

Mechaniczno-biologiczne oczyszczalnie ścieków stanowią istotne źródło bakterii antybiotykoopornych (ARB) oraz genów antybiotykooporności (ARGs), które przedostając się wraz ze ściekami odpływającymi do rzek mogą być dalej rozpowszechniane w środowisku. Wraz z bioaerozolem emitowanym podczas mieszania i napowietrzania ścieków w bioreaktorach z osadem czynnym może również dochodzić do transmisji genetycznych determinantów antybiotykooporności do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków, co stwarza potencjalne ryzyko zdrowotne oraz może wspierać rozprzestrzenianie antybiotykooporności za pośrednictwem horyzontalnego transferu genów. Celem pracy było określenie czy konwencjonalna oczyszczalnia ścieków przyczynia się do transmisji potencjalnie chorobotwórczych mikroorganizmów oraz genetycznych determinantów antybiotykooporności do środowiska wodnego oraz do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały podzielone na 4 etapy, w ramach których opublikowano łącznie 4 artykuły.

W pierwszym etapie badań skupiono się na analizie występowania genów warunkujących oporność na leki beta-laktamowe w wodzie rzecznej, osadzie ściekowym oraz w ściekach pozyskanych z kolejnych etapów oczyszczania ścieków pochodzących z dwóch oczyszczalni ścieków wykorzystujących technologię osadu czynnego. Próbkami badawczymi pobierano w dwóch sezonach badawczych (lato, jesień). W DNA wyizolowanym z próbek określono z wykorzystaniem standardowej łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) występowanie genów oporności na beta-laktamy (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}). Geny *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA} oraz *bla*_{SHV} zidentyfikowano we wszystkich analizowanych próbkach ścieków z oczyszczalni usytuowanej na terenie zalesionym. W oczyszczalni ścieków na terenie zurbanizowanym, w obu sezonach w próbkach ścieków zidentyfikowano geny *bla*_{TEM} oraz *bla*_{OXA}. Gen *bla*_{SHV} obecny był w ściekach pobieranych w sezonie jesiennym na wszystkich etapach oczyszczania, natomiast nie wykryto go w ściekach oczyszczonych pozyskanych w sezonie letnim. W obu sezonach w próbkach wody rzecznej przed zrzutem ścieków z oczyszczalni na terenie zalesionym zidentyfikowano geny *bla*_{TEM} oraz *bla*_{SHV}. W wodzie po zrzucie ścieków w sezonie letnim zaobserwowano występowanie genu *bla*_{OXA} oraz nie wykryto obecności genu *bla*_{SHV}. W sezonie jesiennym w wodzie rzecznej po zrzucie ścieków stwierdzono występowanie wszystkich analizowanych genów. W próbkach wody rzecznej przed zrzutem ścieków z oczyszczalni na terenie zurbanizowanym w sezonie jesiennym zidentyfikowano obecność wszystkich analizowanych genów, zaś w sezonie letnim nie zaobserwowano wyłącznie obecności genu *bla*_{SHV}. W wodzie po zrzucie ścieków oczyszczonych w obu sezonach

zidentyfikowano obecność genów *bla*_{TEM} oraz *bla*_{OXA}, zaś nie zidentyfikowano obecności genu *bla*_{SHV}. Zaobserwowane zależności mogą sugerować, iż procesy oczyszczania ścieków nie usuwają całkowicie genów antybiotykooporności ze ścieków, co może stwarzać ryzyko transmisji tych genów do środowiska wodnego.

