

АНОТАЦІЯ

Дмитрієва І. Г. Гельмінти озерної жаби (*Pelophylax ridibundus*): сучасний склад фауни та особливості угруповань. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія». Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена встановленню сучасного складу та структури гельмінтофауни *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) на матеріалі з території України; характеристиці інфраугруповань гельмінтів *P. ridibundus* та пошуку залежності між параметрами інфраугруповань зі статтю та розмірами тіла хазяїв; дослідженню взаємодії популяцій гельмінтів у інфраугрупованнях за допомогою статистичних методів та інтерпретації результатів відповідно до наявних відомостей про біологічні особливості видів гельмінтів та хазяїна, а також характеристиці компонентних угруповань гельмінтів *P. ridibundus*, порівнянню параметрів угруповань залежно від типів популяцій хазяїв з комплексу «*Pelophylax esculentus*» та встановленню географічних та екологічних особливостей у складі та структурі компонентних угруповань гельмінтів *P. ridibundus*.

Дослідження проводили на базі Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України (Київ, Україна). Збір та визначення амфібій здійснювали за участі колег з Інституту та інших установ у травні–жовтні з 2016 по 2024 роки у 29 локалітетах на території України. Видову ідентифікацію хазяїв проводили на основі морфологічних ознак. Досліджували амфібій з комплексу «*P. esculentus*»: *P. ridibundus* (R), *P. esculentus* (E), *P. lessonae* (L) у складі вибірок, які представляли батьківські (R, L) чи змішані (RE, LE) популяції; основну частину хазяїв (за винятком двох вибірок) становили дорослі особини.

Проводили повне гельмінтологічне дослідження хазяїв, зокрема, їхніх внутрішніх органів, порожнини тіла, шкіри та м'язів хазяїв. Ідентифікацію гельмінтів здійснювали за морфологічними ознаками на тимчасових препаратах після просвітлення у лактофенолі, або на постійних препаратах після фарбування

частини матеріалу (цестоди, трематоди) карміном та гематоксилином за Майером, а також на основі молекулярних даних (отримання послідовностей нуклеотидів окремих ділянок геномної ДНК, зокрема генів *18S* та *28S* ядерної рибосомальної ДНК та гену *cox1* мітохондріальної ДНК).

З метою отримання сучасної інформації про склад та структуру фауни гельмінтів *P. ridibundus*, а також про характерні особливості їх угруповань, проведено гельмінтологічне дослідження 456 особин зелених жаб комплексу «*P. esculentus*», у тому числі 371 озерних жаб (*P. ridibundus*), 73 гібридних форм *P. esculentus* та 12 ставкових жаб (*P. lessonae*). В ході проведення дослідження зібрано та ідентифіковано більше 50 тисяч екземплярів гельмінтів.

Трапляння та чисельність гельмінтів в популяціях та угрупованнях визначали за параметрами екстенсивності інвазії, інтенсивності інвазії та індексу рясності з вказуванням довірчих інтервалів (95%) у програмі Quantitative Parasitology (QP) 3.0 (Bush et al., 1997; Rózsa et al., 2000; Reiczigel et al., 2019; Reiczigel, 2003); значення екстенсивності інвазії порівнювали із застосуванням безумовного точного тесту (Reiczigel et al., 2008), значення індексу рясності – bootstrap t-тесту у програмі QP 3.0.

Інфраугруповання гельмінтів для різних статей хазяїв характеризували за допомогою видового багатства та чисельності та порівнювали з використанням критерію Манна-Уїтні в програмі PAST 3.10 (Hammer, 1999–2015); кореляцію параметрів інфраугруповань з розмірами тіла хазяїв виявляли за допомогою коефіцієнту кореляції Спірмена в програмі PAST 3.10. Статистичний аналіз спільного паразитування в інфраугрупованнях гельмінтів проводили методом виявлення попарних міжвидових асоціацій між траплянням видів у хазяїні та між чисельністю інфрапопуляцій у хазяїні (Ludwig & Reynolds, 1988) за допомогою Хі-квадрат (χ^2) тесту, мережі співіснування «co-occurrence network» (packages «cooccur» (Griffith et al., 2016), «visNetwork» (Almende et al., 2021)) та коефіцієнту кореляції Спірмена в програмах Ms Excel 2019, PAST 3.10 та у програмному середовищі R (R Core Team, 2022). Для отриманих значень міжвидових асоціацій гельмінтів проводили корекцію на множинне тестування за Холмом (Aickin & Gensler, 1996) у програмному середовищі R.

