
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Analiza reziduurilor de antibiotice și a antibiorezistenței unor tulpini de *Escherichia coli* în trei stații de epurare a apelor uzate din România

Doctorand **Laviță Svetlana Iuliana (căs. Polianciuc)**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	2
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	2
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	4
1. Obiectivele cercetării	4
2. Metodologia generală de prelevare	5
3. Studiul 1. Dinamica sezonieră, eficiența de eliminare și evaluarea riscului de mediu al antibioticelor în stațiile de epurare a apelor uzate	5
3.1 Obiectivele studiului	5
3.2 Materiale și metode	6
3.3 Rezultate și discuții	6
3.4 Concluzii	7
4. Studiul 2. Variații sezoniere ale încărcăturilor bacteriene și susceptibilității la antibiotice în stațiile de epurare a apelor uzate	7
4.1 Obiectivele studiului	7
4.2 Materiale și metode	7
4.3 Rezultate și discuții	7
4.4 Concluzii	8
5. Studiul 3. Prevalența și caracterizarea <i>Escherichia coli</i> rezistentă la antibiotice din stațiile de epurare a apelor uzate	8
5.1 Obiectivele studiului	8
5.2 Materiale și metode	8
5.3 Rezultate și discuții	8
5.4 Concluzii	9
6. Concluzii generale	9
7. Originalitatea și contribuțiile inovatoare	10

Cuvinte cheie: antibiotice, rezistență la antibiotice, stații de epurare a apelor uzate, încărcături bacteriene, *Escherichia coli*, evaluarea riscului de mediu, gene rezistente la antibiotice, sănătate publică, variații sezoniere, eficiență de eliminare

INTRODUCERE

Rezistența antimicrobiană (RAM) reprezintă o amenințare globală pentru sănătatea publică, punând în pericol eficacitatea antibioticelor existente. Stațiile de epurare a apelor uzate sunt considerate potențiale rezervoare și puncte de diseminare pentru reziduuri de antibiotice, bacterii și gene rezistente la antibiotice.

Această teză de doctorat este structurată în trei studii principale:

1. Analiza dinamicii sezoniere, a eficienței de eliminare și evaluarea riscului de mediu al antibioticelor în trei stații de epurare din regiunea central-vestică a României.

2. Investigarea variațiilor sezoniere ale încărcăturilor bacteriene și susceptibilității la antibiotice

3. Examinarea prevalenței și caracterizarea *Escherichia coli* rezistentă la antibiotice în stațiile de epurare

Cercetarea este deosebit de relevantă în contextul specific al României, care se confruntă cu două provocări majore în domeniul sănătății publice și al mediului. În primul rând, țara înregistrează una dintre cele mai ridicate rate de consum de antibiotice din Europa, ceea ce ridică îngrijorări serioase privind dezvoltarea rezistenței la antibiotice. În al doilea rând, România se confruntă cu deficiențe importante în tratarea apelor uzate, având un nivel de conformitate cu reglementările Directivei UE de doar 12%, mult sub media europeană. Această situație subliniază nevoia abordării problemei contaminării mediului cu reziduuri farmaceutice și necesitatea unor soluții pentru protejarea sănătății publice și a ecosistemelor acvatice.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Descoperirea antibioticelor la începutul secolului XX a revoluționat medicina modernă, reducând semnificativ mortalitatea și morbiditatea cauzate de infecțiile bacteriene, anterior considerate principalele cauze de deces¹. Pandemia de COVID-19 a influențat modul de utilizare a antibioticelor, cu un declin inițial, urmat de o revenire la nivelurile pre-pandemice sau chiar mai mari în unele țări. România a fost raportată ca având una dintre cele mai mari rate de consum de antibiotice din Europa în 2021-2022, cu 25,9 doze zilnice definite la 1.000 de locuitori pe zi². Această rată ridicată de consum este atribuită factorilor precum accesul ușor la antibiotice fără prescripție și barierele socio-economice^{3,4}.

Impactul reziduurilor de antibiotice asupra mediului și sănătății publice relevă o serie de aspecte critice. Există dovezi substanțiale că reziduurile de antibiotice, chiar și la concentrații scăzute, pot favoriza dezvoltarea rezistenței la bacteriile din mediu. Această rezistență poate fi ulterior transferată la specii asociate cu infecțiile umane, reprezentând un risc semnificativ pentru sănătatea publică⁵⁻⁷. Pentru produsele farmaceutice autorizate înainte de 2006, ghidurile actuale prevăd necesitatea unei evaluări a riscului de mediu (ERA) în cazul modificărilor semnificative ale utilizării sau al apariției de noi dovezi științifice privind potențialele pericole pentru mediu⁸. Această abordare asigură o reevaluare a siguranței

produselor farmaceutice mai vechi atunci când circumstanțele o impun. Totuși, anumite antibiotice, precum ciprofloxacina, claritromicina și nu numai sunt considerate deosebit de problematice din perspectiva mediului datorită: persistenței lor în mediu și rezistenței la procesele de tratare a apelor uzate, potențialului de bioacumulare în țesuturile organismelor, ecotoxicității semnificative chiar și la concentrații foarte scăzute (valori PNEC reduse)⁹. De asemenea, antibioticele pot perturba ecosistemele acvatice, afectând bacteriile, algele și nevertebratele. Ele promovează dezvoltarea bacteriilor rezistente la antibiotice și perturbă comunitățile microbiene esențiale pentru funcțiile ecosistemului¹⁰.

Studiile recente la nivel european dar și global, evidențiază necesitatea de a consolida reglementările existente^{10,11}, precum și de a îmbunătăți sistemele de colectare a datelor, aspect deosebit de relevant în contextul României, unde informațiile din acest domeniu sunt adesea insuficiente sau chiar absente, creând astfel o lacună în înțelegerea și gestionarea eficientă a problemei reziduurilor de antibiotice în mediul înconjurător.

Totodată, stadiul actual al cunoașterii evidențiază rolul esențial al stațiilor de epurare a apelor uzate în răspândirea rezistenței la antibiotice, cu accent pe *Escherichia coli* ca organism indicator, datorită prevalenței sale în apele uzate și capacității sale de a dobândi și răspândi gene de rezistență¹²⁻¹⁵. În România, tulpinile de *E. coli* multi-rezistente (MDR) sunt prevalente, în special în mediile de ape uzate, făcându-le un potențial model pentru urmărirea tendințelor RAM¹⁶⁻¹⁸. Studiile au arătat niveluri ridicate de rezistență în *E. coli* izolată din apele uzate, cu 85,11% din izolatele din apele uzate spitalicești și 68,09% din apele uzate comunitare fiind multi-rezistente¹⁷. Prezența reziduurilor de antibiotice și a altor poluanți în aceste medii exercită o presiune selectivă asupra populațiilor bacteriene, favorizând proliferarea tulpinilor rezistente. Transferul genelor de rezistență între diverse populații bacteriene este intensificat în stațiile de epurare datorită densității și diversității ridicate a microorganismelor prezente.

