Streszczenie

WSTĘP

Światowe zużycie i popyt na energię stale rosną, jednak zasoby takie jak węgiel, gaz ziemny i ropa naftowa nie stanowią zrównoważonego źródła energii. Z uwagi na rosnący poziom zaludnienia, koniecznym staje się zwiększenie nakładów energetycznych, co wpływa bezpośrednio na wzrost zainteresowania energią odnawialną. Biogaz, uzyskiwany na drodze fermentacji metanowej, stanowi jedną z najbardziej obiecujących alternatyw bioenergetycznych dla energii opartej na paliwach kopalnych (Holm-Nielsen et al., 2009; Scarlat et al., 2018). Co ważne, z przyjaznego środowisku paliwa, jakim jest biogaz, wytworzone może zostać najbardziej wydajne biopaliwo, czyli biometan (Bowe, 2013). Globalna liczba biogazowni na całym świecie wciąż rośnie, a potencjał rozwoju branży biogazowej jest ogromny i obejmuje każdy kraj. Aktualnie na całym świecie działa około 50 milionów mikro-bioreaktorów oraz łącznie 132,000 małych, średnich i dużych komór fermentacyjnych (World Biogas Association, 2019).

Fermentacja metanowa jest atrakcyjną praktyką przetwarzania odpadów, umożliwiającą ich zagospodarowanie przy jednoczesnym odzysku energii. Ten czteroetapowy, beztlenowy proces wymaga aktywności różnorodnych populacji mikroorganizmów, odpowiedzialnych za przebieg każdej z poszczególnych faz. Wśród nich wymienić można drobnoustroje hydrolizujące, acidogenne, acetogenne oraz metanogeny, bezpośrednio odpowiedzialne za produkcję metanu (Światczak et al. 2017). Niestety, znacznym utrudnieniem dla powszechnego stosowania tego procesu są problemy związane z jego optymalizacją i odpowiednio wysoką efektywnością. Główną przyczyną inhibicji fermentacji metanowej są różnorodne substancje, obecne w znacznych stężeniach w odpadach poddawanych stabilizacji beztlenowej. Wśród inhibitorów procesu można wymienić między innymi substancje przeciwdrobnoustrojowe (Rusanowska et al. 2019; Meegoda et al. 2018; Scarlat et al. 2018). Globalne spożycie antybiotyków w latach 2000-2015 wzrosło o 65%, z kolei na rok 2030 prognozowany jest 200% wzrost konsumpcji leków w porównaniu z rokiem 2015 (Klein et al., 2018). Intensywne spożywanie leków przez ludzi oraz ich nadmierne wykorzystanie w sektorze weterynaryjnym prowadzi do przedostawania się do środowiska antybiotyków w formie niezmienionej lub w postaci produktów ich transformacji. Z tego powodu leki przeciwdrobnoustrojowe mogą akumulować się w substratach poddawanych stabilizacji beztlenowej.

Fermentacja metanowa jest jedną z głównych strategii stabilizacji osadów ściekowych pochodzących z oczyszczalni ścieków (wastewater treatment plants – WWTPs) (Grobelak et al. 2019). Ilość osadów ściekowych wytwarzanych w WWTPs stale rośnie, a na całym świecie corocznie produkowane są one w setkach milionów ton. Zanieczyszczenia obecne w ściekach dopływających do WWTPs, w tym zanieczyszczenia mikrobiologiczne i pozostałości substancji przeciwdrobnoustrojowych, kumulują się w osadach ściekowych. Osady ściekowe mogą charakteryzować się występowaniem antybiotyków w koncentracjach wahających się od <1 do kilku tysięcy μg kg^{-1} (Czatzkowska et al., 2022). Co więcej, zarówno w ściekach, jak również w osadach ściekowych, stwierdza się występowanie ogromnej liczby drobnoustrojów, w tym mikroorganizmów chorobotwórczych. Szczególnie niebezpieczne wśród nich są bakterie posiadające mechanizmy oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe (Manaia et al. 2018). Jedną z przyczyn występowania bakterii posiadających jeden lub więcej genów oporności na antybiotyki (antibiotic resistance genes - ARGs), jest przede wszystkim niewłaściwe stosowanie substancji przeciwdrobnoustrojowych w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej. Zjawisko wymiany struktur genetycznych między drobnoustrojami, w tym również ARGs, predysponuje do szerzenia w środowisku zjawiska antybiotykooporności (antimicrobial resistance - AR). Z uwagi na powszechne stosowanie antybiotyków w ostatnich dziesięcioleciach, ARGs definiuje się jako nowe zanieczyszczenia, zagrażające bezpieczeństwu i zdrowiu publicznemu (Becerra-Castro et al. 2015; Xu et al. 2017; Barancheshme and Munir 2019). Co ważne, z uwagi na obecność w ściekach i osadach ściekowych subinhibitorowych stężeń substancji przeciwdrobnoustrojowych, WWTPs sprzyjają zwiększonej selekcji bakterii posiadających specyficzne ARGs (Sun et al. 2019). Rodzaje i koncentracje antybiotyków oraz ARGs, a także liczebność i skład społeczności drobnoustrojów obecnych w osadach ściekowych może być zróżnicowana i zależy bezpośrednio od jakości ścieków przyjmowanych przez WWTPs, a także od rodzaju procesów wykorzystywanych do ich oczyszczania.

