Obecnie ludzie na całym świecie są zmuszeni stawić czoła zjawisku antybiotykooporności. Ten szeroko rozpowszechniony problem stanowi dzisiaj jedno z największych zagrożeń zdrowia publicznego, wynikających głównie z nadużywania antybiotyków w medycynie, weterynarii oraz rolnictwie. Ścieki dopływające do oczyszczalni ścieków (WWTPs) zawierają antybiotyki i/lub metale ciężkie (HMs), które mogą być czynnikami wywołującymi presję selekcyjną. Ścieki z regionów o wyższym stopniu urbanizacji oraz uprzemysłowienia charakteryzują się wyższą koncentracją tych zanieczyszczeń w porównaniu do ścieków z regionów słabiej uprzemysłowionych. Dodatkowo, dopływ ścieków szpitalnych do sieci kanalizacyjnej doprowadzającej ścieki komunalne do WWTP również stanowi bardzo istotny czynnik indukujący rozprzestrzenianie determinantów antybiotykooporności o znaczeniu klinicznym. Oczyszczalnie ścieków nie posiadają systemów, które eliminowałyby materiał genetyczny ze ścieków. Poprzez stały napływ materiału genetycznego, w tym genów antybiotykooporności (ARGs), ekosystemy wodne stanowią idealne środowisko do nabywania i rozprzestrzeniania ARGs z powodu ciągłego zanieczyszczenia tych ekosystemów związkami przeciwdrobnoustrojowymi pochodzenia antropogenicznego.

Celem pracy było określenie wpływu pochodzenia ścieków komunalnych na antybiotykooporność bakterii bytujących w ściekach i wodzie rzecznej będącej odbieralnikiem ścieków oczyszczonych oraz określenie efektywności procesu fotolizy wpływającej na degradacje antybiotyków i determinantów antybiotykooporności w oczyszczonych ściekach komunalnych.

W pierwszym etapie badań skupiono się na występowaniu genów oporności na tetracykliny w próbkach ścieków, osadów ściekowych oraz wody rzecznej będącej odbiornikiem ścieków oczyszczonych z dwóch WWTPs różniących się charakterystyką ścieków dopływających. Wyniki wskazują na występujące różnice w częstości pojawiania się genów oporności w zależności od charakterystyki ścieków dopływających. WWTP zlokalizowana w regionie wysoce turystycznym z bogatym zalesieniem i charakteryzującej się 2%-wym dopływem ścieków szpitalnych oraz 8% dopływem ścieków przemysłowych (WM-WWTP), wykazano brak redukcji występowania genu *tet*(A) po procesie oczyszczania. W przypadku genu *tet*(M) odnotowano sezonowe zmiany jego obecności, a mianowicie w próbkach osadu czynnego, ścieków oczyszczonych, wody rzecznej oraz osadów ściekowych. Wykonane badania potwierdzają brak możliwości usuwania ARGs w procesie technologicznym oczyszczania ścieków wykorzystanym przez WWTPs. W drugiej WWTP zlokalizowanej w regionie zindustrializowanym z 25%-wym udziałem dopływających

ścieków przemysłowych oraz 0.4%-wym udziałem dopływających ścieków szpitalnych (S-WWTP), cechowała się brakiem eliminacji genów badanych po procesie oczyszczania. Nie zaobserwowano tam również zmian sezonowych występowania badanych genów. Ponadto geny z grupy tetracyklin były obecne we wszystkich próbkach wody rzecznej. Do wydajnego redukowania genów antybiotykooporności ze ścieków wymagana jest modyfikacja procesu oczyszczania.

Celem drugiego etapu badań była ocena wpływu udziału ścieków industrialnych oraz szpitalnych na zjawisko antybiotykooporności w ściekach komunalnych oczyszczanych w badanych WWTPs (S-WWTP powiązanej z dopływem ścieków przemysłowych oraz WM-WWTP powiązanej z dopływem ścieków szpitalnych). Do tego celu wykorzystano wyniki z przeprowadzonych analiz zależności pomiędzy zanieczyszczeniami takimi jak antybiotyki i HMs a determinantami antybiotykooporności oraz wyniki określające różnorodność genów warunkujących oporność na antybiotyki beta-laktamowe, ze szczególnym uwzględnieniem genów karbapenemaz, podczas procesu oczyszczania. Zaobserwowano niewiele istotnych zależności pomiędzy koncentracją antybiotyków w badanych próbkach a występowaniem w nich ARGs. Z kolei stężenie HMs korelowało z koncentracją ARGs, co potwierdza istotną rolę HMs w promowaniu występowania zjawiska lekooporności. Zauważono również występowanie istotnych zależności ($p<0.05$) pomiędzy liczebnością genów integrazy a liczebnością ARGs oraz koncentracją HMs. Próbki z S-WWTP charakteryzowały się wyższym zanieczyszczeniem metalami ciężkimi oraz większą ilością istotnie statystycznych korelacji pomiędzy badanymi zmiennymi w porównaniu do próbek pochodzących z WM-WWTP. Porównując próbki ścieków z dwóch oczyszczalni charakteryzujących się dopływem ścieków szpitalnych na różnym poziomie, stwierdzono większą różnorodność typów genów warunkujących oporność na beta-laktamy w ściekach z wyższym udziałem procentowym ścieków szpitalnych (58 typów) w porównaniu do ścieków z mniejszym udziałem (52 typy). W próbkach z obu oczyszczalni dominującymi genami beta-laktamaz były typy bla_{OXA}, bla_{GES}, bla_{BEL}, bla_{CfxA} oraz bla_{TEM}. Warto zwrócić uwagę, że geny bla_{KPC} oraz bla_{NDM} zostały stwierdzone tylko w nieoczyszczonych ściekach komunalnych o większej zawartości ścieków szpitalnych. W ściekach charakteryzujących się wyższym udziałem ścieków szpitalnych zaobserwowano 94 korelacje, podczas gdy w ściekach z mniejszym udziałem zanotowano 41 korelacji, pomiędzy częstotliwością występowania genów integrazy oraz genów beta-laktamaz. Zrzut ścieków oczyszczonych z WWTPs do środowiska naturalnego może stanowić

