



Silesian University of Technology
Faculty of Energy and Environmental Engineering
Department of Environmental Biotechnology

The influence of chosen antibiotics on the anammox process

DOCTORAL THESIS

mgr inż. Filip Gamoń

Supervisor: dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, prof. PŚ

Assistant supervisor: dr inż. Grzegorz Cema

GLIWICE 2023

Streszczenie

Szerokie i niekontrolowane stosowanie antybiotyków w medycynie, weterynarii i hodowli zwierząt ma bezpośrednie odzwierciedlenie w ich występowaniu w środowisku, zwłaszcza wodnym. Szacuje się, że rocznie do środowiska trafia kilka tysięcy ton antybiotyków oraz produktów ich przemiany metabolicznej. Za główne źródło antybiotyków w wodach powierzchniowych i podziemnych uznaje się oczyszczalnie ścieków (ang. *wastewater treatment plants*, WWTPs). Obecność antybiotyków w ściekach wiąże się z rozwojem bakterii opornych na antybiotyki (ang. *antibiotic resistant bacteria*, ARB) i występowaniem genów oporności na antybiotyki (ang. *antibiotic resistance gens*, ARGs), które stanowią szczególne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt na całym świecie. Ponadto antybiotyki mają negatywny wpływ na proces biologicznego oczyszczania ścieków, takich jak na przykład nityfikacja i denityfikacja, powodując obniżenie aktywności metabolicznej mikroorganizmów prowadzących te procesy, czego efektem może być obniżenie efektywności oczyszczania ścieków. Jednym z takich procesów, który jest szczególnie wrażliwy na działanie antybiotyków jest anammox (ang. *anaerobic ammonium oxidation*). Anammox jest znany jako innowacyjna i bardziej ekonomiczna alternatywa dla konwencjonalnych metod biologicznego usuwania azotu ze ścieków (nityfikacji i denityfikacji). Jednakże bakterie prowadzące proces anammox są podatne na czynniki toksyczne występujące w ściekach (w tym antybiotyki), co może utrudniać wdrożenie procesu w skali technicznej.

Prezentowana praca doktorska obejmuje trzy publikacje opisujące interakcję pomiędzy trzema popularnymi antybiotykami (oksytetracyliną (OTC), cyprofloksacyną (CIP) i klarytromycyną (CLA)) a osadem czynnym anammox. Badania zostały poprzedzone szczegółową analizą literatury (**Publikacja 1**), która ujawniła kierunki badawcze, w których obecnie dostępna wiedza z zakresu działania antybiotyków na proces anammox była ograniczona. **Publikacja 1** ukazała w szczególności brak wystarczającej liczby badań na niskich stężeniach antybiotyków (występujących w ściekach) oraz brak badań nad antybiotykami, które powszechnie i w dużych ilościach występują w ściekach, jak cyprofloksacyna i klarytromycyna. Badania opisane w niniejszej pracy były prowadzone w sekwencyjnym reaktorze porcjowym (ang. *sequencing batch reactor*, SBR). W ramach pracy określono: (I) działanie śladowego stężenia antybiotyków ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) na wydajność procesu anammox, (II) efekt wzrastających stężeń antybiotyków ($0,001\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$) na proces

anammox, (III) zmian w strukturze zbiorowiska bakteryjnego anammox wywołanych działaniem antybiotyków, (IV) liczebność genów funkcyjnych (adaptatywnych) przemian azotowych w osadzie czynnym anammox, (V) efekt działania antybiotyków na właściwości mikroorganizmów i strukturę komórek bakterii anammox, (VI) mechanizmy obronne bakterii anammox przed działaniem antybiotyków w oparciu o produkcję zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (ang. *extracellular polymeric substances*, EPSs) i wymianę genów oporności na antybiotyki (ARGs).