Компонентні угруповання гельмінтів характеризували за видовим багатством (фактичне значення, розраховані значення за методами *Chao1*, *bootstrap* та *jackknife* (Poulin, 1998)) та показниками різноманіття та розподілу видів із застосуванням індексів Пієлу, Шеннона, Сімпсона ($1-\lambda$) та Бергера-Паркера (Peet, 1974; Kunakh et al., 2023) у програмі PRIMER 6 (Clarke & Gorley, 2006). Попарне порівняння значень індексів рясності в компонентних угрупованнях гельмінтів проводили за індексом Брея-Кертиса з попередньою трансформацією ($\log X+1$) та стандартизацією (samples by total) даних у програмі PRIMER 6. Візуалізацію подібності між компонентними угрупованнями проводили за допомогою кластерного аналізу методом «group average» та використовуючи графіки неметричного багатовимірного шкалювання (nMDS); відмінності між групами угруповань уточнювали з використанням процедур SIMPER та ANOSIM у програмі PRIMER 6. Для загальної характеристики ступеню антропогенної трансформації локалітетів використовували шкалу урбанізації, запропоновану Європейською Комісією з питань регіональної та міської політики (Dijkstra & Poelman, 2014), розрізняючи локалітети за межами населених пунктів, на межі або в межах населених пунктів, окремо сільського та міського типів.

Встановлено, що у *P. ridibundus* в дослідженому матеріалі наявні щонайменше 39 видів гельмінтів, в тому числі 25 видів трематод (Platyhelminthes: Trematoda), 10 видів нематод (Nematoda: Chromadorea), 2 види цестод (Platyhelminthes: Cestoda) та 2 види акантоцефалів (Acanthocephala: Palaeacanthocephala). Морфологічну ідентифікацію 10 видів гельмінтів підтверджено молекулярними методами. Три знайдені види – нематоди *Rhabdias esculentorum* Cipriani, Mattiucci, Paoletti, Santoro & Nascetti, 2012 та *Strongyloides spiralis* Grabda-Kazubska, 1978, а також цестода *Ophiotaenia saphena* Osler, 1931 – вперше зареєстровані у фауні України. Переважна більшість видів гельмінтів, виявлених в озерної жаби, є гетероксенними паразитами; лише нематоди з родини Cosmocercidae та роду *Oswaldocruzia* є моноксенними. Більшість виявлених видів (72%) використовують амфібій як дефінітивних хазяїв; їхніми проміжними хазяями є

пов'язані з водним середовищем членистоногі та/або молюски. Для 11 видів гельмінтів (28%) амфібії є проміжними або паратенічними хазяями, а їхніми дефінітивними хазяями слугують рептилії, птахи або ссавці. Різноманіття життєвих циклів гельмінтів озерної жаби свідчить про багатство її трофічних зв'язків у біоценозах.

