UNIWERSYTET
ZIELONOGÓRSKI

dr hab. Katarzyna Baldy-Chudzik, prof. UZ
Katedra Mikrobiologii i Biologii Molekularnej
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum
Uniwersytet Zielonogórski

Zielona Góra, 08.11.2022r.

Review

the doctoral dissertation of Wiktor Zygmunt Zieliński entitled: "Wastewater treatment plants as a source of antibiotic resistance transmission - an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees"

Made at the Department of Water Protection Engineering and Environmental Microbiology, Faculty of Geoengineering, University of Warmia and Mazury in Olsztyn under the supervision of prof. dr hab. Eng. Ewa Korzeniewska and dr hab. Eng. Ewa Felis, prof. at the Silesian University of Technology

Growing antibiotic resistance is a severe epidemiological and environmental problem. The state of knowledge regarding the impact of the wastewater treatment process on the spread of drug-resistant microorganisms still needs to be completed. For practical preventive actions, it is essential to know whether conventional wastewater treatment plants contribute to the transmission of potentially pathogenic microorganisms and genetic determinants of antibiotic resistance to the aquatic environment. Moreover, whether the sewage treatment plant environment, including the emitted bioaerosols, poses a risk of respiratory system infection to plant employees. This task is within the framework of the goal specified in the doctoral dissertation of Mr Wiktor Zygmunt Zieliński.

The doctoral dissertation received for review was written based on four thematically consistent papers published in 2019-2022 with a total IF = 29.992 and 550 points by MEiN scoring. Mr Wiktor Zygmunt Zieliński is the first Author of each publication. The layout of the dissertation is typical in terms of doctoral dissertations in the field of biological sciences based on thematically coherent publications. It did write in English with the correct use of specialist terminology. The text of the dissertation submitted for evaluation consists of 47 pages. It is composed of the following parts: a list of abbreviations used in the preparation, abstract in Polish and English, introduction, scientific purpose, hypotheses and scope of the study, methods and results with the distinction of 4 stages of the study, summary, and conclusions, and bibliography. Copies of the publication, data from supplements and statements of the co-authors complete the work.

The first part of the dissertation is an **Introduction** to the issues related to the role of the wastewater treatment process in the induction and dissemination of both drug-resistant microorganisms and drug-resistance genes. In this part of the work, the PhD student describes the consequences of microbial exposure to residual antibiotics present in wastewater, presents the role of horizontal transfer of genes and mobile genetic elements, including integrons, and the influence of heavy metals on promoting determinants of resistance in the microbial environment. It indicates the potential role of biological aerosols in wastewater treatment in spreading antibiotic resistance in the background. This chapter is a compact and logical part of the work, which indicates a good knowledge of the studied issues and literature in this field. The Author also convincingly justifies the need to undertake the research being the subject of the doctoral dissertation.

The second part of the thesis is the **Scientific objective, hypotheses, and scope of the research**, in which the PhD student formulates the primary goal of the work, presents two hypotheses and defines four research tasks to verify the above views.

The continuation of this part is the chapter **Methods and Research results**, in which the Author clearly shows each of the four distinguished research stages. At each study step, the PhD student describes the characteristics of the sampling sites for biological material for testing: river water, the Sewage Treatment Plant in Olsztyn, the sampling seasons, the method of collecting material from the plant employees (nose and throat swabs), and the size of the test and control group.

The methods used are adequate for the performance of the tasks. The Author uses both classical microbiological methods (stage II) as well as molecular techniques such as DNA isolation (stages I-IV), conventional PCR method (stages I and II), quantitative qPCR method (stages II-III), and then statistical analysis. Physic-chemical analysis in stage III and metagenomic study in stage IV complete a comprehensive range of techniques.

Each stage of the study did design to determine the prevalence of the genetic determinants of antibiotic resistance and antibiotic-resistant microorganisms in wastewater and their transmission to the 1/ rivers receiving effluents and the 2/ upper respiratory tract of the plant employees, with the bioaerosol emitted during the mechanical and biological stages of wastewater treatment. A detailed analysis of the results did carry out for each of the four study stages.

