UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ
GEOINŻYNIERII

Dziedzina nauk inżynieryjno-technicznych

Dyscyplina: Inżynieria środowiska, górnictwo, energetyka

ROZPRAWA DOKTORSKA

Małgorzata Czatzkowska

Wpływ antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodność mikroorganizmów i zjawisko antybiotykooporności

The influence of antimicrobials on the anaerobic digestion of sewage sludge, microbial biodiversity, and the spread of antibiotic resistance

Praca wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej, pod kierunkiem promotor prof. dr hab. inż. Moniki Harnisz oraz promotor pomocniczej dr Pauliny Rusanowskiej

Olsztyn, 2023

Prezentowaną rozprawę doktorską stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

1. **Czatzkowska M**., Harnisz M., Korzeniewska E., Koniuszewska I. 2020. Inhibitors of the methane fermentation process with particular emphasis on the microbiological aspect: A review. Energy Science & Engineering, 8, 1880–1897, https://doi.org/10.1002/ese3.609
   100 pkt. MEiN, **IF 4.035**

2. **Czatzkowska M**., Harnisz M., Korzeniewska E., Rusanowska P., Bajkacz S., Felis E., Jastrzębski J. P., Paukszto Ł., Koniuszewska I. 2021. The impact of antimicrobials on the efficiency of methane fermentation of sewage sludge, changes in microbial biodiversity and the spread of antibiotic resistance. Journal of Hazardous Materials, 416, 125773, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.12577
   200 pkt. MEiN, **IF 14.224**

3. **Czatzkowska M**., Harnisz M., Korzeniewska E., Wolak I., Rusanowska P., Paukszto Ł., Jastrzębski J. P., Bajkacz S. 2022. Long-Term, Simultaneous Impact of Antimicrobials on the Efficiency of Anaerobic Digestion of Sewage Sludge and Changes in the Microbial Community. Energies, 15, 5, 1826, https://doi.org/10.3390/en15051826
   140 pkt. MEiN, **IF 3.252**

4. **Czatzkowska M**., Wolak I., Korzeniewska E., Harnisz M. 2022. Anaerobic Digestion in the Presence of Antimicrobials—Characteristics of Its Parameters and the Structure of Methanogens. Applied Sciences, 12, 17, 8422, https://doi.org/10.3390/app12178422
   100 pkt. MEiN, **IF 2.838**

Spis treści

Streszczenie 4

Abstract 16

Literatura 28

Źródła finansowania badań 30

Załączniki – publikacje naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Załącznik 1

Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E., Koniuszewska I. 2020. Inhibitors of the methane fermentation process with particular emphasis on the microbiological aspect: A review. Energy Science & Engineering, 8, 1880–1897, https://doi.org/10.1002/ese3.609

Załącznik 2

Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E., Rusanowska P., Bajkacz S., Felis E., Jastrzębski J. P., Paukszto Ł., Koniuszewska I. 2021. The impact of antimicrobials on the efficiency of methane fermentation of sewage sludge, changes in microbial biodiversity and the spread of antibiotic resistance. Journal of Hazardous Materials, 416, 125773, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.12577

Załącznik 3

Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E., Wolak I., Rusanowska P., Paukszto Ł., Jastrzębski J. P., Bajkacz S. 2022. Long-Term, Simultaneous Impact of Antimicrobials on the Efficiency of Anaerobic Digestion of Sewage Sludge and Changes in the Microbial Community. Energies, 15, 5, 1826, https://doi.org/10.3390/en15051826

Załącznik 4

Czatzkowska M., Wolak I., Korzeniewska E., Harnisz M. 2022. Anaerobic Digestion in the Presence of Antimicrobials—Characteristics of Its Parameters and the Structure of Methanogens. Applied Sciences, 12, 17, 8422, https://doi.org/10.3390/app12178422

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 (Świątczak 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