Tratamentele convenționale ale stațiilor de epurare a apelor uzate sunt adesea ineficiente în eliminarea completă a antibioticelor dar și a altor determinanți ai rezistenței bacteriene, ceea ce duce la eliberarea lor în mediu, ecosistemele acvatice și răspândirea rezistenței¹⁹. Eficacitatea stațiilor de epurare în eliminarea antibioticelor este variabilă, unele metode fiind mai eficiente decât altele. Spre exemplu, metodele de tratare avansate: filtrarea cu membrane, iradierea UV și ozonizarea, sunt promițătoare în vederea eliminării reziduurilor de antibiotice și genelor de rezistență^{20,21}.

Supravegherea apelor uzate poate reprezenta o metodă eficientă pentru monitorizarea și predicția tendințelor de rezistență la antibiotice la nivel comunitar²². Cercetările au demonstrat că profilurile de rezistență ale *E. coli* în apele uzate reflectă îndeaproape modelele observate clinic în populație, oferind astfel un indicator fiabil al utilizării și abuzului de antibiotice în comunitate^{12,23}.

Tehnicile analitice și moleculare, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă (HPLC-MS) și reacția în lanț a polimerazei (PCR), sunt esențiale pentru cuantificarea reziduurilor de antibiotice și detectarea genelor de rezistență în probele de mediu^{24,25}. Aceste metode sunt

utilizate pe scară largă datorită sensibilității și specificității lor ridicate și sunt necesare în înțelegerea persistenței antibioticelor în apele uzate și a riscului potențial reprezentat de prezența lor în efluentul tratat. Cu toate acestea, analiza reziduurilor de antibiotice în astfel de matrici complexe prezintă provocări precum efectul de matrice și necesitatea unor tehnici eficiente de preparare a probelor.

Pentru identificarea și caracterizarea bacteriilor și genelor rezistente la antibiotice, pe lângă metodele convenționale bazate pe cultură care oferă informații privind viabilitatea și fenotipul bacteriilor, tehnicile moleculare precum PCR și PCR cantitativ (qPCR) sunt instrumente importante pentru detectarea genelor de rezistență specifice.

Prezența bacteriilor rezistente la antibiotice în efluențele apelor uzate este identificată ca o potențială amenințare pentru sănătatea publică, deoarece aceste bacterii pot intra în lanțul alimentar uman sau în aprovizionarea cu apă²⁶. De asemenea, impactul economic al rezistenței la antibiotice, inclusiv creșterea costurilor de îngrijire medicală din cauza spitalizărilor mai lungi, tratamentelor mai costisitoare și ratelor de mortalitate mai ridicate, pledează pentru o abordare One Health în combaterea rezistenței la antibiotice, recunoscând interconexiunea dintre sănătatea umană, animală și a mediului ²⁷.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiectivele cercetării

Obiectivele principale ale cercetării au fost concepute pentru a susține scopul general de investigare a prezenței reziduurilor de antibiotice și a prevalenței izolatelor de *E. coli* și a genelor asociate în stațiile de epurare. Cercetarea a utilizat o abordare care combină tehnici analitice și moleculare, microbiologie și evaluarea riscului de mediu pentru a atinge următoarele obiective:

- Evaluarea prezenței și variației sezoniere a antibioticelor țintă (amoxicilină, piperacilină, ciprofloxacina, norfloxacina, azitromicina, claritromicina și doxiciclina) în influenții și efluenții stațiilor de epurare
- Evaluarea eficienței de eliminare a acestor antibiotice în diferite sezoane și stații de epurare și a factorilor care influențează concentrațiile de antibiotice și ratele de eliminare
- Realizarea unei evaluări a riscului de mediu al reziduurilor de antibiotice detectate în efluenții stațiilor de epurare
- Caracterizarea încărcăturilor bacteriene și a profilului de rezistență din apele uzate și evaluarea eficienței de eliminare a acestora
- Determinarea prevalenței *E. coli* în probele de ape uzate și caracterizarea profilului de rezistență antimicrobiană
- Identificarea și analizarea genelor specifice de rezistență la antibiotice în tulpinile de *E. coli* izolate

2. Metodologia generală de prelevare

Metodologia cercetării s-a bazat pe analiza a trei stații de epurare a apelor uzate din România, utilizând un eșantion de 24 de probe (12 de influent, 12 de efluent) colectate pe parcursul a patru sezoane (2021-2022) și 24 de probe colectate pe parcursul a două sezoane în 2023.

Stațiile de epurare a apelor uzate selectate pentru această cercetare sunt situate în regiunea Central-Vest a României, o regiune caracterizată printr-un amestec de zone urbane și rurale și care oferă un cadru adecvat analizei variabilității prezenței antibioticelor, bacteriilor și genelor de rezistență, influențate de factori precum clima (temperatura, precipitațiile), densitatea populației, infrastructurile spitalicești și industria locală. Această selecție geografică a fost strategică, deoarece toate cele trei stații își deversează efluențele în același râu, ceea ce permite o analiză comparativă între acestea care diferă în dimensiune, capacitate de tratare și tipurile de influenți pe care le procesează. Stația de epurare A procesează aproximativ 115.000 de metri cubi de ape uzate pe zi și deservește o populație de aproximativ 300.000 de locuitori. Stațiile de epurare B și C tratează aproximativ 4.772 și respectiv 5.673 de metri cubi pe zi, deservește populații mai mici.

Prima campanie de prelevare a fost efectuată pe parcursul a patru sezoane, din toamna anului 2021 până în vara anului 2022. Aceasta a stat la baza studiilor 1 și 2 ale cercetării. Iar cea de-a doua campanie de prelevare desfășurată în primăvara și vara anului 2023 a reprezentat studiul 3 al cercetării. Probele de ape uzate au fost colectate utilizând prelevatoare automate pe perioade de 24 de ore. Acestea au fost colectate atât din punctele de influent, cât și din cele de efluent ale fiecărei stații de epurare.

Deși metodologia oferă o perspectivă cuprinzătoare, cercetarea prezintă limitări inerente, inclusiv potențiala subestimare a vârfurilor de contaminare pe termen scurt și posibilă nereprezentativitate a întregii diversități a stațiilor de tratare din România. Aceste aspecte subliniază necesitatea interpretării rezultatelor în contextul specific al stațiilor de epurare studiate și sugerează oportunități pentru studii viitoare cu o eșantionare mai frecventă și puncte de prelevare suplimentare pentru o înțelegere mai nuanțată a dinamicii reziduurilor de antibiotice și a bacteriilor rezistente în sistemele de tratare a apelor uzate.

3. Studiul 1. Dinamica sezonieră, eficiența de eliminare și evaluarea riscului de mediu al antibioticelor în stațiile de epurare a apelor uzate

3.1 Obiectivele studiului

- Evaluarea prezenței și variației sezoniere a șapte antibiotice selectate în influenții și efluenții a trei stații de epurare a apelor uzate din regiunea Central-Vestică a României.
- Analiza eficienței de eliminare a antibioticelor în diferite sezoane și stații de epurare.
- Evaluarea riscului de mediu asociat cu prezența reziduurilor de antibiotice în efluenții stațiilor de epurare.

- Investigarea factorilor de influență asupra concentrațiilor de antibiotice în apele uzate.