Celem badań drugiego etapu była analiza występowania antybiotykoopornych oraz wirulentnych szczepów z rodzaju *Staphylococcus* w próbkach wody rzecznej, ścieków oraz wymazów z górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Do badań pobrano próbki wody rzecznej przed i po zrzucie ścieków, ścieki nieoczyszczone, ścieki z bioreaktora z osadem czynnym, ścieki oczyszczone, a także wymazy z nosa i gardła od pracowników oczyszczalni oraz od grupy kontrolnej. Próbkę pobierane były trzy razy w ciągu roku (zima, lato, jesień). Następnie, z próbek wyizolowano genomowe DNA i wykonano identyfikację genu nukleazy oraz genów antybiotykooporności. Próbkę posłużyły również do hodowli bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, w rezultacie czego uzyskano 249 szczepów bakteryjnych, u których z wykorzystaniem PCR analizowano występowanie genu nukleazy (*nuc*), genów wirulencji oraz genów antybiotykooporności. Spośród analizowanych szczepów z rodzaju *Staphylococcus* niemalże we wszystkich analizowanych próbkach co najmniej jeden szczep posiadał gen *nuc*. Spośród wszystkich analizowanych szczepów pochodzących ze ścieków, wody rzecznej oraz wymazów od grupy kontrolnej nie zidentyfikowano genu *mecA*, który warunkuje oporność na metycylinę. Gen ten obecny był u szczepów wyizolowanych z wymazów z górnych dróg oddechowych od pracowników oczyszczalni ścieków. Gen *vanA* odpowiedzialny za oporność na wankomycynę, w największym odsetku zidentyfikowano u szczepów ze ścieków z bioreaktora z osadem czynnym (49%). Spośród genów wirulencji w największej liczbie zidentyfikowano gen *hla* oraz *pvl* i *sasX*, zaś najrzadziej wykrywano *tst1* i *sec*. W kolejnej części badań w ramach tego etapu prac wykonano analizę pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy wszystkimi szczepami z rodzaju *Staphylococcus*. Wykonano dendrogramy na podstawie wzorców elektroforetycznych ERIC-PCR i rozpowszechnienia analizowanych genów, co miało na celu wykazać pokrewieństwo między szczepami ze ścieków oczyszczonych oraz wody rzecznej po zrzucie ścieków oraz między szczepami ze ścieków i wymazami od pracowników oczyszczalni ścieków. Zaobserwowano wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy szczepami ze ścieków z bioreaktora z osadem czynnym i szczepami izolowanymi od pracowników. Wyniki te mogą sugerować występowanie potencjalnej transmisji tych mikroorganizmów wraz z bioaerozolem emitowanym podczas napowietrzania i mieszania ścieków w bioreaktorach z osadem czynnym do górnych dróg oddechowych

pracowników oczyszczalni ścieków. W ostatniej części badań w ramach tego etapu prac, w celu zbadania koncentracji genów *nuc*, *mecA*, *vanA* and *qacA/B* wykonano analizę qPCR w DNA środowiskowym próbek. Gen *nuc* w największej koncentracji wykryto w ściekach nieoczyszczonych (7.76×10^3 to 5.87×10^4 gene copies/mL) oraz w ściekach z bioreaktora z osadem czynnym (2.72×10^3 to 1.82×10^4 gene copies/mL). Gen *mecA* zidentyfikowano w próbkach ścieków nieoczyszczonych w każdym z badanych sezonów w zakresie koncentracji od 3.05×10^2 do 2.68×10^3 gene copies/mL. Gen *vanA* zidentyfikowano w próbkach ścieków nieoczyszczonych we wszystkich sezonach badawczych (średnio 8.28×10^5 gene copies/mL), zaś *qacA/B* został wykryty we wszystkich próbkach z wyjątkiem próbek ścieków z bioreaktora z osadem czynnym (1.02×10^2 to 6.97×10^5 gene copies/mL). Wyniki badań wykazują, że oczyszczalnie ścieków są źródłem genów antybiotykooporności, zaś ścieki oczyszczone odpływające do rzeki mogą wpływać na ich rozprzestrzenianie w środowisku.

