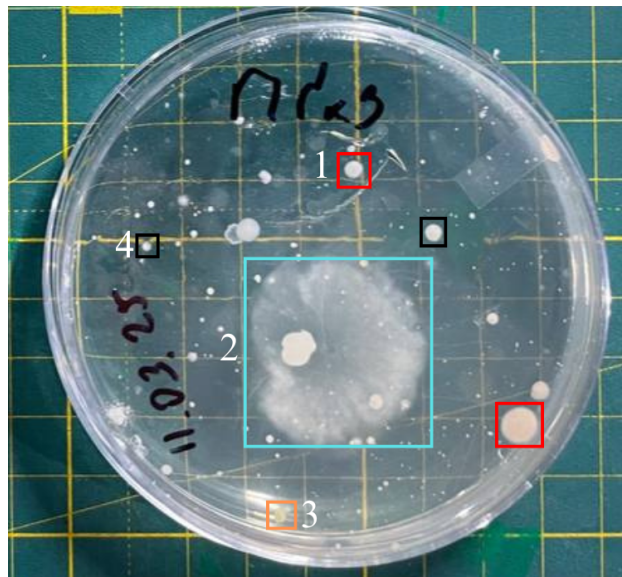


Рис. 3.2. Фото чашки з мікробіомом контрольного зразка ґрунту із розведенням 10^{-3} , де 1 вказує на морфологічно ідентичні колонії, обведені червоними квадратами, 2 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені

блакитними квадратами, 3 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені помаранчевими квадратами, 4 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені чорними квадратами

Зразок Пк3 демонструє ріст поодиноких колоній мінімум трьох різних видів бактерій, а також ріст цвілевого гриба. Нижче наведено характеристику колоній, позначених на рис. 3.2.

Колонії 1 (обведені червоними квадратами) є білими колоніями правильно круглої форми середніх та великих розмірів (від 3 до 6 мм), їхній рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї ворсинчасті, структура гомогенна, консистенція слизова.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є цвілевим грибом. Вона білого кольору, нерівномірної округлої форми, у діаметрі ~30 мм, консистенція повстяна, темп росту швидкий.

Колонія 3 (обведена помаранчевим квадратом) є жовтуватою колонією округлої форми середнього розміру (~3 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, тьмяна; дана колонія є непрозорою, її краї рівні, структура гомогенна, консистенція тістоподібна.

Колонії 4 (обведені чорними квадратами) є білими колоніями правильно круглої форми дрібного та середнього розмірів (2–3 мм), їхній рельєф куполоподібний, поверхня гладка, блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї рівні, структура гомогенна, консистенція слизова.

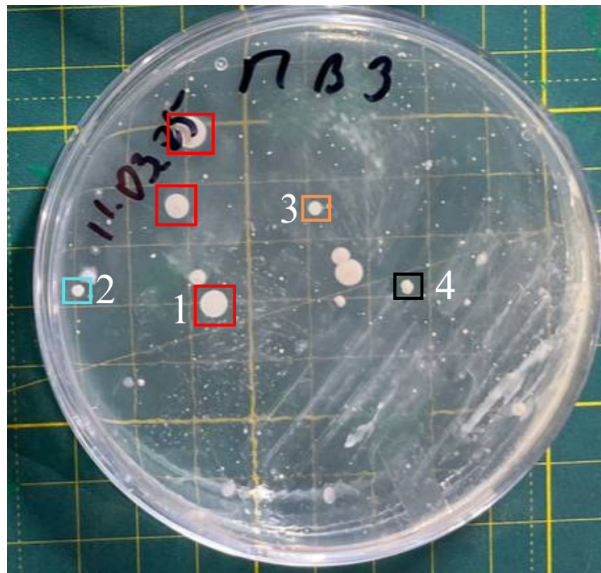


Рис. 3.3. Фото чашки з мікробіомом води із розведенням 10^{-3} , де 1 вказує на морфологічно ідентичні колонії, обведені червоними квадратами, 2 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені блакитними квадратами, 3 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені помаранчевими квадратами, 4 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені чорними квадратами

Зразок ПВЗ демонструє ріст поодиноких колоній мінімум трьох різних видів бактерій, а також, імовірно, ріст дріжджів суцільною напівпрозорою плівкою без чітко виражених колоній. Нижче наведено характеристику колоній, позначених на рис. 3.3.

Колонії 1 (обведені червоними квадратами) є білими колоніями правильно круглої форми середніх та великих розмірів (від 3 до 5 мм), їхній рельєф плаский, поверхня гладка, блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї хвилясті, структура гомогенна, консистенція слизова.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є жовтуватою колонією округлої форми дрібного розміру (~2 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є непрозорою, її краї ворсинчасті, структура гомогенна, консистенція тістоподібна.

Колонія 3 (обведена помаранчевим квадратом) є молочною колонією правильної круглої форми середнього розміру (~3 мм), її рельєф плаский, поверхня округла з валиком по краю, блискуча; дана колонія є

напівпрозорою, її краї хвилясті, структура дрібнозерниста, консистенція тістоподібна.

Колонія 4 (обведена чорним квадратом) є білою колонією амебоподібної форми середнього розміру (~2,5 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладенька, блискуча; ця колонія непрозора, її краї хвилясті, структура дрібнозерниста, консистенція суха. Дана колонія інгібувала ріст, імовірно, дріжджів, що покривали більшу частину площі чашки.

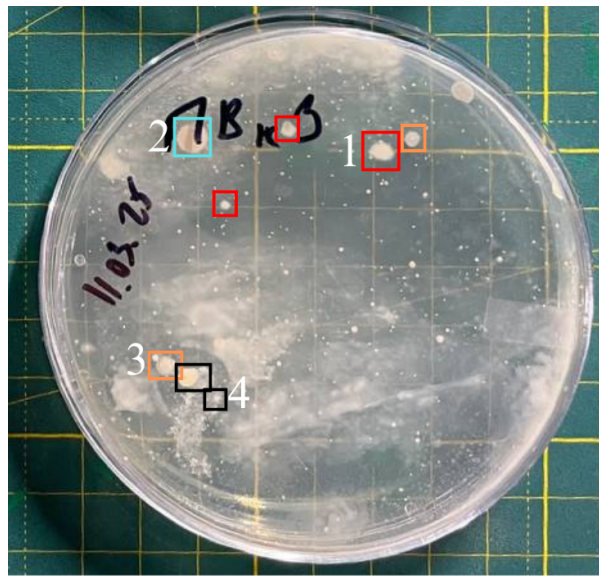


Рис. 3.4. Фото чашки з мікробіомом контрольного зразка води із розведенням 10^{-3} , де 1 вказує на морфологічно ідентичні колонії, обведені червоними квадратами, 2 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені блакитними квадратами, 3 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені помаранчевими квадратами, 4 – на морфологічно ідентичні колонії, обведені чорними квадратами

Зразок ПВк3 демонструє ріст поодиноких колоній мінімум чотирьох різних видів бактерій, а також, імовірно, ріст дріжджів суцільною напівпрозорою плівкою без чітко виражених колоній. Нижче наведено характеристику колоній, позначених на рис. 3.4.

Колонії 1 (обведені червоними квадратами) є білими колоніями неправильної амебоподібної форми дрібних та середніх розмірів (від 1 до 4

мм), їхній рельєф плаский, поверхня гладенька, блискуча; дані колонії напівпрозорі, їхні краї хвилясті, структура дрібнозерниста, консистенція суха.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є молочною колонією правильної круглої форми великого розміру (~5 мм), її рельєф плаский, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є напівпрозорою, її краї лопатеві, структура гомогенна, консистенція слизова.

Колонія 3 (обведена помаранчевим квадратом) є молочною колонією правильної круглої форми дрібного розміру (~2 мм), її рельєф кратероподібний, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є напівпрозорою, її краї лопатеві, структура дрібнозерниста, консистенція тістоподібна.

Колонії 4 (обведені чорними квадратами) є молочно-білими колоніями правильно круглої форми дрібного та середнього розміру (від 1 до 3 мм), їхній рельєф опуклий, поверхня гладенька, блискуча; дані колонії непрозорі, їхні краї хвилясті, структура гомогенна, консистенція слизова.

Загалом аналіз культур продемонстрував велику різноманітність мікроорганізмів у даних мікробіомах, що створює підґрунтя для проведення подальших етапів роботи із можливістю відбору колоній інтересу.

Нижче буде розглянуто колонії, обрані для ізоляції.

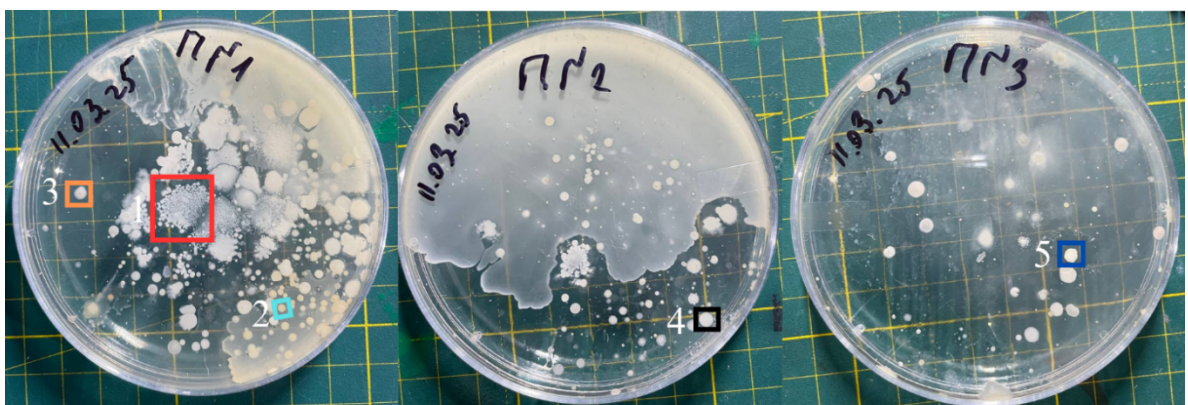


Рис. 3.5. Фото чашок з мікробіомом ґрунту із розведенням 10^{-1} , 10^{-2} та 10^{-3} , з яких було ізольовано культури, де 1 вказує на обрану колонію, обведену червоним квадратом, 2 – на обрану колонію, обведену блакитним квадратом, 3 – на обрану колонію, обведену помаранчевим квадратом, 4 –

на обрану колонію, обведену чорним квадратом, 5 – на обрану колонію, обведену синім кольором

Колонії 1 (обведені червоним квадратом) є білими колоніями правильно круглої форми дрібних розмірів (до 1 мм), їхній рельєф пласкоопуклий, поверхня шорстка, блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї хвилясті, структура дрібнозерниста, консистенція слизова.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є жовтуватою колонією правильної круглої форми дрібних розмірів (~1,5 мм), її рельєф опуклий, поверхня гладка та блискуча; дана колонія є непрозорою, її краї рівні, структура крупнозернистою, консистенція суха.

Колонія 3 (обведена помаранчевим квадратом) є білою колонією округлої форми середнього розміру (~2,5 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, блискуча; ця колонія непрозора, її краї волокнисті, структура гомогенна, консистенція тістоподібна.

Колонія 4 (обведена чорним квадратом) є білою колонією круглої форми середнього розміру (~3 мм), її рельєф плаский, поверхня бородавчаста, з валиком по краю, блискуча; дані колонії є непрозорими, їхні краї хвилясті, структура крупнозерниста, консистенція слизова.

Колонія 4 (обведена синім квадратом) є білою колонією амебоподібної форми середнього розміру (~3,5 мм), її рельєф кратероподібний, поверхня звивиста, тьмяна; ця колонія непрозора, її краї рівні, структура дрібнозерниста, консистенція суха.