3.2 Materiale și metode

Pentru atingerea obiectivelor, s-a aplicat o metodologie complexă care a implicat colectarea de probe compozite pe 24 de ore, analizate prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (HPLC-MS). Procesul analitic a inclus extracția în fază solidă, validarea metodei prin determinarea limitelor de detecție și cuantificare, și analiza statistică utilizând teste descriptive, non-parametrice și modele de regresie. S-a efectuat o evaluare a riscului de mediu utilizând coeficienți de risc (RQ) bazați pe concentrațiile măsurate și valorile PNEC (concentrația predictibilă fără efect). Studiul a luat în considerare și factori de influență precum temperatura, precipitațiile și parametri fizico-chimici ai apelor uzate, oferind o perspectivă cuprinzătoare asupra dinamicii antibioticelor în sistemele de tratare a apelor uzate și a potențialelor riscuri ecologice asociate ²⁸.

3.3 Rezultate și discuții

Rezultatele studiului au evidențiat variații semnificative ale concentrațiilor de antibiotice în influenții și efluenții stațiilor de epurare a apelor uzate, cu diferențe notabile între sezoane și tipurile de antibiotice. Amoxicilina a prezentat cea mai mare variabilitate, cu concentrații mediane Q3 atingând 22,16 $\mu\text{g/mL}$ în primăvara și vara anului 2022, deși diferența medie între influent și efluent (7,11 $\mu\text{g/mL}$) nu a atins pragul de semnificație statistică. S-au observat, de asemenea, fluctuații semnificative pentru piperacilină și norfloxacină, în timp ce azitromicina și ciprofloxacina au prezentat concentrații constant scăzute, dar cu variabilitate ridicată în anumite sezoane.

Eficiența de eliminare a antibioticelor a variat considerabil între stații și sezoane, cu rate cuprinse între 3% și -315%. S-au observat rate de eliminare negative pentru unele antibiotice în anumite condiții, sugerând posibilitatea transformării metabolizilor conjugați înapoi în compuși parentali pe parcursul procesului de tratare, eliberare din biofilme și/sau desorbția acestora de pe materia particulată, ceea ce ar putea duce la o creștere a concentrației lor în efluent.

Analiza factorilor de influență a relevat asocieri potențiale între concentrațiile de antibiotice și factorii de mediu, în special pentru amoxicilină și doxiciclină. Temperatura și precipitațiile au avut un impact semnificativ, alături de pH-ul și alți parametri fizico-chimici ai apelor uzate. Temperatura a apărut ca un factor semnificativ care afectează concentrațiile de antibiotice și ratele de eliminare, în special pentru amoxicilină și doxiciclină. În ceea ce privește precipitațiile, efectul asupra concentrațiilor de antibiotice, în special pentru amoxicilină și doxiciclină, a fost mai puțin pronunțat decât cel al temperaturii. Această diferență poate fi explicată prin factori concurenți. Pe de o parte, precipitațiile pot duce la o diluare a concentrațiilor de antibiotice în apele uzate. Pe de altă parte, ele pot crește aportul de antibiotice din surse agricole prin intensificarea scurgerilor de suprafață. Acești factori opuși pot conduce la efecte variabile ale precipitațiilor asupra concentrațiilor de antibiotice în apele uzate, explicând astfel impactul lor mai puțin clar comparativ cu temperatura.

Evaluarea riscului de mediu a relevat că toate antibioticele vizate au prezentat coeficienți de risc ridicați ($RQ > 1$) la un moment dat în timpul perioadei de studiu, indicând riscuri ecologice.

3.4 Concluzii

Studiul subliniază complexitatea dinamicii antibioticelor în sistemele de tratare a apelor uzate și importanța considerării factorilor sezonieri și operaționali în evaluarea și gestionarea riscurilor asociate cu prezența reziduurilor de antibiotice în mediul acvatic.

4. Studiul 2. Variații sezoniere ale încărcăturilor bacteriene și susceptibilității la antibiotice în stațiile de epurare a apelor uzate

4.1 Obiectivele studiului

Studiul a examinat trei stații de epurare a apelor uzate, concentrându-se pe variațiile sezoniere ale încărcăturilor bacteriene și tiparele de rezistență la antibiotice.

Obiectivele principale au fost evaluarea variațiilor sezoniere ale încărcăturilor bacteriene în influenți și efluenți, precum și analizarea eficacității stațiilor în reducerea încărcăturilor bacteriene și a rezistenței la antibiotice.

4.2 Materiale și metode

Metodologia a implicat utilizarea tehnicii unităților formatoare de colonii (UFC) pentru evaluarea încărcăturilor bacteriene, izolarea și caracterizarea bacteriilor prin colorație Gram, testarea susceptibilității la antibiotice prin metoda difuzimetrică și analiza morfologică prin microscopie electronică de baleiaj (SEM). Cele șapte antibiotice detectate în cadrul primului studiu al tezei au fost selectate pentru testarea susceptibilității, iar interpretarea rezultatelor s-a realizat conform ghidurilor EUCAST. Această abordare a permis o analiză detaliată a variațiilor sezoniere în încărcăturile bacteriene și a profilurilor de rezistență la antibiotice în stațiile de epurare studiate ²⁸.

4.3 Rezultate și discuții

Studiul a relevat variații sezoniere semnificative ale încărcăturilor bacteriene în stațiile de epurare a apelor uzate, cu valori maxime înregistrate în perioada de primăvară, atingând 9,230 log UFC/mL în influentul stației B. S-a observat o eficiență variabilă în reducerea încărcăturii bacteriene, stația de epurare A demonstrând cea mai consistentă performanță, cu o reducere de până la 99,31% în primăvară.

Analiza microscopică a evidențiat predominanța bacteriilor Gram-negative, în special în sezoanele calde. Microscopia electronică de baleiaj a relevat formarea de biofilme în unele probe de efluent, sugerând potențialul de protecție împotriva agenților antimicrobieni și facilitarea transferului orizontal de gene.

Testarea susceptibilității la antibiotice a indicat profiluri de rezistență variate, cu o rezistență mai pronunțată în lunile de primăvară și vară, în special la amoxicilină și claritromicină. S-a observat prezența tulpinilor multi-rezistente, mai

ales în sezoanele calde, indicând un potențial efect sezonier asupra dezvoltării și răspândirii rezistenței la antibiotice în stațiile de epurare.

4.4 Concluzii

Studiul oferă o analiză preliminară a variațiilor sezoniere ale încărcăturilor bacteriene și a susceptibilității la antibiotice în trei stații de epurare a apelor uzate. Încărcăturile bacteriene mai mari și rezistența crescută la antibiotice în lunile mai calde sugerează necesitatea unor procese de tratare îmbunătățite în aceste perioade. Eficiența variabilă a reducerii încărcăturii bacteriene între stațiile de epurare evidențiază importanța optimizării proceselor de tratare în diferite facilități.