З метою встановлення особливостей інфрагруповань гельмінтів, пов'язаних з віком хазяїна, було визначено кореляцію між розмірами тіла озерних жаб та основними чисельними параметрами інфрагруповань гельмінтів – видовим багатством та чисельністю. В аналізі використано об'єднану вибірку, що складала 361 особину хазяїв (201 самець, 160 самок). На значній за розміром вибірці було підтверджено, що обидва параметри позитивно корелюють із розмірами тіла жаб, тобто хазяї більшого розміру та, відповідно, старшого віку, мають більшу кількість видів та екземплярів гельмінтів. Показано, що найбільший внесок у цю кореляцію вносять нематода *Icosiella neglecta* та трематода *Codonosephalus urniger* (на стадії метацеркарії); на нашу думку, це пов'язано з відносно довгою тривалістю їх життя та здатністю накопичуватися в організмі хазяїв. Вірогідну кореляцію чисельності гельмінтів із розмірами тіла хазяїв також встановлено для більшості видів трематод, що паразитують у травному тракті амфібій. Це, ймовірно, пов'язано зі збільшенням у раціоні живлення дорослих жаб частки членистоногих – проміжних хазяїв трематод. Порівняння параметрів інфрагруповань для різних статей амфібій в об'єднаній вибірці показало, що і видове багатство, і чисельність гельмінтів є вищими в інфрагрупованнях самців жаб, ніж самок. Виявлення причин цих відмінностей потребує окремого дослідження.

Для дослідження міжвидової взаємодії гельмінтів у інфрагрупованнях *P. ridibundus* було використано об'єднану вибірку гельмінтів з 201 особини жаб, зібраних у північних регіонах України – Волинській, Рівненській, Житомирській та Київській областях. В аналіз включено 9 видів гельмінтів, які заражали не менше 15% хазяїв у вибірці. Виявлено позитивні асоціації між трематодами родини Pleurogenidae (*Pleurogenes claviger*, *Prosotocus confusus*, *Pleurogenoides medians*), які пояснюються подібністю їх життєвих циклів та

трансмисії в амфібій. Два з цих видів (*P. confusus* та *P. medians*) виявили позитивні асоціації з нематодою *I. neglecta*, яка, ймовірно, пояснюється однаковою тенденцією до збільшення екстенсивності інвазії всіх трьох видів зі збільшенням розмірів тіла хазяїна – крупніші хазяї з більшою ймовірністю заражені всіма цими видами. Натомість виявлену негативну асоціацію між нематодами *I. neglecta* та *C. ornata* можна пояснити зменшенням екстенсивності інвазії останнім видом у крупних жаб і, відповідно, нижчою ймовірністю одночасної присутності цих видів в хазяїні. Вірогідність позитивних асоціацій між парою видів *I. neglecta* та *P. medians* (p -значення скоректоване методом Холма = 0,00463645) та *P. claviger* і *P. medians* (p -значення скоректоване методом Холма = 0,001162368) було підтверджено із застосуванням корекції на множинне тестування.

Міжвидові асоціації за чисельністю в інфрапопуляціях видів (міжвидові коваріації) визначали за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена. Виявлена позитивна асоціація між трематодами *P. confusus* та *P. medians* найбільш ймовірно пояснюється подібністю їх життєвих циклів та участю одних й тих самих проміжних хазяїв у зараженні амфібій. Позитивна асоціація між трематодами *Opisthoglyphe ranae* та *Diplodiscus subclavatus* може бути пояснена подібною, порівняно більш інтенсивною циркуляцією цих видів в амфібіях завдяки диксеним життєвим циклам. Негативна асоціація між нематодою *C. ornata* та трематодою *D. subclavatus* найбільш ймовірно пов'язана зі спільною локалізацією цих паразитів (задня частина кишківника, ректум) в хазяїні та конкуренцією між ними. Причини деяких виявлених міжвидових асоціацій наразі не мають очевидних обґрунтувань та потребують окремого дослідження. Такими є, приміром, негативні асоціації скреблянки *Acanthocephalus ranae* з трематодою *C. urniger* та нематодою *C. ornata*.