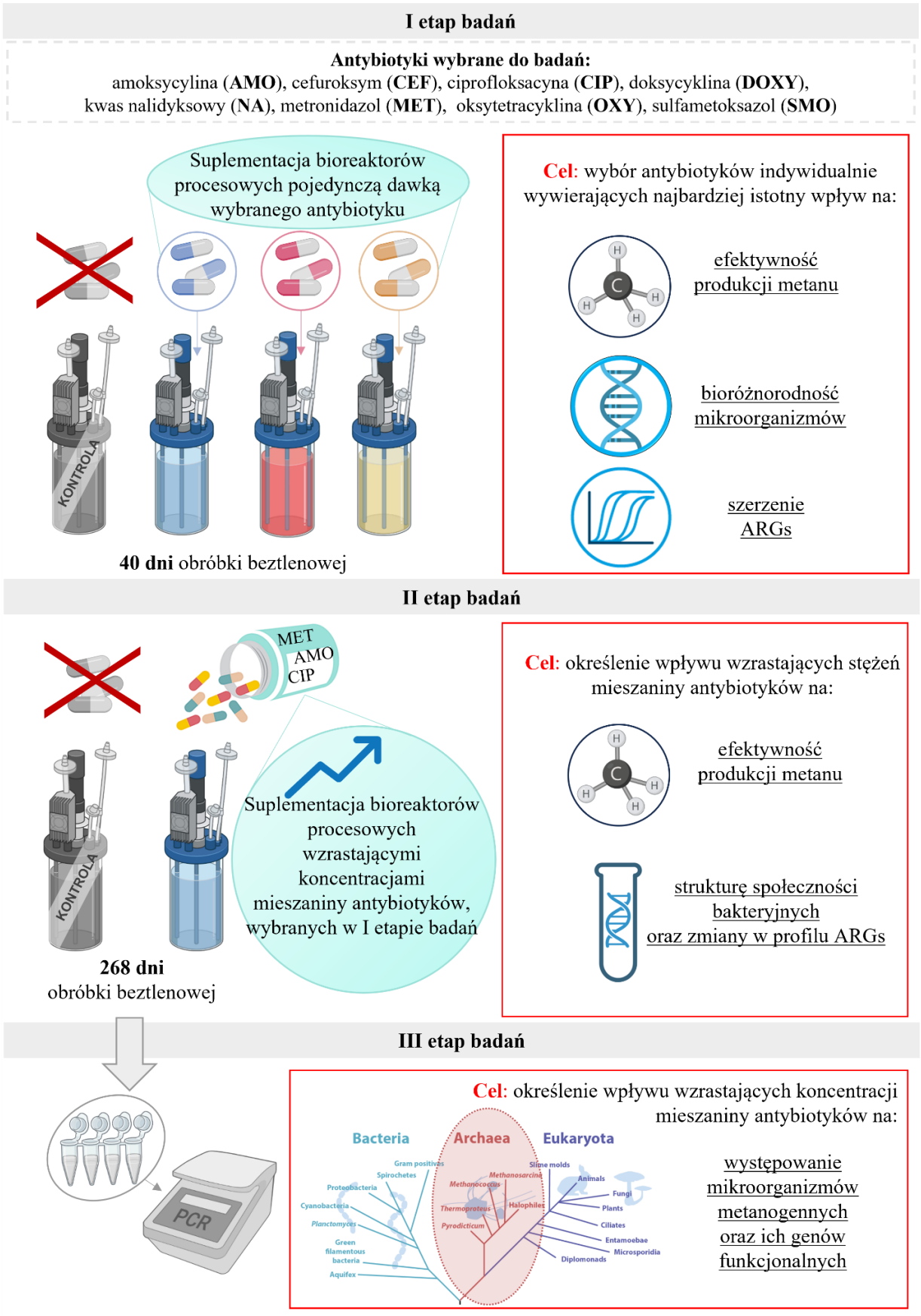
1. Ekspozycja osadów ściekowych na antybiotyki wpływa na efektywność produkcji metanu podczas ich stabilizacji beztlenowej.
2. Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych nie eliminuje ARGs.
3. Obecność antybiotyków w osadzie ściekowym poddanym fermentacji metanowej oddziałuje na zmiany w strukturze społeczności 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.

Abstract

INTRODUCTION

The global consumption and demand for energy continue to increase, but fossil fuels such as coal, natural gas, and oil are not sustainable energy sources. The supply of energy carriers has to increase to cater to rapid population growth, which is directly responsible for the recent interest in renewable energy. Biogas produced during anaerobic digestion is one of the most promising alternatives to fossil fuels in energy generation (Holm-Nielsen et al., 2009; Scarlat et al., 2018). Biogas is environmentally friendly, and it can be converted to biomethane, which is the most efficient type of biofuel (Bowe, 2013). The number of biogas plants continues to increase around the world, and the biogas sector has a massive growth potential in all countries. At present, nearly 50 million micro-scale digesters and 132,000 small, medium, and large-scale digesters are operated around the world (World Biogas Association, 2019).

Anaerobic digestion is an attractive waste processing method that promotes effective waste management and energy recovery. This four-stage processes takes place in the presence of various microbial populations, including hydrolyzing, acidogenic, acetogenic, and methane-producing bacteria, which are responsible for different stages of fermentation (Światczak et al. 2017). However, the efficiency of anaerobic digestion is difficult to optimize, which prevents the widespread implementation of this process. Anaerobic digestion is inhibited mainly by substances that are present in large quantities in stabilized waste, including antimicrobial compounds (Rusanowska et al. 2019; Meegoda et al. 2018; Scarlat et al. 2018). Global antibiotic consumption increased by 65% between 2000 and 2015, and a further increase of 200% is expected by 2030 (Klein et al., 2018). High antibiotic consumption in human medicine and the overuse of antimicrobials in the veterinary sector promote the spread of the parent compounds and their metabolites in the environment. As a result, antimicrobials can accumulate in substrates that are subjected to anaerobic digestion.

