Streszczenie

Głównymi źródłami wzbierającej na sile antybiotykooporności w glebie są dodatki glebowe, takie jak poddane obróbce osady ściekowe oraz obornik pochodzenia zwierzęcego, suplementacja którymi ma na celu poprawę wartości użytkowej gleby. Nadużywanie antybiotyków zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej powoduje, iż duże ilości tych związków oraz produktów ich transformacji pojawia się w odchodach ludzi i zwierząt, po czym trafiają one wraz z obornikiem lub poddanymi procesom stabilizacji osadami ściekowymi do gleby. Te i wiele innych współwystępujących zanieczyszczeń są przyczyną kształtowania antybiotykooporności w środowisku glebowym. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie zróżnicowania determinantów antybiotykooporności w nawożonej glebie oraz ocena ryzyka ich transmisji do sąsiadujących składowych środowiska jakimi są woda gruntowa oraz rośliny uprawne. Badania składające się na tę rozprawę złożone są z 4 etapów. Każdy z nich został zakończony publikacją w czasopiśmie naukowym.

Pierwszy etap badań miał na celu ocenę efektywności poszczególnych etapów mechaniczno-biologicznych oczyszczalni ścieków w usuwaniu genów integrazy oraz określenie wpływu ścieków oczyszczonych na jakość wody rzecznej stanowiącej ich odbiornik. Obiektem badań były ścieki pochodzące z różnych etapów oczyszczania pobierane sezonowo na terenie dwóch oczyszczalni ścieków, osady ściekowe oraz woda rzeczna przed oraz po zrzucie ścieków oczyszczonych. W materiale genetycznym wyizolowanym z pobranych próbek oznaczano 3 geny integrazy (*intI*1, *intI*2, *intI*3) z wykorzystaniem reakcji PCR. Badane geny były obecne w genomowym DNA próbek pochodzących ze wszystkich etapów oczyszczania oraz w próbkach wody rzecznej zarówno przed jak i po zrzucie ścieków oczyszczonych. Wyniki wskazują, że wybrane oczyszczalnie ścieków (WWTPs) nie są skuteczne w eliminacji genów integrazy determinujących włączanie do genomu bakteryjnego genów oporności na antybiotyki (ARGs), co w efekcie może sprzyjać rozprzestrzenianiu zjawiska antybiotykooporności szczególnie w środowisku wodnym oraz glebowym.

Celem etapu drugiego było usystematyzowanie wiedzy dotyczącej obecności wybranych mikrozanieczyszczeń w osadach ściekowych po procesie stabilizacji oraz określenie ich wpływu na środowisko oraz organizmy żywe w wyniku wprowadzania do gleby tych zanieczyszczeń razem z osadami ściekowymi. Badania powstały w oparciu o przegląd literatury dotyczącej tematyki zanieczyszczeń w osadach ściekowych, pochodzącej z lat 2010-2020, dostępnej w najbardziej popularnych wyszukiwarkach Google Scholar oraz Pubmed.

Publikacja odnosi się do 183 pozycji literaturowych ściśle związanych z celem pracy. Wyniki wskazują, że wszystkie ze znanych metod przetwarzania osadów ściekowych mających za zadanie ich stabilizację w celu wtórnego wykorzystania jako nawozu nie są w pełni efektywne pod kątem eliminacji zanieczyszczeń takich jak antybiotyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne, metale ciężkie czy genetyczne determinanty antybiotykooporności. W wyniku tego dochodzić może do wzajemnych interakcji pomiędzy wspomnianymi zanieczyszczeniami, które promują rozprzestrzenianie zjawiska antybiotykooporności w glebie. Zbiór informacji dotyczących jakości poddanych oczyszczaniu osadów ściekowych skłania także do refleksji na temat bezpieczeństwa organizmów żywych zasiedlających nawożoną glebę. Dostępne badania wskazują, że stopniowa akumulacja nawet niewielkich ilości metali ciężkich wystawia organizmy glebowe na toksyczne oddziaływanie tych związków, co wpływa na inaktywację i/lub śmierć organizmów, przyczyniając się do zubożenia terenów uprawnych. Wykazano także, że wszystkie rozpatrywane zanieczyszczenia mogą być pobierane przez rośliny uprawne, stwarzając ryzyko związane z ich konsumpcją.