Основні характеристики компонентних угруповань гельмінтів проаналізовані на 20 вибірках хазяїв, що склалися виключно з *P. ridibundus*. Встановлено, що видове багатство в компонентних угрупованнях загалом залежить від інтенсивності прояву антропогенної трансформації екосистем – показником якого нами було обрано ступінь урбанізації. Найнижче видове

багатство очікувано спостерігалось в урбоценозах (в середньому 4,6 видів), найвище – у вибірках за межами населених пунктів (в середньому 5,9 видів). Водночас, значення індексів різноманіття в угрупованнях з урбоценозів виявилися неочікувано високими, близькими до таких в угрупованнях з природних екосистем і вищими за такі в угрупованнях з околиць міст та населених пунктів сільського типу. Ймовірним поясненням цього може бути майже однаково низька чисельність компонентних популяцій всіх видів гельмінтів у вибірках з урбоценозів, і, як наслідок, висока рівномірність у розподілі чисельності видів, в той час, як у менш трансформованих екосистемах виявлено чітко виражені домінуючі за чисельністю види.

Аналіз подібності між вибірками гельмінтів жаб з комплексу «*P. esculentus*» з використанням індексу Брея-Кертиса, методів ANOSIM та SIMPER, кластерного аналізу та nMDS показав, що компонентні угруповання гельмінтів з різних типів популяцій хазяїв не утворюють кластерів відповідно до складу популяцій. Наприклад, компонентні угруповання гельмінтів з популяцій озерної жаби (тип R) не мали вірогідних відмінностей від таких зі змішаних популяцій озерних жаб та гібридних особин (тип RE) – ANOSIM $R=-0,028$; $p=0,56$. Отже, тип популяції хазяїв з комплексу «*P. esculentus*» не є визначальним чинником у формуванні подібностей та відмінностей між компонентними угрупованнями гельмінтів; на склад та структуру угруповань гельмінтів *Pelophylax* spp. більшою мірою впливають інші чинники, такі, на нашу думку, як умови зовнішнього середовища та історія формування угруповання.

Водночас, аналіз подібностей між угрупованнями гельмінтів *P. ridibundus* виявив існування принаймні двох груп, відмінних за складом угруповань та чисельністю популяцій окремих видів. Перша група («північна» або Поліська) включала вибірки з півночі Київської області, Києва та Житомирської області. Друга група («південна») складалась із вибірок з півдня Київської області, а також з Миколаївської, Кіровоградської та Дніпропетровської областей. Відмінності між цими групами були значними і вірогідними за результатом ANOSIM ($R=0,72$; $p=0,002$). Найбільш очевидним внеском у відмінності між групами є наявність видів *Pleurogenes loossi*, *R. esculentarum* та

S. erinaceieuropaei у південній групі та їх відсутність у північній. Окрім того, види *C. urniger* та *C. ornata* у досліджених вибірках мали вірогідно більшу чисельність та екстенсивність інвазії у південних популяціях хазяїна, а види *D. subclavatus*, *I. neglecta* та *P. confusus* – у північних. Таким чином, зроблено висновок про існування принаймні двох фауністичних комплексів гельмінтів озерної жаби на території України.

Наукова новизна роботи полягає в отриманні актуальних даних щодо складу та структури фауни гельмінтів *P. ridibundus* на території України, зокрема у виявленні трьох нових для фауни країни видів – нематод *Rhabdias esculentorum* та *Strongyloides spiralis*, та цестоди *Ophiotaenia saphena*. Вперше охарактеризовано інфраугруповання гельмінтів озерної жаби, виявлено вірогідні відмінності у зараженні самців та самок, вперше досліджено міжвидові асоціації гельмінтів. Вперше досліджено компонентні угруповання гельмінтів озерної жаби; показано, що вони не відрізняються достовірно від угруповань зі змішаних популяцій (озерні жаби та гібридні особини). Виявлено достовірні відмінності між угрупованнями з північних та південних вибірок амфібій, показано існування принаймні двох фауністичних комплексів гельмінтів озерної жаби в Україні. Продемонстровано, що видове багатство у компонентних угрупованнях гельмінтів озерної жаби залежить від ступеня антропогенної трансформації екосистем (урбанізації). Виявлено, що показники (індекси) різноманіття гельмінтів в угрупованнях з урбоценозів є неочікувано високими і наближаються до таких у природних екосистемах.