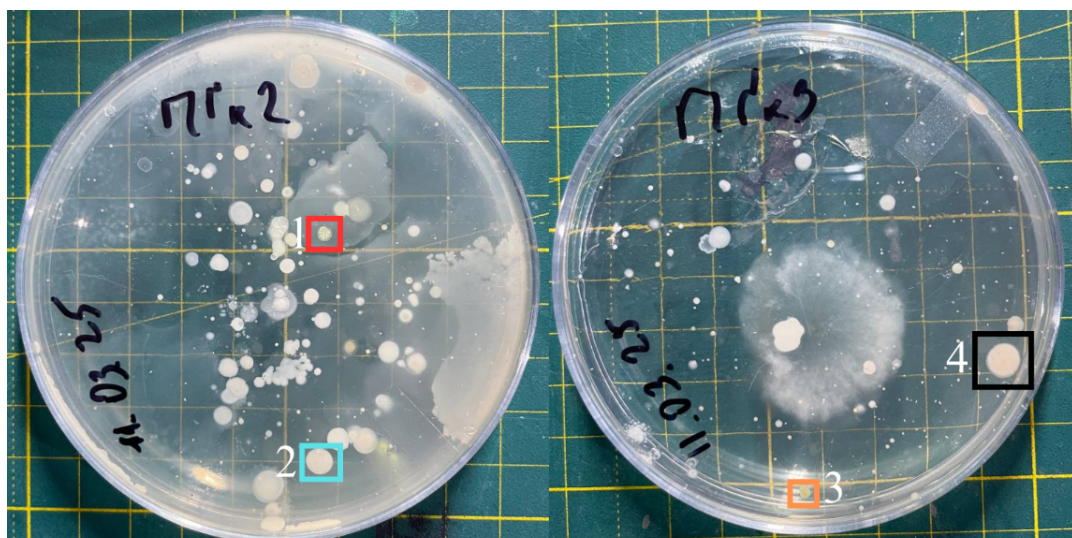


Рис. 3.6. Фото чашок з мікробіомом контрольного зразка ґрунту із розведенням 10^{-2} та 10^{-3} , з яких було ізольовано культури, де 1 вказує на обрану колонію, обведену червоним квадратом, 2 – на обрану колонію, обведену блакитним квадратом, 3 – на обрану колонію, обведену помаранчевим квадратом, 4 – на обрану колонію, обведену чорним квадратом

Колонія 1 (обведена червоним квадратом) є жовтуватою колонією округлої форми дрібного розміру (~ 2 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня складчаста, блискуча; дана колонія є напівпрозорою, її краї рівні, структура дрібнозерниста, консистенція тістоподібна.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є молочно-білою колонією круглої форми великого розміру ($\sim 3,5$ мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є непрозорою, її краї гладенькі, структура гомогенна, консистенція слизова.

Колонія 3 (обведена помаранчевим квадратом) є жовтуватою колонією округлої форми середнього розміру (~ 3 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, тьмяна; дана колонія є непрозорою, її краї рівні, структура гомогенна, консистенція тістоподібна.

Колонія 4 (обведена чорним квадратом) є білою колонією круглої форми великого розміру (~ 5 мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка,

блискуча; дана колонія є непрозорою, її краї ворсинчасті, структура гомогенна, консистенція слизова.

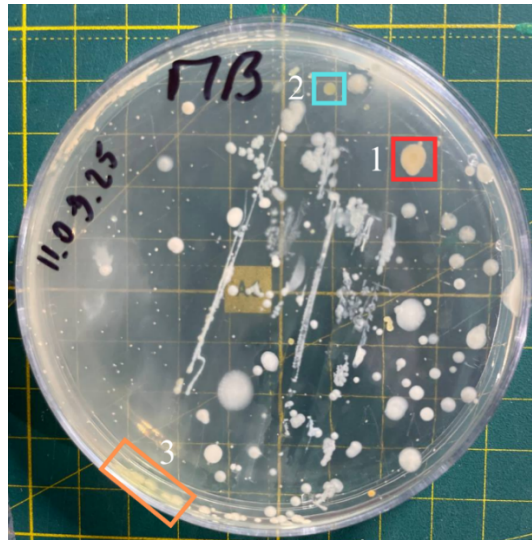


Рис. 3.7. Фото чашки з мікробіомом води із розведенням 10^0 , з якої було ізольовано культури, де 1 вказує на обрану колонію, обведену червоним квадратом, 2 – на обрану колонію, обведену блакитним квадратом, 3 – на обрану колонію, обведену помаранчевим квадратом

Колонія 1 (обведена червоним квадратом) є молочно-жовтуватою колонією правильної круглої форми середнього розміру (~ 3 мм), її рельєф плаский, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є непрозорою, її краї гладенькі, структура дрібнозерниста, консистенція слизова.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є жовтою колонією витягнутої форми дрібного розміру ($\sim 1,5$ мм), її рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є напівпрозорою, її краї хвилясті, структура дрібнозерниста, консистенція тістоподібна.

Колонії 3 (обведені помаранчевим квадратом) є жовтими колоніями правильної круглої форми дрібного розміру (до 1 мм), їхній рельєф пласкоопуклий, поверхня гладка, блискуча; дані колонії напівпрозорі, їхні краї гладкі, структура гомогенна, консистенція суха.

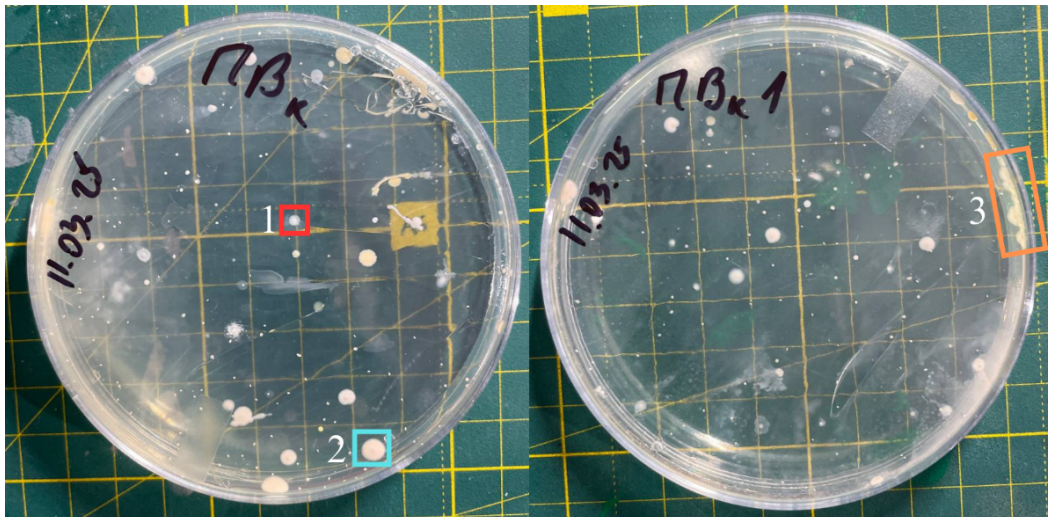


Рис. 3.8. Фото чашок з мікробіомом контрольного зразка води із розведенням 10^0 та 10^{-1} , з яких було ізольовано культури, де 1 вказує на обрану колонію, обведену червоним квадратом, 2 – на обрану колонію, обведену блакитним квадратом, 3 – на обрану колонію, обведену помаранчевим квадратом

Колонія 1 (обведена червоним квадратом) є молочною колонією правильної круглої форми дрібного розміру ($\sim 1,5$ мм), її рельєф кратероподібний, поверхня гладка, блискуча; дана колонія є напівпрозорою, її краї хвилясті, структура дрібнозерниста, консистенція тістоподібна.

Колонія 2 (обведена блакитним квадратом) є білою колонією правильно круглої форми середнього розміру (~ 3 мм), її рельєф плаский, поверхня гладенька, блискуча; дані колонії непрозорі, їхні краї хвилясті, структура гомогенна, консистенція слизова.

Колонії 3 (обведені помаранчевим квадратом) є жовтуватими колоніями округлої форми дрібного розміру (до 2 мм), їхній рельєф плаский, поверхня гладка, блискуча; дані колонії є напівпрозорими, їхні краї гладкі, структура крупнозерниста, консистенція тістоподібна.

3.2 Результати ізоляції чистих культур

За допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.52к було визначено площі росту чистих культур, які наведені у таблиці нижче.

Таблиця 3.1

**Обчислення площі росту ізолюваних культур, що відображає
кількісний ріст бактерій**

Позначення чашки	Загальна площа культури у чашці, мм ²			
	12 год	24 год	36 год	48 год
ПГ1 Скупчення білих дрібних колоній	3200,22	3648,094	3657,639	3800,652
ПГ1 Біла колонія дрібна	371,399	1691,847	2151,044	2377,789
ПГ1 Жовтуваті колонії на дріжджах	812	1932,018	4298,904	5615,516
ПГ2 Білі колонії	344,384	1451,541	1473,524	1755,437
ПГ3 Біла колонія амебоподібна				
ПГк2 Велика біла колонія	2075,885	3437,058	4342,113	4515,83
ПГк2 Жовтувата складчаста колонія				
ПГк3 Велика біла колонія	3266,437	3873,006	4759,613	4777,847
ПГк3 Дрібні жовтуваті колонії		2053,958	3438,054	5037,962
ПВ Жовті колонії	295,532	1804,694	2509,199	1962,814
ПВ Кругла молочна колонія	1003,327	1843,662	2465,995	2406,428
ПВ Жовта дрібна колонія			1406,222	1888,017
ПВк Молочні колонії середні			1760,313	4662,321
ПВк Білі колонії	1006,718	2890,508	3717,382	3734,994
ПВк1 Жовтуваті колонії	288,62	2698,905	2715,009	3384,055

Повна або часткова відсутність характеристики деяких чашок обумовлена труднощами з фотофіксацією деяких ізолятів (вони були прозорими), а також порушенням методики посіву ізолятів (попередньо заготовані чашки, котрі містили конденсат, не були просушені в асептичних умовах).

За отриманими даними площі було обчислено швидкість приросту культур клітин. Розраховані дані динаміки росту наведено на рис. 3.9.

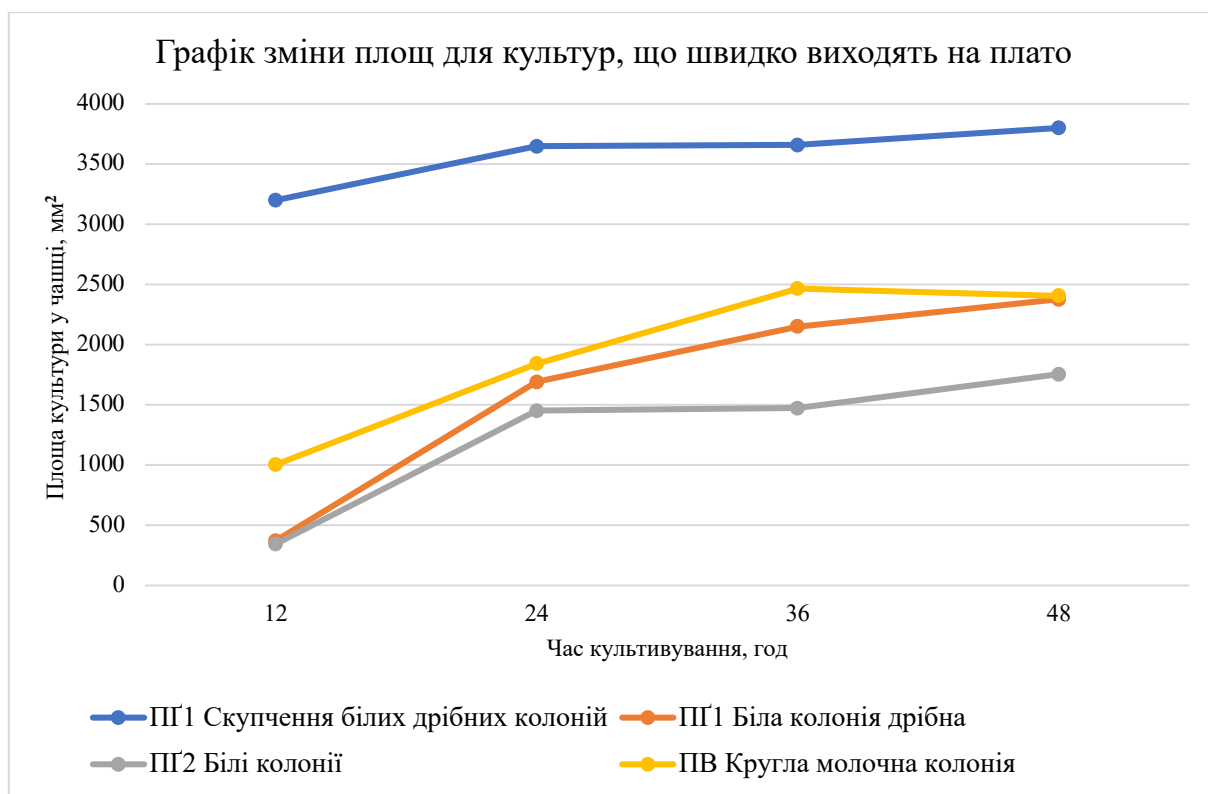
Рис. 3.9. Швидкість приросту культур клітин, мм²/год