Wyniki przedstawione w **Publikacji 2** wskazują, że krótkoterminowy wpływ antybiotyków w stężeniu $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ spowodował wzrost efektywności procesu anammox o około 7,1% podczas działania OTC, natomiast zarówno CIP, jak i CLA spowodowały spadek aktywności odpowiednio o 8,4% i 3,2%. Test długoterminowy nie wykazał istotnych zmian w efektywności procesu anammox, co może wynikać z ochronnego działania polimerów zewnątrzkomórkowych przed tak niskimi stężeniami antybiotyków. Niemniej jednak każdy z antybiotyków powodował zmiany w strukturze zbiorowiska bakteryjnego. Zaobserwowano spadek liczebności *Candidatus Brocadia*, natomiast liczebność bakterii *Nitrospira* (nityfikator II fazy) wzrosła o 1,68% (bioreaktor z dodatkiem OTC), 4,43% (bioreaktor z dodatkiem CIP), 3,08% (bioreaktor z dodatkiem CLA). Obecność bakterii *Nitrospira* może być związana z jej zdolnością do przeprowadzania całkowitej nityfikacji (comammox, ang. *complete ammonia oxidation*) w warunkach ograniczonego dostępu do tlenu. Zmiany w strukturze społeczności bakteryjnej odpowiadały zmianom w obfitości genów przemian azotowych, gdzie obfitość genu *hzo* zmniejszyła się, natomiast geny odpowiedzialne za nityfikację (*amoA* i *nxrA*) miały w całym okresie trwania eksperymentu wyższą liczebność niż gen *hzo*. Śladowe stężenie antybiotyków spowodowało również rozwój antybiotykooporności. Spośród 6 wykrytych genów determinujących oporność na badane antybiotyki (*tetX*, *tetC*, *tetW* - ARGs-OTC; *mphA* - ARGs-CLA; *qnrB4*, *qnrS* - ARGs-CIP) liczebność aż 4 wzrosła (*tetW*, *tetC*, *qnrB4*, *qnrS*). W Publikacji 3 odnotowano, że przy długim czasie ekspozycji antybiotyków na proces anammox jedynie stężenia antybiotyków powyżej 1 mg L^{-1} mają istotny wpływ na efektywność usuwania azotu ze ścieków. Dla badanych antybiotyków efektywność usuwania azotu zmniejszyła się o 27% (OTC), 30% (CIP) i 56% (CLA) na koniec eksperymentu, co wykazało, że CLA ma najbardziej niekorzystny wpływ na proces anammox. Analiza struktury społeczności bakterii anammox i genów przemian związków azotowych wykazała rozwój bakterii należących do typu *Planctomycetes* (w tym bakterii anammox) pod wpływem każdego z antybiotyków, podczas gdy większość tych bakterii nie była zdolna do prowadzenia procesu anammox. Podobnie jak

w badaniach przedstawionych w **Publikacji 2**, liczebność bakterii z rodzaju *Nitrospira* wzrastała wraz ze wzrostem stężenia antybiotyków. W czasie trwania eksperymentu zaobserwowano rozwój oporności na antybiotyki, gdzie liczebność poszczególnych ARGs determinujących oporność na badane antybiotyki była wyższa od poziomu na początku eksperymentu. Dodatkowo, analiza zależności pomiędzy dominującymi gatunkami a ARGs i genami funkcyjnymi wskazała znaczącą rolę Candidatus *Jettenia* w transferze oporności na CLA.

Podsumowując, w prezentowanej rozprawie udowodniono, że antybiotyki w stężeniach takich, jakie występują w ściekach (0.001 mg L^{-1}), nie wpływają na efektywność procesu anammox. Powodują natomiast zmiany w strukturze zbiorowiska bakterii osadu czynnego oraz powodują rozwój antybiotykooporności na badane antybiotyki. Co więcej, dopiero wyższe stężenia antybiotyków (powyżej kilku mg L^{-1}) powodują znaczne obniżenie efektywności procesu anammox oraz powodują zmiany w strukturze komórek bakterii anammox. Dodatkowo, wykazano, że bakterie żyjące w zbiorowisku osadu czynnego anammox są w stanie ochronić się przed działaniem antybiotyków poprzez produkcję EPSs i transfer ARGs. Udowodniono, że Candidatus *Jettenia* uczestniczy w transferze ARGs determinujących oporność CLA.