Практична цінність роботи полягає в тому, що її результати можуть бути використані для подальшого моніторингу процесів у складі та структурі гельмінтофауни озерної жаби в центральній частині її ареалу, що зумовлені кліматичними змінами та впливом антропогенної трансформації середовища. Використані в роботі характеристики та параметри угруповань гельмінтів з різних типів екосистем можуть слугувати індикаторами стану екосистем та популяцій хазяїна. Результати роботи стали частиною виконання наступних грантових програм та планових тем:

- 1) планова тема III-56-21 «Склад і структура фауністичних комплексів і угруповань гельмінтів хребетних в умовах змін клімату і антропогенної трансформації екосистем» (Державний реєстраційний номер 0121U100699) у межах розділу 2 «Особливості угруповань гельмінтів амфібій та рептилій в екосистемах різних типів»;
- 2) конкурсний проєкт Національного фонду досліджень України №2023.03/0068 «Паразити і шосте вимирання: дослідження стану угруповань популяцій паразитів модельних груп тварин в умовах сучасної кризи біорізноманіття»;
- 3) грантовий проєкт НАН України №0121U111976 «Створення генетичної бази даних паразитів фонових видів амфібій та рептилій території України»;
- 4) індивідуальний грант від European Molecular Biology Organization (EMBO) №5447-2023 «Investigation of helminth diversity of green frogs *Pelophylax* spp. and common frog *Rana temporaria* in Lithuania».

Матеріали роботи можуть бути використані під час викладання таких навчальних курсів, як «Паразитологія», «Гельмінтологія» та «Екологія тварин». Всі зібрані та зафіксовані зразки гельмінтів були додані до колекції відділу паразитології Інституту зоології ім. І. І. Шмальгаузена НАН України.

Ключові слова: озерна жаба, *Pelophylax*, *P. ridibundus*, гельмінти, гельмінтофауна, угруповання, інфраугруповання, компонентні угруповання, видове багатство, індекси різноманіття, міжвидові асоціації.

ANNOTATION

I. G. Dmytrieva. Helminths of the marsh frog (*Pelophylax ridibundus*): present faunal composition and characteristics of communities. – Qualifying scientific work printed as a manuscript.

The dissertation for a scientific degree of the Doctor of Philosophy on the specialty 091 – «Biology». I. I. Schmalhausen Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation aims to determine the current composition and structure of the helminth fauna of *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) based on the material from Ukraine; to characterize the helminth infracommunities in *P. ridibundus*, and identify the relations between the parameters of infracommunities and the host body size and gender; to investigate the interactions of helminth populations in the infracommunities using statistical methods and analyze the results based on available information on the biology of helminth and host species; to characterize the helminth component communities in *P. ridibundus*, to compare the parameters of communities depending on the type of host population in «*Pelophylax esculentus*» complex; and to identify geographical and ecological traits in the composition and structure of helminth component communities of *P. ridibundus*.

The research was conducted at the I. I. Shmalhausen Institute of Zoology of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv, Ukraine). From May to October 2016–2024, amphibians were collected and identified in 29 localities in Ukraine. The hosts were identified based on their morphological characters. Amphibians from the «*P. esculentus*» complex – *P. ridibundus* (R), *P. esculentus* (E), *P. lessonae* (L) – were examined in the samples representing parental (R, L) or mixed (RE, LE) populations. The majority of the hosts (with the exception of two samples) were adult individuals.

We performed a helminthological investigation of the hosts, including their internal organs, body cavities, skin and muscles. Helminths were identified by morphological data (either on the temporary slides after clearing in lactophenol or on the permanent slides (for cestodes and trematodes) stained with carmine and Mayer's hematoxylin), and by molecular data (obtaining the partial nucleotide sequences of the nuclear ribosomal 18S and 28S genes, and mitochondrial *cox1* genes).

In order to obtain current data on the composition and structure of the helminth fauna of *P. ridibundus*, as well as the characteristics of helminth communities, we examined 456 individuals of green frogs «*P. esculentus*»: 371 marsh frogs (*P. ridibundus*), 73 edible frogs (*P. esculentus*), and 12 pool frogs (*P. lessonae*). Over 50.000 helminth specimens were collected and identified during the study.