5. Studiul 3. Prevalența și caracterizarea *Escherichia coli* rezistentă la antibiotice din stațiile de epurare a apelor uzate

5.1 Obiectivele studiului

Studiul s-a concentrat pe izolarea și caracterizarea *E. coli* din probele de ape uzate, urmărind:

- Determinarea prevalenței *E. coli* în probele de ape uzate din trei stații de epurare diferite din România.
- Caracterizarea profilurilor de rezistență antimicrobiană ale tulpinilor de *E. coli* izolate.
- Identificarea și analiza prezenței genelor specifice de rezistență la antibiotice în tulpinile de *E. coli* izolate

5.2 Materiale și metode

Metodologia studiului a cuprins colectarea probelor de ape uzate în sezoanele de primăvară și vară în 2023, izolarea și identificarea *E. coli* conform standardelor internaționale, cu confirmare biochimică utilizând sistemul Vitek® 2. Testarea susceptibilității antimicrobiene s-a realizat prin determinarea concentrațiilor minime inhibitorii folosind sistemul VITEK® 2 și cardurile AST-GN96. S-a evaluat susceptibilitatea la 18 antibiotice, acoperind diverse clase și mecanisme de acțiune, utilizate atât în medicina umană, cât și în cea veterinară.

Caracterizarea moleculară a genelor de rezistență antimicrobiană a implicat extracția ADN-ului genomic și amplificarea PCR pentru detectarea genelor de rezistență specifice (*blaSHV*, *blaCMY*, *blaTEM*, *blaCTX*, *blaOXA*, *qnrA*, *aac*, *sul1*, *tetA* și *tetB*), inclusiv gene pentru β -lactamaze, rezistență la quinolone, aminoglicozide, sulfonamide și tetraciline.

Această abordare metodologică a permis o evaluare detaliată a prevalenței *E. coli* rezistente la antibiotice în stațiile de epurare a apelor uzate, oferind informații valoroase despre potențialul de răspândire a rezistenței antimicrobiene în mediul acvatic și implicațiile pentru sănătatea publică²⁹.

5.3 Rezultate și discuții

S-a constatat o prevalență ridicată (50%) a *E. coli* în probele de ape uzate. 83,34% din tulpinile de *E. coli* izolate erau multi-rezistente.

Nivelurile cele mai ridicate de rezistență au fost observate pentru ampicilină (66,66%), ticarcilină/acid clavulanic (50% rezistente, 16,66% intermediare) și cefotaxim (33,33% rezistente, 33,33% intermediare). Analiza genetică a relevat

prezența frecventă a genelor de rezistență la antibiotice *tetA*, *tetB* (50% fiecare), *sul1* (50%), *blaTEM* (41,66%) și *blaCTX* (25%).

Corelațiile între rezistența fenotipică și markerii genotipici au fost evidențiate printr-o analiză heatmap, care a arătat asocieri complexe între genele de rezistență și fenotipurile de rezistență. Prezența genelor de rezistență asociate cu antibiotice de uz veterinar sugerează o posibilă contaminare din surse agricole.

Studiul subliniază importanța abordării "One Health" în combaterea rezistenței la antibiotice, evidențiind faptul că stațiile de epurare reprezintă posibile rezervoare și puncte de diseminare pentru bacterii și gene rezistente la antibiotice.

Rezultatele indică necesitatea unor programe mai stricte de administrare a antibioticelor și a unei supravegheri integrate a rezistenței antimicrobiene în sectoarele uman, animal și de mediu.

Limitările studiului includ numărul redus de probe și acoperirea geografică și sezonieră limitată. Cu toate acestea, aceste constatări preliminare oferă informații valoroase pentru ghidarea viitoarelor investigații mai cuprinzătoare asupra rezistenței antimicrobiene în sistemele de ape uzate din România.

5.4 Concluzii

Prevalența ridicată a *E. coli* rezistentă la o serie de antibiotice în probele de ape uzate ridică preocupări semnificative pentru sănătatea publică. Detectarea diverselor gene de rezistență la antibiotice indică potențialul de transfer orizontal de gene în mediile de ape uzate. Prezența rezistenței atât la antibioticele umane, cât și la cele veterinare evidențiază necesitatea unei abordări One Health în abordarea rezistenței la antibiotice.

6. Concluzii generale

Prezența cercetare doctorală a investigat dinamica reziduurilor de antibiotice, încărcăturile bacteriene și modelele de rezistență la antibiotice în trei stații de epurare a apelor uzate din România. Cercetarea, desfășurată pe parcursul mai multor sezoane, a evidențiat influența factorilor de mediu și a proceselor de tratare asupra evoluției antibioticelor și prevalenței bacteriilor rezistente la antibiotice.

S-au observat variații sezoniere semnificative în concentrațiile de antibiotice, încărcăturile bacteriene și modelele de rezistență, cu niveluri în general mai ridicate în lunile mai calde.

Eficiența de eliminare a antibioticelor în stațiile de epurare a variat considerabil, evidențiind necesitatea unor tehnologii și practici de tratare îmbunătățite.

Toate antibioticele vizate au prezentat coeficienți de risc ridicați la un moment dat în timpul perioadei de studiu, indicând potențiale riscuri ecologice pentru mediile acvatice.

Prevalența ridicată a *E. coli* rezistentă la mai multe medicamente în probele de ape uzate ridică preocupări semnificative pentru sănătatea publică.

Prezența *E. coli* rezistentă atât la antibioticele umane, cât și la cele veterinare evidențiază potențialul de contaminare încrucișată între diferite sectoare.

Cercetarea subliniază importanța monitorizării și supravegherii continue a rezistenței la antibiotice în stațiile de epurare pentru a informa intervențiile de sănătate publică și deciziile politice.

Teza semnaleză necesitatea îmbunătățirii practicilor de tratare a apelor uzate, utilizarea responsabilă a antibioticelor și o abordare One Health pentru a aborda provocarea globală a rezistenței la antibiotice. De asemenea, solicită cercetări suplimentare, inclusiv monitorizarea pe termen lung a rezistenței la antibiotice în stațiile de epurare, dezvoltarea de tehnologii avansate de tratare și explorarea unor abordări noi pentru reducerea utilizării antibioticelor și prevenirea răspândirii rezistenței.

7. Originalitatea și contribuțiile inovatoare

Această teză aduce contribuții originale în domeniul rezistenței la antibiotice în stațiile de epurare a apelor uzate și impactul lor asupra mediului, cu accent pe zona central-vestică a României. Studiul oferă o analiză sezonieră a reziduurilor de antibiotice, încărcăturilor bacteriene și modelelor de rezistență la antibiotice în trei stații de epurare din România.

Metodologia permite o evaluare complexă, de la detectarea și cuantificarea reziduurilor de antibiotice până la identificarea și caracterizarea bacteriilor și genelor rezistente. Cercetarea evidențiază stațiile de epurare ca potențiale rezervoare și puncte de diseminare pentru antibiotice, bacterii și gene rezistente la antibiotice.

Includerea antibioticelor de uz uman și veterinar oferă perspective asupra transferului de rezistență între mediile agricole și urbane. Cercetarea demonstrează potențialul epidemiologiei bazate pe ape uzate pentru monitorizarea tendințelor de rezistență la antibiotice la nivel comunitar.

O evaluare a riscurilor de mediu pentru reziduurile de antibiotice din efluenții stațiilor de epurare este prezentată, iar analiza heatmap este utilizată pentru vizualizarea asocierilor între genele de rezistență la antibiotice și fenotipuri în izolatele de *E. coli*. De asemenea, integrează factori de mediu în interpretarea datelor privind nivelurile de antibiotice în apele uzate.

