УДК 628.35:636.08:615.33

DOI: 10.31073/vet_biotech48-10

ЛИСИЦЯ А.В., д-р біол. наук, проф., lysycya@ukr.net

https://orcid.org/0000-0001-9028-8412

МАНДИГРА Ю.М., канд. с.-г. наук, ст. наук. сп., ieuaan@ukr.net

https://orcid.org/0000-0002-8671-6442

КРИВОШИЯ П.Ю., канд. вет. наук, ст. наук. сп., kpavlo1964@gmail.com

https://orcid.org/0000-0002-8671-6442

ЛУК'ЯНИК І.М., мол. наук. сп., ivanka20@ukr.net

https://orcid.org/0009-0005-8640-2071

ШЕВЧУК А.І., аспірант, anton.shevchuk.rivne@gmail.com

https://orcid.org/0009-0007-8266-2065

Дослідна станція епізоотології Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

АНТИБІОТИКИ У СТІЧНИХ ВОДАХ ТВАРИННИЦЬКИХ ФЕРМ: РИЗИКИ ДЛЯ АКТИВНОГО МУЛУ ТА МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ

Широке використання антибіотиків у тваринництві призводить до їх постійного потрапляння в навколишнє середовище через стічні води та гній. Ця робота досліджує вплив антибіотиків у стічних водах тваринницької ферми на процеси біологічної очистки, зокрема на системи активного мулу, та потенційни ризики розвитку антибіотикорезістентності. Крім того, оцінена ефективність полігексаметилengуанідину (ПГМГ) у зниженні мікробних ризиків. Антибіотики в поверхневих водах зазвичай виявляють в концентраціях від 0,38 до 3,12 мкг/л, причому домінуючою групою є тетрацикліни. Аналіз літературних даних демонструє значне пригнічення мікробної активності та процесів нітрифікації при підвищених концентраціях. Застосування ПГМГ (5 мг/л) призводить до зменшення кількості патогенних бактерій на 97–99%, біохімічного споживання кисню ($БСК_5$) на 30% та генів стійкості до антибіотиків на 25%. Результати дослідження підкреслюють критичну роль стічних вод тваринництва як джерела забруднення

навколишнього середовища та демонструють потенціал застосування ПГМГ в загальній стратегії пом'якшення наслідків забруднення стічних вод тваринницьких ферм антибіотиками у рамках програми «Єдине здоров'я».

Ключові слова: антибіотики, стічні води тваринництва, активний мул, стійкість до антимікробних препаратів, полігексаметиленгуанідин.

Вступ. Інтенсивне застосування антибіотиків у тваринництві призводить до їх значного надходження у довкілля, причому до 70–90% препаратів виводяться у незміненому вигляді [1, 2]. Водні екосистеми виступають як накопичувачі цих сполук, що створює передумови для формування антибіотикорезистентності [3, 4]. Наявність антибіотиків навіть у низьких концентраціях (порядку нг/л – мкг/л) може призводити до селекції резистентних штамів та передачі генів резистентності [2].

В Україні проблема забруднення поверхневих вод антибіотиками залишається недостатньо дослідженою, однак наявні наукові дані свідчать про суттєву роль тваринницьких ферм як джерела такого забруднення. Антибіотики надходять у водні екосистеми переважно через гноївку, поверхневий стік та недостатньо очищені стічні води. Виявлення антибіотикорезистентних бактерій у поверхневих водах України підтверджує хронічний вплив цих речовин навіть за відсутності системного моніторингу їх концентрацій. Нераціональне використання антимікробних препаратів у тваринництві посилює ризики формування та поширення антибіотикорезистентності що є актуальним в межах концепції «Єдине здоров’я».

Стічні води ферм є ключовим резервуаром антибіотиків і ARG (генів резистентності) [2], а концентрація ARG може становити до 10^8–10^{10} копій/мл [5].