Рис. 3.10. Графік зміни площ для культур, що швидко виходять на плато



Рис. 3.11. Графік зміни площ для культур, що збільшують площу з середньою швидкістю

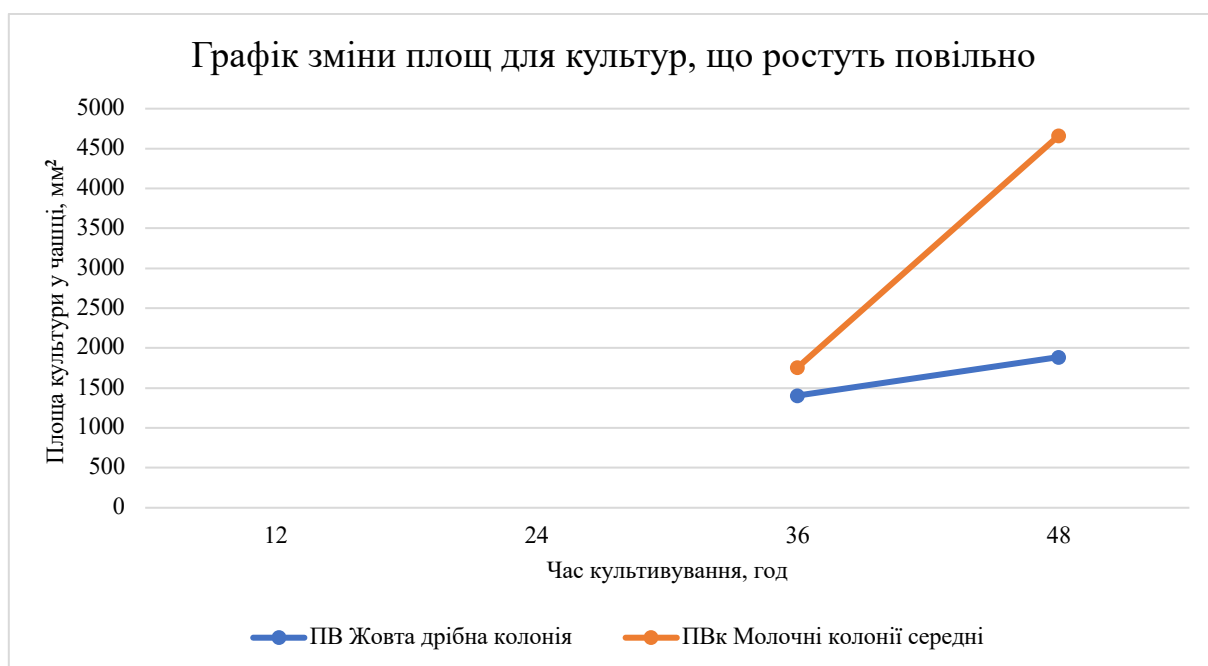


Рис. 3.12. Графік зміни площ для культур, що ростуть повільно

Усі культури можна розділити на 3 групи за швидкістю зростання:

- культури, що швидко виходять на плато;
- культури, що збільшують площу з середньою швидкістю;

- культури, що ростуть повільно.

Культури, що швидко виходять на плато, характеризуються тим, що стрімко досягають максимальної площі росту і опісля практично припиняють ріст, їхня метаболічна активність є високою на початкових етапах, вони швидко споживають поживні речовини та показують щільний ріст. До представників таких цієї групи можна віднести культури ПГ1 Скупчення білих дрібних колоній, ПГ1 Біла колонія дрібна, ПГ2 Білі колонії, ПВ Кругла молочна колонія.

Культури, що збільшують площу з середньою швидкістю, демонструють поступовий рівномірний ріст протягом культивування, до таких можна віднести культури ПГ1 Жовтуваті колонії на дріжджах, ПГк2 Велика біла колонія, ПГк3 Велика біла колонія, ПГк3 Дрібні жовтуваті колонії, ПВ Жовті колонії, ПВк Білі колонії, ПВк1 Жовтуваті колонії.

Культури, що ростуть повільно, характеризуються низьким приростом площі за одиницю часу, а також повільним метаболізмом або потребою в спеціальних умовах культивування. До цієї категорії можна віднести культури ПВ Жовта дрібна колонія, ПВк Молочні колонії середні, що продемонстрували стрибок росту в останні 12 годин культивування.

Культури ПГ3 Біла колонія амебоподібна та ПГк2 Жовтувата складчаста колонія, скоріше за все, можна віднести до колоній, що збільшують площу з середньою швидкістю, адже вони поступово утворювали суцільний газон.

3.3 Результати створення фіксованих мазків та фарбування за Грамом

Після створення фіксованих мазків та їхнього фарбування було проведено мікроскопування із використанням світлового мікроскопу Carton Micro Systems CM200 Series із максимальним збільшенням 400x та імерсійним об'єктивом. Проте цього збільшення не було достатньо для визначення грамнегативності або грампозитивності, адже роздільна здатність не давала змогу побачити забарвлення саме клітинної стінки

бактерій. Виконаний етап роботи не був продуктивним та не надав результатів.

3.4 Результати застосування методу дискової дифузії в агарі

Метод дискової дифузії в агарі було використано для оцінки стійкості культур мікробіомів ґрунту та води, виділених зі зразків, до антибіотиків ампіциліну, стрептоміцину та рифампіцину. Діаметри вимірювали за допомогою штангенциркуля.

Таблиця 3.2

Вимірювання зон інгібування, утворених тест-дисками з ампіциліном, стрептоміцином та рифампіцином

Зразок	Діаметр інгібування, мм			Резистентність
	Ампіцилін	Стрептоміцин	Рифампіцин	
ПГ				
ПГ1 Скупчення білих дрібних колоній	0	25	20	ампіцилін
ПГ1 Біла колонія дрібна	21	30	21	-
ПГ1 Жовтуваті колонії на дріжджах	0	35	34	ампіцилін
ПГ2 Білі колонії	16	29	21	-
ПГ3 Біла колонія амебоподібна	14	30	8	низька чутливість до рифампіцину

Продовж. табл. 3.2

ПГк				
ПГк2 Жовтувата складчаста колонія	0	10	15	ампіцилін, імовірно, розвиток часткової чутливості до стреп- томіцину
ПГк2 Велика біла колонія	22	32	23	-
ПГк3 Дрібні жовтуваті колонії	24	0	50	стрептоміцин
ПГк3 Велика біла колонія	20	30	21	-
ПВ				
ПВ Кругла молочна колонія	25	22	30	-
ПВ Жовті колонії	0	30	11	ампіцилін, імовірно, розвиток часткової чутливості до рифампіцину
ПВ Жовта дрібна колонія	8	0	20	стрептоміцин, низька чут- ливість до ампіциліну
ПВк				
ПВк Білі колонії	20	30	20	-
ПВк Молочні колонії середні	0	29	19	ампіцилін
ПВк1 Жовтуваті колонії	0	40	25	ампіцилін

Аналіз зон інгібування, утворених дисковою дифузією в агарі продемонстрував наступні результати: у пробі ґрунту, відібраного поблизу птахофабрики, два виділені ізоляти мікробіому мали стійкість до ампіциліну, ще один був частково чутливим до рифампіцину, про що свідчив невеликий діаметр зони інгібування; у контрольній пробі ґрунту також виявлено стійкі складові мікробіому, зокрема один ізолят продемонстрував резистентність до ампіциліну та зниження стійкості до стрептоміцину, ще один ізолят – стійкість до стрептоміцину.

У пробі води, відібраної з озера, один ізолят виявився стійким до ампіциліну та продемонстрував наближення до зниженої резистентності до рифампіцину, інший – до стрептоміцину та частково до ампіциліну. У контрольній пробі води у двох із трьох виділених ізолятів було виявлено стійкість до ампіциліну. На прикладі порівняння цих двох зразків можна припустити, що закрита водна система демонструє більшу накопичену кількість генів резистентності.

Ці дані, цілком імовірно, демонструють обширність біогенного впливу на мікробіоми, стійкість різних зразків до всіх трьох антибіотиків, що належать до різних класів, підкреслює вплив антропогенних факторів, зокрема застосування антибіотиків у сільському господарстві. Часткова чутливість, тобто чутливість до конкретного антибіотика за його збільшеного дозування, також може вказувати на розвиток стійкості певного ізоляту. Для більш детального аналізу є необхідною ідентифікація виділених штамів з метою розуміння того, чи є ця резистентність природною чи набутою, а також для подальшого порівняння з табличними значеннями зон інгібування.

Таким чином, вплив антибіотиків на мікробіоми ґрунту та води проявляється у формуванні стійких популяцій мікроорганізмів, що потенційно впливає на різноманіття мікроорганізмів, їхнє співіснування в межах біогеоценозу.

3.5 Розробка рекомендацій з метою зниження біогенного впливу антибіотиків

Виходячи з отриманих результатів доцільним є надання рекомендацій для птахофабрик та інших сільськогосподарських підприємств задля мінімізації впливу використання антибіотиків на мікробіоми ґрунту та води.

В першу чергу важливим є зменшення профілактичного застосування антибіотичних препаратів, натомість рекомендується приділити більше уваги гігієні курника та співробітників, дотриманню чистоти та безпекових заходів з метою мінімізації поширення резистентних патогенів. Підвищення обізнаності персоналу про глобальну проблему антибіотикорезистентності та можливі варіанти зниження ризиків також поширить більш свідомий підхід серед працівників. Крім того, паралельне поліпшення умов утримання птахів з метою зменшення стресу призведе до підвищення стійкості до хвороб. Також необхідним є ведення суворого обліку використаних засобів (як у профілактичних, так і лікувальних цілях) компетентним ветеринарним лікарем.

Крім того, значущою є оптимізація системи утилізації відходів, отриманих у ході вирощування птахів, зокрема гною, підстилки, а також води, адже це – основні шляхи потрапляння стійких бактерій та генів резистентності до довкілля. Можливими підходами є компостування або піроліз гною, а також біоконверсія із застосуванням деструкторів антибіотиків, багатоетапна очистка води з обов'язковою перевіркою на залишки даних препаратів. Моніторинг має бути регулярним та відстежувати, щоб залишкові концентрації не перевищували гранично допустимі значення.

У перспективі рекомендовано поступове впровадження альтернативних методів профілактики та лікування, зокрема введення пробіотиків, преобіотиків, синбіотиків, застосування бактеріофагів, імуномоделюючих агентів тощо. Хоч ці підходи наразі дорожчі за класичні

антибіотики, обмеження поширення стійкості є надважливою стратегією для зменшення руйнівного впливу антибіотикорезистентності на людство.