We estimated the occurrence and abundance of helminths in populations and communities by calculating the prevalence and the intensity of infection, the mean abundance, and their 95% confidence intervals in the Quantitative Parasitology (QP) v. 3.0 software (Bush et al., 1997; Rózsa et al., 2000; Reiczigel et al., 2019; Reiczigel, 2003); a comparison of the prevalence values was performed by the unconditional exact test (Reiczigel et al., 2008), the bootstrap t-test was used for comparison of mean abundance values, using QP 3.0.

The helminth infracommunities in separate host genders were characterized by the species richness and abundance, and compared using the Mann–Whitney U test in the PAST v. 3.10 software (Hammer, 1999–2015); the correlation between the species richness and abundance in the infracommunities and the host size was identified based on the Spearman's correlation coefficient in the same program. The statistical analysis of helminth species co-occurrence was performed by revealing the pairwise interspecific associations between the prevalence and abundance of species in the host (Ludwig & Reynolds, 1988), using the chi-square (χ^2) test, «co-occurrence network» (packages «cooccur» (Griffith et al., 2016), «visNetwork» (Almende et al., 2021)), and the Spearman's correlation coefficient in Ms Excel 2019, PAST v. 3.10, and R software (R Core Team, 2022). For interspecific associations, the *p*-values were adjusted for multiple testing using Holm's method (Aickin & Gensler, 1996) in R software.

Helminth component communities were characterized by the species richness (observed value, the *Chao1*, *bootstrap*, and *jackknife* estimators (Poulin, 1998)), and species diversity using the Pielou, Shannon, Simpson ($1-\lambda$), and Berger-Parker indices (Peet, 1974; Kunakh et al., 2023) using the PRIMER 6 software (Clarke & Gorley, 2006). Helminth component communities were compared by the mean abundance values using the matrix of Bray-Curtis index (before the analysis, the data were $\log X+1$ transformed and standardized (samples by total)) in the PRIMER 6 software. The

results were visualized by cluster analysis («group average» method) and the non-metric multidimensional scaling (nMDS) plots; dissimilarities between communities were estimated using the ANOSIM and SIMPER routines in PRIMER 6 software. In order to classify the level of anthropogenic transformation of studied localities, we applied the approach proposed by the European Commission Directorate General for Regional and Urban Policy (Dijkstra & Poelman, 2014); the localities were distinguished by the degree of urbanization as follows: outside settlements, in the vicinities of and inside rural areas, towns, and cities.

In the studied sample of *P. ridibundus*, we found at least 39 helminth species from four taxonomic groups: 25 trematodes (Platyhelminthes: Trematoda), 10 nematodes (Nematoda: Chromadorea), 2 cestodes (Platyhelminthes: Cestoda), and 2 acanthocephalans (Acanthocephala: Palaeacanthocephala). Morphological identification of 10 helminth species was confirmed by molecular methods. Three species – the nematodes *Rhabdias esculentarum* Cipriani, Mattiucci, Paoletti, Santoro & Nascetti, 2012, and *Strongyloides spiralis* Grabda-Kazubska, 1978, and the cestode *Ophiotaenia saphena* Osler, 1931 – were recorded for the first time in Ukraine. Most helminth species found in the marsh frog are heteroxenous parasites, with the exception of monoxenous nematodes belonging to the family Cosmocercidae and the genus *Oswaldocruzia*. The majority of the recorded species (72%) reach maturity in amphibian hosts; their intermediate hosts are aquatic arthropods and/or molluscs. Eleven species (28%) use amphibians as intermediate or paratenic hosts, with reptiles, birds, and mammals serving as definitive hosts. Thus, the variety of marsh frog helminth life cycles reflects the wide range of its trophic connections in the ecosystems.