Anaerobic digestion is one of the key strategies for stabilizing sewage sludge from wastewater treatment plants (WWTPs) (Grobelak et al. 2019). Wastewater treatment plants produce increasing quantities of sewage sludge, and hundreds of millions tons of sewage sludge are being generated each year around the world. Incoming raw wastewater contains various pollutants, including microbial contaminants and drug residues, which are accumulated in sewage sludge. Antibiotic concentrations in sewage sludge can range from <1 to several thousand μg kg^{-1} (Czatzkowska et al., 2022). In addition, both wastewater and sewage sludge

are also massively colonized by microorganisms, including pathogens. Bacteria harboring mechanisms of antimicrobial resistance (AR) pose a particular threat (Manaia et al. 2018). The misuse of antibiotics in human and veterinary medicine leads to the emergence of bacteria with one or more antibiotic resistance genes (ARGs). The exchange of genetic structures, including ARGs, between microorganisms contributes to the spread of AR in the environment. Due to the widespread use of antibiotics in recent decades, ARGs have been classified as a new source of pollution that poses a threat to public health and safety (Becerra-Castro et al. 2015; Xu et al. 2017; Barancheshme and Munir 2019). In addition, wastewater and sewage sludge contain subinhibitory concentrations of antimicrobials, and WWTPs promote increased selection pressure on bacteria harboring specific ARGs (Sun et al. 2019). The types and concentrations of antibiotics and ARGs, and the abundance and composition of microbial communities in sewage sludge can vary, depending on the quality of incoming raw wastewater and the applied wastewater treatment technology.

As previously mentioned, anaerobic digestion is an effective method of managing sewage sludge, a by-product of the wastewater treatment process which is generated in massive quantities around the world. The energy accumulated in sewage sludge is recovered during anaerobic digestion. The efficiency of this process can be compromised by the presence of antimicrobial substances in the substrate. Decreased activity of different microbial groups that participate in anaerobic digestion can also undermine digestion efficiency (Chen et al., 2008; Scarlat et al. 2018). The presence of inhibitors in sewage sludge can destabilize anaerobic digestion and decrease methane output. Nearly half of the sewage sludge produced in the EU is used in agriculture as organic fertilizer and is introduced to the soil environment (Campo et al., 2021). Digestate-based fertilizers can promote the spread of ARGs in cultivated fields; ARGs are then transferred from the soil to groundwater and crops, and they ultimately reach humans and animals (Xiao et al., 2021). The pollutants present in the substrate should be controlled, and processing parameters in reactors should be closely monitored to maximize the efficiency of anaerobic digestion. In turn, the quality of the resulting digestate, including the presence of ARGs, should be analyzed to reduce the spread of AR in the environment.

AIM OF THE STUDY

The aim of the study, whose results constituted the basis for this doctoral dissertation, was to determine the effect of antibiotics present in sewage sludge subjected to anaerobic digestion on (1) efficiency of methane production, (2) fate of ARGs and the spread of AR, (3)

qualitative and quantitative changes in the consortia of microorganisms that participate in anaerobic digestion, and (4) prevalence of methanogens.

RESEARCH HYPOTHESES

5. Exposure of sewage sludge to antibiotics affects the efficiency of methane production during anaerobic digestion.
6. Anaerobic digestion of sewage sludge does not eliminate ARGs.
7. The presence of antibiotics in sewage sludge subjected to anaerobic digestion induces changes in the structure of Eubacteria communities.
8. Antimicrobials present in sewage sludge affect the activity and biodiversity of methanogens that participate in anaerobic digestion.

SCOPE OF THE STUDY, RESEARCH METHODS AND RESULTS

Inhibitors of anaerobic digestion may affect the activity of both methanogens and other groups of microorganisms that participate in anaerobic digestion. Each year, thousands of millions tons of antibiotics, classified as non-specific organic inhibitors, are detected in wastewater around the world. Due to the continuous supplementation of wastewater with antimicrobials, these substances are also identified in sewage sludge. The inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by antibiotics is affected by their type and concentration, and the co-occurrence of other antimicrobial agents in the substrate. Recent research findings regarding anaerobic digestion and its inhibitors, including antibiotics, were summarized in a review based on 168 articles (**Appendix 1**). Microbial groups involved in each stage of biomethanation, inhibitors of the process and mechanisms of their action were identified and characterized. The aim of the review was to identify the inhibitors of anaerobic digestion, which remain insufficiently investigated in the scientific literature. Particular emphasis was placed on a knowledge gap regarding the inhibition of the activity of the microbiome involved in each stage of anaerobic digestion. The review provided a basis for verifying the research hypotheses formulated in the dissertation, and paved the way for future research whose stages are presented in Figure 1. An experiment conducted as part of doctoral research was divided into three stages:

IV. The aim of the first stage of research was to identify antimicrobials that exert the most significant effect on anaerobic digestion. For this purpose, individual antibiotics were added to the feedstock in bioreactors. The efficiency of methane production, the structure of microbial communities and the fate of ARGs during the anaerobic digestion of sewage sludge were determined;

V. Three antimicrobials, selected in the first stage of the study, were simultaneously applied to the substrate subjected to anaerobic digestion. The second stage of research was divided into experimental series, and the concentrations of all antibiotics in the mixture were increased in each series. The aim of this stage was to determine the long-term impact of increasing concentrations of the tested antibiotic mixture on the efficiency of methane production, structure of microbial populations and ARG profiles;

VI. The last stage of research focused on complementing previous findings with the results of an analysis of variation in the prevalence of methanogens and their characteristic functional genes during long-term exposure of the substrate in a bioreactor to increasing concentrations of the tested antibiotic mixture.

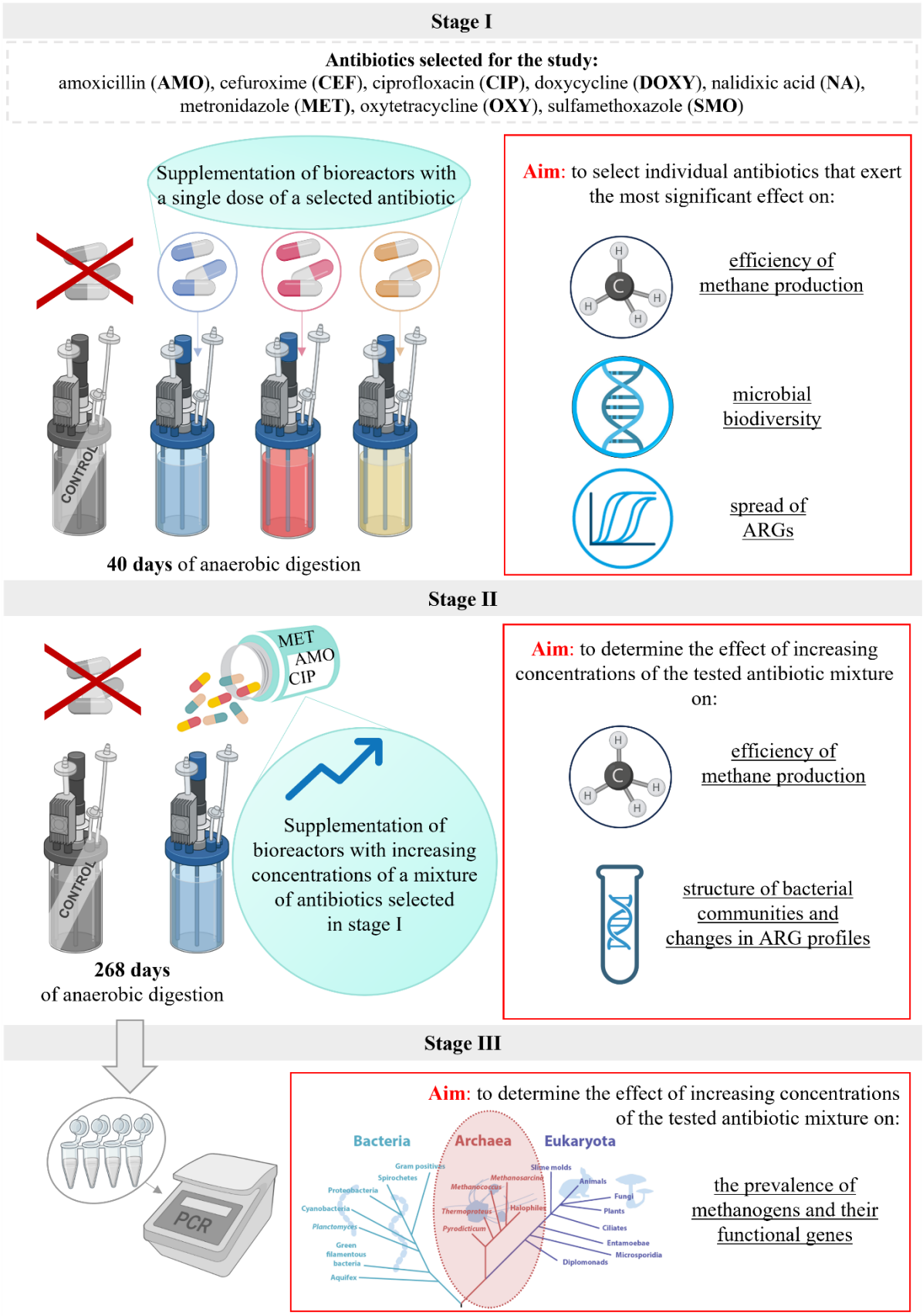


Figure 1. Stages of research described in the doctoral dissertation.