Badania przeprowadzone w etapie trzecim miały na celu określenie stopnia potencjalnej transmisji wybranych zanieczyszczeń wraz ze ściekami oczyszczonymi do wody rzecznej oraz wraz z bioaerozolem emitowanym podczas napowietrzania i mieszania ścieków do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Analizie poddano próbki wody rzecznej przed i po zrzucie ścieków, ścieki nieoczyszczone, ścieki z bioreaktora z osadem czynnym, ścieki oczyszczone, a także wymazy z nosa i gardła od pracowników oczyszczalni oraz od grupy kontrolnej. Próbkę pobierane były trzykrotnie w ciągu roku (zima, lato, jesień) ze względu na potencjalne różnice w spożyciu antybiotyków w różnych sezonach. W uzyskanym materiale genetycznym identyfikowano geny warunkujące antybiotykooporność, geny oporności na metale ciężkie oraz geny integrazy z wykorzystaniem metody qPCR. Ponadto, w próbkach zbadano koncentrację wybranych parametrów fizykochemicznych, metali ciężkich oraz antybiotyków popularnie stosowanych w lecznictwie. Wszystkie z 17 analizowanych ARGs wykryto w co najmniej jednej próbce ścieków lub wody rzecznej. W próbkach ścieków najwyższe stężenia osiągnęły geny odpowiedzialne za oporność na beta-laktamy oraz antybiotyki z grupy MLS. Zaobserwowano spadek koncentracji większości ARGs podczas kolejnych etapów oczyszczania ścieków. W próbkach wody rzecznej wykryto 13 spośród 17 badanych ARGs oraz zaobserwowano, że wszystkie ARGs w próbkach DRW występowały w stężeniach wyższych w porównaniu do ich stężeń występujących w URW. Spośród genów integrazy dominował gen *intI1*, natomiast w przypadku genów oporności na metale ciężkie zidentyfikowano wyłącznie gen *cnrA*. Kolejną częścią badań w ramach tego etapu było określenie relatywnych koncentracji (gene copies/16S rRNA copies) wybranych

pięciu genów antybiotykooporności – *bla*_{TEM}, *AmpC*, *sul1*, *ermF*, *mefA* oraz genu integrazy klasy pierwszej – *intI1* w DNA wyizolowanym z próbek wymazów od pracowników oczyszczalni ścieków oraz od osób z grupy kontrolnej nie związanych z WWTP. Stwierdzono, że większość analizowanych genów występuje w wyższych stężeniach w DNA z wymazów pobranych od personelu oczyszczalni niż od grupy kontrolnej. W próbkach wymazów z gardła dominowały geny *ermF* (2.62×10^{-2} – 7.45×10^{-3} gene copies/16S rRNA copies) oraz *mefA* (1.54×10^{-1} – 4.84×10^{-2} gene copies/16S rRNA copies), zaś w próbkach z wymazów z nosa dominowały geny *intI1* (5.81 – 7.72×10^{-1} gene copies/16S rRNA copies) oraz *sul1* (1.74 – 2.62×10^{-2} gene copies/16S rRNA copies). Wszystkie badane geny obecne w DNA z próbkach wymazów od pracowników oczyszczalni zidentyfikowano również w DNA pochodzącym ze ścieków z bioreaktora z osadem czynnym. Pracownicy mechaniczno-biologicznych oczyszczalni ścieków, w których występuje intensywna emisja bioaerozoli, są narażeni na ryzyko przeniesienia do górnych dróg oddechowych ARGs ze ścieków. Analiza współczynnika korelacji Spearman’a wykazała wiele statystycznie istotnych pozytywnych korelacji między koncentracją wybranych parametrów fizycznych, a stężeniem analizowanych ARGs. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że środowiskowe parametry fizykochemiczne mogą mieć wpływ na zmiany obecności i liczby ARGs w zbiornikach wodnych oraz na ich transmisję w środowisku. Istotne znaczenie ma głównie obecność pozostałości antybiotyków i produktów ich rozpadu (TPs). Stwierdzono, że próbki ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych zawierają 13 z 16 analizowanych antybiotyków, zaś najwyższymi stężeniami w próbkach ścieków nieoczyszczonych charakteryzowały się: trimetoprim (2.45–1643.74 ng/L), cyprofloksacyna (92.16–306.79 ng/L), klarytromycyna (69.30–401.79 ng/L), sulfametoksazol (118.82–160.27 ng/L) oraz doksyacylina (16.44–97.91 ng/L). Zaobserwowano, że próbki ścieków oczyszczonych zawierały wszystkie antybiotyki zidentyfikowane w ściekach nieoczyszczonych. W wodzie rzecznej poniżej punktu zrzutu ścieków stężenia większości analizowanych antybiotyków były wyższe niż w próbkach przed ich zrzutem. Skuteczność usuwania leków w procesie technologicznym była zróżnicowana w zależności od rodzaju antybiotyku i pory roku. W sezonie zimowym oraz letnim zaobserwowano całkowite usunięcie lewofloksacyny oraz wysoki stopień usunięcia sulfadiazyny (87.7–94%), sulfametoksazolu (81.8–84%) i cyprofloksacyny (79.6–82.6%). W próbkach ścieków nieoczyszczonych stężenia wszystkich metali ciężkich mieściły się w granicach dopuszczalnych przez obowiązujące w Polsce wytyczne (MEIN 2019), natomiast w ściekach z bioreaktora z osadem czynnym zawartość cynku (1.47–2.39 mg/L) w każdej z próbek przekroczyła wartości progowe (≤ 1 mg/L). Procesy oczyszczania ścieków stosowane w układzie technologicznym oczyszczalni