zatem ciągłe zagrożenie życia i zdrowia ludzi, poprzez przenoszenie zanieczyszczeń takich jak geny antybiotykooporności, antybiotyki czy HMs do środowiska.

W badaniach prowadzonych w trzecim etapie skupiono uwagę na określeniu obecności determinantów oporności na antybiotyki u szczepów *Acinetobacter* sp. wyizolowanych z próbek ścieków w poszczególnych etapach procesu oczyszczania oraz próbek wody rzecznej. Następnie, przy użyciu narzędzi molekularnych, takich jak jakościowa i ilościowa reakcja PCR oraz analiza metagenomiczna, określono obecność genów oporności na antybiotyki beta-laktamowe (klasy B i D Amblera), sekwencji insercyjnej *ISAba*1, genów integrazy klasy I, II i III oraz strukturę taksonomiczną. Szczepy *Acinetobacte*r sp. oraz *A. baumannii* najczęściej określano w próbkach ścieków i wody rzecznej pobranych w czerwcu i wrześniu. Wśród analizowanych genów oporności, najwyższą częstością występowania u szczepów *Acinetobacter* sp. wykazywał gen $bla_{\text{OXA-51}}$, natomiast analiza metagenomiczna wskazała, że gen $bla_{\text{OXA-58}}$ występował najliczniej w badanych próbkach. W obrębie 13 szczepów stwierdzono obecność kompleksu *ISAba1*/$bla_{\text{OXA-51}}$, co potwierdza występowanie szczepów opornych na karbapenemy w analizowanych próbkach. Brak redukcji liczby izolatów *Acinetobacter* sp. niosących geny oporności na antybiotyki w próbkach ścieków oczyszczonych w porównaniu do ścieków dopływających sugeruje, że procesy oczyszczania stosowane w oczyszczalni ścieków są nieefektywne.

Celem czwartego etapu było określenie efektywności usuwania antybiotyków oraz determinantów antybiotykooporności ze ścieków oczyszczonych wskutek zastosowania procesu fotodegradacji. Wykazano, że zastosowane naświetlania światłem słonecznym oraz wykorzystanie dodatkowo fotokatalizatora (TiO_2) istotnie wpływa na zmniejszenie ilości antybiotyków oraz ARGs w ściekach. Wykazano, że analizowane metody są w stanie wyeliminować od 52% do 69% badanych związków antybakteryjnych oraz od 84% do 90% badanych genów. Wdrożenie tych metod do ciągu technologicznego oczyszczania ścieków może powodować istotne poprawienie jakości ścieków oczyszczonych wprowadzanych do środowiska naturalnego.

Biorąc pod uwagę zebrane wyniki, można stwierdzić, że skład ścieków oczyszczanych w WWTPs, kreowany poprzez ich pochodzenie, istotnie wpływa na zjawisko antybiotykooporności. W próbkach pochodzących z WWTP zlokalizowanej w regionie wysoce uprzemysłowionym charakteryzującym się wysokim zanieczyszczeniem HMs, określono więcej istotnych zależności pomiędzy HMs a determinantami oporności niż w próbkach uzyskanych z WWTP zlokalizowanej w regionie o mniejszym uprzemysłowieniu. Z przeprowadzonych badań wynika, że HMs

indukującą problem antybiotykooporności. Natomiast w ściekach pobranych z WWTP mającej większy dopływ ścieków szpitalnych (2%), w porównaniu do WWTP mającej mniejszy udział owych ścieków (0.4%), zaobserwowano częstsze występowanie genów oporności o znaczeniu istotnym klinicznie. Ostatecznie, stwierdzono, że wykorzystanie procesów fotokatalizy oraz fotodegradacji w usuwaniu mikrozanieczyszczeń ze ścieków oczyszczonych istotnie wpływa na ograniczenie rozprzestrzeniania zjawiska oporności poprzez degradację antybiotyków oraz redukcję liczebności występujących w ściekach determinantów oporności.