Stage I. included the analysis of genes determining resistance to β-lactam antibiotics in river water, sewage sludge, and sewage from specific steps of the treatment process. Results showed that wastewater treatment processes did not wholly remove antibiotic-resistance genes from wastewater.

Stage II analyzed the presence of antibiotic-resistant and virulent strains of the genus *Staphylococcus* in river water samples, sewage, and in swabs from the upper respiratory tract of plant employees. This study revealed that wastewater treatment plants are a source of antibiotic resistance genes and that treated wastewater that flows into rivers can affect its distribution in the environment.

Stage III. Estimating the potential transmission of pollutants such as antibiotics, antibiotic-resistance genes (ARGs) and mobile genetic elements (MGEs) with treated sewage to river water and with aerosol emitted during the aeration and mixing of sewage to the upper respiratory tract of plant employees. The study demonstrated that the co-selection of antibiotic resistance might occur in wastewater contaminated with heavy metals such as copper, zinc, chromium and arsenic. Results revealed that workers in mechanical-biological wastewater treatment plants are at risk of migrating ARGs from sewage to the upper respiratory tract.

In Stage IV., the metagenomic sequences analysis demonstrated that *Actinobacteria* predominated in wastewater samples from an activated sludge bioreactor, which emits large quantities of bioaerosols, and in nasal and throat swabs collected from plant employees. Their abundance did correlate with the concentration of ARGs. Revealed relationships may point to their potential transmission to the upper respiratory tracts of plant employees. Moreover, the discharged sewage increased the taxonomic diversity of the bacteria and the concentration of various antibiotic-resistance genes in the river waters.
The results obtained at each stage of the research does clearly described.

The thesis ends with the **Summary and Conclusions chapter**, in which the Author skillfully summarizes each stage of the study and formulates two conclusions. The first indicates that mechanical-biological treatment plants and those using the activated sludge technology contribute to disseminating drug-resistant microorganisms in the waters receiving treated sewage. The second is that bioaerosol emitted during the mixing and oxygenation of wastewater poses a real risk of transmission of drug-resistant microorganisms to the upper respiratory tract of plant employees. The conclusions fully reflect the analysis of the obtained research results and validate the hypotheses. Based on the study's results, the PhD student indicates the need to implement wastewater treatment technologies with limited bioaerosol emissions to the environment.

The cited bibliography includes 45 references published in the years 2011-2021. The selection of the most recent literature indicates a good knowledge of the literature on the subject and the Author's scientific maturity.

The dissertation presented for review lacks even a short chapter Discussion of the results, which would complement the work and evaluate the obtained results against the background of available world literature.

After a complete analysis of the work, I have comments regarding stylistic and editorial errors:

1. The total DNA from a given sample of water or sewage, and even more from pooled swabs, is a metagenomic DNA / environmental DNA, not genomic - the note applies to the entire text of the work.

2. In some workplaces, e.g., pp. 33, line 19, the term "popular antibiotic / popular antibiotics" appears - such a category of an antibiotic does not exist; only frequently used antibiotics exist, e.g., due to the type of pathogen causing the infection.

3. Page 33, line 2 - error in the number of resistance genes: There are "23 ARGs," but it should be "17 ARGs".

In summary, the assessed doctoral dissertation is an original and valuable study. The studies conducted by the Author provide new insights into the transmission of antibacterial resistance determinants to surface water bodies. It is worth emphasizing the extensive methodology and very reliable research. The content of the dissertation indicates the comprehensive theoretical knowledge and skills of the Doctoral student in the field of conducting scientific work.

Taking the above into account, I conclude that the doctoral dissertation of Mr Wiktor Zygmunt Zieliński, entitled: "Wastewater treatment plants as a source of antibiotic resistance transmission - an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees," meets the requirements provided for in Article 187 of the ACT of 20 July 2018 The Law on Higher Education and Science (Journal of Laws of 2022, item 574, as amended). So, I would like to ask the Council of Discipline of the Faculty of Biological Sciences of the University of Warmia and Mazury for the admission of Mr Wiktor Zygmunt Zieliński to go over the doctoral dissertation.