Jak napisano powyżej, fermentacja metanowa stanowi metodę zagospodarowania osadów ściekowych - produktu ubocznego procesu oczyszczania ścieków, generowanego na całym świecie w ogromnych ilościach – umożliwiającą jednoczesny odzysk energii z tegoż odpadu. Efektywność tego procesu może zostać obniżona wskutek obecnych w substracie substancji przeciwdrobnoustrojowych. Przyczynę zakłóceń fermentacji metanowej stanowić może między innymi obniżona aktywność różnych grup mikroorganizmów, biorących udział w stabilizacji beztlenowej (Chen et al., 2008; Scarlat et al. 2018). Ekspozycja osadów ściekowych na inhibitory fermentacji metanowej może skutkować niestabilnością całego procesu i obniżoną

efektywnością produkcji metanu. Co więcej, prawie połowa produkowanych w UE osadów ściekowych wykorzystywana jest w rolnictwie i trafia do gleb (Campo et al., 2021). Wykorzystywanie przefermentowanych osadów ściekowych jako nawozu organicznego może predysponować do przedostawania się ARGs na pola uprawne, skąd wraz ze spływami wód gruntowych i uprawami trafiać mogą one ostatecznie do organizmów ludzi i zwierząt (Xiao et al., 2021). W celu zapewnienia możliwie najwyższej wydajności procesu, niezwykle ważna jest kontrola zanieczyszczeń obecnych w substracie, jak również monitoring parametrów panujących w komorach fermentacyjnych; z kolei ograniczenie szerzenia AR w środowisku wymaga kontroli jakości pofermentu, uwzględniającej analizę występowania ARGs.

CEL PRACY

Celem badań podjętych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu obecności antybiotyków w osadzie ściekowym poddanym fermentacji metanowej, zarówno na (1) wydajność produkcji metanu, jak również (2) los ARGs oraz rozpowszechnianie zjawiska AR, (3) zmiany jakościowe i ilościowe w konsorcjach mikroorganizmów odpowiadających za właściwy przebieg procesu oraz (4) występowanie mikroorganizmów metanogennych.