Stage I

Based on a report of the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC 2018), antimicrobial drugs that are most widely used in human medicine were selected for the study: metronidazole (MET), amoxicillin (AMO), cefuroxime (CEF), oxytetracycline (OXY), doxycycline (DOXY), sulfamethoxazole (SMO), ciprofloxacin (CIP) and nalidixic acid (NA). In order to determine their individual effects on the anaerobic digestion of sewage sludge, bioreactors were filled with 25 g of the substrate and 175 g of the inoculum, i.e. sewage sludge and anaerobically digested sludge from a fermentation tank, respectively, collected in the "Łyna" Municipal WWTP in Olsztyn. Selected antimicrobials at doses determined experimentally during a preliminary study were added to substrates in bioreactors. The experiment was performed in duplicate. In the control bioreactor, the substrate was not exposed to antibiotics. Anaerobic digestion was conducted for 40 days under mesophilic conditions at a temperature of 37°C. Methane production was measured with the AMPTS II. Biogas quality was analyzed in a gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector. After anaerobic digestion, representative digestate samples were collected from each bioreactor. The samples were analyzed to determine the concentrations of volatile fatty acids (VFAs). In addition, DNA was isolated from digestate samples with the use of the FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals). The genetic material was subjected to sequencing of the hypervariable region V3-V4 of the *16S r*RNA gene with the use of the Illumina MiSeq instrument, to determine microbial diversity. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was applied to analyze the concentrations of selected ARGs, genes encoding class 1 and 2 integrases, genes specific to the families of methanogens that predominate in anaerobically digested sludge (*Methanosarcinaceae* - *MSC* and *Methanosaetaceae* - *MST*), and the functional methyl-coenzyme M reductase gene (*mcr*A), which catalyzes the final step of anaerobic digestion - methanogenesis. The results of this experiment were presented in a research article (**Appendix 2** to this dissertation), and all research hypotheses were verified.

In the described study, anaerobic digestion was significantly inhibited in the bioreactors where the substrate was supplemented with MET, AMO, OXY, DOXY and CIP. Metronidazole, which is used to treat infections caused by anaerobic bacteria, was the strongest inhibitor, and its introduction to the bioreactor decreased the methane content of biogas to 12.8±4.0% and reduced the methane production rate to 21.85 L kg^{-1} d^{-1}. The inhibition of methanogenesis led to the accumulation of VFAs. The concentrations of seven out of the nine analyzed VFAs were significantly higher in the digestate supplemented with MET than in the sample from the control

bioreactor. Amoxicillin and CIP were also potent inhibitors of anaerobic digestion of sewage sludge. The addition of AMO to the bioreactor significantly reduced the methane content of biogas (by approx. 44%), whereas the introduction of CIP decreased methane production (by approx. 40%, relative to the control bioreactor).

An analysis of DNA sequences in the samples from all bioreactors revealed that *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the dominant bacterial phyla in the digestate. In comparison with the control treatment, the greatest decrease in the number of *Bacteroidetes*-specific reads was noted in digestate samples exposed to MET. A significant increase in the proportions of *Firmicutes* and *Proteobacteria* (by 6% and 6.8% relative to the control treatment, respectively) was also observed in these samples. The exposure of the substrate to AMO and CIP significantly decreased the proportion of Syntrophobacteriales, which may point to the inhibition of acetogenesis.

Analyses involving qPCR demonstrated that the concentration of the *mcr*A gene in digestate samples exposed to MET, CEF and NA was lower than in the control treatment. However, it was found that the abundance of this functional gene does not fully reflect the actual efficiency of methane production in the presence of antimicrobials. The total concentration of genes specific to the families *Methanosarcinaceae* and *Methanosetaceae* decreased significantly (relative to the control treatment) in digestate samples exposed to MET, CEF and NA, which could suggest that methanogens are somewhat sensitive to these antimicrobials.

The presence of antibiotics affected the prevalence of the analyzed ARGs, leading to an increase in the copy numbers of genes encoding resistance to β-lactams, tetracyclines and fluoroquinolones. It was found, however, that the selective pressure exerted by antimicrobials was not specific to the corresponding ARGs. The correlation analysis revealed that genes encoding class 1 and 2 integrases play an important role in the transfer of ARGs during anaerobic digestion.