Due to the great importance of the topic undertaken by the PhD student, the scope of the research, and obtaining valuable results, I would like to ask for an award for a doctoral dissertation.

Katarzyna Bałdy-Chudzik

dr hab. Katarzyna Baldy-Chudzik, prof. UZ
Katedra Mikrobiologii i Biologii Molekularnej
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum
Uniwersytet Zielonogórski

Zielona Góra, 08.11.2022r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wiktora Zygmunta Zielińskiego pt. "Wastewater treatment plants as a source of antibiotic resistance transmission – an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees"

wykonanej w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Geoinżynierii , Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Ewy Korzeniewskiej oraz dr hab. inż. Ewy Felis, prof. Politechniki Śląskiej

Rosnąca oporność na antybiotyki jest poważnym problemem epidemiologicznym i środowiskowym. Stan wiedzy dotyczący wpływu procesu oczyszczania ścieków na rozprzestrzenianie drobnoustrojów lekoopornych jest ciągle fragmentaryczny. Dla skutecznych działań zapobiegawczych istotne znaczenie ma poznanie czy konwencjonalne oczyszczalnie ścieków przyczyniają się do transmisji potencjalnie chorobotwórczych mikroorganizmów oraz genetycznych determinant antybiotykoodporności do środowiska wodnego oraz czy środowisko oczyszczalni, w tym emitowane bioaerosole, stwarzają ryzyko infekcji układu oddechowego u pracowników oczyszczalni. Zadanie to mieści się w ramach celu określonego w dysertacji doktorskiej Pana mgr Wiktora Zygmunta Zielińskiego.

Otrzymana do recenzji dysertacja doktorska została napisana w oparciu o cztery spójne tematycznie prace, opublikowane w latach 2019-2022 o łącznym IF = 29,992 i 550 pkt. wg. punktacji MEiN. Pan mgr Wiktor Zygmunt Zieliński jest pierwszym autorem w każdej publikacji. Układ pracy jest typowy w formie w odniesieniu do prac doktorskich z zakresu nauk biologicznych, opartych na spójnych tematycznie publikacjach. Napisana jest ona w języku angielskim z prawidłowym użyciem nazewnictwa specjalistycznego.

Tekst przedstawionej do oceny pracy mieści się na 47 stronach, które obejmują: spis stosowanych w opracowaniu skrótów, abstrakt w języku polskim i angielskim, wstęp, cel naukowy, hipotezy i zakres badania, metody i wyniki z rozróżnieniem 4 etapów badania, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. Dalszą część pracy stanowią kopie publikacji wraz z danymi z suplementów oraz oświadczenia współautorów.

Pierwszą część dysertacji stanowi **Wstęp (Introduction)** zawierający wprowadzenie do zagadnień dotyczących roli procesu oczyszczania ścieków w indukowaniu i rozpowszechnianiu zarówno drobnoustrojów lekoopornych jak i genów lekooporności. W tej części pracy doktorant opisuje konsekwencje ekspozycji drobnoustrojów na resztkowe antybiotyki obecne w ściekach, przedstawia rolę horyzontalnego transferu genów i mobilnych elementów genetycznych, w tym integronów oraz wpływ metali ciężkich na promowanie i szerzenie determinant oporności w środowisku drobnoustrojów. Wskazuje na potencjalną rolę biologicznych aerosoli, emitowanych w procesie oczyszczania ścieków, w rozprzestrzenianiu antybiotykooporności w środowisku. Rozdział ten jest zwartą i logiczną częścią pracy, co wskazuje na dobrą znajomość badanych zagadnień i piśmiennictwa z tego zakresu. Autor w przekonujący sposób uzasadnia również potrzebę podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Drugą część pracy stanowi **Cel naukowy, hipotezy i zakres badania (Scientific objective, hypotheses, and scope of the research)**, w którym Doktorant formułuje główny cel pracy, przedstawia dwie hipotezy i wyznacza cztery zadania badawcze mające na celu zweryfikowanie powyższych hipotez.