HIPOTEZY BADAWCZE

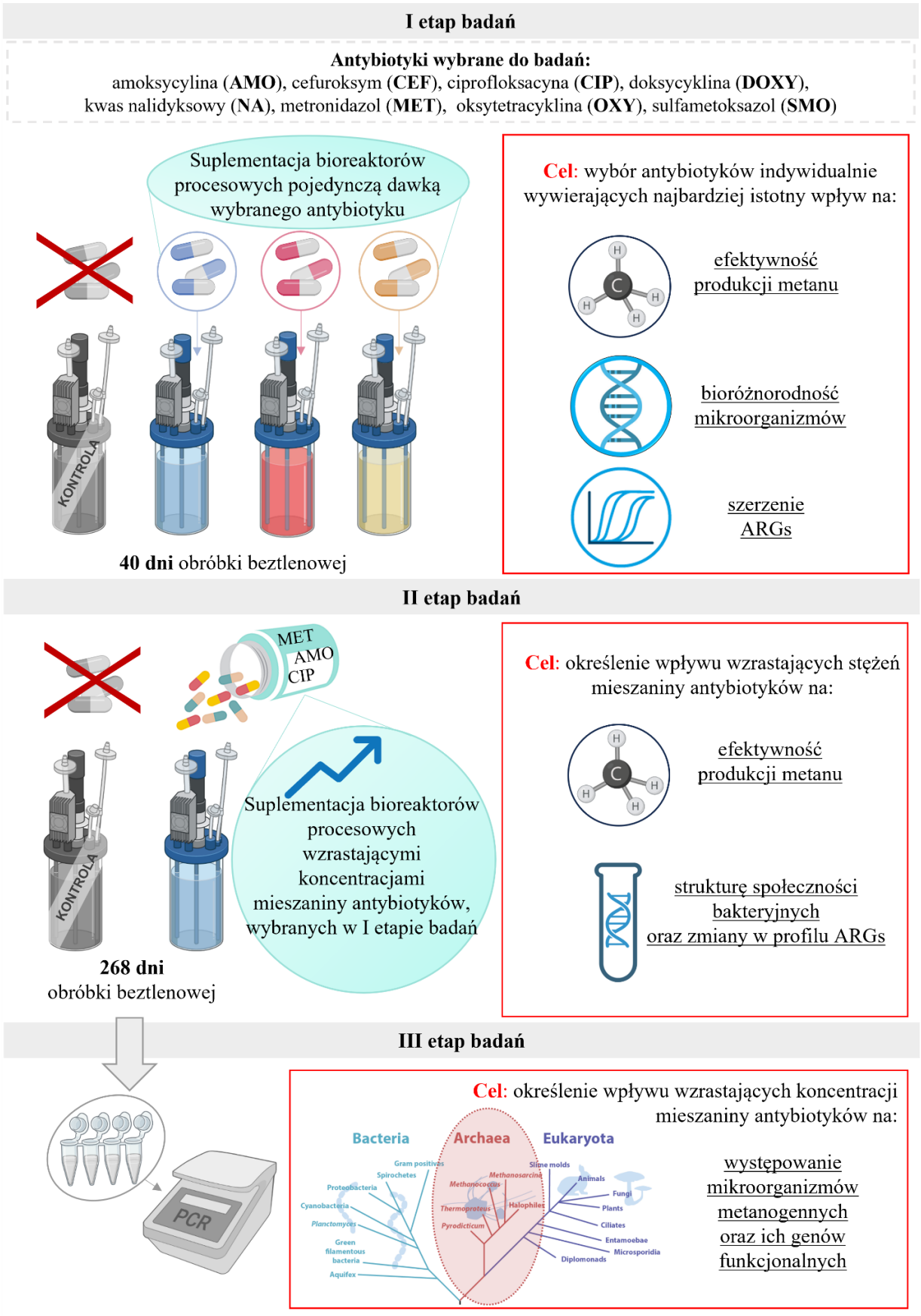
1. Ekspozycja osadów ściekowych na antybiotyki wpływa na efektywność produkcji metanu podczas ich stabilizacji beztlenowej.
2. Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych nie eliminuje ARGs.
3. Obecność antybiotyków w osadzie ściekowym poddanym fermentacji metanowej oddziałuje na zmiany w strukturze społeczności bakterii właściwych.
4. Substancje przeciwdrobnoustrojowe obecne w osadach ściekowych wywierają wpływ na aktywność i bioróżnorodność mikroorganizmów metanogennych zaangażowanych w proces stabilizacji beztlenowej.

ZAKRES BADAŃ, METODYKA I WYNIKI

Inhibitory fermentacji metanowej mogą wpływać zarówno na aktywność samych metanogenów, jak również innych grup mikroorganizmów zaangażowanych w stabilizację beztlenową. Antybiotyki, zaliczane do organicznych inhibitorów niespecyficznych, przedostają się do ścieków w tysiącach ton każdego roku na całym świecie. Ciągłe wzbogacanie ścieków w substancje przeciwdrobnoustrojowe powoduje ich wykrywanie również w osadach ściekowych. Inhibicja stabilizacji beztlenowej osadów ściekowych przez poszczególne

antybiotyki uzależniona jest od ich rodzaju i stężenia, a także współwystępowania w substracie innych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Pogłębianie wiedzy na temat procesu fermentacji metanowej, a także jego inhibitorów - w tym antybiotyków - zaowocowało opracowaniem pracy przeglądowej, opartej na 168 artykułach naukowych (**Załącznik 1**). Dokonano w niej identyfikacji i charakterystyki zarówno grup mikroorganizmów zaangażowanych w poszczególne etapy biometanizacji, jak również inhibitorów procesu i mechanizmów ich działania. Opracowanie pracy przeglądowej miało na celu identyfikację inhibitorów fermentacji metanowej, na temat których literatura naukowa dysponuje nadal dość skąpymi informacjami. W artykule zwrócono szczególną uwagę na lukę w wiedzy dotyczącej hamowania aktywności mikrobiomu zaangażowanego w poszczególne etapy fermentacji metanowej. Praca ta stanowiła podwaliny do weryfikacji postawionych w rozprawie hipotez, a także dalszych badań, których etapy przedstawiono na Rycinie 1. W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej, zaplanowano eksperyment, który podzielono na trzy etapy:

I. Celem pierwszego etapu badań było wyznaczenie substancji przeciwdrobnoustrojowych, wywierających najbardziej istotny wpływ na fermentację metanową. W tym celu do wsadu bioreaktorów indywidualnie zadawano antybiotyki. W analizach uwzględniono zarówno efektywność produkcji metanu, jak również strukturę drobnoustrojów oraz losy ARGs podczas beztlenowej stabilizacji osadów ściekowych;
II. Trzy substancje przeciwdrobnoustrojowe, wyselekcjonowane na podstawie I etapu badań, dawkowano jednocześnie do substratu poddawanego fermentacji metanowej. Drugi etap badań podzielony został na serie eksperymentalne, z których każda kolejna charakteryzowała się zwiększeniem koncentracji każdego z antybiotyków, wchodzących w skład suplementowanej mieszaniny. Celem tego etapu badań było określenie długoterminowego wpływu wzrastających stężeń mieszaniny antybiotyków na efektywność produkcji metanu, strukturę populacji drobnoustrojów i profile ARGs;
III. W ostatnim etapie badań skupiono się na uzupełnieniu uprzednio uzyskanych wyników rezultatami analizy zmienności występowania metanogenów oraz charakterystycznego dla nich genu funkcjonalnego w trakcie długoterminowej ekspozycji wsadu bioreaktora na mieszaninę antybiotyków o wzrastającym stężeniu.



Ryc. 1. Schemat obrazujący etapy badań prezentowanych w ramach rozprawy doktorskiej.

I etap badań

Na podstawie raportu European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC 2018) do badań wyselekcjonowano najczęściej stosowane w leczeniu ludzi substancje przeciwdrobnoustrojowe; metronidazol (MET), amoksycylinę (AMO), cefuroksym (CEF), oksytetracyklinę (OXY), doksycyklinę (DOXY), sulfametoksazol (SMO), ciprofloksacynę (CIP) i kwas nalidyksowy (NA). W celu określenia ich indywidualnego wpływu na fermentację metanową osadów ściekowych, przygotowano szereg bioreaktorów wypełnionych 25 g substratu i 175 g inokulum, które stanowiły odpowiednio osad ściekowy i osad beztlenowy z komory fermentacyjnej, pobrane z miejskiej oczyszczalni ścieków „Łyna" w Olsztynie. Do każdego z bioreaktorów wprowadzono wybraną substancję przeciwdrobnoustrojową, w dawce określonej eksperymentalnie na podstawie badań wstępnych. Eksperyment prowadzono w dwóch powtórzeniach, przy uwzględnieniu bioreaktora kontrolnego, w którym wsad bioreaktora nie został poddany ekspozycji na antybiotyk. Fermentację metanową prowadzono przez 40 dni w warunkach mezofilnych, w temperaturze 37°C. Produkcję metanu mierzono za pomocą urządzenia służącego do pomiaru potencjału wytwórczego metanu AMPTS II. Jakość biogazu analizowano z wykorzystaniem chromatografu gazowego, wyposażonego w detektor przewodności cieplnej. Po zakończeniu fermentacji metanowej z każdego bioreaktora pobrano reprezentatywne próbki pofermentu. Próbki te poddano analizie pod kątem zawartości lotnych kwasów tłuszczowych (LKT). Dodatkowo, z próbek pofermentu wyizolowano DNA, z wykorzystaniem FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals). Materiał genetyczny poddano sekwencjonowaniu regionu hiperzmiennego V3-V4 genu *16S r*RNA, z wykorzystaniem Illumina MiSeq, w celu określenia różnorodności mikrobiomu. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (quantitative polymerase chain reaction – qPCR) została wykorzystana do analizy występowania w próbkach wybranych genów antybiotykooporności i genów kodujących integrazy, a także genów charakterystycznych dla rodzin metanogenów dominujących w osadzie beztlenowym (*Methanosarcinaceae- MSC* i *Methanosaetaceae – MST*) oraz funkcjonalnego genu metanogenów, katalizującego ostatnią fazę metanogenezy (*mcr*A). Wyniki tego eksperymentu przedstawiono w artykule naukowym, stanowiącym **Załącznik 2** do rozprawy doktorskiej, poddającym weryfikacji wszystkie postawione hipotezy badawcze.