In order to examine the relations between the parameters of helminth infracommunities and the host age, we determined the correlation between the body size of frogs and helminth species richness and abundance. For this analysis, we used a sample of 361 frogs (201 males and 160 females). Both helminth species richness and abundance demonstrated a positive correlation with host body size. In other words, larger and, accordingly, older frogs harboured a higher number of helminth species and specimens. The greatest contribution to this correlation belonged to the nematode *Icosiella neglecta* and the trematode *Codonocephalus urniger* (at the metacercarial

stage), which may be explained by the relatively long lifetime of these helminths and their ability to accumulate in the definitive host. A significant correlation between helminth abundance and amphibian body size was also found for most trematode species dwelling in the digestive tract of the frogs. In our opinion, this may be due to the increasing proportion of arthropods (trematode intermediate hosts) in the diet of adult amphibians. A comparison of the parameters of helminth infracommunities between male and female frogs showed that both species richness and abundance values were significantly higher in males. The reason for such a difference needs further investigation.

We investigated the co-occurrence of helminth species in the infracommunities in a sample of 201 marsh frogs, collected in the northern part of the study area (the Volyn, Rivne, Zhytomyr, and Kyiv Regions in Ukraine). The analysis was performed for nine helminth species with an infection prevalence of 15% or higher in the sample. Possible biological grounds of some species interactions are suggested. The positive interspecific associations were found among trematodes of the family Pleurogenidae (*Pleurogenes claviger*, *Prosotocus confusus*, *Pleurogenoides medians*), which may be explained by their similar life cycles and transmission routes in amphibians. Two species (*P. confusus* and *P. medians*) showed positive association with the nematode *I. neglecta*, which might be caused by a similar tendency of these three species to increase the infection prevalence in larger hosts. In contrast, a negative association of nematodes *I. neglecta* and *C. ornata* may be explained by decreasing the infection prevalence of the latter species in larger frogs, and, therefore, a lower chance of these nematodes to meet in the same frog individuals. Positive associations of *I. neglecta* and *P. medians* (p -adjusted = 0.00463645), as well as *P. claviger* and *P. medians* (p -adjusted = 0.001162368) were confirmed by the multiple testing correction.

The positive interspecific associations by helminth abundance were identified using Spearman's correlation coefficient. A positive association found between trematodes *P. confusus* and *P. medians* is most likely due to these species sharing the same individuals of second intermediate hosts as the intake pathways in amphibians. A positive association between trematodes *Opisthioglyphe ranae* and *Diplodiscus subclavatus* may be related to their active transmission in the ecosystem

as dioxenous parasites. A negative association between the nematode *C. ornata* and the trematode *D. subclavatus* is probably caused by their shared site in the host; both species inhabit the rectum, which may lead to interspecific competition. For some associations found in this study (such as a negative association of the acanthocephalan *Acanthocephalus ranae* with the trematode *C. urniger* and the nematode *C. ornata*) we found no obvious biological explanation; such cases of associations could be precisely examined in further studies.

The helminth component communities were analyzed in 20 host samples consisting of *P. ridibundus*. Helminth species richness in component communities was found to depend on the intensity of anthropogenic transformation of ecosystems (indicated by us as the urbanization degree). The lowest species richness was observed in highly urbanized ecosystems (4.6 species on average), while the highest value was recorded in samples collected from sites outside settlements (5.9 species on average). Meanwhile, the diversity indices in helminth communities from highly urbanized ecosystems were unexpectedly high – their values were close to those in natural ecosystems and were higher than those in the vicinities of settlements. In our opinion, this may be due to low abundance in all the helminth component populations from highly urbanized ecosystems; that forms the greater evenness of the species distribution (whereas helminth species with high abundances were found in the communities from the moderately urbanized ecosystems).