În contextul în care doar 12% din stațiile de epurare din România îndeplinesc standardele UE, studiul oferă recomandări importante pentru factorii de decizie. Teza adoptă o perspectivă One Health, recunoscând interconexiunea dintre sănătatea umană, animală și de mediu în contextul rezistenței la antibiotice.

Această abordare integrată facilitează evaluarea eficienței stațiilor de epurare în eliminarea antibioticelor și a bacteriilor rezistente, contribuind astfel la dezvoltarea de strategii mai eficiente pentru gestionarea acestei probleme complexe de sănătate publică și de mediu.

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Analysis of antibiotic residues and of antibiotic resistance of certain *Escherichia coli* strains in three wastewater treatment plants in Romania

PhD Student **Laviță Svetlana Iuliana (married Polianciuc)**

PhD Supervisor Prof. Dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	14
STATE OF THE ART	14
PERSONAL CONTRIBUTION	16
1. Objective of the study	16
2. General Sampling Methodology	17
3. Study 1. Seasonal dynamics, removal efficiency, and environmental risk assessment of antibiotics in wastewater treatment plants	17
3.1 Study Objectives	17
3.2 Materials and Methods	18
3.3 Results and Discussion	18
3.4 Conclusions	19
4. Study 2. Seasonal variations of bacterial loads and antibiotic susceptibility in wastewater treatment plants	19
4.1 Study Objectives	19
4.2 Materials and Methods	19
4.3 Results and Discussion	19
4.4 Conclusions	20
5. Study 3. Prevalence and characterization of antibiotic-resistant <i>Escherichia coli</i> from wastewater treatment plants	20
5.1 Study Objectives	20
5.2 Materials and Methods	20
5.3 Results and Discussion	20
5.4 Conclusions	21
6. General Conclusions	21
Selective References	23

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, wastewater treatment plants, bacterial loads, *Escherichia coli*, environmental risk assessment, antibiotic resistance genes, public health, seasonal variations, removal efficiency

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance (AMR) represents a global threat to public health, jeopardizing the efficacy of existing antibiotics. Wastewater treatment plants are considered potential reservoirs and dissemination points for antibiotic residues, bacteria, and antibiotic-resistant genes.

This doctoral thesis is structured into three main studies:

1. Analysis of seasonal dynamics, removal efficiency, and environmental risk assessment of antibiotics in three wastewater treatment plants in the central-western region of Romania.

2. Investigation of seasonal variations in bacterial loads and antibiotic susceptibility.

3. Examination of the prevalence and characterization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewater treatment plants.

The research is particularly relevant in the specific context of Romania, which faces two major challenges in public health and environmental domains. Firstly, the country records one of the highest rates of antibiotic consumption in Europe, raising serious concerns about the development of antibiotic resistance. Secondly, Romania faces significant deficiencies in wastewater treatment, with a compliance level with EU Directive regulations of only 12%, far below the European average. This situation underscores the need to address the issue of environmental contamination with pharmaceutical residues and the necessity for solutions to protect public health and aquatic ecosystems.

STATE OF THE ART

The discovery of antibiotics at the beginning of the 20th century revolutionized modern medicine, significantly reducing mortality and morbidity caused by bacterial infections, previously considered the main causes of death¹. The COVID-19 pandemic influenced antibiotic use patterns, with an initial decline followed by a return to pre-pandemic levels or even higher in some countries. Romania was reported as having one of the highest rates of antibiotic consumption in Europe in 2021-2022, with 25.9 defined daily doses per 1,000 inhabitants per day². This high consumption rate is attributed to factors such as easy access to antibiotics without prescription and socio-economic barriers^{3,4}.

The impact of antibiotic residues on the environment and public health reveals several critical aspects. There is substantial evidence that antibiotic residues, even at low concentrations, can promote the development of resistance in environmental bacteria. This resistance can subsequently be transferred to species associated with human infections, representing a significant risk to public health⁵⁻⁷. For pharmaceutical products authorized before 2006, current guidelines stipulate the need for an environmental risk assessment (ERA) in case of significant changes in use or the emergence of new scientific evidence regarding potential

environmental hazards⁸. This approach ensures a re-evaluation of the safety of older pharmaceutical products when circumstances require it. However, certain antibiotics, such as ciprofloxacin, clarithromycin, and others, are considered particularly problematic from an environmental perspective due to their persistence in the environment and resistance to wastewater treatment processes, the potential for bioaccumulation in organism tissues, and significant ecotoxicity even at very low concentrations (low PNEC values)⁹. Additionally, antibiotics can disrupt aquatic ecosystems, affecting bacteria, algae, and invertebrates. They promote the development of antibiotic-resistant bacteria and disturb microbial communities essential for ecosystem functions¹⁰.

Recent studies at European and global levels highlight the need to strengthen existing regulations^{10,11}, as well as to improve data collection systems, an aspect particularly relevant in the context of Romania, where information in this field is often insufficient or even absent, thus creating a gap in the understanding and effective management of the problem of antibiotic residues in the environment.

At the same time, the current state of knowledge highlights the essential role of wastewater treatment plants in the spread of antibiotic resistance, with emphasis on *Escherichia coli* as an indicator organism, due to its prevalence in wastewater and its ability to acquire and spread resistance genes¹²⁻¹⁵. In Romania, multi-resistant (MDR) *E. coli* strains are prevalent, especially in wastewater environments, making them a potential model for tracking AMR trends¹⁶⁻¹⁸. Studies have shown high levels of resistance in *E. coli* isolated from wastewater, with 85.11% of isolates from hospital wastewater and 68.09% from community wastewater being multi-resistant¹⁷. The presence of antibiotic residues and other pollutants in these environments exerts selective pressure on bacterial populations, favoring the proliferation of resistant strains. The transfer of resistance genes between various bacterial populations is intensified in wastewater treatment plants due to the high density and diversity of microorganisms present.

Conventional wastewater treatment plant treatments are often ineffective in eliminating antibiotics and other determinants of bacterial resistance, leading to their release into the environment, and aquatic ecosystems, and the spread of resistance¹⁹. The efficacy of wastewater treatment plants in eliminating antibiotics is variable, with some methods being more effective than others. For example, advanced treatment methods: membrane filtration, UV irradiation, and ozonation, are promising for the removal of antibiotic residues and resistance genes^{20,21}.

Wastewater surveillance can represent an effective method for monitoring and predicting antibiotic resistance trends at the community level²². Research has demonstrated that resistance profiles of *E. coli* in wastewater closely reflect clinically observed patterns in the population, thus providing a reliable indicator of antibiotic use and abuse in the community^{12,23}.

Analytical and molecular techniques, such as high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS) and polymerase chain reaction (PCR), are essential for quantifying antibiotic residues and detecting resistance genes in environmental samples^{24,25}. These methods are widely used due

to their high sensitivity and specificity and are necessary for understanding the persistence of antibiotics in wastewater and the potential risk represented by their presence in effluent. However, the analysis of antibiotic residues in such complex matrices presents challenges such as matrix effect and the need for efficient sample preparation techniques.