W opisanych badaniach fermentacja metanowa została istotnie zahamowana w bioreaktorach, w których wsad suplementowany był MET, AMO, OXY, DOXY i CIP. MET, stosowany w leczeniu zakażeń drobnoustrojami beztlenowymi, był najsilniejszym inhibitorem,

a jego wprowadzenie do reaktora obniżyło zawartość metanu w biogazie do 12,8 ± 4,0% i zmniejszyło szybkość produkcji metanu do 21,85 L $kg^{-1}d^{-1}$. Zahamowanie metanogenezy doprowadziło do akumulacji LKT. Stężenia siedmiu z dziewięciu analizowanych LKT były istotnie wyższe w pofermencie z dodatkiem MET niż w próbce z bioreaktora kontrolnego. Poza MET, największe działanie inhibitujące stabilizację beztlenową osadów ściekowych wykazały AMO i CIP. Dodatek AMO do wsadu reaktora znacznie obniżył zawartość metanu w biogazie (o około 44%), natomiast wprowadzenie CIP zmniejszyło produkcję metanu (o około 40% w stosunku do bioreaktora kontrolnego).

Analiza sekwencji DNA w próbkach ze wszystkich bioreaktorów wykazała, że dominującymi typami mikroorganizmów w pofermencie byli przedstawiciele typów *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. W porównaniu do kontroli, największy spadek liczby odczytów specyficznych dla *Bacteroidetes* odnotowano w próbkach pofermentu poddanego ekspozycji na MET. W tych samych próbkach zaobserwowano istotny wzrost udziału *Firmicutes* i *Proteobacteria* (odpowiednio o 6% i 6,8% w stosunku do kontroli). Ekspozycja wsadu bioreaktora na AMO i CIP istotnie zmniejszyła natomiast udział przedstawicieli rzędu *Syntrophobacteriales*, co może świadczyć o zahamowaniu acetogenezy.

Analizy oparte o metodę qPCR wykazały, że występowanie genu *mcr*A w pofermencie poddanym ekspozycji na MET, CEF i NA było niższe w porównaniu do kontroli. Jednakże analiza obfitości występowania tego funkcjonalnego dla metanogenów genu nie odzwierciedlała rzeczywistego stopnia efektywności produkcji metanu w obecności środków przeciwdrobnoustrojowych. W przefermentowanym osadzie ściekowym wystawionym na działanie MET, CEF i NA stwierdzono istotne względem kontroli zmniejszenie występowania genów charakterystycznych dla metanogennych rodzin *Methanosarcinaceae* i *Methanosaetaceae*. Powyższe obserwacje mogą świadczyć o pewnym stopniu wrażliwości metanogenów na wymienione związki przeciwdrobnoustrojowe.

Obecność antybiotyków wpłynęła na częstość występowania wytypowanych do analiz ARGs, powodując wzrost liczby kopii genów kodujących oporność wobec β-laktamów, tetracyklin i fluorochinolonów. Wykazano jednak, że presja selekcyjna wywierana przez substancje przeciwdrobnoustrojowe nie była specyficzna wobec genów kodujących oporność na ich poszczególne klasy. Wykorzystanie analizy korelacji pozwoliło wykazać, że geny kodujące integrazę odgrywają ważną rolę w przenoszeniu ARGs podczas fermentacji metanowej.

II etap badań

W ramach kontynuacji prezentowanych w I etapie badań przeprowadzono kolejny eksperyment, podjęty w celu oceny jednoczesnego, długoterminowego wpływu środków przeciwbakteryjnych na fermentację metanową osadów ściekowych. Badania objęły trzy substancje przeciwdrobnoustrojowe, które indywidualnie wywarły największy istotny wpływ na stabilizację beztlenową, z uwzględnieniem aspektów mikrobiologicznych procesu – MET, AMO i CIP. Przeprowadzony eksperyment przedstawiono w artykule naukowym, stanowiącym **Załącznik 3** do rozprawy doktorskiej, poddając weryfikacji pierwsze trzy hipotezy badawcze.