Stage II

The research described in stage I was continued, and another experiment was conducted to determine a long-term, simultaneous impact of antimicrobials on the efficiency of anaerobic digestion of sewage sludge. Three antibiotics, MET, AMO and CIP, which individually exerted the most significant effect on anaerobic digestion, including the microbiological aspects of the process, were analyzed. The results of this experiment were presented in a research article (**Appendix 3** to this dissertation), and the first three research hypotheses were verified.

In the second stage of the study, sewage sludge was inoculated with anaerobically digested sludge from a fermentation tank, collected in the same WWTP, and it was subjected to anaerobic digestion in semi-continuous flow digesters, under mesophilic conditions (37°C). The digesters were fed substrates containing a mixture of MET, AMO and CIP or sewage sludge not exposed to antibiotics (control). The experiments were performed in duplicate for each substrate. The study consisted of six experimental series that differed in the concentrations of antibiotics applied to the substrate. The initial concentration of each of the three antibiotics in the mixture dosed to sewage sludge during the first experimental series was similar to the concentrations of the respective drugs in the wastewater flowing into the WWTP from which the sludge was obtained. The concentrations of the antibiotics added to the digester were increased after doubling the hydraulic volume of each digester. Each of the experimental series lasted 45 days on average, and the entire study lasted 268 days. Throughout the study, methane production was measured (AMPTS II) every week, and biogas quality was analyzed in a gas chromatograph equipped with a thermal conductivity detector. The concentrations of VFAs in the collected samples were also determined at weekly intervals. Samples for DNA isolation and sequencing were collected from process bioreactors (containing substrate supplemented with antibiotics) at the beginning, in the middle and at the end of each experimental series, whereas one sample was collected from the control bioreactor during the first, fourth and last experimental series. Microbial biodiversity and prevalence of ARGs were determined using a sensitive molecular method of metagenomic sequencing (Illumina NovaSeq).

An analysis of methane production revealed that prolonged exposure to a combination of antimicrobials could influence microbial acclimation inside the bioreactor, thus contributing to the adaptation of microorganisms. Methane production in process and control bioreactors followed a similar trend, but its efficiency was significantly lower in the process bioreactor where the substrate was supplemented with a mixture of MET, AMO and CIP than in the control bioreactor. No significant differences in the concentrations of individual VFAs were found between sewage sludge samples collected from process and control bioreactors.

The sequencing analysis revealed significant differences in the structure of microbiota between samples of control and supplemented sewage sludge during the experiment. Exposure to increasing doses of the tested antibiotics induced changes in the structure of microbial populations. Bacteria of the phylum *Acidobacteria* were predominant in samples of anaerobically digested sewage sludge collected from both control and process bioreactors, but their abundance differed significantly between substrates exposed to antibiotics and the control

substrate. It was found that substrate exposure to AMO (36 µg/mL), CIP (16 µg/mL) and MET (16 µg/mL) significantly inhibited the growth of *Acidobacteria*. During the entire process, the prevalence of *Candidatus Cloacimonetes* and *Proteobacteria* was similar in control and antibiotic-supplemented substrates, whereas the abundance of operational taxonomic units (OTUs) characteristic of *Bacteroidetes* differed significantly between samples collected from process and control bioreactors. The high initial abundance of *Firmicutes* in the process bioreactor decreased under exposure to a mixture of the tested antibiotics.

Exposure to a mixture of the tested antibiotics significantly increased the abundance of OTUs characteristic of *Archaea* in the analyzed samples, but these changes did not affect the efficiency of biogas production. An analysis of the abundance of OTUs characteristic of methanogens supported the identification of four main orders of methanogens in substrate samples: *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* of the class *Methanomicrobia*, *Methanomassiliicoccales* of the class *Thermoplasmata*, and *Methanobacteriales* of the class *Methanobacteria*. Throughout the experiment, significant differences were observed in the abundance of *Methanosarcinales* and *Methanomassiliicoccales* in samples collected from both process and control bioreactors. The abundance of OTUs characteristic of these methanogens was bound by a significant negative correlation. It was concluded that dynamic changes in microbial communities and their adaptation to changing environmental conditions are essential for the stable operation of anaerobic digesters.

Substrate samples collected from both process and control bioreactors were characterized by a predominance of genes conferring resistance to multiple drugs and MLS antibiotics (>20 ppm). Tetracycline and bacitracin resistance genes were also abundant (5-15 ppm) in the analyzed samples. It was confirmed again that selective pressure exerted by antibiotics added to the substrate in process bioreactors did not specifically target genes encoding resistance to various classes of antimicrobials. Total ARG abundance decreased in both process and control digestates at the end of anaerobic digestion. However, it should be noted that the prevalence of multidrug resistance genes increased in samples of antibiotic-supplemented samples, whereas a reverse trend was observed in control samples. It should also be stressed that the transfer of multidrug resistance genes between bacteria poses a serious public health threat around the world.