For the identification and characterization of antibiotic-resistant bacteria and genes, in addition to conventional culture-based methods that provide information on bacterial viability and phenotype, molecular techniques such as PCR and quantitative PCR (qPCR) are important tools for detecting specific resistance genes.

The presence of antibiotic-resistant bacteria in wastewater effluents is identified as a potential threat to public health, as these bacteria can enter the human food chain or water supply²⁶. Additionally, the economic impact of antibiotic resistance, including increased healthcare costs due to longer hospitalizations, more expensive treatments, and higher mortality rates, advocates for a One Health approach in combating antibiotic resistance, recognizing the interconnection between human, animal, and environmental health²⁷.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Objective of the study

The main objectives of the research were designed to support the general aim of investigating the presence of antibiotic residues and the prevalence of *E. coli* isolates and associated genes in wastewater treatment plants. The research used an approach combining analytical and molecular techniques, microbiology, and environmental risk assessment to achieve the following objectives:

- Evaluate the presence and seasonal variation of target antibiotics (amoxicillin, piperacillin, ciprofloxacin, norfloxacin, azithromycin, clarithromycin, and doxycycline) in the influents and effluents of wastewater treatment plants.
- Assess the removal efficiency of these antibiotics in different seasons and wastewater treatment plants and the factors influencing antibiotic concentrations and removal rates.
- Conduct an environmental risk assessment of antibiotic residues detected in wastewater treatment plant effluents.
- Characterize bacterial loads and resistance profiles in wastewater and evaluate their removal efficiency.
- Determine the prevalence of *E. coli* in wastewater samples and characterize the antimicrobial resistance profile.
- Identify and analyze specific antibiotic resistance genes in isolated *E. coli* strains.

2. General Sampling Methodology

The research methodology was based on the analysis of three wastewater treatment plants in Romania, using a sample of 24 samples (12 influent, 12 effluent) collected over four seasons (2021-2022) and 24 samples collected over two seasons in 2023.

The wastewater treatment plants selected for this research are located in the Central-West region of Romania, a region characterized by a mix of urban and rural areas and which provides an appropriate framework for analyzing the variability of antibiotic presence, bacteria, and resistance genes, influenced by factors such as climate (temperature, precipitation), population density, hospital infrastructure, and local industry. This geographical selection was strategic, as all three stations discharge their effluents into the same river, allowing for a comparative analysis between them, which differ in size, treatment capacity, and the types of influents they process. Wastewater treatment plant A processes approximately 115,000 cubic meters of wastewater per day and serves a population of approximately 300,000 inhabitants. Wastewater treatment plants B and C treat approximately 4,772 and 5,673 cubic meters per day, respectively, serving smaller populations.

The first sampling campaign was conducted over four seasons, from autumn 2021 to summer 2022. This formed the basis for studies 1 and 2 of the research. The second sampling campaign conducted in the spring and summer of 2023 represented study 3 of the research. Wastewater samples were collected using automatic samplers over 24-hour periods. These were collected from both the influent and effluent points of each wastewater treatment plant.

Although the methodology offers a comprehensive perspective, the research has inherent limitations, including the potential underestimation of short-term contamination peaks and possible non-representativeness of the entire diversity of treatment plants in Romania. These aspects underscore the need to interpret the results in the specific context of the studied wastewater treatment plants and suggest opportunities for future studies with more frequent sampling and additional collection points for a more nuanced understanding of the dynamics of antibiotic residues and resistant bacteria in wastewater treatment systems.

3. Study 1. Seasonal dynamics, removal efficiency, and environmental risk assessment of antibiotics in wastewater treatment plants

3.1 Study Objectives

- Evaluate the presence and seasonal variation of seven selected antibiotics in the influents and effluents of three wastewater treatment plants in the Central-Western region of Romania.
- Analyze the removal efficiency of antibiotics in different seasons and wastewater treatment plants.

- Assess the environmental risk associated with the presence of antibiotic residues in wastewater treatment plant effluents.
- Investigate influencing factors on antibiotic concentrations in wastewater.

3.2 Materials and Methods

A complex methodology was applied to achieve the objectives, which involved collecting 24-hour composite samples, analyzed by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS). The analytical process included solid-phase extraction, method validation by determining detection and quantification limits, and statistical analysis using descriptive, non-parametric tests and regression models. An environmental risk assessment was performed using risk quotients (RQ) based on measured concentrations and PNEC (Predicted No Effect Concentration) values. The study also considered influencing factors such as temperature, precipitation, and physicochemical parameters of wastewater, providing a comprehensive perspective on the dynamics of antibiotics in wastewater treatment systems and associated ecological risks²⁸.

3.3 Results and Discussion

The study results highlighted significant variations in antibiotic concentrations in the influents and effluents of wastewater treatment plants, with notable differences between seasons and types of antibiotics. Amoxicillin showed the highest variability, with median Q3 concentrations reaching 22.16 µg/mL in spring and summer 2022, although the average difference between influent and effluent (7.11 µg/mL) did not reach statistical significance. Significant fluctuations were also observed for piperacillin and norfloxacin, while azithromycin and ciprofloxacin showed consistently low concentrations but with high variability in certain seasons.

The removal efficiency of antibiotics varied considerably between stations and seasons, with rates ranging from 3% to -315%. Negative removal rates were observed for some antibiotics under certain conditions, suggesting the possibility of conjugated metabolites transforming back into parent compounds during the treatment process, release from biofilms, and/or desorption from particulate matter, which could lead to an increase in their concentration in the effluent.

Analysis of influencing factors revealed potential associations between antibiotic concentrations and environmental factors, especially for amoxicillin and doxycycline. Temperature and precipitation had a significant impact, along with pH and other physicochemical parameters of wastewater. Temperature emerged as a significant factor affecting antibiotic concentrations and removal rates, especially for amoxicillin and doxycycline. Regarding precipitation, the effect on antibiotic concentrations, especially for amoxicillin and doxycycline, was less pronounced than that of temperature. This difference can be explained by competing factors. On one hand, precipitation can lead to a dilution of antibiotic concentrations in wastewater. On the other hand, it can increase the input of antibiotics from agricultural sources by intensifying surface runoff. These opposing factors can lead to variable effects of

precipitation on antibiotic concentrations in wastewater, thus explaining their less clear impact compared to temperature.

The environmental risk assessment revealed that all targeted antibiotics presented high-risk quotients (RQ > 1) at some point during the study period, indicating ecological risks.

3.4 Conclusions

The study underlines the complexity of antibiotic dynamics in wastewater treatment systems and the importance of considering seasonal and operational factors in assessing and managing risks associated with the presence of antibiotic residues in the aquatic environment.

4. Study 2. Seasonal variations of bacterial loads and antibiotic susceptibility in wastewater treatment plants

4.1 Study Objectives

The study examined three wastewater treatment plants, focusing on seasonal variations in bacterial loads and antibiotic resistance patterns.

The main objectives were to evaluate seasonal variations in bacterial loads in influents and effluents, as well as to analyze the effectiveness of the plants in reducing bacterial loads and antibiotic resistance.