W trzecim etapie badań oceniano wpływ nawożenia gleby obornikiem drobiowym i bydlęcym na zawartość wybranych antybiotyków, metali ciężkich, genów antybiotykooporności (ARGs) oraz genów integrazy w glebie, wodzie gruntowej oraz roślinach uprawnych. Badano także korelacje pomiędzy różnymi typami zanieczyszczeń. Eksperyment prowadzono w Stacji Dydaktyczno-Eksperymentalnej, Tomaszkowo, Polska. Wybrana do badań gleba nie była suplementowana obornikiem ani antybiotykami przez ostatnie 10 lat. Wyznaczone poletka badawcze odpowiednio suplementowano wybranym obornikiem z lub bez dodatku antybiotyków oraz obsiewano pietruszką. Poziom koncentracji antybiotyków analizowano z wykorzystaniem metody HPLC-MS/MS, pomiar koncentracji metali ciężkich wykonano metodą HGAAS i ICP-OES, natomiast kwantyfikację genów integrazy i ARGs przeprowadzono metodą Real-Time PCR (qPCR). Próbki obornika, gleby oraz roślin uprawnych charakteryzowały się najwyższą koncentracją Zn (10^4-10^5 ng g_{sm}^{-1}) i Cu (10^3-10^5 ng g_{sm}^{-1}). Gleba suplementowana obornikiem charakteryzowała się wysokim stężeniem doksycykliny oraz enrofloksacyny. Geny integrazy występowały w wysokiej liczebności w próbkach obornika (10^9-10^{10} kopii g_{sm}^{-1}) oraz gleby (10^7-10^8 kopii g_{sm}^{-1}). Spośród wszystkich badanych genów, najbardziej popularnymi były *sul*1, *sul*2, bla_{TEM} oraz geny integrazy. Gen *sul*1 jako jedyny występował w próbkach pochodzących ze wszystkich badanych środowisk (od 10^2 kopii mL^{-1} w próbkach wody gruntowej do 10^{11} kopii g_{dm}^{-1} w próbkach obornika drobiowego). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że obornik zwierzęcy może

wpływać na wzrost koncentracji metali ciężkich w środowisku glebowym oraz ich kumulację w roślinach uprawnych, co może oddziaływać na zdrowie ludzi oraz zwierząt wykorzystujących te rośliny do celów konsumpcyjnych. Ponadto wysoka liczebność genów integrazy i ARGs oraz ich wzajemne korelacje z metalami ciężkimi niosą poważne ryzyko szybkiego rozprzestrzeniania antybiotykooporności w środowisku.

Czwarty etap stanowi uzupełnienie trzeciego etapu prezentowanych badań, mając na celu ocenę ryzyka transmisji ARGs i bakterii będących nosicielami ARGs do nawożonej gleby oraz endomikrobiomu roślin uprawnych przeznaczonych do spożycia w formie nieprzetworzonej. Badania rozszerzono o analizę mobilnych elememtów genetycznych związanych z mobilnością ARGs charakterystycznych dla mikroorganizmów zaliczanych do grupy ESKAPEE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* sp., *Escherichia coli*) o szczególnym znaczeniu klinicznym. Badania prowadzono z zastosowaniem metody sekwencjonowania nowej generacji (Next-Generation Sequencing, NGS) wykonanej przez Macrogen (Seoul, Korea) z wykorzystaniem TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina Inc., San Diego, California, USA). Pozwoliło to na zdeponowanie 32 próbek metagenomicznych w bazie danych ENA pod numerem akcesyjnym No. PRJEB48283. Obornik drobiowy charakteryzował się około 4 razy większą całkowitą liczbą ARGs (555 ppm) niż obornik bydlęcy (140 ppm), co znalazło odzwierciedlenie w glebie po jej nawożeniu. Obornik drobiowy spowodował większy wzrost koncentracji ARGs (196.4 ppm) w nawożonej glebie w porównaniu z obornikiem bydlęcym (137.8 ppm) bezpośrednio po nawożeniu. Suplementacja obornikiem drobiowym spowodowała w największym stopniu wzrost liczności genów oporności na tetracykliny (9%), aminoglikozydy (3.5%), sulfonamidy (3%), bacytracynę (2%), chloramfenikol (2%) oraz grupę makrolidy-linkozamidy-streptograminy (MLS) (1%). Badania dowodzą także, że metale ciężkie stają się silniejszym promotorem antybiotykooporności w środowisku w porównaniu z antybiotykami, które wpływają bardziej na podtrzymanie zróżnicowania ARGs w glebie niż na wzrost ich liczności. Na skutek nawożenia, wprowadzone do gleby duże ilości sekwencji insercyjnych (ISs), w tym związane z mobilnością ARGs w populacji patogenów ESKAPEE, wykazują stabilność przez nawet kilka miesięcy, co wskazuje, iż obornik szczególnie pochodzenia drobiowego, stwarza ogromne ryzyko szybkiego transferu ARGs w środowisku. Wpływa on także w wysokim stopniu na wzrost zróżnicowania rezystomu i mobilomu w metagenomie bakterii izolowanych z upraw, a gromada Proteobacteria staje się szczególnie

zaangażowana w rozprzestrzenianie licznych genów antybiotykooporności w uprawach przeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierzęta.

Zbiór wyników badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wykazał, że zarówno dodatek poddanych stabilizacji osadów ściekowych jak i obornika pochodzenia zwierzęcego do gleby stanowi ryzyko kontaminacji środowiska naturalnego zanieczyszczeniami o wysokiej trwałości, toksyczności oraz potencjale szerzenia zjawiska antybiotykooporności. Ponadto badania podkreślają potrzebę nowelizacji istniejących lub wprowadzenia nowych uregulowań prawnych dotyczących ochrony środowiska w kontekście wykorzystywania nawozów naturalnych jako dodatków glebowych.