W niniejszej pracy, osad ściekowy, zaszczepiony osadem beztlenowym z komory fermentacyjnej, pobrany z tej samej WWTP, poddano stabilizacji beztlenowej w fermentatorach półciągłych przepływowych, utrzymywanych w warunkach mezofilnych (37°C). Komory zasilano substratem zawierającym mieszaninę MET, AMO i CIP, a także osadem ściekowym niepoddanym ekspozycji na antybiotyki (kontrola). Eksperymenty dla każdego z substratów przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Badanie składało się z sześciu serii eksperymentalnych, które różniły się stężeniami antybiotyków aplikowanymi do substratu. Początkowe stężenie każdego z trzech antybiotyków w mieszaninie dozowanej do osadów ściekowych podczas pierwszej serii doświadczalnej było zbliżone do stężeń tych leków w ściekach wpływających do oczyszczalni, z której pobrano osad ściekowy. Stężenia antybiotyków dodawanych do komory fermentacyjnej zwiększano po dwukrotnej wymianie objętości hydraulicznej komór fermentacyjnych. Każda z serii eksperymentalnych trwała średnio 45 dni, a cały eksperyment trwał 268 dni. W trakcie badań cotygodniowo dokonywano regularnego pomiaru ilości wytwarzanego metanu (AMPTS II), a jakość biogazu analizowano w chromatografie gazowym wyposażonym w detektor przewodności cieplnej. W tych samych odstępach czasu pobierano próbki w celu pomiaru LKT. Próbki przeznaczone do izolacji i sekwencjonowania DNA pobierano z wsadu bioreaktorów procesowych (zawierających substrat suplementowany antybiotykami) na początku, w środku i na końcu każdej serii doświadczalnej, natomiast z bioreaktora kontrolnego dokonano poboru jednej próbki podczas pierwszej, czwartej i ostatniej serii doświadczalnej. Do analizy bioróżnorodności mikroorganizmów oraz monitoringu występowania genów antybiotykooporności zastosowano czułą, molekularną metodę sekwencjonowania metagenomowego (Illumina NovaSeq).

Na podstawie analizy produkcji metanu zaobserwowano, że przedłużona ekspozycja na kombinację środków przeciwdrobnoustrojowych może wpływać na aklimatyzację mikroorganizmów wewnątrz bioreaktora, co sprzyja adaptacji drobnoustrojów. Tendencje

produkcji metanu w bioreaktorze kontrolnym i procesowym wykazywały podobny trend, jednak wydajność produkcji metanu w bioreaktorze, w którym wsad suplementowany był mieszaniną MET, AMO i CIP, była istotnie niższa, w porównaniu do kontroli. W prezentowanych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach poszczególnych LKT pomiędzy próbkami wsadu pobranego z bioreaktorów procesowych i kontrolnych.

Analiza danych pozyskanych w wyniku sekwencjonowania wykazała istotne różnice w strukturze mikrobiomu pomiędzy próbkami wsadu kontrolnego i suplementowanego w trakcie eksperymentu. Ekspozycja na wzrastające dawki mieszaniny antybiotyków wywołała zmiany w strukturze populacji drobnoustrojów. Bakterie należące do typu *Acidobacteria* dominowały w próbkach osadu beztlenowego pobranych zarówno z bioreaktorów kontrolnych, jak i procesowych, lecz ich liczebność różniła się istotnie pomiędzy substratem poddanym działaniu antybiotyków, a kontrolą. Zaobserwowano, ze ekspozycja wsadu bioreaktora na AMO (36 μg/mL), CIP (16 μg/mL) i MET (16 μg/mL) znacząco hamowała wzrost przedstawicieli *Acidobacteria*. Podczas całego procesu częstość występowania *Candidatus Cloacimonetes* i *Proteobacteria* była podobna we wsadzie kontrolnym i suplementowanym antybiotykami, podczas gdy liczebność operacyjnych jednostek taksonomicznych (operational taxonomic unit – OTU) charakterystycznych dla *Bacteroidetes* różniła się istotnie między próbkami. Początkowo wysoka liczebność przedstawicieli *Firmicutes* w próbkach wsadu z bioreaktora procesowego zmniejszała się pod wpływem dalszej ekspozycji na mieszaninę substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Ekspozycja na mieszaninę antybiotyków istotnie zwiększyła liczbę OTU charakterystycznych dla *Archaea* w analizowanych próbkach, jednak zmiany te nie wpłynęły na efektywność produkcji biogazu. Analiza liczebności OTU charakterystycznych dla metanogenów pozwoliła na identyfikację w próbkach wsadu czterech głównych rzędów metanogenów: *Methanosarcinales* i *Methanomicrobiales* z klasy *Methanomicrobia*, *Methanomassiliicoccales* z klasy *Thermoplasmata* i *Methanobacteriales* z klasy *Methanobacteria*. W czasie trwania całego eksperymentu obserwowano istotne różnice w obfitości przedstawicieli *Methanosarcinales* i *Methanomassiliicoccales*, zarówno w próbkach z bioreaktora procesowego, jak i kontrolnego. Występowanie OTUs charakterystycznych dla tych rodzajów metanogenów wykazywało silnie ujemną, wzajemną korelację. Wnioskowano, że dynamiczne zmiany w zbiorowiskach mikroorganizmów i ich adaptacja do zmieniających się warunków środowiskowych są niezbędne dla stabilnej pracy beztlenowych komór fermentacyjnych.