Stage III

Although the metagenomic sequencing of samples collected in the previous stage of the study supported the identification of sequences characteristic of *Archaea*, their number was significantly lower than the number of Eubacteria-specific reads. Therefore, the last stage of research focused on expanding the existing knowledge on the effect exerted by long-term supplementation of sewage sludge with a mixture of antibiotics at increasing concentrations on methanogenic microorganisms.

The genetic material isolated in the second stage of the study was evaluated to determine the prevalence of genes characteristic of methanogens of the families *Methanosarcinaceae* (*MSC*) and *Methanosaetaceae* (*MST*), belonging to the order *Methanosarcinales*. The analyses were performed using the qPCR technique. The results of a preliminary study enabled to exclude a significant proportion of methanogenic families of other orders in the domain *Archaea* in anaerobically digested sludge. The activity of methanogenic microorganisms was assessed based on the concentration of the methyl-coenzyme M reductase gene (*mcr*A), which catalyzes the final step of anaerobic digestion - methanogenesis. The results of this experiment were presented in a research article (**Appendix 4** to this dissertation), and the fourth research hypothesis was verified.

A molecular analysis of the efficiency of anaerobic digestion, including the concentration of the functional *mcr*A gene, demonstrated that the concentration of this gene in substrate samples collected from process and control bioreactors varied throughout the entire experimental series. It was found that methane production was not correlated with the prevalence of the *mcr*A gene during long-term anaerobic digestion, regardless of exposure to antibiotics. It was confirmed again that changes in methane yields cannot be reliably measured based on the abundance of the *mcr*A gene despite the fact that this gene has been proposed by other researchers as a bioindicator for monitoring methanogen activity.

In both experimental and control substrate samples, the copy numbers of genes characteristic of *Methanosarcinaceae* remained stable during the experiment. The only exception was the last, sixth experimental series, where the abundance of *MSC* genes increased by two orders of magnitude in 1 gram of digestate. This points to a stable increase in *Methanosarcinaceae* counts during the anaerobic digestion of sewage sludge, regardless of antibiotic supplementation. In turn, highly significant ($P \leq 0.001$) differences were noted in the abundance of *MST* genes, characteristic of the family *Methanosaetaceae*, between antibiotic-

supplemented and control samples. It should be stressed that in the last experimental series, the abundance of *MST* genes was similar in experimental and control substrate samples, which suggests that microbial consortia adapted to the increasing concentrations of antibiotics. It was concluded that both methanogen families well adapted to the conditions in the process bioreactor, but irrespective of antibiotic exposure, *Methanosaetaceae* predominated in the digestate.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The results of the study provided new information on the impact of antimicrobials on anaerobic digestion, in both technological and microbiological contexts. The research objectives were achieved, and all hypotheses formulated in the doctoral dissertation were positively verified. It was found that:

(1) some antimicrobials, widely used in human medicine, may decrease the efficiency of anaerobic digestion of sewage sludge.

(2) the presence of antimicrobials during anaerobic digestion exerts a significant effect on ARG profiles. Exposure to MET induced the most significant changes in ARG concentrations, in particular through increasing the concentrations of genes encoding resistance to β-lactams, tetracyclines and fluoroquinolones, and decreasing the concentrations of genes encoding resistance to MLS antibiotics. The selective pressure exerted by antimicrobials was not specific to the corresponding ARGs. Moreover, the study highlighted the problem associated with ineffective elimination of ARGs during the anaerobic digestion of sewage sludge and threats posed by the spread of AR, which are very important considerations.

(3) the exposure of sewage sludge to antimicrobials during anaerobic digestion significantly affects the structure of microbial communities, including methanogens. The greatest changes in microbial diversity were induced by MET, which decreased the proportion of *Bacteroidetes*, and increased the abundance of OTUs characteristic of *Firmicutes* and *Proteobacteria*. *Methanosaetaceae* dominated among methanogenic microorganisms during supplementation with individual antibiotics and during simultaneous exposure to MET, AMO and CIP.

(4) the results of a quantitative analysis of genes specific to methanogenic microorganisms, such as the functional *mcr*A gene, do not fully reflect the parameters of anaerobic digestion, i.e. the actual efficiency of methane production in the presence of antimicrobials.

The conducted experiments revealed the need for further research to determine the effect of inhibitors, such as antibiotics, on the activity of microorganisms responsible for each stage of anaerobic digestion, which in the future will make it possible to ensure optimal conditions for their growth and development. Such research should involve the use of modern molecular techniques, including metagenomic sequencing.