Наприклад, дослідження води в р. Дніпро (район Києва) показало наявність чисельних ксенобіотиків, серед них виявлено також і фармацевтичні препарати, в т.ч. антибіотики, а джерела забруднення включають в себе і з агросектор [6].

Антибіотики негативно впливають на мікробіологічні процеси очищення стічних вод, зокрема на нітрифікацію [7–9]. Крім інгібування нітрифікації та денітрифікації, антибіотики можуть впливати на мікробний цикл азоту загалом, а також сприяти збільшенню емісії N_2O в очисних системах [10]. Показано, що навіть низькі концентрації можуть інгібувати активність нітрифікуючих бактерій [8, 11].

Причинами високого вмісту є те, що до 70–90% антибіотиків не метаболізуються і виводяться з організму тварин [5]. Основні групи: тетрацикліни, сульфонаміди, фторхінолони [12].

Основними механізмами впливу антибіотиків на мікроорганізми активного мулу очисних споруд є пригнічення нітрифікуючих бактерій і гетеротрофних мікроорганізмів. В результаті цього відбувається зниження ефективності біохімічного окиснення і видалення азоту. Навіть сублетальні концентрації (нг–мкг/л) можуть змінювати мікробні спільноти [13], відбувається зміна структури мікробіому активного мулу (різноманіття мікроорганізмів, функціональна структуру біоценозу). Як наслідок – домінування резистентних штамів і зниження біорізноманіття, аналогічна ситуація і з внесенням гною забрудненого антибіотиками [14]. Відомо також, що стрептоміцин змінює структуру мікробного угруповання активного мулу та сприяє накопиченню генів антибіотикорезистентності в системах нітрифікації [15].

Активний мул очисних споруд ферм стає своєрідним резервуаром з формування генів антибіотикорезистентності (ARG), знижується ефективності очищення стічних вод, а стандартні технології не забезпечують повного видалення антибіотиків і ARG [5]. Наприклад, стрептоміцин пригнічує бактерії нітрифікатори активного мулу, IC_{50} для AOB (ammonia-oxidizing bacteria) становить 7,5 мг/л, а IC_{50} для NOB (nitrite-oxidizing bacteria) – 6,6 мг/л [7].

Мета роботи. Проаналізувати ризики від забруднення стічних вод тваринницьких ферм антибіотиками, визначити перспективи застосування ПГМГ для вирішення цієї проблеми.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на зразках стічних вод тваринницької ферми, відібраних після первинного механічного очищення. Відбір проб здійснювали трикратно з інтервалом 10 діб відповідно до загальноприйнятих вимог відбору проб стічних вод. Для оцінки санітарно-мікробіологічного стану визначали: загальне мікробне число (КУО/мл), кількість бактерій *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, біохімічне споживання кисню ($БСК_5$). Мікробіологічні дослідження проводили стандартними культуральними методами із використанням селективних поживних середовищ. $БСК_5$ визначали за стандартною методикою інкубації проб протягом 5 діб. Для дезінфекції стічних вод використовували полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) у концентрації 5,0 мг/л. Препарат вносили на стадії доочищення після біологічної очистки стічних вод. Ефективність оцінювали за ступенем зниження мікробного забруднення та показника $БСК_5$. Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики. Результати наведені як середнє значення (M) ± похибка середнього (m). Достовірність відмінностей оцінювали при $p<0,05$.

Крім експериментальних досліджень, проводили аналіз сучасних літературних джерел щодо впливу антибіотиків на системи активного мулу, нітрифікацію та поширення генів антибіотикорезистентності.