4.2 Materials and Methods

The methodology involved using the colony-forming units (CFU) technique for evaluating bacterial loads, isolation and characterization of bacteria by Gram staining, antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method, and morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM). The seven antibiotics detected in the first study of the thesis were selected for susceptibility testing, and the interpretation of results was performed according to EUCAST guidelines. This approach allowed for a detailed analysis of seasonal variations in bacterial loads and antibiotic resistance profiles in the studied wastewater treatment plants²⁸.

4.3 Results and Discussion

The study revealed significant seasonal variations in bacterial loads in wastewater treatment plants, with maximum values recorded in the spring period, reaching 9.230 log CFU/mL in the influent of plant B. Variable efficiency in reducing bacterial load was observed, with wastewater treatment plant A demonstrate the most consistent performance, with a reduction of up to 99.31% in spring.

Microscopic analysis highlighted the predominance of Gram-negative bacteria, especially in warm seasons. Scanning electron microscopy revealed biofilm formation in some effluent samples, suggesting the potential for protection against antimicrobial agents and facilitating horizontal gene transfer.

Antibiotic susceptibility testing indicated varied resistance profiles, with more pronounced resistance in spring and summer, especially to amoxicillin and clarithromycin. The presence of multi-resistant strains was observed, especially in

warm seasons, indicating a potential seasonal effect on antibiotic resistance development and spread in wastewater treatment plants.

4.4 Conclusions

The study provides a preliminary analysis of seasonal variations in bacterial loads and antibiotic susceptibility in three wastewater treatment plants. Higher bacterial loads and increased antibiotic resistance in warmer months suggest the need for improved treatment processes during these periods. The variable efficiency of bacterial load reduction between wastewater treatment plants highlights the importance of optimizing treatment processes in different facilities.

5. Study 3. Prevalence and characterization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* from wastewater treatment plants

5.1 Study Objectives

The study focused on the isolation and characterization *E. coli* from wastewater samples, aiming to:

- Determine the prevalence of *E. coli* in wastewater samples from three different wastewater treatment plants in Romania.
- Characterize the antimicrobial resistance profiles of isolated *E. coli* strains.
- Identify and analyze the presence of specific antibiotic-resistance genes in isolated *E. coli* strains.

5.2 Materials and Methods

The study methodology included collecting wastewater samples in spring and summer seasons of 2023, isolating, and identifying *E. coli* according to international standards, with biochemical confirmation using the Vitek® 2 system. Antimicrobial susceptibility testing was performed by determining minimum inhibitory concentrations using the VITEK® 2 system and AST-GN96 cards. Susceptibility to 18 antibiotics was evaluated, covering various classes and mechanisms of action, used in both human and veterinary medicine.

Molecular characterization of antimicrobial resistance genes involved genomic DNA extraction and PCR amplification for detecting specific resistance genes (*blaSHV*, *blaCMY*, *blaTEM*, *blaCTX*, *blaOXA*, *qnrA*, *aac*, *sul1*, *tetA*, and *tetB*), including genes for β -lactamases, quinolone resistance, aminoglycosides, sulfonamides, and tetracyclines.

This methodological approach allowed for a detailed assessment of the prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in wastewater treatment plants, providing valuable information about the potential for spreading antimicrobial resistance in the aquatic environment and implications for public health²⁹.

5.3 Results and Discussion

A high prevalence (50%) of *E. coli* was found in wastewater samples. 83.34% of the isolated *E. coli* strains were multi-resistant.

The highest levels of resistance were observed for ampicillin (66.66%), ticarcillin/clavulanic acid (50% resistant, 16.66% intermediate) and cefotaxime

(33.33% resistant, 33.33% intermediate). Genetic analysis revealed the frequent presence of antibiotic-resistance genes *tetA*, *tetB* (50% each), *sul1* (50%), *blaTEM* (41.66%), and *blaCTX* (25%).

Correlations between phenotypic resistance and genotypic markers were highlighted through a heatmap analysis, which showed complex associations between resistance genes and resistance phenotypes. The presence of resistance genes associated with veterinary antibiotics suggests possible contamination from agricultural sources.

The study underscores the importance of the "One Health" approach in combating antibiotic resistance, highlighting that wastewater treatment plants represent possible reservoirs and dissemination points for antibiotic-resistant bacteria and genes.

The results indicate the need for stricter antibiotic stewardship programs and integrated surveillance of antimicrobial resistance in human, animal, and environmental sectors.

Limitations of the study include the small number of samples and limited geographical and seasonal coverage. However, these preliminary findings provide valuable information to guide future more comprehensive investigations into antimicrobial resistance in wastewater systems in Romania.

5.4 Conclusions

The high prevalence of *E. coli* resistant to a range of antibiotics in wastewater samples raises significant public health concerns. The detection of various antibiotic resistance genes indicates the potential for horizontal gene transfer in wastewater environments. The presence of resistance to both human and veterinary antibiotics highlights the need for a One Health approach in addressing antibiotic resistance.

6. General Conclusions

This doctoral research investigated the dynamics of antibiotic residues, bacterial loads, and antibiotic resistance patterns in three wastewater treatment plants in Romania. The research, conducted over several seasons, highlighted the influence of environmental factors and treatment processes on the evolution of antibiotics and the prevalence of antibiotic-resistant bacteria.

Significant seasonal variations were observed in antibiotic concentrations, bacterial loads, and resistance patterns, with generally higher levels in warmer months.

The removal efficiency of antibiotics in wastewater treatment plants varied considerably, highlighting the need for improved treatment technologies and practices.

All targeted antibiotics presented high risk quotients at some point during the study period, indicating potential ecological risks for aquatic environments.

The high prevalence of multi-drug resistant *E. coli* in wastewater samples raises significant public health concerns.

The presence of *E. coli* resistant to both human and veterinary antibiotics highlights the potential for cross-contamination between different sectors.

The research underscores the importance of continuous monitoring and surveillance of antibiotic resistance in wastewater treatment plants to inform public health interventions and policy decisions.

The thesis signals the need for improving wastewater treatment practices, responsible use of antibiotics, and a One Health approach to address the global challenge of antibiotic resistance. It also calls for further research, including long-term monitoring of antibiotic resistance in wastewater treatment plants, development of advanced treatment technologies, and exploration of new approaches to reduce antibiotic use and prevent the spread of resistance.

7. Originality and Innovative Contributions

This thesis brings original contributions to the field of antibiotic resistance in wastewater treatment plants and their impact on the environment, focusing on the central-western area of Romania. The study provides a seasonal analysis of antibiotic residues, bacterial loads, and antibiotic resistance patterns in three wastewater treatment plants in Romania.

The methodology allows for a complex evaluation, from the detection and quantification of antibiotic residues to the identification and characterization of resistant bacteria and genes. The research highlights wastewater treatment plants as potential reservoirs and dissemination points for antibiotics, bacteria, and antibiotic-resistant genes.

The inclusion of both human and veterinary antibiotics provides insights into the transfer of resistance between agricultural and urban environments. The research demonstrates the potential of wastewater-based epidemiology for monitoring antibiotic resistance trends at the community level.

An environmental risk assessment for antibiotic residues in wastewater treatment plant effluents is presented, and heatmap analysis is used to visualize associations between antibiotic resistance genes and phenotypes in *E. coli* isolates. It also integrates environmental factors in the interpretation of data on antibiotic levels in wastewater.