doprowadziły do dużego spadku zawartości HMs w ściekach oczyszczonych, co może być wynikiem ich kumulacji w osadach ściekowych usuwanych z oczyszczalni. W badaniach zaobserwowano statystycznie istotne pozytywne korelacje między koncentracjami genów integrazy trzech klas, a szeroką gamą ARGs, pomiędzy koncentracjami genu *cnrA* oraz 12 ARGs, a także między koncentracjami genów integrazy i stężeniem antybiotyków. Wykazano również pozytywne istotne statystycznie korelacje ($r = 0.60\text{--}0.96$) między koncentracją ARGs, a stężeniem metali ciężkich, spośród których wyróżniały się zawartość cynku oraz miedzi. Wyniki potwierdzają ważną rolę integronów w rozpowszechnianiu antybiotykooporności.

Celem przeprowadzonych badań w etapie czwartym było określenie: 1) czy w oczyszczalni ścieków wykorzystującej technologię osadu czynnego dochodzi do transmisji czynników antybiotykooporności wraz z bioaerozolem wytwarzanym podczas oczyszczania ścieków do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni, a także 2) czy wraz ze ściekami oczyszczonymi odpływającymi do rzeki mogą one przedostawać się do zbiorników wód powierzchniowych. Do badań pobrano próbki wody rzecznej, ścieków oraz wymazów od pracowników oczyszczalni ścieków, które poddano głębokiemu sekwencjonowaniu nowej generacji. W próbkach określano zawartość genów antybiotykooporności oraz mobilnych elementów genetycznych, a także skład taksonomiczny mikroorganizmów. Największe zróżnicowanie taksonomiczne zaobserwowano w próbkach ścieków nieoczyszczonych, a najmniejsze w próbkach ścieków oczyszczonych. Dominującymi gromadami bakteryjnymi były Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria oraz Bacteroidetes. Próbkę URW charakteryzowały się niższą bioróżnorodnością w porównaniu do próbek DRW. W wymazach od pracowników zaobserwowano podobny skład taksonomiczny mikroorganizmów, dominantami były głównie Firmicutes i Actinobacteria i Bacteroidetes. Względna obfitość ARGs wahała się od 2.88×10^{-5} kopii genów/16S rRNA do 1.27 kopii genów/16S rRNA w próbkach z UWW; od 1.3×10^{-4} kopii genów/16S rRNA do 9.0×10^{-2} kopii genów/16S rRNA w próbkach AS; i od 2.62×10^{-5} kopii genu/16S rRNA do 7.3×10^{-1} kopii genu/16S rRNA w próbkach TWW. Dominującymi typami ARGs były geny oporności wielolekowej, a następnie geny kodujące oporność na leki z grupy MLS, beta-laktamy oraz tetracykliny. Liczebność ARGs w próbkach wody wahała się od 1.84×10^{-5} kopii genów/16S rRNA do 2.244 kopii genów/16S rRNA w próbkach URW oraz od 9.98×10^{-6} do 1.83 kopii genów/16S rRNA w próbkach DRW. W próbkach wody najbardziej licznie występowały geny oporności wielolekowej, geny kodujące oporność na beta-laktamy, MLS oraz aminoglikozydy. Zaobserwowano większą różnorodność ARGs w próbach DRW w