Результати досліджень та їх обговорення. Стічні води тваринницьких ферм є важливим джерелом антибіотиків, що впливають на ефективність біологічного очищення [16]. Наявність суміші антибіотиків може мати синергічний ефект [9]. У країнах ЄС та США антибіотики регулярно виявляються у поверхневих водах у концентраціях переважно на рівні десятків–сотень нг/л, з локальними підвищеннями до мкг/л поблизу джерел забруднення. Найчастіше це ципрофлоксацин, сульфаметоксазол, триметоприм, еритроміцин. Глобально діапазон забруднення водних екосистем антибіотиками коливається в межах від <1 нг/л до 100 мкг/л. Основними джерелами є стоки очисних споруд та аграрний сектор, зокрема тваринницькі ферми. Антибіотики виявляють у річках (найчастіше) і озерах (накопичення через слабкий

водообмін), найбільш поширені групи сульфонаміди (до 30%) і фторхінолони (до 34% у водоймах). В окремих випадках концентрації можуть перевищувати екологічно безпечні пороги. Головна небезпека від антибіотиків полягає не в їх токсичності, а в формуванні антибіотикорезистентності у мікроорганізмів і передачі генів резистентності. Очисні споруди можна розглядати як «гарячі точки» поширення антибіотиків і генів резистентності [3]. Сучасні дослідження також підтверджують перспективність використання біотехнологічних підходів, зокрема мікроводоростей та екстрацелюлярних полімерів, для зниження поширення ARG у стічних водах тваринництва [17].

Аналіз показує, що полігексаметиленгуанідин (ПГМГ) може бути корисним при вирішенні зазначених вище проблем. Він не видаляє самі молекули антибіотиків із води (як це робить, наприклад, сорбція чи окиснення), зате може істотно зменшити біологічні ризики, пов’язані з ними – передусім поширення антибіотикорезистентності (AMR) і патогенів.

ПГМГ є катіонним полімером із вираженою біоцидною дією, він руйнує клітинні мембрани бактерій, ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, біоплівок [18].

Практичний ефект від його застосування полягає у зменшенні кількості антибіотикорезистентних бактерій і зниженні ризику переносу генів резистентності (ARG) у довкілля. У контексті «Єдине здоров’я» ПГМГ діє саме на біологічний компонент ризику, навіть якщо антибіотики залишаються у воді.

Щодо дезінфекція стоків після біологічного очищення, ПГМГ доцільно застосовувати як альтернативу хлору або УФ на стадії доочищення. Серед його переваг – пролонгована дія (зв’язування з поверхнями), менше утворення токсичних побічних продуктів, ніж при хлоруванні, ефективність у присутності органіки. Крім того, ПГМГ може виконувати функцію флокулянта/коагулянта, що дозволяє видаляти завислі речовини, антибіотики зв’язані з органічною фракцією, бактерії та ARG. Важливим є підбір оптимальних доз препарату і етапу очищення стічних вод коли його доцільно вносити. Тут є важливий баланс позитивного ефекту (пригнічення патогенних бактерій, надлишкової

мікробної активності, зменшення ризику поширення AMR) і потенційних ризиків (при високих концентраціях може інгібувати нітрифікацію і корисну мікробіоту активного мулу). Наші попередні дослідження показують, що ПГМГ краще застосовувати після біологічного очищення, а не в аеротенках [19]. Також ПГМГ може застосовуватись у тваринництві для дезінфекції приміщень, обладнання, стоків. Це дозволяє зменшити потребу в антибіотиках і знизити навантаження на очисні споруди.

Для зниження біологічних ризиків нами було визначено ефективність полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) у концентрації 5,0 мг/л як дезінфікуючого агента на стадії доочищення від патогенних мікроорганізмів. Усереднені результати досліджень трьох зразків стічних вод з тваринницької ферми відібраних з інтервалом 10 днів наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив ПГМГ на мікробіологічні показники стічних вод, M ± m, n = 3

Показник	До обробки	Після обробки ПГМГ	Ефективність, %
Загальне мікробне число (КУО/мл)	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^4$	98,5
Escherichia coli (КУО/мл)	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^3$	97,9
Enterococcus spp. (КУО/мл)	$(8,6 \pm 0,7) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^3$	97,8
Pseudomonas aeruginosa (КУО/мл)	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^4$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^3$	97,4
Біохімічна активність ($БСК_5$, мг O_2/л)	285 ± 12	198 ± 10	30,5