ВИСНОВКИ

1. Проведено аналіз літератури, який свідчить про нагальність глобальної проблеми антибіотикорезистентності та вплив сільськогосподарської діяльності на формування та поширення стійких штамів мікроорганізмів у довкіллі.
2. Показано та обґрунтовано попадання антибіотиків та їх метаболітів до навколишнього середовища на прикладі птахоферми.
3. Розроблено методику відбору проб, виділення, висівання та вирощування мікробіомів зі зразків ґрунту та води, ізоляції чистих культур, надання характеристик бактеріальних культур та дослідження резистентності.
4. Виявлено різноманітність мікроорганізмів у ґрунті та воді, які знаходяться поблизу птахоферми.
5. Виділено чисті культури з природних біотопів та показано швидкості їх росту в системі *in vitro*.
6. Проведено розподіл на групи культур мікроорганізмів за швидкістю їх росту в культурі *in vitro*, що є важливою біологічною характеристикою цих штамів.
7. Досліджено виділені культури мікроорганізмів на наявність антибіотикорезистентності.
8. Пояснено необхідність додаткового очищення стічних вод та, можливо, їхньої утилізації, а також утилізації гною з сільськогосподарських підприємств, які використовують антибіотики, що дозволить зменшити ризики появи антибіотикорезистентності у природних популяціях.

ДОДАТКИ

Додаток А

Результати висівання та вирощування мікробіому ґрунту та води зі зразків

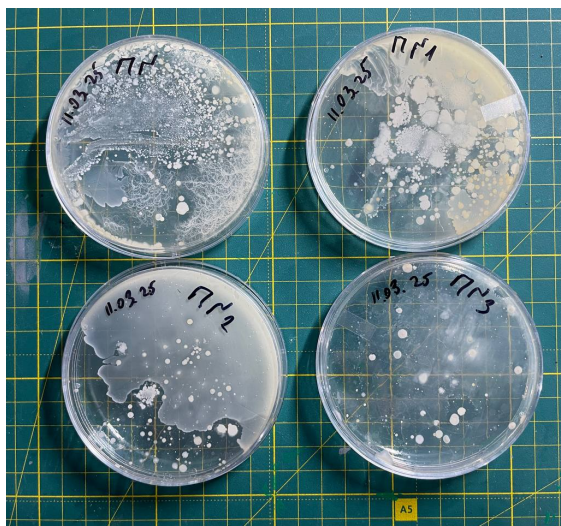


Рис. 1. Чашки з мікробіомом ґрунту, де ПГ, ПГ1, ПГ2, ПГ3 – проба ґрунту із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

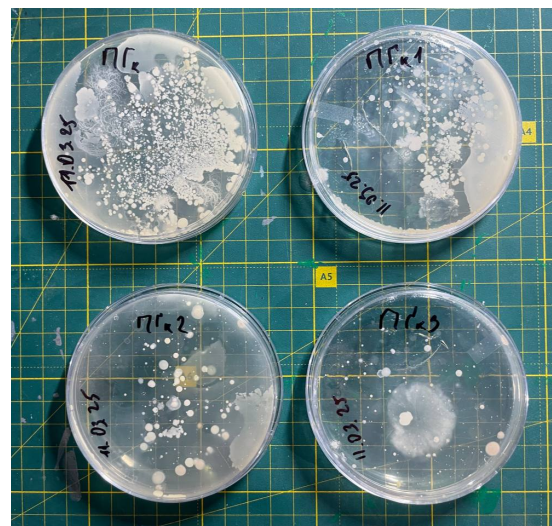


Рис. 2. Чашки з мікробіомом контрольного ґрунту, де ПГк, ПГк1, ПГк2, ПГк3 – проба ґрунту контроль із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

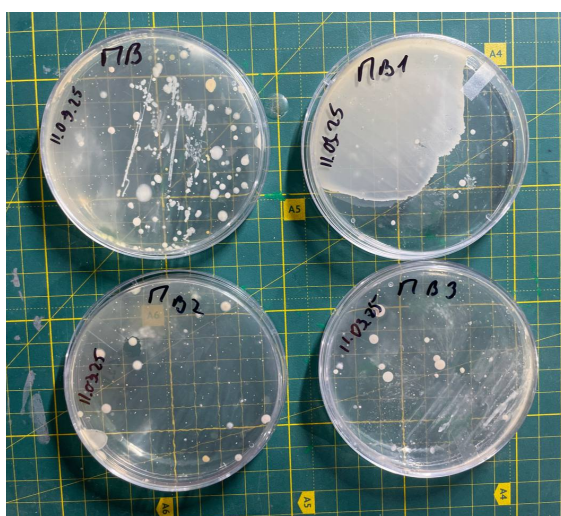


Рис. 3. Чашки з мікробіомом води, де ПВ, ПВ1, ПВ2, ПВ3 – проба

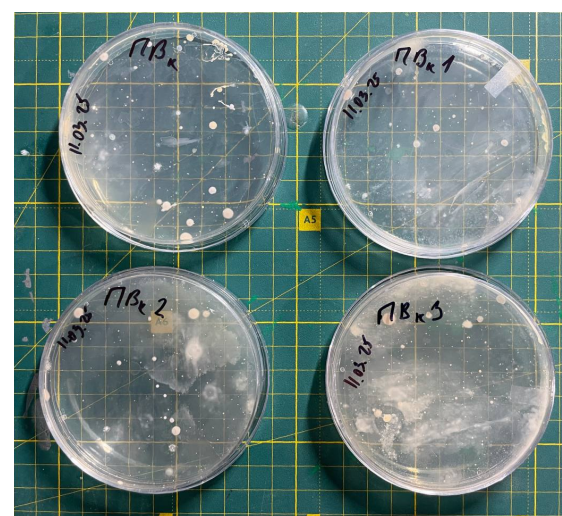


Рис. 4. Чашки з контрольним мікробіомом води, де ПВк, ПВк1,

води із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

ПВк2, ПВк3 – проба води контроль із позначенням відповідного розведення 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

Результати ізоляції чистих культур

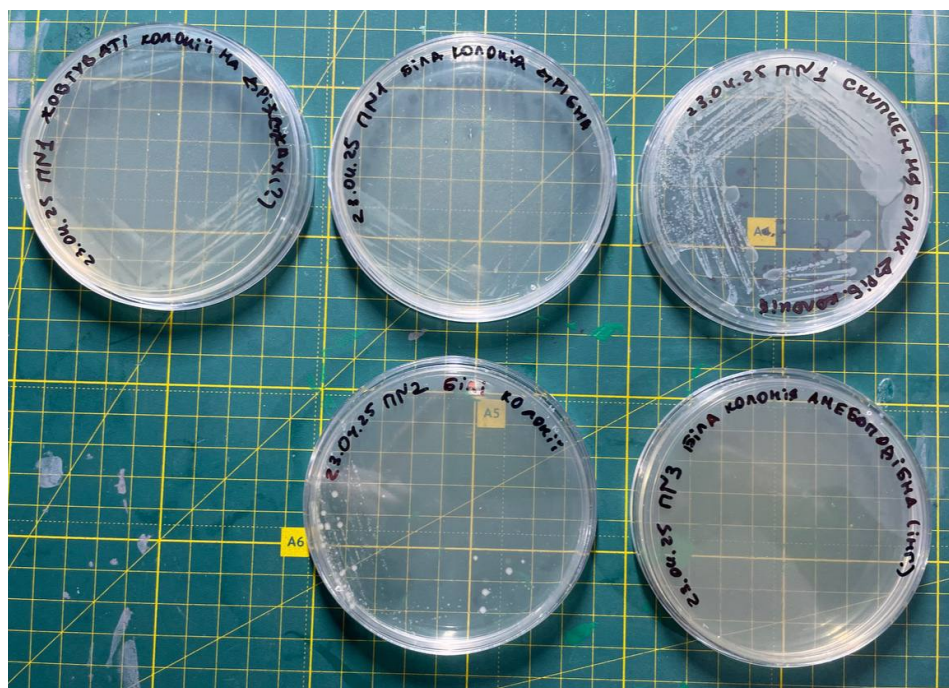


Рис. 1. Чисті культури, виділені зі зразка ПП, 12 годин після початку культивування

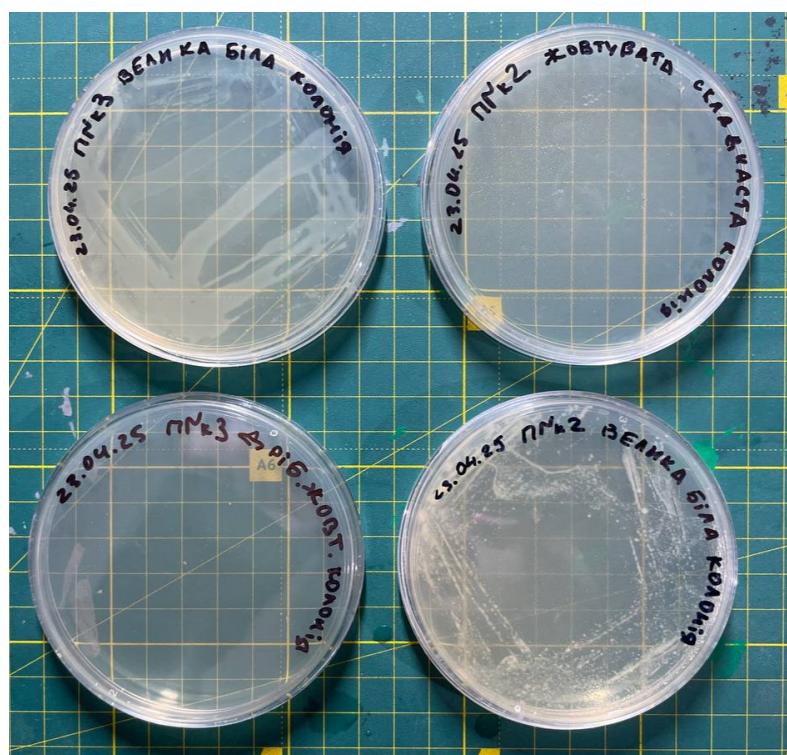


Рис. 2. Чисті культури, виділені зі зразка ППк, 12 годин після початку культивування

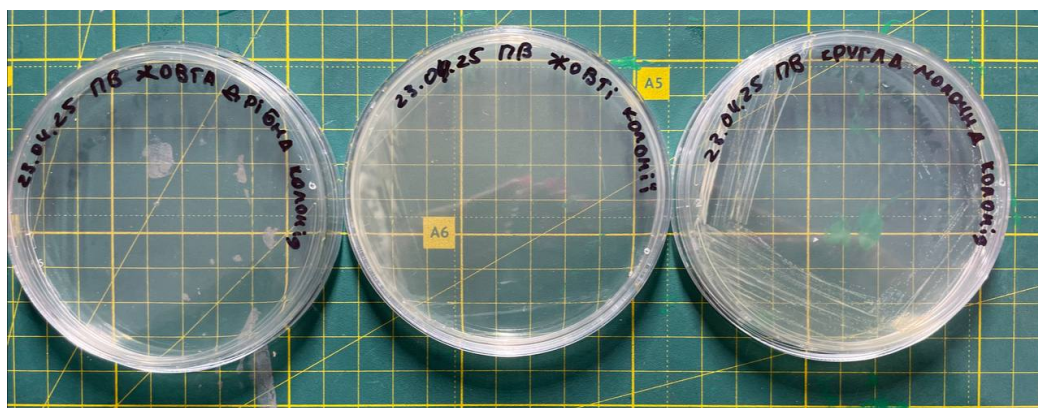


Рис. 3. Чисті культури, виділені зі зразка ПВ, 12 годин після початку культивування

