



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **157030** (13) **U**
(51) МПК (2024.01)
C12Q 1/00
G01N 33/18 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2023 02217	(72) Винахідник(и): Савенко Маріанна Вікторівна (UA), Кривцова Марина Валеріївна (UA), Миронюк Іван Святославович (UA)
(22) Дата подання заявки: 10.05.2023	(73) Володілець (володільці): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", вул. Підгірна, 46, м. Ужгород, 88000 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 05.09.2024	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 04.09.2024, Бюл.№ 36	

(54) СПОСІБ ІНДИКАЦІЇ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЯКОСТІ ВОДИ ЗА СТУПЕНЕМ ЧУТЛИВОСТІ ВИДІЛЕНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

(57) Реферат:

Спосіб індикації мікробіологічної якості води за ступенем чутливості виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів включає проведення мікробіологічного аналізу води. Для індикації мікробіологічної якості води використовують показники чутливості виділених ізолятів до антибіотиків різного спектра дії. Визначають кореляційні взаємозв'язки між концентраціями важких металів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот та до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій.

UA 157030 U

Корисна модель належить до галузі медичної екології, санітарії та гігієни, зокрема до способів визначення якості води у комплексі з санітарно-бактеріологічними показниками, і може бути використана при проведенні санітарно-гігієнічної оцінки як водних об'єктів, так і джерел водопостачання, а також при визначенні рівня техногенної трансформованості водних екосистем.

У зв'язку з погіршенням якості питних вод, значна частина населення планети використовує для своїх життєвих потреб неякісну воду, що загрожує здоров'ю населення, тому існує потреба у розробці нових підходів до тестування прісних вод відкритих водойм та питної води. З плином часу змінюються чинники, які впливають на якість води, з'являються нові поллютанти, видозмінюються фактори, під впливом яких вода, як основний ресурс людського існування, втрачає свої якості [1]. Одним із таких викликів сучасності є зростання рівня антибіотикорезистентності мікроорганізмів, яке перетнуло межу клінічного профілю і дедалі частіше зустрічається в об'єктах навколишнього середовища. Санітарно-мікробіологічний аналіз води передбачає проведення якісного та кількісного аналізу води з визначенням умовно-патогенних та патогенних штамів. Водночас показники ступеня антибіотикорезистентності мікроорганізмів виділених із зразків води відіграють важливу роль у визначенні екологічного стану водойми та якості води в цілому [2].

Найближчим аналогом є спосіб індикації техногенно-трансформованих ґрунтів за мікробіологічними показниками [3], в якому використали показники кількості різних еколого-трофічних груп мікроорганізмів, встановили достовірні кореляційні зв'язки між кількістю деяких груп мікроорганізмів та вмістом кислоторозчинних форм важких металів. Недоліком способу є те, що визначення еколого-трофічних груп мікроорганізмів є трудомістким та вартісним процесом, а також не дає оцінити потенційну генетичну трансформацію мікроорганізмів під впливом техногенного впливу.

Водночас рівень антибіотикорезистентності є швидким орієнтовним способом визначення стану техногенної трансформації екосистеми.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб індикації мікробіологічної якості води за ступенем чутливості виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, за допомогою якого можна визначити рівень антропогенного навантаження на водні екосистеми за рахунок дослідження ступеня чутливості виділених умовно-патогенних мікроорганізмів до антибіотиків.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі індикації мікробіологічної якості води за ступенем чутливості виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, що включає проведення мікробіологічного аналізу води, згідно з корисною моделлю, для індикації мікробіологічної якості води використовують показники чутливості виділених ізолятів до антибіотиків різного спектра дії, визначають кореляційні взаємозв'язки між концентраціями важких металів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот та до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій.

Корисна модель реалізується наступним чином. Відбір зразків води з річки Уж проводили відповідно СанПін № 4630-88 [4]. Ідентифікація мікроорганізмів включала вивчення морфологічних характеристик колоній на агарі Хотгінгера ($\text{pH} \pm 7,2$) і подальшу диференціацію на селективних середовищах Ендо, Плоскирева, вісмут-сульфітному агарі. Хромогенне поживне середовище (Hi Crom UTI Agar, Modified HiMedia, Індія) використовували для одноетапного виділення та прямої ідентифікації найбільш частих і значущих для санітарної мікробіології Enterobacteriaceae. Визначення родової та видової приналежності умовно-патогенних бактерій проводили за результатами комплексу біохімічних тестів (Enterotest 24 та Enterotest 16) фірми Lachema, Чехія. Геном штамів Salmonella підтверджений сироваткою Salmonella (Denka Seiken, Японія).