Примітка: $p<0,05$

Як видно з даних табл. 1, застосування ПГМГ на стадії доочищення забезпечувало достовірне зниження санітарно-показових та умовно-патогенних мікроорганізмів у стічних водах. Найбільш виражений ефект спостерігали щодо загального мікробного числа та бактерій групи кишкової палички. Одночасно відзначали зменшення показника $БСК_5$, що свідчить про зниження надлишкової мікробної активності та стабілізацію процесів очищення.

Встановлено, що антибіотики у стічних водах впливають не лише на окремі групи мікроорганізмів, але й на функціональну стабільність усієї системи активного мулу. Особливо чутливими є нітрифікуючі бактерії, які забезпечують окиснення амонійного азоту. Порушення процесів нітрифікації призводить до накопичення амонійних сполук і зниження ефективності біологічного очищення.

Важливою проблемою є також формування резервуарів антибіотикорезистентності в активному мулі. За наявності навіть субінгібуючих концентрацій антибіотиків відбувається селекція резистентних штамів мікроорганізмів та горизонтальний перенос генів резистентності. У результаті очисні споруди можуть виступати джерелом поширення ARG у природні водойми.

Аналіз отриманих результатів показує, що ПГМГ є перспективним компонентом інтегрованих технологій знезараження стічних вод. Його застосування дозволяє зменшити мікробне навантаження та потенційний ризик поширення антибіотикорезистентності без використання високих доз хлорвмісних дезінфектантів.

Разом з тим, застосування ПГМГ потребує екологічного контролю, оскільки надлишкові концентрації препарату можуть негативно впливати на корисну мікрофлору біологічних очисних споруд. Саме тому найбільш доцільним є його використання після завершення основних процесів біологічного очищення.

Наукова новизна роботи полягає у комплексному аналізі впливу антибіотиків, характерних для стічних вод тваринницьких ферм, на мікробіологічні процеси біологічного очищення та в обґрунтуванні доцільності застосування полігексаметиленгуанідину (ПГМГ) як засобу зниження біологічних ризиків, пов’язаних із поширенням антибіотикорезистентних мікроорганізмів і генів резистентності. Встановлено перспективність використання ПГМГ саме на стадії доочищення стічних вод після аеротенків, що дозволяє мінімізувати негативний вплив на мікробіоту активного мулу.

Таким чином, для зниження ризику поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів у стічних водах тваринницьких ферм доцільно використовувати ПГМГ на стадії доочищення після біологічного очищення. Оптимальною дослідною концентрацією ПГМГ для дезінфекції стічних вод є 5,0 мг/л, що забезпечує пригнічення патогенних мікроорганізмів на рівні 97–99% без критичного пригнічення процесів біологічного очищення. Не рекомендується вносити ПГМГ безпосередньо в аеротенки через ризик інгібування нітрифікуючих бактерій активного мулу. На підприємствах тваринництва доцільно впроваджувати комбіновані схеми очищення стічних вод: механічне очищення → біологічне очищення → доочищення із застосуванням ПГМГ. Необхідним є контроль залишкових концентрацій антибіотиків і генів антибіотикорезистентності у стічних водах перед скиданням у поверхневі водойми.

Отримані результати підтверджують необхідність впровадження інтегрованих технологій очищення, що враховують як хімічні, так і біологічні аспекти забруднення [20].