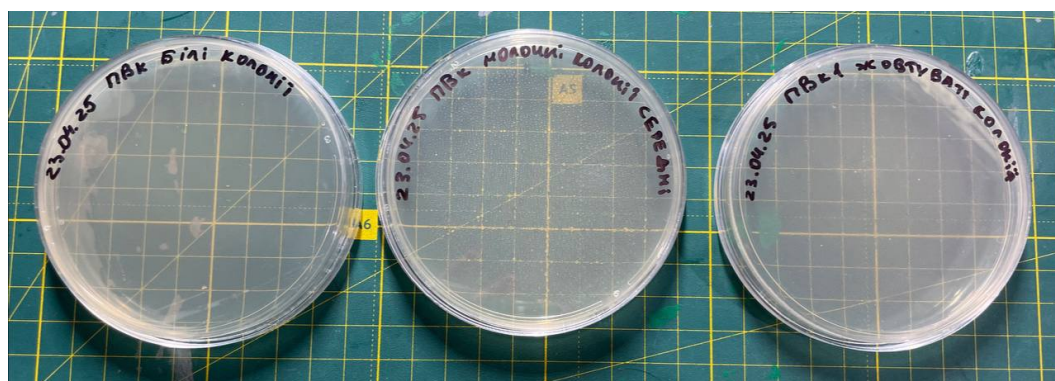


Рис. 4. Чисті культури, виділені зі зразка ПВк, 12 годин після початку культивування

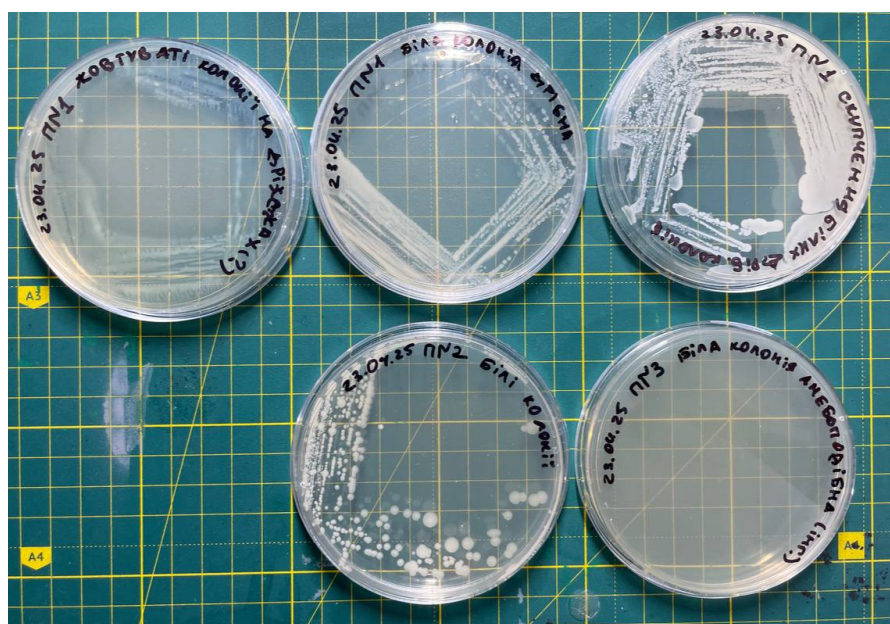


Рис. 5. Чисті культури, виділені зі зразка ПГ, 24 години після початку культивування

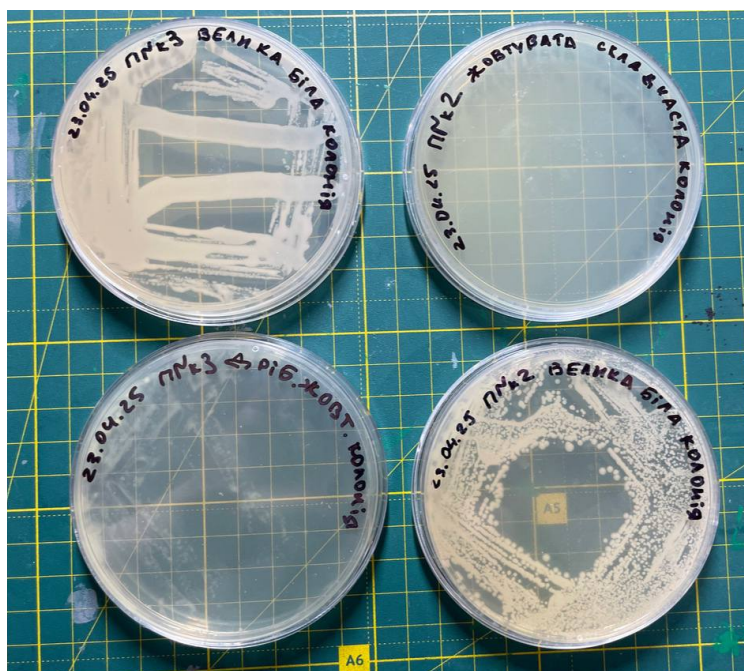


Рис. 6. Чисті культури, виділені зі зразка Пк, 24 години після початку культивування



Рис. 7. Чисті культури, виділені зі зразка ПВ, 24 години після початку культивування

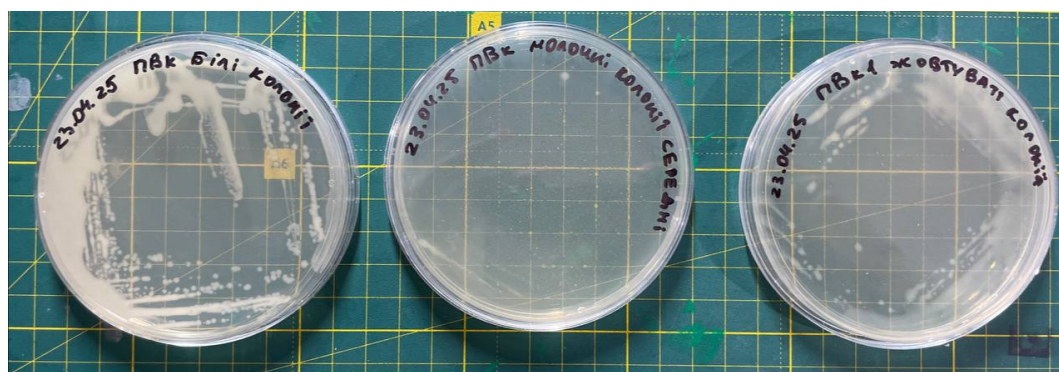


Рис. 8. Чисті культури, виділені зі зразка ПВк, 24 години після початку культивування

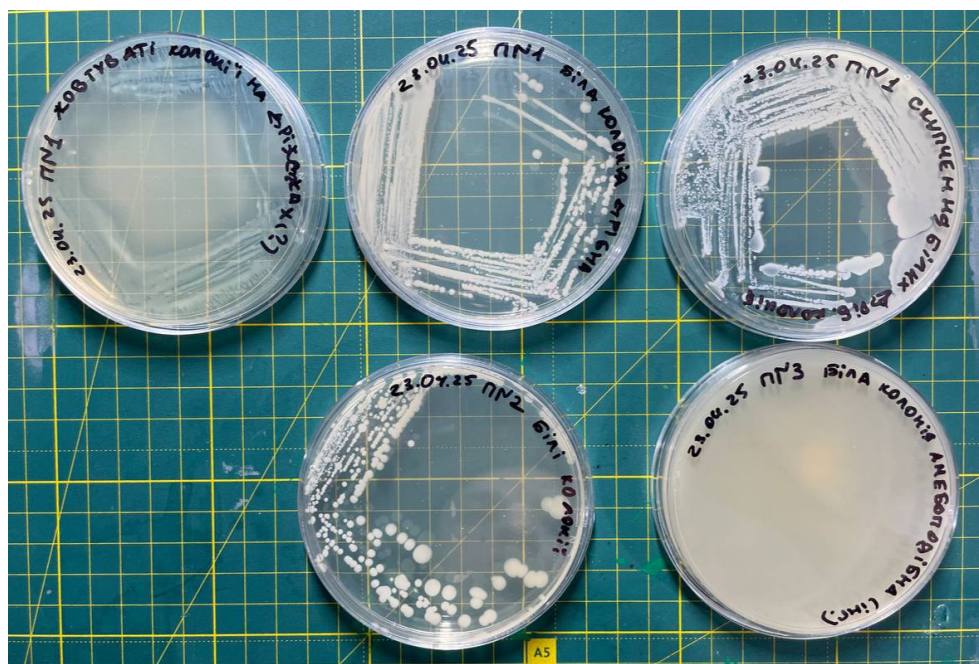


Рис. 9. Чисті культури, виділені зі зразка ПП, 36 годин після початку культивування

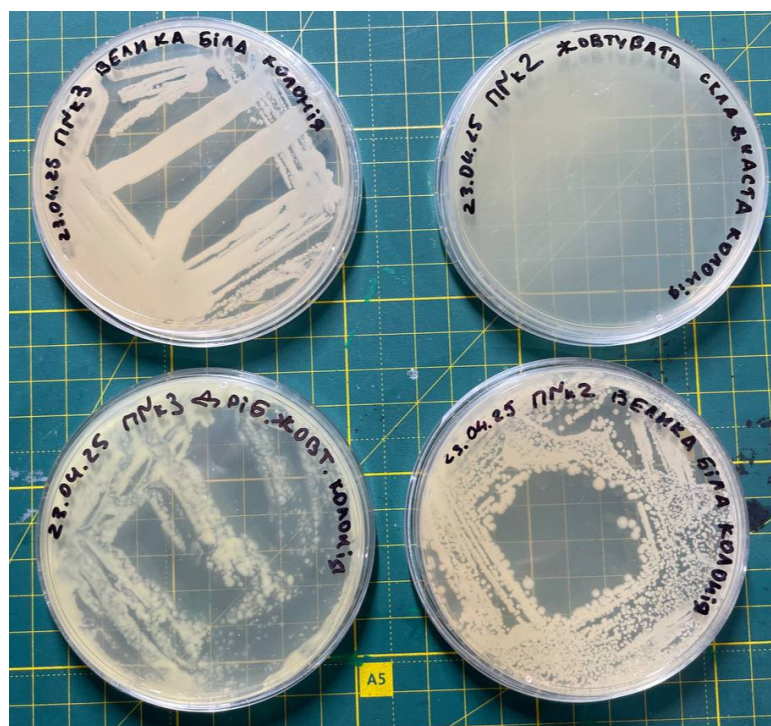


Рис. 10. Чисті культури, виділені зі зразка ППк, 36 годин після початку культивування



Рис. 11. Чисті культури, виділені зі зразка ПВ, 36 годин після початку культивування



Рис. 12. Чисті культури, виділені зі зразка ПВк, 36 годин після початку культивування

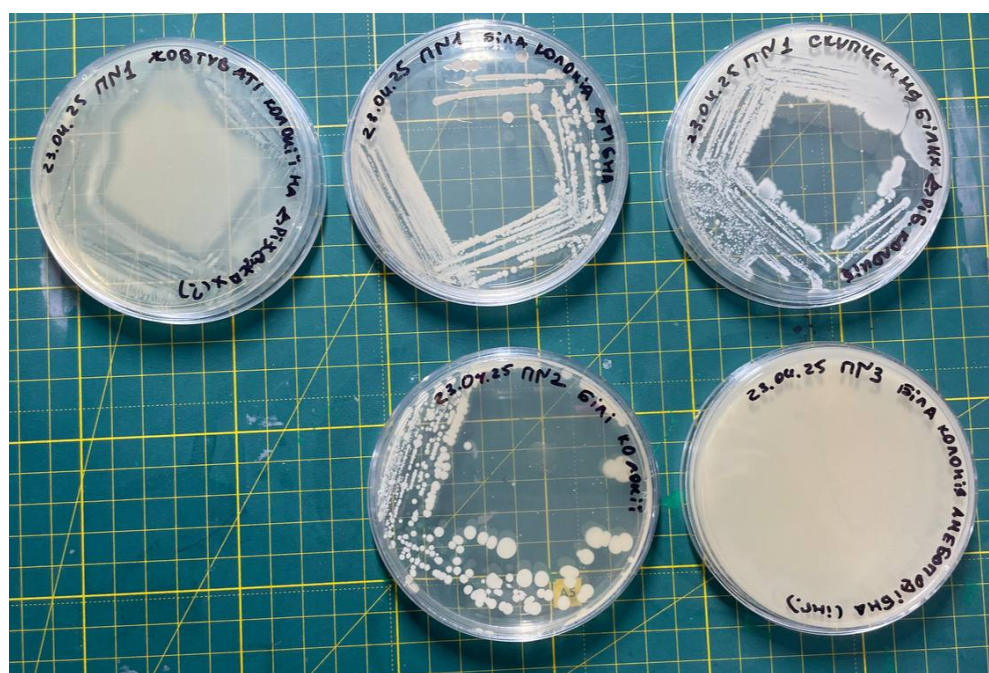


Рис. 13. Чисті культури, виділені зі зразка ПП, 48 годин після початку культивування