In the context where only 12% of wastewater treatment plants in Romania meet EU standards, the study provides important recommendations for decision-makers. The thesis adopts a One Health perspective and recognizes the interconnection between human, animal, and environmental health in the context of antibiotic resistance.

This integrated approach facilitates the evaluation of the efficiency of wastewater treatment plants in removing antibiotics and resistant bacteria, thus contributing to the development of more effective strategies for managing this complex public health and environmental issue.

Selective References

1. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
2. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2022>.
3. Toma A, Crişan O. Developing the role of the Romanian community pharmacy in environmental protection. *Farmacia.* 2023;71(5). <https://doi.org/10.31925/farmacia.2023.5.25> FARMACIA,
4. Ghiga I, Stålsby Lundborg C. "Struggling to be a defender of health" -a qualitative study on the pharmacists' perceptions of their role in antibiotic consumption and antibiotic resistance in Romania. *J Pharm Policy Pract.* 2016;9(1):1-10. doi:10.1186/s40545-016-0061-y
5. Kusturica MP, Jevtic M. Minimizing the environmental impact of unused pharmaceuticals : Review focused on prevention. 2022;(December):1-8. doi:10.3389/fenvs.2022.1077974
6. Carvalho IT, Santos L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ Int.* 2016;94:736-757. doi:10.1016/j.envint.2016.06.025
7. Polianciuc SI, Gurzău AE, Kiss B, Georgia Ştefan M, Loghin F. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med Pharm Reports.* 2020;93(3):231-240. doi:10.15386/mpr-1742
8. Environmental risk assessment of medicinal products for human use - Scientific guideline. Accessed August 31, 2024. <https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-scientific-guideline>
9. Okoye CO, Nyaruaba R, Ita RE, et al. Antibiotic resistance in the aquatic environment: Analytical techniques and interactive impact of emerging contaminants. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2022;96(January):103995. doi:10.1016/j.etap.2022.103995
10. Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int.* 2016;86:140-149. doi:10.1016/j.envint.2015.10.015
11. Ågerstrand M, Josefsson H, Wernersson AS, Larsson DGJ. Opportunities to tackle antibiotic resistance development in the aquatic environment through the Water Framework Directive. *Ambio.* 2023;52(5):941-951. doi:10.1007/s13280-022-01828-7
12. Paulshus E, Kühn I, Möllby R, et al. Diversity and antibiotic resistance among *Escherichia coli* populations in hospital and community wastewater compared to wastewater at the receiving urban treatment plant. *Water Res.* 2019;161:232-241. doi:10.1016/j.watres.2019.05.102
13. Price RG, Wildeboer D. E. coli as an Indicator of Contamination and Health Risk in Environmental Waters. In: *Escherichia Coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications.* ; 2017:125-139.
14. Aslan A, Cole Z, Bhattacharya A, Oyibo O. Presence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewater treatment plant effluents utilized as water reuse for irrigation. *Water (Switzerland).* 2018;10(6). doi:10.3390/w10060805
15. Muna F Anjum, Heike Schmitt, Stefan Börjesson, Thomas U Berendonk, Erica Donner, Eliana Guedes Stehling, Patrick Boerlin, Edward Topp, Claire Jardine, Xuewen Li, Bing Li, Monika Dolejska, Jean-Yves Madec, Christophe Dagot, Sebastian Guenther, Fiona Walsh, The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Curr Opin Microbiol.* 2021;64:152-158.
16. Marinescu F, Marutescu L, Savin I, Lazar V. Antibiotic resistance markers among Gram-negative isolates from wastewater and receiving rivers in South Romania. *Rom Biotechnol Lett.* 2015;20(1):10055-10069.
17. Gaşpar CM, Csiszter LT, Lăzărescu CF, Ţibru I, Pentea M, Butnariu M. Antibiotic resistance among *escherichia coli* isolates from hospital wastewater compared to community wastewater. *Water (Switzerland).* 2021;13(23). doi:10.3390/w13233449
18. Marutescu LG, Popa M, Gheorghe-Barbu I, Barbu IC, Rodríguez-Molina D, Berglund F, Blak H, Flach C-F, Kemper MA, Spießberger B, Wengenroth L, Larsson DGJ, Nowak D, Radon K, de Roda Husman AM, Wieser A, Schmitt H, Pircalabioru Gradisteanu G VC and CM (2023). Wastewater treatment plants , an " escape gate " for ESCAPE pathogens. *Front Microbiol.* Published online 2023:1-15. doi:10.3389/fmicb.2023.1193907
19. Alfonso-Muniozguren P, Serna-Galvis EA, Bussemaker M, Torres-Palma RA, Lee J. A review on pharmaceuticals removal from waters by single and combined biological, membrane filtration and ultrasound systems. *Ultrason Sonochem.* 2021;76. doi:10.1016/j.ultsonch.2021.105656
20. Post C, Heyden N, Reinartz A, et al. Possibilities of Real Time Monitoring of Micropollutants in Wastewater using Laser-Induced Raman & Fluorescence Spectroscopy (LIRFS) and Artificial Intelligence (AI). *Sensors.* 2022;22(13). doi:10.3390/s22134668
21. Foroughi M, Khiadani M, Kakhki S, Kholghi V, Naderi K, Yektay S. Effect of ozonation-based disinfection methods on the removal of antibiotic resistant bacteria and resistance genes

- (ARB/ARGs) in water and wastewater treatment: a systematic review. *Sci Total Environ.* 2022;811:151404. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151404
22. Clarke LM, O'Brien JW, Murray AK, Gaze WH, Thomas K V. A review of wastewater-based epidemiology for antimicrobial resistance surveillance. *J Environ Expo Assess.* 2024;3(1). doi:10.20517/jeea.2023.29
23. Huijbers PMC, Larsson DGJ, Flach CF. Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environ Pollut.* 2020;261:114200. doi:10.1016/j.envpol.2020.114200
24. Kim C, Ryu HD, Chung EG, Kim Y, Lee J kwan. A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry. *J Environ Manage.* 2018;217:629-645. doi:10.1016/j.jenvman.2018.04.006
25. Gros M, Petrović M, Barceló D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: A review. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(4):941-952. doi:10.1007/s00216-006-0586-z
26. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;27:101-111. doi:10.1016/j.jgar.2021.08.001
27. <https://onehealthjp.eu/about>. The One Health European Joint Programme (OHEJP).
28. Svetlana Iuliana Polianciuc, Alexandra Ciorăță, Maria Loredana Soran, Ildiko Lung, Bela Kiss, Maria Georgia Ștefan, Daniel Corneliu Leucuța, Anca Elena Gurzău, Rahela Carpa, Liora Mihaela Colobățiu FL. Antibiotic Residues and Resistance in Three Wastewater Treatment Plants in Romania. *Antibiotics.* 2024;13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080780>
29. Polianciuc SI, Colobatiu L, Duma M, Mihaiu M, Loghin F. The first characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from three wastewater treatment plants in Romania. *Water Sci Technol.* Published online September 6, 2024. doi:10.2166/wst.2024.307