**Wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na produkcję biogazu, rozpowszechnienie genów lekooporności oraz mikrobiom zaangażowany w procesy fermentacji metanowej gnojowicy bydlęcej**

## Streszczenie

Wraz ze wzrostem zapotrzebowania na przyjazną dla środowiska energię alternatywną, fermentacja metanowa/ biometanizacja (ang. AD – anaerobic digestion) stała się popularną metodą stabilizacji materii organicznej z różnorodnych substratów. Instalacje takie jak biogazownie (ang. BP – biogas plants) są szeroko rozpowszechnione zarówno w Europie, jak również w Polsce, a ich liczba stale rośnie. Całkowita liczba inżynieryjnych projektów biogazowych na świecie wynosi 132 000, z czego 17 783 zlokalizowanych jest w Europie. W Polsce w 2021 r. działało już 128 biogazowni rolniczych.

Proces biometanizacji w warunkach beztlenowych jest atrakcyjną technologią stosowaną do higienizacji i stabilizacji odpadów organicznych oraz do produkcji energii przyjaznej środowisku jakim jest biogaz. Substraty jakimi są odpady organiczne poddawane procesowi AD nie ulegają całkowitemu rozkładowi, powstaje odpad jakim jest masa pofermentacyjna – poferment (ang. D – digestate). Poferment najczęściej wykorzystywany jest jako nawóz organiczny na nieużytki rolne. W celu zapewnienia bezpieczeństwa sanitarnego środowiska, istotna jest zawartość w pofermencie środków przeciwdrobnoustrojowych oraz produktów przemian tych związków, które trafiają tam z substratów AD. Ponieważ antybiotyki nie są w pełni metabolizowane przez organizm człowieka oraz zwierząt trafiają one do substratów AD, najczęściej z oczyszczalni ścieków oraz odchodów zwierzęcych. Wskutek powszechnego występowania antybiotyków w substratach, istnieje możliwość ich wpływu na mikrobiom zaangażowany w procesy AD, niekorzystne zmiany w społeczności drobnoustrojów, zahamowanie wzrostu i rozwoju metanogenów odpowiedzialnych za produkcję metanu ($CH_4$) oraz wzrost liczby genów lekooporności (ang. ARGs – antibiotic resistance genes) w pofermencie, a co się z tym wiąże szerzenie zjawiska antybiotykooporności (ang. AR – antibiotic resistance) w środowisku glebowym po nawożeniu jej pofermentem. W literaturze jest niewiele informacji na temat składu masy pofermentacyjnej. Pomimo, iż poferment zawiera składniki odżywcze i substancje organiczne, które mogą sprzyjać wzrostowi upraw, stosowanie go na glebach uprawnych może znacznie zwiększyć liczebność ARGs w mikrobiomie gleby. Dlatego nie można bagatelizować znaczenia badań dotyczących poziomu antybiotyków i ich obecności w pofermencie z biogazowni rolniczych, wpływu farmaceutyków na mikrobiom zaangażowany w procesy AD oraz rozprzestrzenianie ARGs

w masie pofermentacyjnej. Ważne jest poznanie bioróżnorodności mikrobiomu zaangażowanego w proces AD i odpowiedź społeczności drobnoustrojów na antybiotyki zawarte w substratach AD i masie pofermentacyjnej. Zarówno bakterie jak i *Archaea,* zaangażowane w proces AD mogą stanowić potencjalne źródło mobilnych elementów genetycznych (ang. MGEs – mobile genetic elements) i ARGs.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badano jednostkowy oraz synergistyczny wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na proces fermentacji beztlenowej prowadzonej w warunkach mezofilnych w układzie technologicznym na skalę laboratoryjną oraz bezpośrednio w biogazowniach rolniczych. W pracy badano obecność pozostałości antybiotyków należących do klasy beta-laktamów (amoksycylina, ampicylina), tetracyklin (tetracykliny, oksytetracykliny, doksycykliny, chlorotetracyklina), sulfonamidów (sulfametoksazol, sulfonamid), fluorochinolonów (enrofloksacyna, cyprofloksacyna), antybiotyków z grupy MLS (makrolidy – linkozamidy – streptograminy) i inhibitorów reduktazy dihydrofolianowej (trimetoprim) w pofermencie pobranym zarówno z układu technologicznego jak i bezpośrednio z wybranych biogazowni rolniczych w Polsce. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badano także skład mikrobiomu masy pofermentacyjnej oraz zachodzące w mikrobiomie zmiany wśród społeczności drobnoustrojów należących zarówno do domeny *Bacteria* jak i *Archaea*. Celem niniejszych badań była również analiza dotycząca występowania ARGs niosących lekooporność na antybiotyki należące do klasy betalaktamów, tetracyklin, fluorochinolonów, sulfonamidów, grupy MLS, oraz genów integrazy klasy 1 oraz 2 w pobranych próbkach pofermentu. Zaplanowane badania pozwoliły uzyskać informacje odnośnie odpowiedzi drobnoustrojów na jednostkową oraz synergistyczną suplementację środków przeciwdrobnoustrojowych wprowadzanych do wsadu bioreaktorów AD, zmianach zachodzących w mikrobiomie zaangażowanym w proces AD, jakości mikrobiologicznej uzyskanego po procesie AD pofermentu oraz skuteczności procesu AD w eliminacji ARGs. Innowacyjne metody biologii molekularnej i metagenomiki pozwoliły uzyskać szeroki zakres informacji na temat jakości badanego pofermentu, zarówno w układzie technologicznym jak i bezpośrednio pochodzącym z procesu AD prowadzonego w biogazowniach rolniczych pracujących na skalę przemysłową w oparciu o różnorodne substraty. Na podstawie otrzymanych wyników badań podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy fermentacja metanowa biomasy organicznej jest bezpieczna dla środowiska naturalnego w przypadku odprowadzania masy pofermentacyjnej do gleby oraz czy proces ten może ograniczyć wprowadzanie środków farmaceutycznych do gleby i rozprzestrzenianie ARGs w pofermencie, glebie oraz szeroko