Антибіотикорезистентність ізолятів Enterobacteriaceae визначали диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера згідно з EUCAST (Європейський комітет із тестування чутливості до антимікробних засобів). Ізоляти перевіряли на чутливість до таких антибіотиків: ампіцилін (АМФ, 10 мкг), ампіцилін-сульбактам (АМП/С, 10/10 мкг), цефтріаксон (ЦФР, 30 мкг), іміпенем (ІМП, 10 мкг), цефуроксим (ЦФР, 30 мкг), цефоперазон-сульбактам (ЦФП/С, 75/30 мкг), меропенем (МЕР, 10 мкг); амікацин (АМК, 30 мкг); гентаміцин (ГЕН- 10 мкг); ципрофлоксацин (ЦИП, 5 мкг), левофлоксацин (ЛФК, 5 мкг), гатифлоксацин (ГАТ, 5 мкг), норфлоксацин (НОР, 10 мкг), офлоксацин (ОФЛ, 2 мкг), ломефлоксацин (ЛОМ, 30 мкг); тетрациклін (ТЕТ, 30 мкг) і доксициклін (ДОК, 10 мкг). Кожен бактеріальний ізолят класифікували як чутливий (S), проміжний (I) або стійкий (R) до антибіотиків відповідно до стандарту інтерпретації діаметра зони, рекомендованого EUCAST. Escherichia coli ATCC 25922 використовувався як штам контролю якості для перевірки якості середовищ і дисків з антибіотиками, а також точності процедури

тестування. Для визначення концентрацій важких металів та органічних речовин у зразках води проводили відбір проб із поверхневого горизонту середини водойми за допомогою пластикових пробовідбірників об'ємом 1 дм³. Визначення концентрацій важких металів (Cu, Zn, Cr, Ni, As, V, Pb) проводили на емісійному спектрометрі на ICP-MS "Agilent7700x" відповідно стандартної методики.

Суть корисної моделі пояснюють креслення, де на фіг. 1 зображені кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Zn та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот (техногенно-трансформована територія № 3); (n=10; p<0,05). Крім цього, кореляційні взаємозв'язки між концентраціями Zn та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій (техногенно-трансформована територія № 3); (n=10; p<0,05) зображені на фіг. 2.

Приклад. На прикладі чотирьох моніторингових ділянок, розташованих у витоках річки Уж - с. Волосянка, яка не підпадає під антропогенний вплив і визначається як контрольна точка № 1; ділянка № 2 - на території до м. Перечин; ділянка річки нижче за течією була визначена, як антропогенно-навантажена, через близьке розташування до Перечинського-лісохімічного заводу - точка № 3, розташована в 100 м від впадіння струмка Доморадж у водойму; ділянка № 4 - за м. Перечин. Найбільш ймовірним джерелом промислових стічних вод є струмок Доморадж, який протікає біля заводу й впадає в річку Уж [5].

Виділені мікроорганізми в межах точки № 1 та № 2 проявляли обернену залежність відносно концентрацій важких металів, наприклад відносно Pb (r=-0,17 - ампіцилін; r=-0,22 - ампіцилін-сульбактам; r=-0,10 - цефтріаксон; r=-0,29 - іміпенем; r=-0,55 - цефоперазон-сульбактам; r=-0,49 - меропенем; r=-0,02 - цефуроксим). Така динаміка пов'язана з низьким рівнем забруднення території, зокрема і важкими металами. Освоєння даної території обмежене через гірський рельєф та лісистість місцевості. На антропогенно-навантаженій території № 3 встановлено позитивний зв'язок між підвищенням Zn та зростанням резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, які є інгібіторами синтезу нуклеїнових кислот (r=+0,96 - офлоксацин; r=+0,59 - ломефлоксацин; r=+0,83 - ципрофлоксацин; r=+0,91 - левофлоксацин; r=+0,83 - гатифлоксацин; r=+0,55 - норфлоксацин) та ігібіторами синтезу клітинної стінки бактерій (r=+0,99 - ампіцилін; r=-0,45 - ампіцилін-сульбактам; r=+0,93 - цефтріаксон; r=+0,81 - іміпенем; r=+0,68 - цефоперазон-сульбактам; r=+0,99 - меропенем; r=-0,02 - цефуроксим). В межах моніторингової точки № 4 відмічається зниження позитивних корелятивних зв'язків, розглянемо на прикладі Cr і стійкості до антибіотиків, які є інгібіторами синтезу нуклеїнових кислот (r=-0,31 - офлоксацин; r=0,11 ломефлоксацин; r=-0,20 - ципрофлоксацин; r=+0,15 - левофлоксацин; r=-0,83 - гатифлоксацин; r=-0,25 - норфлоксацин).

Встановлено чіткі взаємозв'язки між розвитком антибіотикорезистентності та концентраціями металів у водоймі. Така динаміка може бути наслідком як і спільних джерел забруднення, так і безпосереднього впливу політантів на розвиток механізмів стійкості.

Корисна модель може бути використана в лабораторіях при проведенні санітарно-гігієнічної оцінки якості водних об'єктів і джерел водопостачання, а також при визначенні рівня техногенної трансформованості водних екосистем.

Джерела інформації:

1. Kittinger, C., Kirschner, A., Lipp, M., Baumert, R., Mascher, F., Farnleitner, A.H., & Zarfel, G.E. (2018). Antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolates from the river Danube: susceptibility stays high. *International journal of environmental research and public health*, 75(1), 52.

2. Singh R., Singh A.P., Kumar S., Giri B.S., Kim K-H. (2019). Antibiotic Resistance in Major Rivers in the World: A Systematic Review on Occurrence, Emergence, and Management Strategies. *Journal of Cleaner Production*, 234.