Próbki wsadu pobrane zarówno z bioreaktorów procesowych, jak i kontrolnych charakteryzowały się przewagą genów wielolekooporności oraz genów nadających oporność na antybiotyki MLS (>20 ppm). W próbkach licznie występowały również geny oporności na tetracyklinę i bacytracynę (5–15 ppm). Ponownie dowiedziono, że presja selekcyjna wywierana przez antybiotyki suplementowane do wsadu bioreaktorów procesowych nie była specyficznie ukierunkowana na geny kodujące oporność wobec konkretnych klas środków przeciwdrobnoustrojowych. Całkowita obfitość ARGs zmniejszyła się pod koniec stabilizacji beztlenowej, zarówno w próbkach wsadu z bioreaktorów procesowych, jak i kontrolnych. Co ważne, częstość występowania genów oporności wielolekowej wzrosła w próbkach wsadu bioreaktorów procesowych, podczas gdy w próbkach kontrolnych zaobserwowano tendencję odwrotną. Należy podkreślić, że przenoszenie genów oporności wielolekowej między mikroorganizmami stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie.

III etap badań

Pomimo, iż sekwencjonowanie metagenomowe próbek z poprzedniego etapu badań umożliwiło identyfikację sekwencji charakterystycznych dla przedstawicieli *Archaea*, ich liczba była istotnie niższa w porównaniu do liczby odczytów charakterystycznych dla bakterii właściwych. W związku z tym, ostatni etap badań ukierunkowano na pogłębienie wiedzy dotyczącej wpływu, jaki długoterminowa suplementacja osadów ściekowych mieszaniną antybiotyków o wzrastającym stężeniu wywiera na mikroorganizmy metanogenne.

Materiał genetyczny wyizolowany w II etapie badań poddano ocenie występowania genów charakterystycznych dla metanogenów z rodzin *Methanosarcinaceae* (*MSC*) i *Methanosaetaceae* (*MST*), należących do rzędu *Methanosarcinales*. Do analiz wykorzystano technikę qPCR. Wyniki badań wstępnych pozwoliły na wykluczenie w osadzie beztlenowym istotnego udziału przedstawicieli metanogennych rodzin z innych rzędów, należących do domeny *Archaea*. Aktywność mikroorganizmów metanogennych oceniono poprzez określenie stężenia genu kodującego reduktazę metylokoenzymu M (*mcr*A), katalizującego ostatni etap fermentacji metanowej - metanogenezę. Wyniki tego eksperymentu przedstawiono w artykule naukowym, stanowiącym **Załącznik 4** do rozprawy doktorskiej. W tej pracy zweryfikowano ostatnią, czwartą hipotezę badawczą.

Na podstawie wyników molekularnej analizy efektywności stabilizacji beztlenowej, uwzględniającej koncentrację funkcjonalnego genu *mcr*A, zaobserwowano, że stężenia tego genu w próbkach wsadu z bioreaktorów procesowych i kontrolnych, różniły się w całej serii

eksperymentalnej. Wykazano, że produkcja metanu nie była skorelowana z występowaniem genu *mcr*A podczas długotrwałej stabilizacji beztlenowej, bez względu na ekspozycję na leki bądź jej brak. Po raz kolejny potwierdzono, że zmiany w wydajności uzysku metanu nie mogą być wiarygodnie mierzone na podstawie obfitości genu *mcr*A, pomimo faktu, że gen ten został zaproponowany przez innych naukowców jako marker do monitorowania aktywności metanogenów.