pojętym środowisku. Wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły określić, czy proces AD oprócz wytwarzania przyjaznej środowisku energii prowadzi także do całkowitego usunięcia ARGs i antybiotyków, niezależnie od składu substratowego poszczególnych próbek pofermentu. Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej podzielono na trzy etapy.

**W I etapie eksperymentu** w układzie technologicznym AD, w warunkach laboratoryjnych zbadano indywidualny wpływ ośmiu środków przeciwdrobnoustrojowych należących do klasy beta-laktamów (AMO – amoksycylina, AMP – ampicylina), tetracyklin (OXY – oksytetracyklina, TET – tetracyklina, CHLOR – chlorotetracyklina), fluorochinolonów (ENRO – enrofloksacyna), sulfametoksazoli (SMX – sulfametoksazol) i pochodne nitroimidazolu (MET – metronidazol) na wydajność produkcji biogazu w procesie AD gnojowicy bydlęcej, który to proces prowadzono w warunkach mezofilnych. Zbadano mikrobiom zaangażowany w proces AD, obecność i liczbę genów *mcr*A, *MSC* i *MST* swoistych dla *Archaea* oraz liczebność genów oporności na antybiotyki w pofermencie pochodzącym z substratu eksponowanego na wybrane środki przeciwdrobnoustrojowe. Indywidualny dodatek antybiotyków do substratu w bioreaktorach procesowych AD istotnie obniżył produkcję biogazu. Zadawana jednostkowo do wsadu bioreaktorów AMO, należąca do klasy betalaktamów, spowodowała największy, 75% spadek produkcji $CH_4$ w porównaniu z próbkami kontrolnymi bez dodatku antybiotyku. Wprowadzane indywidualnie do bioreaktorów ENRO, TET, OXY i CHLOR także zmniejszyły ilość wytwarzanego biogazu odpowiednio o 36, 39, 45 i 53%. Wyniki wysokowydajnego sekwencjonowania 16S *r*RNA wykazały, że we wszystkich badanych próbkach pofermentu wśród mikroorganizmów dominowały te należące do domeny *Bacteria*. Ponadto, antybiotyki doprowadziły do zmniejszenia liczebności genów *mcr*A, *MSC, MST* charakteryzujących metanogeny należące do domeny *Archaea*. Środki przeciwdrobnoustrojowe indukowały również wzrost liczby genów oporności na tetracykliny. Po przeprowadzonym pierwszym etapie badań wywnioskowano, że antybiotyki zadawane indywidualnie do wsadu bioreaktorów zmniejszały wydajność procesu AD i znacząco obniżały objętość uzyskiwanego $CH_4$, jednocześnie stymulując wzrost liczby ARGs w próbkach pofermentu.

**W II etapie eksperymentu** AD prowadzonego w bioreaktorach beztlenowych układu technologicznego na skalę laboratoryjną zbadano długoterminowy (417 dni), synergistyczny efekt środków przeciwdrobnoustrojowych na AD gnojowicy bydlęcej. Przy wykorzystaniu analiz metagenomicznych i bioinformatycznych zbadano rozpowszechnienie ARGs i zmiany