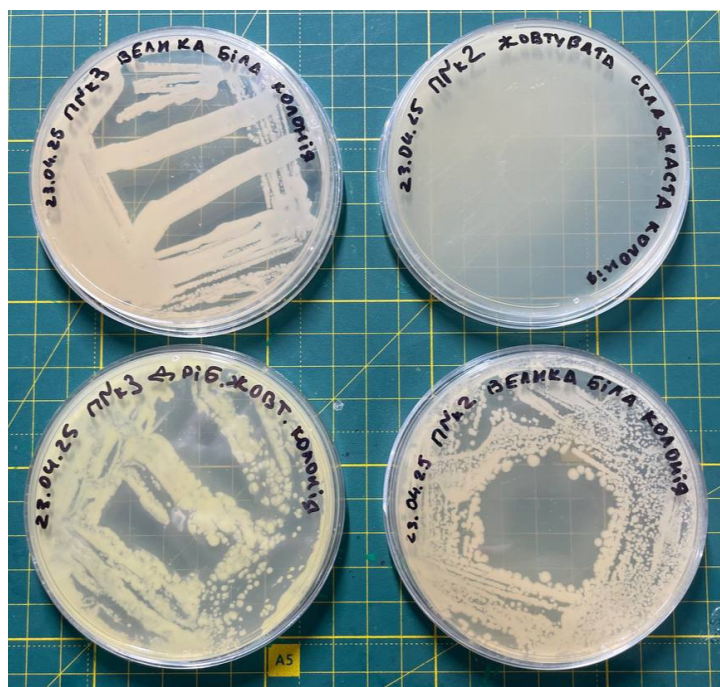


Рис. 14. Чисті культури, виділені зі зразка ПГк, 48 годин після початку культивування



Рис. 15. Чисті культури, виділені зі зразка ПВ, 48 годин після початку культивування



Рис. 16. Чисті культури, виділені зі зразка ПВк, 48 годин після початку культивування

Результати застосування методу дискової дифузії в агарі з використанням ампіциліну, стрептоміцину та рифампіцину

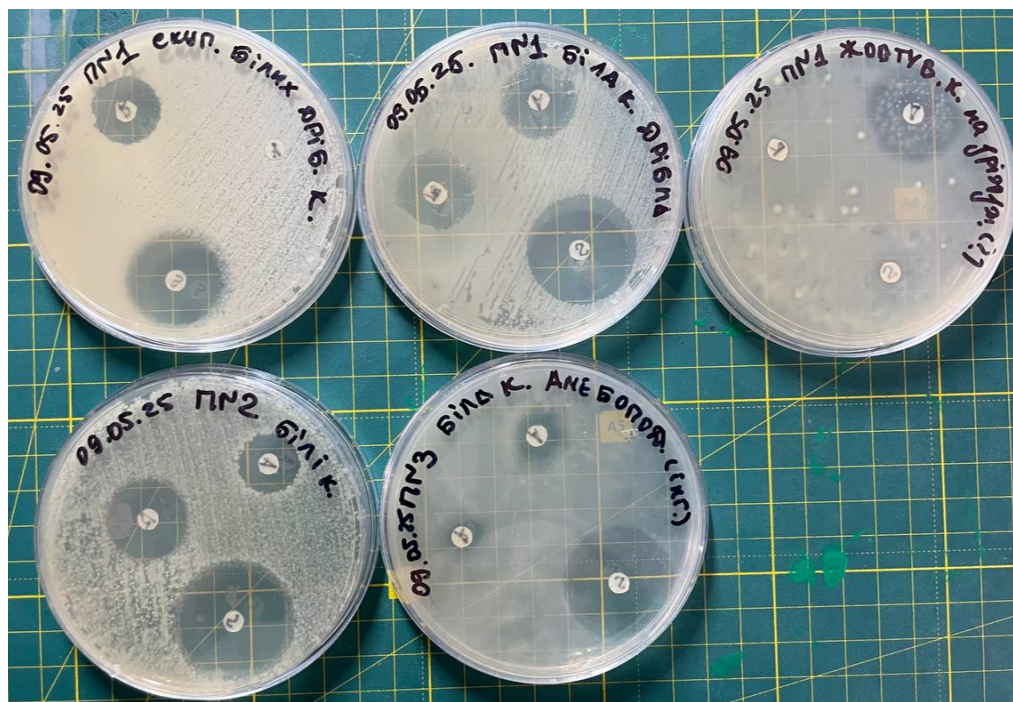


Рис. 1. Метод дискової дифузії на культурах зі зразку ПГ, 20 годин після початку культивування

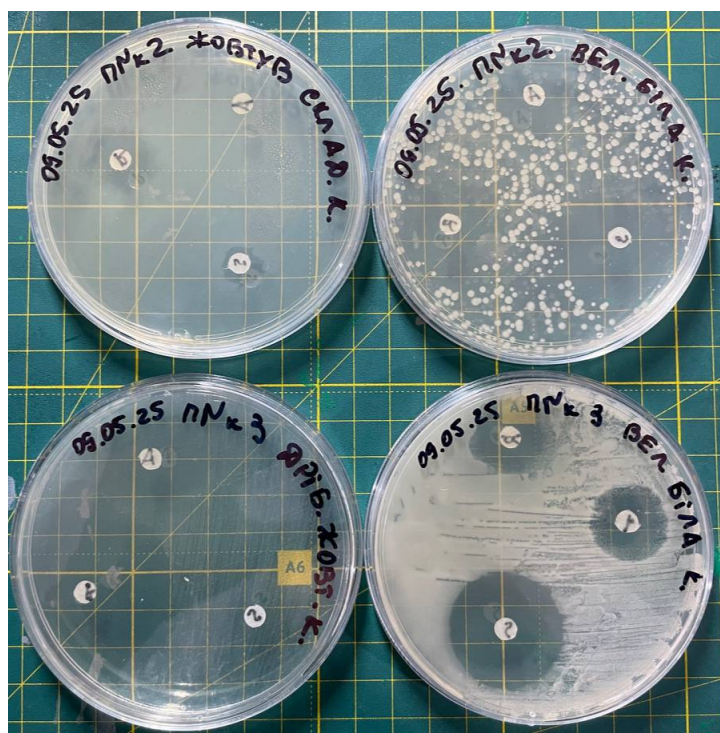


Рис. 2. Метод дискової дифузії на культурах зі зразку ПГк, 20 годин після початку культивування

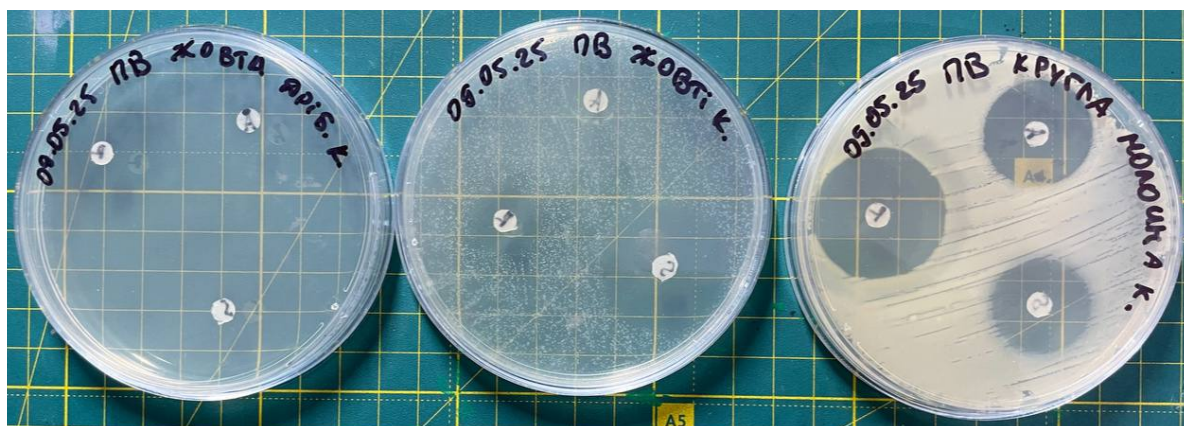


Рис. 3. Метод дискової дифузії на культурах зі зразку ПВ, 20 годин після початку культивування



Рис. 4. Метод дискової дифузії на культурах зі зразку PVK, 20 годин після початку культивування

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Antimicrobial resistance. *World Health Organization (WHO)*. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (date of access: 07.03.2025).
2. Antibiotic resistance: the challenges and some emerging strategies for tackling a global menace / D. Chinemerem Nwobodo et al. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1002/jcla.24655> (date of access: 07.03.2025).
3. Vestergaard M., Frees D., Ingmer H. Antibiotic resistance and the MRSA problem. *Microbiology spectrum*. 2019. Vol. 7, no. 2. URL: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018> (date of access: 07.03.2025).
4. Uehara Y. Current status of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec). *Antibiotics*. 2022. Vol. 11, no. 1. P. 86. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010086> (date of access: 07.03.2025).
5. Gajdács M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2019. Vol. 8, no. 2. P. 52. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020052> (date of access: 07.03.2025).
6. Durand G. A., Raoult D., Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International journal of antimicrobial agents*. 2019. Vol. 53, no. 4. P. 371–382. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010> (date of access: 13.03.2025).
7. Baquero F. Threats of antibiotic resistance: an obliged reappraisal. *International microbiology*. 2021. Vol. 24. P. 499–506. URL: <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00184-y> (date of access: 15.03.2025).
8. Yadav S., Kapley A. Antibiotic resistance: global health crisis and metagenomics. *Biotechnology reports*. 2021. Vol. 29. URL: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00604> (date of access: 15.03.2025).

9. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / C. J. Murray et al. *The Lancet*. 2022. Vol. 399, no. 10325. P. 629–655. URL: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0) (date of access: 15.03.2025).
10. Drug-resistant infections: a threat to our economic future / O. B. Jonas et al. Washington (DC): World Bank, 2017. 142 p.
11. Antibiotic resistance: one health one world outlook / B. Aslam et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510> (date of access: 15.03.2025).
12. Overview of antimicrobial resistance and mechanisms: the relative status of the past and current / N. S. Devi et al. *The Microbe*. 2024. Vol. 3. URL: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100083> (date of access: 17.03.2025).
13. Antibiotic resistance in microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects / T. M. Uddin et al. *Journal of infection and public health*. 2021. Vol. 14, no. 12. P. 1750–1766. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020> (date of access: 15.03.2025).
14. C Reygaert W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*. 2018. Vol. 4, no. 3. P. 482–501. URL: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482> (date of access: 17.03.2025).
15. Olby R. C. DNA, history of. *Brenner's encyclopedia of genetics*. 2nd ed. 2013. P. 364–368. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.00436-8> (date of access: 17.03.2025).
16. Guzmán-Herrador D. L., Llosa M. The secret life of conjugative relaxases. *Plasmid*. 2019. Vol. 104. URL: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.102415> (date of access: 17.03.2025).
17. Zarei-Baygi A., Smith A. L. Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment: prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies. *Bioresource technology*. 2021. Vol. 319.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124181> (date of access: 17.03.2025).

18. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010. Vol. 74, no. 3. P. 417–433. URL: <https://doi.org/10.1128/membr.00016-10> (date of access: 17.03.2025).

19. Martinez J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug discovery today: Technologies*. 2014. Vol. 11. P. 33–39. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001> (date of access: 17.03.2025).

20. Intensive poultry farming: a review of the impact on the environment and human health / G. Gržinić et al. *Science of the total environment*. 2022. Vol. 858, no. 3. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160014> (date of access: 25.03.2025).

21. The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment / D. Fatta-Kassinos et al. *Science of the total environment*. 2011. Vol. 409, no. 19. P. 3555–3563. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.036> (date of access: 25.04.2025).

22. Li B., Zhang T. Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants. *Chemosphere*. 2011. Vol. 83, no. 9. P. 1284–1289. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.002> (date of access: 25.04.2025).

23. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures / W.-J. Sim et al. *Chemosphere*. 2011. Vol. 82, no. 2. P. 179–186. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.026> (date of access: 25.04.2025).

24. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in Japan and their effects on bacterial ammonia oxidation / G. C. Ghosh et

al. *Water science and technology*. 2009. Vol. 59, no. 4. P. 779–786. URL: <https://doi.org/10.2166/wst.2009.067> (date of access: 25.04.2025).

25. Gatica J., Cytryn E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environmental science and pollution research*. 2013. Vol. 20, no. 6. P. 3529–3538. URL: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1505-4> (date of access: 14.04.2025).

26. Cycoń M., Mroziak A., Piotrowska-Seget Z. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338> (date of access: 14.04.2025).

27. Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp. / E. Topp et al. *Journal of environmental quality*. 2013. Vol. 42, no. 1. P. 173–178. URL: <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0162> (date of access: 25.04.2025).

28. Zhang Q., Dick W. A. Growth of soil bacteria, on penicillin and neomycin, not previously exposed to these antibiotics. *Science of the total environment*. 2014. Vol. 493. P. 445–453. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.114> (date of access: 25.04.2025).

29. Biotransformation of tetracycline by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* DT1 / Y. Leng et al. *Journal of hazardous materials*. 2016. Vol. 318. P. 125–133. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.053> (date of access: 25.04.2025).

30. Biodegradation of sulfamethoxazole in bacteria from three different origins / S. I. Mulla et al. *Journal of environmental management*. 2018. Vol. 206. P. 93–102. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.029> (date of access: 25.04.2025).

31. Isolation and characterization of a high-efficiency erythromycin a-degrading ochrobactrum sp. strain / W. Zhang et al. *Marine pollution bulletin*. 2017. Vol. 114, no. 2. P. 896–902. URL: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.076> (date of access: 25.04.2025).
32. No evidential correlation between veterinary antibiotic degradation ability and resistance genes in microorganisms during the biodegradation of doxycycline / X. Wen et al. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2018. Vol. 147. P. 759–766. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.025> (date of access: 25.04.2025).
33. Impact of abiotic stressors on soil microbial communities: a focus on antibiotics and their interactions with emerging pollutants / A. R. P. Rasheela et al. *Soil systems*. 2024. Vol. 9, no. 1. P. 2. URL: <https://doi.org/10.3390/soilsystems9010002> (date of access: 14.04.2025).
34. Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health / Y.-G. Zhu et al. *Environment international*. 2019. Vol. 131. URL: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059> (date of access: 16.04.2025).
35. The spreading of antibiotic-resistant bacteria in terrestrial ecosystems and the formation of soil resistome / L. Symochko et al. *Land*. 2023. Vol. 12, no. 4. URL: <https://doi.org/10.3390/land12040769> (date of access: 16.04.2025).
36. Serwecińska L. Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health. *Water*. 2020. Vol. 12, no. 12. URL: <https://doi.org/10.3390/w12123313> (date of access: 16.04.2025).
37. The global distribution and environmental drivers of the soil antibiotic resistome / M. Delgado-Baquerizo et al. *Microbiome*. 2022. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01405-w> (date of access: 16.04.2025).
38. Antibiotic resistance in the soil ecosystem: A One Health perspective / F. Wang et al. *Current opinion in environmental science & health*.

2021. Vol. 20. URL: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100230> (date of access: 16.04.2025).

39. Vaz-Moreira I., Nunes O. C., Manaia C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS microbiology reviews*. 2014. Vol. 38, no. 4. P. 761–778. URL: <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12062> (date of access: 16.04.2025).

40. Ding C., He J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010. Vol. 87, no. 3. P. 925–941. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5> (date of access: 16.04.2025).

41. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: a review / P. Kovalakova et al. *Chemosphere*. 2020. Vol. 251. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351> (date of access: 16.04.2025).

42. Comprehensive assessment of antibiotic impacts and risk thresholds on aquatic microbiomes and resistomes / G. Jin et al. *Water research*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.123262> (date of access: 16.04.2025).

43. Gomez J., Mendez R., Lema J. M. The effect of antibiotics on nitrification processes. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1996. Vol. 57-58, no. 1. P. 869–876. URL: <https://doi.org/10.1007/bf02941767> (date of access: 25.04.2025).

44. Klaver A. L., Matthews R. A. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture*. 1994. Vol. 123, no. 3-4. P. 237–247. URL: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90062-0) (date of access: 25.04.2025).

45. Halling-Sørensen B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2001. Vol. 40, no. 4. P. 451–460. URL: <https://doi.org/10.1007/s002440010197> (date of access: 25.04.2025).

46. Abdisa Serbessa T., Gemechu Geleta Y., Obsa Terfa I. Review on diseases and health management of poultry and swine. *International journal of avian & wildlife biology*. 2023. Vol. 7, no. 1. P. 27–38. URL: <https://doi.org/10.15406/ijawb.2023.07.00187> (date of access: 19.03.2025).
47. Animal Diseases. *WOAH - World Organisation for Animal Health*. URL: https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/?_tax_animal=terrestrials,avian (date of access: 19.03.2025).
48. Diseases of poultry / L. R. McDougald et al. ; ed. by D. E. Swayne et al. 14th ed. Wiley, 2019. 1488 p. URL: <https://doi.org/10.1002/9781119371199> (date of access: 19.03.2025).
49. Pullorum disease. *WOAH - World Organisation for Animal Health*. URL: <https://www.woah.org/en/disease/pullorum-disease/> (date of access: 20.03.2025).
50. Fowl typhoid. *WOAH - World Organisation for Animal Health*. URL: <https://www.woah.org/en/disease/fowl-typhoid/> (date of access: 20.03.2025).
51. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes / D. H. Shah et al. *Poultry science*. 2017. Vol. 96, no. 3. P. 687–702. URL: <https://doi.org/10.3382/ps/pew342> (date of access: 21.03.2025).
52. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry / S. Parveen et al. *Journal of food protection*. 2007. Vol. 70, no. 11. P. 2466–2472. URL: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.11.2466> (date of access: 21.03.2025).
53. A systematic review on the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in poultry and poultry environments in Bangladesh between 2010 and 2021 / M. S. Islam et al. *BioMed research international*. 2023. Vol. 2023. P. 1–18. URL: <https://doi.org/10.1155/2023/2425564> (date of access: 21.03.2025).

54. Hart W. S., Heuzenroeder M. W., Barton M. D. A study of the transfer of tetracycline resistance genes between *Escherichia coli* in the intestinal tract of a mouse and a chicken model. *Journal of veterinary medicine series B*. 2006. Vol. 53, no. 7. P. 333–340. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00967.x> (date of access: 21.03.2025).
55. Ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from turkeys in Great Britain / R. J. Gosling et al. *Avian pathology*. 2012. Vol. 41, no. 1. P. 83–89. URL: <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.640659> (date of access: 21.03.2025).
56. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* / L. Poirel et al. *Microbiology spectrum*. 2018. Vol. 6, no. 4.
57. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens / K. Keyes et al. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000. Vol. 44, no. 2. P. 421–424. URL: <https://doi.org/10.1128/aac.44.2.421-424.2000> (date of access: 21.03.2025).
58. *Campylobacter jejuni* is associated with, but not sufficient to cause vibriotic hepatitis in chickens / J. L. Jennings et al. *Veterinary microbiology*. 2011. Vol. 149, no. 1-2. P. 193–199. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.005> (date of access: 21.03.2025).
59. Relevance of *Campylobacter* to public health—the need for a one health approach / G. Götz et al. *International journal of medical microbiology*. 2014. Vol. 304, no. 7. P. 817–823. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.015> (date of access: 22.03.2025).
60. Production systems and important antimicrobial resistant-pathogenic bacteria in poultry: a review / P. H. W. Mak et al. *Journal of animal science and biotechnology*. 2022. Vol. 13, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00786-0> (date of access: 22.03.2025).
61. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* in broiler chicken along the food chain in Canada / O. Dramé et al. *Foodborne pathogens and disease*.

2020. Vol. 17, no. 8. P. 512–520.
URL: <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2752> (date of access: 22.03.2025).

62. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story / J. M. Nelson et al. *Clinical infectious diseases*. 2007. Vol. 44, no. 7. P. 977–980.
URL: <https://doi.org/10.1086/512369> (date of access: 22.03.2025).

63. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chickens in the north of Tunisia / M. Gharbi et al. *BioMed research international*. 2018. Vol. 2018. P. 1–7.
URL: <https://doi.org/10.1155/2018/7943786> (date of access: 22.03.2025).

64. Prevalence of some common bacterial diseases in commercial poultry farm / S. Halder et al. *Ukrainian journal of veterinary and agricultural sciences*. 2021. Vol. 4, no. 2. P. 44–51. URL: <https://doi.org/10.32718/ujvas4-2.08> (date of access: 22.03.2025).

65. Tsehay M. T., Zeru A. G., Mengist G. K. Review on fowl cholera. *Journal of life sciences research and reviews*. 2025. Vol. 3, no. 1.
URL: [https://doi.org/10.47363/JLSRR/2025\(3\)131](https://doi.org/10.47363/JLSRR/2025(3)131).

66. Insights on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in poultry: a systematic review / J. P. Yadav et al. *Animal biotechnology*. 2021. P. 1–10.
URL: <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1908316> (date of access: 22.03.2025).

67. Rood J. I. General physiological and virulence properties of the pathogenic clostridia. *Clostridial diseases of animals*. Hoboken, NJ, 2016. P. 7–12. URL: <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch2> (date of access: 24.03.2025).

68. Fu Y., Alenezi T., Sun X. *Clostridium perfringens*-induced necrotic diseases: an overview. *Immuno*. 2022. Vol. 2, no. 2. P. 387–407.
URL: <https://doi.org/10.3390/immuno2020024> (date of access: 24.03.2025).