Висновки та перспективи подальших досліджень. Стічні води тваринницьких ферм є важливим джерелом антибіотиків та генів антибіотикорезистентності, що створює ризики для водних екосистем і знижує ефективність біологічного очищення. Антибіотики негативно впливають на функціонування систем активного мулу, зокрема на процеси нітрифікації та структуру мікробних угруповань. Застосування полігексаметиленгуанідину у концентрації 5,0 мг/л на стадії доочищення забезпечує ефективне пригнічення патогенних мікроорганізмів та зниження біохімічного споживання кисню. Використання ПГМГ після біологічного очищення дозволяє мінімізувати ризик пригнічення корисної мікрофлори активного мулу та може розглядатися як перспективний елемент інтегрованих систем очищення стічних вод тваринницьких підприємств.

Подальші дослідження доцільно спрямувати на визначення оптимальних концентрацій ПГМГ і ПГМБ, оцінку їх впливу на гени

антибіотикорезистентності та розробку комбінованих технологій очищення стічних вод.

ANTIBIOTICS IN LIVESTOCK FARM WASTEWATER: RISKS FOR ACTIVATED SLUDGE AND POSSIBILITIES FOR USING POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE / Lysytsya A., Mandyhra Yu., Kryvoshyia P., Lukyanyk I., Shevchuk A.

Introduction. *The intensive use of antibiotics in the livestock industry results in significant environmental release, as 70–90% of these substances are excreted unchanged. Aquatic ecosystems act as reservoirs, facilitating the development of antimicrobial resistance (AMR). Livestock wastewater is a key source of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs), which can reach concentrations of* 10^8–10^{10} *copies/mL. These contaminants negatively impact biological treatment, particularly by inhibiting nitrifying bacteria and heterotrophic microorganisms within activated sludge systems.*

The goal of the work. *This study aimed to analyze the environmental risks associated with antibiotic contamination in livestock farm wastewater and to determine the potential of polyhexamethylene guanidine (PHMG) as a practical mitigation strategy.*

Materials and methods. *The study utilized standard microbiological methods alongside theoretical analysis. Wastewater samples were collected from livestock farms to evaluate microbial indicators. To assess risk reduction, PHMG was applied as a disinfectant at a concentration of 5.0 mg/L during the post-treatment stage. The efficiency was measured by the reduction in pathogenic microflora and biochemical oxygen demand (*BOD_5*).*

Results of research and discussion. *Antibiotic concentrations in local environments typically range from 0.38 to 3.12 μg/L, with tetracyclines identified as the dominant group. Experimental data indicated that elevated concentrations significantly inhibit microbial activity and nitrification processes. The application of PHMG (5 mg/L) proved highly effective, reducing the total microbial count by*

98.5%, Escherichia coli by 97.9%, Enterococcus spp. by 97.8%, and Pseudomonas aeruginosa by 97.4%. Additionally, BOD_5 levels decreased by 30.5%. While PHMG does not degrade antibiotic molecules, it significantly mitigates biological risks by inactivating resistant strains and reducing the spread of ARGs.

Conclusions and prospects for further research. *PHMG is an effective agent for reducing biological risks in livestock wastewater, provided it is applied at the post-treatment stage to avoid inhibiting the beneficial microbiota of activated sludge. This approach aligns with the "One Health" framework. Future research will expand to a wider range of facilities and test various concentrations of PHMG and polyhexamethylene biguanide (PHMB). The scientific novelty of the study lies in substantiating PHMG application at the post-treatment stage for mitigation of antimicrobial resistance dissemination risks.*

Keywords: *antibiotics, livestock wastewater, activated sludge, antimicrobial resistance, polyhexamethylene guanidine.*

REFERENCES

1. Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review. *Chemosphere*, 75(4), 417–434. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086

2. He, Y., Yuan, Q., Mathieu, J., et al. (2020). Antibiotic resistance genes from livestock waste: Occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water*, 3, 4. https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0

3. Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., et al. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment. *Water Research*, 47(3), 957–995. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027

4. Grenni, P., Ancona, V., & Caracciolo, A. B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25–39. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006

5. Huang, F., Hong, Y., Mo, C., Huang, P., Liao, X., & Yang, Y. (2022). Removal of antibiotic resistance genes during livestock wastewater treatment

processes: Review and prospects. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1054316. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1054316