w bioróżnorodności drobnoustrojów w pofermencie gnojowicy bydlęcej, którą to gnojowicę bydlęcą jako wsad bioreaktora eksponowano na mieszaninę leków wybranych na podstawie wyników uzyskanych w ramach pierwszego etapu, tj. AMO, ENRO oraz MET. Farmaceutyki zadawano do wsadu bioreaktorów w zmiennych, wzrastających stężeniach. W prowadzonym eksperymencie analizowano efektywność produkcji $CH_4$ a z wykorzystaniem analiz metagenomicznych badano mikrobiom zaangażowany w proces AD i zachodzące w nim zmiany w społeczności drobnoustrojów. Podobnie jak w pierwszym etapie prowadzonym w ramach niniejszej dysertacji badań, wśród drobnoustrojów dominowały mikroorganizmy należące do domeny *Bacteria*. *Bacteroidetes, Firmicutes* i *Actinobacteria* były najliczniejszymi grupami bakterii w próbkach. Domena *Archaea* reprezentowana była głównie przez metanogenne rodzaje *Methanothrix* i *Methanosarcina* oraz rząd *Methanomassiliicocales*. Ekspozycja na zadawaną do wsadu bioreaktorów mieszaninę antybiotyków hamowała wzrost i rozwój mikroorganizmów metanogennych we wsadzie bioreaktora AD. Antybiotyki wprowadzane synergistycznie w mieszaninie do wsadu bioreaktorów procesu AD wpłynęły również na obfitość i częstość występowania ARGs w próbkach pofermentu, w których zidentyfikowano i sklasyfikowano łącznie siedemnaście rodzajów ARGs. Najliczniej zidentyfikowano geny kodujące oporność na tetracykliny, antybiotyki MLS i aminoglikozydy, a także geny oporności wielolekowej. Antybiotyki synergistycznie oddziaływały na bakterie homoacetogenne i metanogeny oraz zmniejszały efektywność produkcji $CH_4$. Jednakże wywołany mieszaniną antybiotyków okresowy spadek produkcji $CH_4$ został zminimalizowany w obecności wysoce lekoopornych mikroorganizmów w bioreaktorach AD, które wykorzystały produkty metabolizmu leków jako źródło węgla jednocześnie produkując substraty do etapu metanogenezy w procesie AD, niezbędne drobnoustrojom metanogennym do produkcji $CH_4$.

**W III etapie eksperymentu** prowadzonego w warunkach in vivo w działających na skalę przemysłową biogazowniach rolniczych, poferment pochodzący z wybranych do badań biogazowni rolniczych pracujących w oparciu o różnorodne substraty tj. osad ściekowy, gnojowicę bydlęcą oraz substraty roślinne, badano pod kątem obecności wybranych 13 antybiotyków należących do klasy betalaktamów (AMO – amoksycylina), tetracyklin (TET, OXY, DOXY, CHLOR), sulfonamidów (SMX, SMD – sulfonamid), fluorochinolonów (ENRO, CIP – ciprofloksacyna), makrolidów (CLR – klarytromycyna), linkozamidów (CLD – klindamycyna) i streptogramin oraz inhibitorów reduktazy kwasu dihydrofoliowego (TRIM – trimetoprim). W próbkach pofermentu badano także obecność genów niosących lekooporność na betalaktamy (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{OXA}$, *cfx*A), tetracykliny (*tet*A, *tet*M), sulfonamidy

(*sul*1, *sul*2), fluorochinolony (*aac 6'-Ib-cr*, *qep*A) i grupę leków MLS (*erm*F). W pracy badano także geny integrazy klasy 1 oraz 2 (*intI*1 oraz *intI*2). Geny oporności na antybiotyki obecne w substratach przetwarzanych podczas AD w biogazowniach rolniczych mogą przedostać się do pofermentu, który jest używany jako nawóz w agrokulturze. Środki przeciwdrobnoustrojowe i ARGs mogą być przenoszone na grunty rolne, co może zwiększać ich koncentrację w środowisku. Na podstawie rezultatów uzyskanych w ramach przeprowadzonego trzeciego etapu badań stwierdzono, że środki przeciwdrobnoustrojowe nie zostały wyeliminowane podczas procesu AD. Ich stężenia różniły się w próbkach pofermentu otrzymanych z różnych substratów oraz we frakcji płynnej i stałej poszczególnych próbek. Ponadto próbki masy pofermentacyjnej otrzymane z substratów pochodzenia roślinnego charakteryzowały się wysokimi stężeniami ARGs. Wysokie stężenia genów integrazy rzędu do $10^7$ kopii w 1 gramie pofermentu mogą również wskazywać, że MGEs są zaangażowane w rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki. Wyniki powyższych badań sugerują, że ryzyko zanieczyszczenia gleby antybiotykami, i ARGs może być stosunkowo wysokie w gospodarstwach, w których poferment z biogazowni rolniczych jest używany jako nawóz.

Wyniki niniejszej dysertacji doktorskiej pozwalają określić, w jaki sposób środki przeciwdrobnoustrojowe wpływają na proces AD z różnorodnych substratów i na zmiany w różnorodności biologicznej drobnoustrojów oraz w koncentracji liczby genów funkcjonalnych i ARGs w pofermencie. Praca zawiera również technologiczne i praktyczne informacje na temat procesu AD, w którym substraty eksponowane są na określone stężenia leków przeciwdrobnoustrojowych.