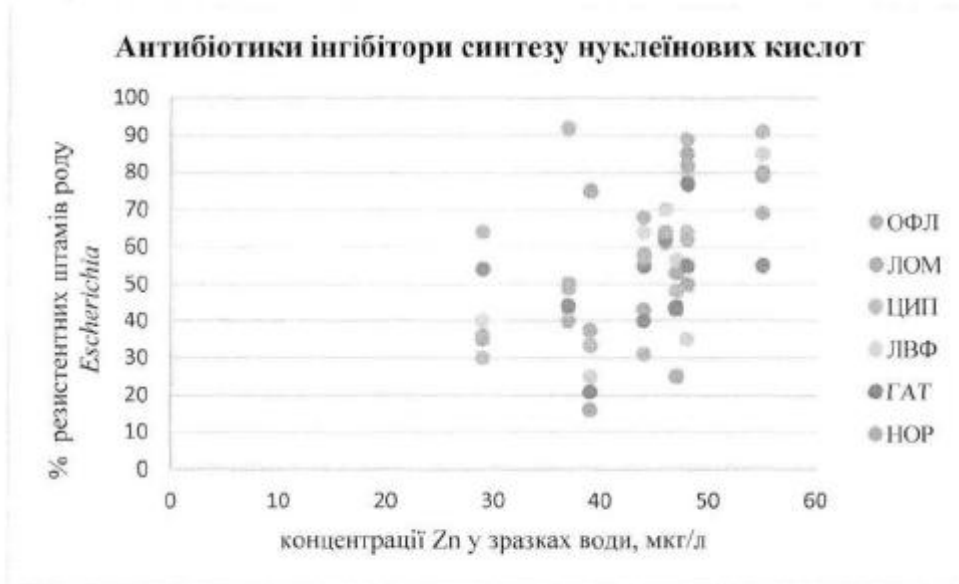
3. Патент UA 120177, МПК C12Q 1/00, G01N 33/24 (2006.01). Спосіб індикації техногенно трансформованих ґрунтів за мікробіологічними показниками / Кривцова Марина Валеріївна (UA); Бобрик Надія Юріївна (UA); Ніколайчук Віталій Іванович (UA).- № u201704022; заяв. 24.04.2017; опуб. 25.10.2017, 20, Бюл. № 20. - Найближчий аналог.

4. Державні санітарні норми та правила "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною": ДСанПіН 2.2.4-400-10. - [Чинний від 2010.06.01]. ДсанПін <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0452-10#Text>

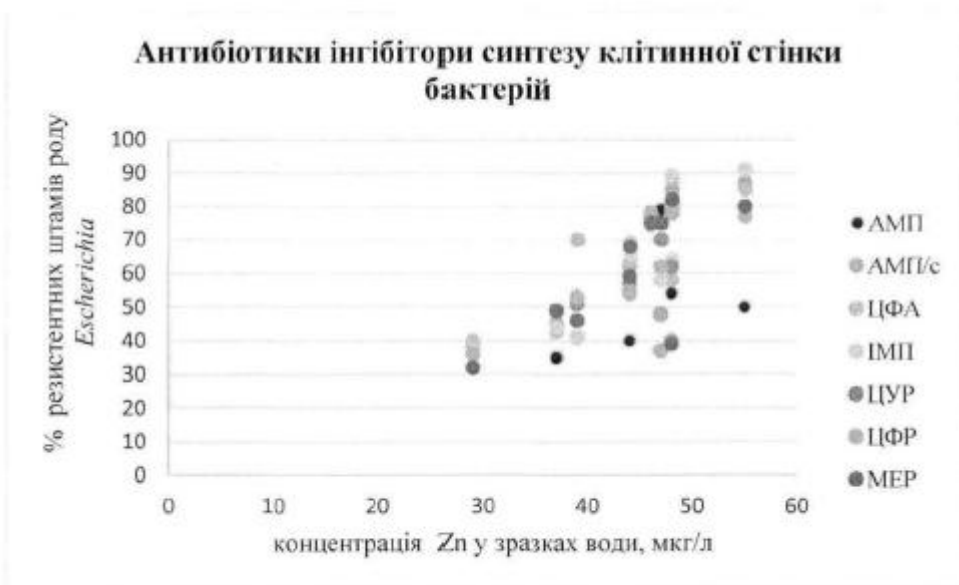
5. Kryvtsova, M., Bobrik, N., Sabov, M., Sabov, M. (2017). Microbiological Indication of Soils in Zone of Influence of Perechin Timber and Chemical Plant. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, (1).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Спосіб індикації мікробіологічної якості води за ступенем чутливості виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, що включає проведення мікробіологічного аналізу води, який **відрізняється** тим, що для індикації мікробіологічної якості води використовують показники чутливості виділених ізолятів до антибіотиків різного спектра дії, визначають кореляційні взаємозв'язки між концентраціями важких металів та ступенем резистентності мікроорганізмів до антибіотиків інгібіторів синтезу нуклеїнових кислот та до антибіотиків інгібіторів синтезу клітинної стінки бактерій.



Фіг. 1



Фіг. 2