Helminth component communities in host samples of «*P. esculentus*» complex were compared using the Bray-Curtis index; similarities and differences between communities were estimated by the ANOSIM and SIMPER routines, and showed in cluster and nMDS plots. It was found that helminth component communities from different host populations did not share clusters based on the population type. For example, helminth communities in *P. ridibundus* samples (R-type) showed no significant differences from those in mixed populations (RE-type) – ANOSIM $R=0.028$; $p=0.56$. Therefore, we came to conclusion that the host population type in «*P. esculentus*» complex does not specify similarities and dissimilarities in helminth component communities. The composition and structure of helminth communities are

rather determined by other factors, such as environmental changes, than by the genetic structure of the host population.

Meanwhile, we identified at least two groups of helminth communities from *P. ridibundus* samples: the first group (the «northern» or «Polissia» group) included samples collected in Kyiv, the northern part of the Kyiv Region, and in Zhytomyr Region; the second group (the «southern» group) included samples from the southern part of the Kyiv Region, as well as from the Mykolaiv, Kirovohrad, and Dnipropetrovsk Regions. Significant dissimilarities between the groups were confirmed by ANOSIM ($R=0.72$; $p=0.002$). Helminths distinguishing the «southern» group of communities included *Pleurogenes loossi*, *R. esculentarum* and *S. erinaceieuropaei* that were found only in this group, as well as *C. urniger* and *C. ornata* that had significantly higher prevalence and abundance there. On the other hand, *D. subclavatus*, *I. neglecta* and *P. confusus* were significantly more prevalent and abundant in the «northern» group, contributing to the differences between two groups. Thus, we conclude that there are at least two faunistic complexes of helminths of *P. ridibundus* in Ukraine.

The scientific novelty of this study includes obtaining up-to-date information on the composition and structure of *P. ridibundus* helminth fauna in Ukraine, reporting three new species for the first time in the country – the nematodes *Rhabdias esculentarum*, *Strongyloides spiralis*, and the cestode *Ophiotaenia saphena*. For the first time, helminth infracommunities of the marsh frog were analyzed; significant differences in infection parameters between male and female hosts were found, helminth co-infections were investigated. For the first time, helminth component communities of *P. ridibundus* were analyzed, it was found that they do not differ significantly from communities in mixed populations (RE-type). Significant differences between helminth communities from northern and southern localities in the study were found; the existence of at least two faunistic complexes of the marsh frog helminths in Ukraine was suggested. It was shown that helminth species richness in component communities of the marsh frog depends on the anthropogenic transformation of ecosystems (urbanization). It was found that helminth diversity

indices in communities from urban ecosystems were unexpectedly high and resembled those in natural ecosystems.

The practical value of this study allows to apply results to the further monitoring of changes in *P. ridibundus* helminth fauna in central part of the host distribution range, which are caused by climate change or urbanization. The parameters of helminth communities in different types of ecosystems that were used in the present study, may serve as indicators of the state of ecosystems and host populations. The results of this study are implemented to the following grants and long-term research programmes:

- 1) long-term research program III-56-21 «Composition and structure of helminth faunistic complexes in vertebrate hosts under climate change and anthropogenic transformation of ecosystems» (registration number 0121U100699), section 2 «Characteristics of amphibian and reptile helminth communities in different types of ecosystems»;
- 2) project of the National Research Foundation of Ukraine №2023.03/0068 «Parasites and the sixth extinction: a study of the state of parasite communities and populations in model animal groups under the current biodiversity decline»;
- 3) grant project of the National Academy of Sciences of Ukraine №0121U111976 «Genetic database of helminths of the common species of amphibians and reptiles from the territory of Ukraine»;
- 4) individual grant of the European Molecular Biology Organization (EMBO) №5447-2023 «Investigation of helminth diversity of green frogs *Pelophylax* spp. and common frog *Rana temporaria* in Lithuania».

The results of this study can contribute to the educational courses such as Parasitology, Helminthology, and Animal Ecology. All collected helminth specimens are stored in the collection of the I. I. Schmalhausen Institute of Zoology of National Academy of Sciences of Ukraine.

Keywords: marsh frog, *Pelophylax*, *P. ridibundus*, helminths, helminth fauna, communities, infracommunities, component communities, species richness, diversity indices, interspecific associations.