porównaniu do URW. Koncentracja ARGs w wymazach z nosa wahała się od 3.96×10^{-5} gene copies/16S rRNA copies do 4.61×10^{-1} gene copies/16S rRNA copies, natomiast w wymazach z gardła od 1.38×10^{-5} gene copies/16S rRNA copies do 1.57×10^{-1} gene copies/16S rRNA. W wymazach z nosa dominowały geny oporności na leki MLS, aminoglikozydy oraz chloramfenikol, natomiast w gardle – geny oporności na beta-laktamy, tetracykliny i antybiotyki z grupy MLS. Zidentyfikowane rodziny sekwencji insercyjnych występowały w największej liczbie w ściekach nieoczyszczonych, a do najliczniej występujących zaliczono IS3, IS4 i IS21. W próbkach wody po zrzucie zaobserwowano większą liczebność IS niż w wodzie przed zrzutem ścieków, a najbardziej rozpowszechnionymi były IS3, IS4 oraz IS5. W wymazach z nosa i gardła zaobserwowano zbliżone wartości IS, dominowały zaś IS3, ISL3 i IS30. Analiza ARGs w kontekście transmisji determinantów antybiotykooporności oraz mikroorganizmów wraz ze ściekami do wody rzecznej wykazała, że względna liczebność prawie wszystkich badanych ARGs była wyższa w próbkach DRW w porównaniu do ich ilości w próbkach URW. Ponadto próbki DRW zawierały ARGs, które nie zostały wykryte w próbkach URW. W próbkach URW i DRW najliczniejszymi ARGs były *bacA*, *bcrA*, *emrE*, *mexD*, *aph(3'')-I*, *sul1*, *tetQ* oraz *ermF*. Zaobserwowano również, że 8 z 10 analizowanych rodzin IS występowało liczniej w próbkach DRW w porównaniu z URW. Analiza współczynnika korelacji, wykazała, że zidentyfikowane gromady bakterii skorelowane są ze stężeniami analizowanych ARGs oraz sekwencjami insercyjnymi. Analiza danych w kontekście transmisji mikroorganizmów oraz determinantów antybiotykooporności do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków wykazała, że część z ARGs zidentyfikowano w wymazach z nosogardzieli w koncentracji zbliżonej do ich koncentracji w próbkach ścieków. W wymazach z nosa dominowały *ermC*, *ermX*, *ant(2'')-I*, *sul1*, natomiast w gardle przewyższały *cfxA2*, *tetM*, *tetQ* oraz *ermB*. Zaobserwowano pozytywne istotne statystycznie korelacje między koncentracjami ARGs, a liczebnością gromad mikroorganizmów, które zidentyfikowano zarówno w wymazach od pracowników oraz w ściekach. W próbkach wymazów od pracowników oczyszczalni zidentyfikowano sekwencje insercyjne, które nie są charakterystyczne dla ludzkiego mikrobiomu, a zostały wykryte w próbkach ścieków nieoczyszczonych i z bioreaktora z osadem czynnym. Wyniki wskazują, że odprowadzanie ścieków zwiększa pulę genetycznych determinantów antybiotykooporności w wodach powierzchniowych, a także wskazują na niebezpieczeństwo ich transmisji do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Przeprowadzone badania wskazują, że wraz z emisją bioaerozoli podczas oczyszczania ścieków może dochodzić do transmisji antybiotykoopornych mikroorganizmów oraz determinantów antybiotykooporności do górnych

dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków, co może stanowić zagrożenie zdrowotne i epidemiologiczne. Badania podkreślają potrzebę wdrożenia środków ochronnych i zapobiegawczych dla pracowników oczyszczalni ścieków, a także opracowania i wdrożenia nowych technologii oczyszczania ścieków w celu zminimalizowania emisji bioaerozolu. Ponadto, badania wykazały, że wraz ze ściekami oczyszczonymi odpływającymi z oczyszczalni ścieków może dochodzić do odprowadzania do rzeki szerokiej gamy antybiotykoopornych oraz potencjalnie chorobotwórczych mikroorganizmów, determinantów antybiotykooporności oraz zanieczyszczeń chemicznych.