69. Clostridium botulinum type C, D, C/D, and D/C: an update / F. Meurens et al. *Frontiers in microbiology*. 2023. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1099184> (date of access: 24.03.2025).
70. Schwartz B., Vetvicka V. Review: β -glucans as effective antibiotic alternatives in poultry. *Molecules*. 2021. T. 26, № 12. С. 3560. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules26123560> (дата звернення: 25.03.2025).
71. On additives for use in animal nutrition : Regulation (EC) of the European Parliament and of the Council of 18.10.2006 no. 1831/2003.
72. Hedman H. D., Vasco K. A., Zhang L. A review of antimicrobial resistance in poultry farming within low-resource settings. *Animals*. 2020. Vol. 10, no. 8. URL: <https://doi.org/10.3390/ani10081264> (date of access: 25.03.2025).
73. Laxminarayan R., Van Boeckel T., Teillant A. The economic costs of withdrawing antimicrobial growth promoters from the livestock sector. *OECD food, agriculture and fisheries papers*. 2015. No. 78. URL: <https://doi.org/10.1787/5js64kst5wv1-en> (date of access: 25.03.2025).
74. Diarra M. S., Malouin F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in microbiology*. 2014. Vol. 5. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00282> (date of access: 25.03.2025).
75. Antibiotic resistance—the need for global solutions / R. Laxminarayan et al. *The lancet infectious diseases*. 2013. Vol. 13, no. 12. P. 1057–1098. URL: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(13)70318-9) (date of access: 26.03.2025).
76. Methodologies and standards for monitoring antimicrobial use and antimicrobial resistance in shrimp aquaculture / S. Devadas et al. *Aquaculture*. 2024. Vol. 579. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740216> (date of access: 27.03.2025).
77. Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage at farm and flock level on 181 broiler farms in nine European countries / P. Joosten et

al. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019. Vol. 74, no. 3. P. 798–806. URL: <https://doi.org/10.1093/jac/dky498> (date of access: 26.03.2025).

78. Antibiotic use in chicken farms in northwestern China / J. Xu et al. *Antimicrobial resistance & infection control*. 2020. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0672-6> (date of access: 26.03.2025).

79. Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: pluses and minuses / T. T. H. Van et al. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2020. Vol. 20. P. 170–177. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.031> (date of access: 26.03.2025).

80. Understanding antimicrobial use contexts in the poultry sector: challenges for small-scale layer farms in Kenya / S. Kiambi et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10, no. 2. P. 106–123. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020106> (date of access: 26.03.2025).

81. Al-Mustapha A. I., Adetunji V. O., Heikinheimo A. Risk perceptions of antibiotic usage and resistance: a cross-sectional survey of poultry farmers in Kwara state, Nigeria. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9, no. 7. P. 378–388. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070378> (date of access: 26.03.2025).

82. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries / I. Chantziaras et al. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014. Vol. 69, no. 3. P. 827–834. URL: <https://doi.org/10.1093/jac/dkt443> (date of access: 26.03.2025).

83. Ferreira J. P., Staerk K. Antimicrobial resistance and antimicrobial use animal monitoring policies in Europe: where are we?. *Journal of public health policy*. 2017. Vol. 38, no. 2. P. 185–202. URL: <https://doi.org/10.1057/s41271-017-0067-y> (date of access: 26.03.2025).

84. Futuristic non-antibiotic therapies to combat antibiotic resistance: a review / M. Kumar et al. *Frontiers in microbiology*. 2021. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609459> (date of access: 27.03.2025).

85. The current status of the alternative use to antibiotics in poultry production: an African perspective / L. Andrew Selaledi et al. *Antibiotics*. 2020.

Vol. 9, no. 9. P. 594–612. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090594> (date of access: 27.03.2025).

86. An overview of the use of bacteriophages in the poultry industry: successes, challenges, and possibilities for overcoming breakdowns / A. Abd-El Wahab et al. *Frontiers in microbiology*. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1136638> (date of access: 29.03.2025).

87. Young R. F., White R. L. Lysis of the host by bacteriophage. *Encyclopedia of virology*. 3rd ed. 2008. P. 248–258. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00752-4> (date of access: 29.03.2025).

88. Bacteriophages, phage endolysins and antimicrobial peptides – the possibilities for their common use to combat infections and in the design of new drugs / T. Mirski et al. *Annals of agricultural and environmental medicine*. 2019. Vol. 26, no. 2. P. 203–209. URL: <https://doi.org/10.26444/aaem/105390> (date of access: 29.03.2025).

89. Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents / Ł. Grabowski et al. *Microbiological research*. 2021. Vol. 248. URL: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126746> (date of access: 29.03.2025).

90. Lin D. M., Koskella B., Lin H. C. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2017. Vol. 8, no. 3. P. 162–173. URL: <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162> (date of access: 29.03.2025).

91. Żbikowska K., Michalczyk M., Dolka B. The use of bacteriophages in the poultry industry. *Animals*. 2020. Vol. 10, no. 5. P. 872–890. URL: <https://doi.org/10.3390/ani10050872> (date of access: 29.03.2025).

92. Examining the effects of Salmonella phage on the caecal microbiota and metabolome features in Salmonella-free broilers / L. Lorenzo-Rebenaque et al. *Frontiers in genetics*. 2022. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1060713> (date of access: 29.03.2025).

93. Broad-host-range Salmonella bacteriophage STP4-a and its potential application evaluation in poultry industry / M. Li et al. *Poultry science*. 2020. Vol. 99, no. 7. P. 3643–3654. URL: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.051> (date of access: 29.03.2025).
94. Critical evaluation of bacteriophage to prevent and treat colibacillosis in poultry / W. E. Huff et al. *Journal of the Arkansas academy of science*. 2009. Vol. 63. P. 93–98.
95. Tabashsum Z., Scriba A., Biswas D. Alternative approaches to therapeutics and sub-therapeutics for sustainable poultry production. *Poultry science*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102750> (date of access: 02.04.2025).
96. Prevalence and antibiotic resistance pattern of Salmonella serovars in integrated crop-livestock farms and their products sold in local markets / M. Peng et al. *Environmental microbiology*. 2016. Vol. 18, no. 5. P. 1654–1665. URL: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13265> (date of access: 02.04.2025).
97. Salmonella interacts with autophagy to offense or defense / S. Wu et al. *Frontiers in microbiology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00721> (date of access: 02.04.2025).
98. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *The journal of nutrition*. 2007. Vol. 137, no. 3. P. 830–837. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830s> (date of access: 25.04.2025).
99. Potential for prebiotics as feed additives to limit foodborne Campylobacter establishment in the poultry gastrointestinal tract / S. A. Kim et al. *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00091> (date of access: 02.04.2025).
100. Gibson G. R., Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The journal of nutrition*. 1995. Vol. 125, no. 6. P. 1401–1412. URL: <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401> (date of access: 25.04.2025).

101. Peng M., Bitsko E., Biswas D. Functional properties of peanut fractions on the growth of probiotics and foodborne bacterial pathogens. *Journal of food science*. 2015. Vol. 80, no. 3. P. 635–641. URL: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12785> (date of access: 02.04.2025).

102. The effect of synbiotic preparations on the intestinal microbiota and her metabolism in broiler chickens / K. Śliżewska et al. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61256-z> (date of access: 02.04.2025).

103. Effects of probiotic and phytogetic products on performance, gut morphology and cecal microflora of broiler chickens / L. Perić et al. *Archives animal breeding*. 2010. Vol. 53, no. 3. P. 350–359. URL: <https://doi.org/10.5194/aab-53-350-2010> (date of access: 02.04.2025).

104. Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry - a review / A. S. Yadav et al. *Journal of experimental biology and agricultural sciences*. 2016. Vol. 4, no. 3S. P. 368–383. URL: [https://doi.org/10.18006/2016.4\(3s\).368.383](https://doi.org/10.18006/2016.4(3s).368.383) (date of access: 02.04.2025).

105. Sarker S. D., Nahar L. Characterization of nanoparticles. *Advances in nanotechnology-based drug delivery systems*. 2022. P. 45–82. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-88450-1.00011-9> (date of access: 03.04.2025).

106. Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies / N. Chakraborty et al. *Journal of nanobiotechnology*. 2022. Vol. 20, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01573-9> (date of access: 03.04.2025).

107. Joudeh N., Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of nanobiotechnology*. 2022. Vol. 20, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8> (date of access: 03.04.2025).

108. Tripathi N., Goshisht M. K. Recent advances and mechanistic insights into antibacterial activity, antibiofilm activity, and cytotoxicity of silver

nanoparticles. *ACS applied bio materials*. 2022. Vol. 5, no. 4. P. 1391–1463. URL: <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00014> (date of access: 03.04.2025).

109. pH-triggered size-tunable silver nanoparticles: targeted aggregation for effective bacterial infection therapy / X. Cheng et al. *Small*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1002/sml.202200915> (date of access: 03.04.2025).

110. Gold nanoparticles: can they be the next magic bullet for multidrug-resistant bacteria? / M. Okkeh et al. *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, no. 2. URL: <https://doi.org/10.3390/nano11020312> (date of access: 03.04.2025).

111. Zheng Y., Jiang H., Wang X. Facet-dependent antibacterial activity of Au nanocrystals. *Chinese chemical letters*. 2020. Vol. 31, no. 12. P. 3183–3189. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.05.035> (date of access: 03.04.2025).

112. Alcayaga-Miranda F., Cuenca J., Khoury M. Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells: current status and new perspectives of antimicrobial peptide-based therapies. *Frontiers in immunology*. 2017. Vol. 8. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00339> (date of access: 25.04.2025).

113. Comparison of antibacterial and immunological properties of mesenchymal stem/stromal cells from equine bone marrow, endometrium, and adipose tissue / Y. Cortés-Araya et al. *Stem cells and development*. 2018. Vol. 27, no. 21. P. 1518–1525. URL: <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0241> (date of access: 25.04.2025).

114. The mesenchymal stromal cell secretome impairs methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms via cysteine protease activity in the equine model / C. Marx et al. *Stem cells translational medicine*. 2020. Vol. 9, no. 7. P. 746–757. URL: <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0333> (date of access: 25.04.2025).

115. Google maps. *Google*. URL: <https://www.google.com/maps/?entry=wc> (date of access: 12.04.2025).

116. Raynaud X., Nunan N. Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217> (date of access: 05.04.2025).
117. BioRender. *BioRender* App. URL: <https://app.biorender.com/illustrations/67eeb5391eaacf17c199b2f8> (date of access: 12.04.2025).
118. Developing a smart and clean technology for bioremediation of antibiotic contamination in arable lands / F. Mahmoudi Jalali et al. *Sustainable chemistry and pharmacy*. 2023. Vol. 33. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101127> (date of access: 18.04.2025).
119. Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi – Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity / M. Čvančarová et al. *Chemosphere*. 2015. Vol. 136. P. 311–320. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.012> (date of access: 25.04.2025).
120. Turning pig manure into biochar can effectively mitigate antibiotic resistance genes as organic fertilizer / X. Zhou et al. *Science of the total environment*. 2019. Vol. 649. P. 902–908. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.368> (date of access: 16.04.2025).
121. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils / Y. Negreanu et al. *Environmental science & technology*. 2012. Vol. 46, no. 9. P. 4800–4808. URL: <https://doi.org/10.1021/es204665b> (date of access: 16.04.2025).
122. Hossain T. J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: a review of protocols, advantages, and limitations. *European journal of microbiology and immunology*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035> (date of access: 23.04.2025).
123. Kuswandi B., Futra D., Heng L. Y. Nanosensors for the detection of food contaminants. *Nanotechnology applications in food*. 2017. P. 307–333.

URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811942-6.00015-7> (date of access: 28.04.2025).

124. Tarannum N., Khatoon S., Dzantiev B. B. Perspective and application of molecular imprinting approach for antibiotic detection in food and environmental samples: a critical review. *Food control*. 2020. Vol. 118. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107381> (date of access: 28.04.2025).

125. Migliori G. B., Zumla A. Antituberculosis agents. *Infectious diseases*. 2017. P. 1264–1276. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00148-9> (date of access: 28.04.2025).

126. Cocrystals of tuberculosis antibiotics: challenges and missed opportunities / A. Salem et al. *International journal of pharmaceutics*. 2022. Vol. 623. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121924> (date of access: 28.04.2025).

127. Khawbung J. L., Nath D., Chakraborty S. Drug resistant tuberculosis: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2021. Vol. 74. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101574> (date of access: 28.04.2025).

128. Rifampin - StatPearls - NCBI Bookshelf. *National Center for Biotechnology Information*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557488/> (date of access: 28.04.2025).

129. EUCAST. *EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. URL: <https://www.eucast.org/> (date of access: 09.05.2025).

130. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. *EUCAST*. URL: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (date of access: 09.05.2025).