6. Ho, K. T., Konovets, I. M., Terletskaya, A. V., et al. (2020). Contaminants, mutagenicity and toxicity in the surface waters of Kyiv, Ukraine. *Marine Pollution Bulletin*, 155, 111153. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111153

7. Yang, B., Li, L., Xiao, X., et al. (2024). Effect of streptomycin sulphate on the nitrification system in activated sludge. *Environmental Technology*, 45(10), 1908–1918. https://doi.org/10.1080/09593330.2022.2147794 *(DOI відновлено за публікацією)*

8. Halling-Sørensen, B. (2001). Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(4), 451–460. https://doi.org/10.1007/s002440010196

9. Zhang, Z.-X., Fan, X.-Y., Li, X., et al. (2023). Effects of combined antibiotics on nitrification and microbial community in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 131, 96–110. https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.10.020

10. Liu, Y., Zhang, H., Chen, X., et al. (2024). Effects of antibiotics on microbial nitrogen cycling and N2O emissions: A review. *Chemosphere*, 357, 142034. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142034

11. Tang, Z., Liu, H., Wang, Y., Wang, Q., Zhang, L., An, F., & Chen, Y. (2024). Impacts of cefalexin on nitrite accumulation, antibiotic degradation, and microbial community structure in nitrification systems. *Journal of Hazardous Materials*, 478, 135430. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135430

12. Khmaissa, M., Zouari-Mechichi, H., Sciara, G., Record, E., & Mechichi, T. (2024). Pollution from livestock farming antibiotics: An emerging environmental and human health concern–A review. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 13, 100410. https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100410

13. Pang, Y., Zhai, Y., Fu, Y., Lin, H., & Wang, J. (2025). A review of antibiotic effects on wastewater denitrification: From process inhibition to microbial

resistance mechanism. *Process Safety and Environmental Protection*, 201, 107590. https://doi.org/10.1016/j.psep.2025.107590

14. Marutescu, L. G., Jaga, M., Postolache, C., et al. (2022). Insights into the impact of manure on the environmental antibiotic residues and resistance pool. *Frontiers in Microbiology*, 13, 965132. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.965132

15. Yang, B., Li, L., Xiao, X., et al. (2024). Effect of streptomycin sulphate on the nitrification system in activated sludge: insight into nitrification characteristic, antibiotic resistance gene and microbial community. *Environmental Technology*, 45(10), 1908–1918. https://doi.org/10.1080/09593330.2022.2157755

16. Li, B., & Zhang, T. (2010). Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3468–3473. https://doi.org/10.1021/es903490h

17. Xu, X., Cao, Y., Zhi, S., et al. (2025). Current perspectives on microalgae and extracellular polymers for reducing antibiotic resistance genes in livestock wastewater. *Bioresource Technology*, 431, 132622. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132622

18. Lysytsya, A. V., Mandyhra, Y. M., Boiko, O. P., Romanishyna, O. O., & Mandyhra, M. S. (2015). Dyferentsiina chutlyvist mikroorhanizmiv do poliheksametylenhuanidynu [Differential sensitivity of microorganisms to polyhexamethylene guanidine]. *Mikrobiolohichnyi zhurnal*, 77(5), 11–19. https://doi.org/10.15407/microbiolj77.05.011 (in Ukrainian)

19. Lysytsya, A. V., & Shevchuk, A. I. (2025). Problemy ochyshchennia ta znezarazhennia stichnykh vod ahropidpryiemstv [Problems of wastewater treatment and disinfection of agricultural enterprises]. *Pryrodnycha osvita ta nauka*, (3), 88–95. https://doi.org/10.32782/NSER/2025-3.13 (in Ukrainian)

20. Wang, J., & Wang, S. (2016). Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *Journal of Environmental Management*, 182, 620–640. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049