Zarówno w badanych, jak i kontrolnych próbkach wsadu, liczba kopii genów charakterystycznych dla *Methanosarcinaceae* pozostawała stabilna w czasie trwania eksperymentu, za wyjątkiem ostatniej, szóstej serii eksperymentalnej, w której liczebność genów *MSC* wzrosła o 2 rzędy wielkości w 1 gramie pofermentu. Świadczy to o stabilnym wzroście przedstawicieli *Methanosarcinaceae* podczas fermentacji osadów, niezależnie od suplementacji antybiotykami. Z kolei liczebność genów *MST*, charakterystycznych dla rodziny *Methanosaetaceae*, bardzo istotnie różniła się pomiędzy próbkami suplementowanymi, a kontrolnymi ($P \leq 0.001$). Co ważne, w ostatniej serii eksperymentalnej, liczebność genów *MST* w badanych i kontrolnych próbkach wsadu bioreaktora była zbliżona, co sugeruje, że konsorcja tych drobnoustrojów przystosowały się do wzrastających stężeń leków. Wnioskowano, że obie rodziny metanogenów dobrze zaadaptowały się do warunków panujących w bioreaktorze procesowym, jednak bez względu na ekspozycję na leki, to przedstawiciele *Methanosaetaceae* zdominowali poferment.

PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły szerokiej gamy informacji dotyczących wpływu substancji przeciwdrobnoustrojowych na proces fermentacji metanowej, zarówno w ujęciu technologicznym, jak i mikrobiologicznym. Przedstawione badania pozwoliły na osiągnięcie zamierzonych celów oraz pozytywne zweryfikowanie wszystkich hipotez, postawionych w ramach rozprawy doktorskiej. Wykazano, że:

(1) niektóre leki przeciwdrobnoustrojowe, szeroko stosowane w medycynie, mogą obniżać efektywność fermentacji metanowej osadów ściekowych.

(2) obecność środków przeciwdrobnoustrojowych podczas fermentacji metanowej wywiera istotny wpływ na profil ARGs. Ekspozycja na MET wywołała najbardziej istotne zmiany w stężeniach ARGs, w szczególności poprzez zwiększenie koncentracji genów kodujących oporność wobec β-laktamów, tetracyklin i fluorochinolonów, a także obniżenie stężenia genów nadających oporność na leki z grupy MLS. Presja selekcyjna

wywierana przez antybiotyki nie była specyficzna wobec konkretnych typów ARGs. Co więcej, badania zwróciły uwagę na problem związany z nieskutecznością eliminacji ARGs w wyniku stabilizacji beztlenowej osadów ściekowych oraz zagrożenie związane z szerzeniem zjawiska AR.

(3) ekspozycja osadów ściekowych na środki przeciwdrobnoustrojowe podczas stabilizacji beztlenowej istotnie wpływa na strukturę zbiorowisk drobnoustrojów, w tym metanogenów. MET indukował największe zmiany w bioróżnorodności drobnoustrojów, znacznie zmniejszając udział *Bacteroidetes*, a zwiększając liczbę OTUs charakterystycznych dla *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Przedstawiciele *Methanosaetaceae* dominowali wśród mikroorganizmów metanogennych podczas suplementacji indywidualnymi lekami, jak również w trakcie symultanicznej ekspozycji na MET, AMO i CIP .

(4) ilościowa analiza genów specyficznych dla mikroorganizmów metanogennych, takich jak funkcjonalny gen *mcr*A, nie odzwierciedla wartości parametrów fermentacji metanowej, a tym samym rzeczywistej wydajności procesu w obecności środków przeciwdrobnoustrojowych.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały potrzebę prowadzenia dalszych badań w celu określenia wpływu obecności inhibitorów, takich jak antybiotyki, na aktywność drobnoustrojów fermentacji metanowej, co w przyszłości umożliwi zapewnienie optymalnych warunków wzrostu i rozwoju mikroorganizmów odpowiedzialnych za poszczególne etapy stabilizacji beztlenowej. Takie badania powinny opierać się na nowoczesnych metodach molekularnych, między innymi na sekwencjonowaniu metagenomowym.