

Ścieki oczyszczane przez obiekty komunalne pracujące w technologii oczyszczania osadem czynnym są środowiskiem, w którym występuje ogromna różnorodność mikrobiologiczna. Obok saprotroficznych bakterii biorących udział w oczyszczaniu ścieków znajdują się również bakterie potencjalnie chorobotwórcze i chorobotwórcze, które przedostają się do tych obiektów wraz ze ściekami. Ponadto, w związku z występowaniem w ściekach antybiotyków dochodzi do wzmożonej selekcji bakterii opornych na działanie tych środków przeciwdrobnoustrojowych. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki kodowane są przez geny oporności, które w odpowiednich warunkach mogą być przekazywane z jednej bakterii do drugiej. Beztlenowe bakterie z grupy *Bacteroides fragilis* (BFG) należą do potencjalnych patogenów człowieka i charakteryzują się powszechną opornością na wiele grup antybiotyków stosowanych w terapiach antybiotykowych.

W pracy określono wpływ oczyszczania ścieków w technologii osadu czynnego na lekooporność bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* i ich rozprzestrzenianie w środowisku.

Z podłoża *Bacteroides* Bile Esculin Agar wyizolowano łącznie 319 szczepów o charakterystycznym wyglądzie kolonii, z których 250 wykazywało charakterystyczną dla tych drobnoustrojów oporność na kanamycynę, kolistynę i wankomycynę. Reakcja PCR wykazała, że tylko 135 z badanych szczepów posiadało specyficzny dla BFG gen *bfr*. Natomiast w wyniku identyfikacji za pomocą MALDI-TOF MS tylko 123 izolaty zostały ostatecznie zidentyfikowane do gatunku lub grupy BFG. Najczęściej izolowanymi gatunkami były *Parabacteroides distasonis* (51,22% szczepów) oraz *B. fragilis* (30,01%). Wśród badanych szczepów BFG odnotowano wysoki odsetek izolatów opornych na wiele antybiotyków stosowanych w leczeniu, w tym cyprofloksacynę (97,56% szczepów), erytromycynę (44,71% szczepów), ampicylinę (35,77% szczepów) czy też tetracyklinę (32,52% szczepów). Największą antybiotykoopornością cechowały się szczepy izolowane ze ścieków z oczyszczalni. Badania wykazały powszechną obecność genów kodujących oporność na tetracykliny (97,78% wszystkich szczepów opornych fenotypowo na tetracykliny), makrolidy, linkozamidy i streptograminy (81,97% wszystkich szczepów opornych fenotypowo na erytromycynę) oraz chloramfenikol (100% wszystkich szczepów opornych fenotypowo na chloramfenikol). Geny kodujące oporność na  $\beta$ -laktamy i fluorochinolony były mniej rozpowszechnione wśród badanych izolatów. Szczepy BFG wyizolowane z próbek ścieków pochodzących z oczyszczalni charakteryzowały się największą różnorodnością genów oporności na antybiotyki.

W próbkach ścieków, pobranych z 12 oczyszczalni ścieków, zidentyfikowano cztery dominujące gromady bakterii: *Proteobacteria* (20,4-53,4%), *Firmicutes* (16,1-47,6%),

*Actinobacteria* (4,1-40,8%) oraz *Bacteroidetes* (2,4-15,7%). Klasa *Bacteroidia* stanowiła od <1,0% do 8,2% wszystkich bakterii oznaczonych w badanych próbkach ścieków pochodzących z oczyszczalni. Udział klasy *Bacteroidia* w populacji bakterii ściekowych w próbkach ścieków dopływających i odpływających z oczyszczalni był na podobnym poziomie, co świadczy o ich zdolności do przetrwania procesu oczyszczania ścieków z wykorzystaniem technologii z udziałem osady czynnego.

Średnie koncentracje genów *bfr* oraz markera HF183/BacR287 (specyficznego dla odludzkiego szczepu BFG) były na zbliżonym poziomie i wahały się od  $10^6$  kopii w 1 ml ścieków dopływających do  $10^4$  kopii w 1 ml ścieków odpływających z oczyszczalni. Liczba kopii genów specyficznych dla BFG oraz *E. coli* i *E. faecalis* w badanych próbkach, zwłaszcza ścieków pochodzących z olsztyńskiej oczyszczalni oraz wody rzeki Łyny, były na zbliżonym poziomie. W próbkach ścieków pobranych z 12 badanych oczyszczalni oraz wody rzeki Łyny najwyższą koncentracją charakteryzowały się geny kodujące oporność na tetracykliny, beta-laktamy oraz antybiotyki z grupy MLS (makrolidy, linkozamidy i streptograminy). Zaobserwowano wysoką korelację obfitości genów specyficznych dla BFG względem genów charakterystycznych dla *E. coli* i *E. faecalis* oraz wszystkich badanych genów antybiotykooporności i genów kodujących integrazy. Uzyskane wyniki dowodzą użyteczności genów specyficznych dla BFG nie tylko w badaniach występowania antropogenicznego fekalnego zanieczyszczenia, ale również jako wskaźnika zanieczyszczenia środowiska genami kodującymi antybiotykooporność u drobnoustrojów.

Dwie spośród 12 analizowanych oczyszczalni ścieków, wykazywały wysoką zdolność redukcji (efektywność > 93%) wszystkich badanych genów kodujących lekooporność. Oczyszczalnie te pracowały w systemie podwyższonego usuwania biogenów a wiek osadu i hydrauliczny czas zatrzymania ścieków w bioreaktorze był stosunkowo krótki. Z drugiej strony, w ściekach oczyszczonych, pobranych z oczyszczalni charakteryzującej się najdłuższym wiekiem osadu, wykazano wzrost obfitości niemal wszystkich badanych genów w ściekach po procesie oczyszczania.

Analiza wpływu oczyszczalni na zanieczyszczenie odbiornika ścieków oczyszczonych wykazała istotny wzrost liczby kopii genów specyficznych dla BFG, *E. coli* oraz 7 z 11 genów antybiotykooporności w próbkach wody rzecznej pobranej za punktem zrzutu ścieków oczyszczonych, co potwierdza udział oczyszczalni w zanieczyszczeniu wody rzecznej tymi genami.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania poszerzają wiedzę na temat wpływu oczyszczalni ścieków pracujących w technologii osadu czynnego na występowanie

oraz lekooporność bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* i ich transmisję do środowiska. Wskazują one także na możliwość zastosowania genów specyficznych dla tej grupy bakterii w ocenie antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska wodnego.