Literatura

1. Holm-Nielsen J. B., Al Seadi T., Oleskowicz-Popiel P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. Bioresource Technology, 100, 22, 5478-84, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.046
2. Scarlat N., Dallemand J. F., Fahl, F. 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. Renewable Energy, 129, 457–472, https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006
3. Bowe S. 2013. Market development and certification schemes for biomethane. The Biogas Handbook: Science, Production and Applications, Woodhead Publishing, 444–462. https://doi.org/10.1533/9780857097415.3.444
4. World Biogas Association, 2019. Global Potential of Biogas. Dostęp online: http://www.worldbiogasassociation.org/ (25.05.2023)
5. Świątczak P., Cydzik-Kwiatkowska A., Rusanowska P. 2017. Microbiota of anaerobic digesters in a full-scale wastewater treatment plant. Archives of Environmental Protection, 43, 53–60, https://doi.org/10.1515/aep-2017-0033
6. Rusanowska P., Harnisz M., Zieliński M., Dębowski M., Korzeniewska E., Kisielewska M., Amenda E. 2019. Individual and Synergistic Effects of Metronidazole, Amoxicillin, and Ciprofloxacin on Methane Fermentation with Sewage Sludge. Clean Soil Air Water, 48, 1900281, https://doi.org/10.1002/clen.201900281
7. Meegoda J.N., Li B., Patel K., Wang L.B 2018. A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15, 2224, https://doi.org/10.3390/ijerph15102224
8. Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., Pant S., Gandra S., Levin S.A., Goossens H., Laxminarayan R. 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115, E3463–E3470, https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115
9. Grobelak A., Grosser A., Kacprzak M., Kamizela T. 2019. Sewage sludge processing and management in small and medium-sized municipal wastewater treatment plant-new technical solution. Journal of Environmental Management, 234, 90–96, https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.111
10. Czatzkowska M., Wolak I., Harnisz M., Korzeniewska E. 2022. Impact of Anthropogenic Activities on the Dissemination of ARGs in the Environment-A Review.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 7, 19, 12853, https://doi.org/10.3390/ijerph191912853

11. Manaia C. M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovides I. C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I., Nunes O. C. 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. Environment International, 115, 312-324, https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044
12. Becerra-Castro C., Lopes A. R., Vaz-Moreira I., Silva E. F., Manaia C. M,; Nunes O. C. 2015. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. Environment International 75, 117–135, https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.001
13. Xu Y.-B., Hou M.-Y., Li Y.-F. Huang L., Ruan J.-J., Zheng L., Qiao Q.-X., Du Q.-P., 2017. Distribution of tetracycline resistance genes and AmpC β-lactamase genes in representative non-urban sewage plants and correlations with treatment processes and heavy metals. Chemosphere 170, 274–281, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.02
14. Barancheshme F., Munir M. 2018. Development of Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants. In Antimicrobial Resistance—A Global Threat; IntechOpen: London, UK, 75–92, http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81538
15. Sun C., Li W., Chen Z., Qin W., Wen X. 2019. Responses of antibiotics, antibiotic resistance genes, and mobile genetic elements in sewage sludge to thermal hydrolysis pre-treatment and various anaerobic digestion conditions. Environmental International, 133, 105156, https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105156
16. Chen Y., Cheng J. J., Creamer K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review,. Bioresource Technology 99, 4044–4064, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057
17. Campo G., Cerutti A., Lastella C., Leo A., Panepinto D., Zanetti M., RuffinoB. 2021. Production and destination of sewage sludge in the piemonte region (Italy): The results of a survey for a future sustainable management, Int. J. Environ. Res. Public Health. 18 (2021). https://doi.org/10.3390/ijerph18073556
18. Xiao Y., Raheem A., Ding L., Chen W.-H., Chen X., Wang F., Lin S.-L. 2021. Pretreatment, modification and applications of sewage sludge-derived biochar for resource recovery—A review. Chemosphere 287, 131969, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131969

Źródła finansowania badań

1. Narodowe Centrum Nauki, grant nr 2016/23/B/NZ9/03669. „Wykorzystanie bioaugmentacji do intensyfikacji produkcji biogazu z substratów organicznych o wysokiej koncentracji antybiotyków”. Kierownik projektu: prof. dr hab. Monika Harnisz.

2. Grant Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” na lata 2019–2022. Projekt nr 010/RID/2018/19. „Innowacyjna żywność wysokiej jakości dla zdrowia społeczeństwa i zrównoważonego rozwoju – zintegrowany program rozwoju badań naukowych i innowacji w zakresie nauk rolniczych i nauk weterynaryjnych na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie”. Kierownik projektu: prof. dr hab. Małgorzata Darewicz.