Kontynuacją tej części jest rozdział **Metody i wyniki badań (Methods and Research results)**, w którym w sposób czytelny przedstawiony jest każdy z czterech wyróżnionych etapów badania. Na każdym etapie badania w sposób jasny została przedstawiona charakterystyka miejsc poboru materiału biologicznego do badań: woda rzeczna, Oczyszczalnia Ścieków w Olsztynie, wyszczególniono sezony, w których dokonywano poboru prób; dobrze scharakteryzowano też sposób poboru materiału od pracowników oczyszczalni ścieków (wymazy z nosa i gardła) i liczebność grupy badanej oraz grupy kontrolnej.

Zastosowane metody są adekwatne do realizacji zadań. Wykorzystana metodyka badań obejmuje zarówno klasyczne fenotypowe metody identyfikacji drobnoustrojów (etap II) jak i techniki molekularne, w tym metody pozyskiwania metagenomowego DNA (etap I-IV), konwencjonalnej metody PCR (etap I i II), ilościowej metody qPCR (etap II-III), a także narzędzia bioinformatyczne w analizie metagenomicznej (etap IV), metody fizykochemiczne (etap III) i analizy statystyczne.

Każdy etap badania został zaprojektowany tak, aby określić występowanie genetycznych uwarunkowań antybiotykooporności i lekooporne mikroorganizmy w ściekach oraz ich transmisję zarówno do 1. rzek otrzymujących ścieki jak i 2. górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni wraz z bioaerozolem emitowanym podczas mechanicznych i biologicznych etapów oczyszczania ścieków. Dla każdego z etapów badania została przeprowadzona szczegółowa analiza uzyskanych wyników.

Etap I. Obejmował analizę genów warunkujących oporność na antybiotyki β-laktamowe w wodzie rzecznej, osadzie ściekowym i w ściekach z poszczególnych etapów procesu oczyszczania. Wyniki wykazały, że procesy oczyszczania ścieków nie usuwają całkowicie genów antybiotykoodporności ze ścieków.

Etap II. W tym badaniu analizowano występowanie antybiotykoopornych i wirulentnych szczepów z rodzaju *Staphylococcus* w próbkach wody rzecznej, ściekach oraz w wymazach z górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Wyniki tego badania ujawniły, że oczyszczalnie ścieków są źródłem genów antybiotykoodporności, zaś ścieki oczyszczone odpływające do rzek mogą wpływać na ich rozprzestrzenianie w środowisku.

Etap III. Obejmował oszacowanie potencjalnej transmisji wybranych zanieczyszczeń wraz ze ściekami oczyszczonymi do wody rzecznej oraz wraz z aerosolem emitowanym podczas napowietrzania i mieszania ścieków do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Badanie wykazało, że koselekcja oporności na antybiotyki może wystąpić w ściekach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, takimi jak miedź, cynk, chrom i arsen. Wyniki ujawniły, że pracownicy mechaniczno-biologicznych oczyszczalni ścieków są narażeni na ryzyko przenoszenia do górnych dróg oddechowych genów antybiotykoodporności (ARGs) ze ścieków.

Etap IV. obejmował analizę metagenomiczną, która wykazała, że w próbkach ścieków z bioreaktora z osadem czynnym, który emituje duże ilości bioaerozoli, oraz w wymazach z nosa i gardła pobranych od pracowników zakładu dominowały bakterie należące do typu *Actinobacteria*, a ich liczebność była skorelowana ze stężeniem ARG. Wskazując na potencjalną możliwość transmisji tych bakterii do górnych dróg oddechowych pracowników zakładu. Zjawisko to może stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia. Wykazano też, że zrzucane ścieki powodowały zarówno wzrost różnorodności taksonomicznej mikroorganizmów w wodzie rzecznej jak też wzrost stężenia różnych genów oporności na antybiotyki.

Pracę kończy rozdział **Podsumowanie** i **Wnioski** (**Summary and Conclusions**), w którym doktorant umiejętnie podsumowuje każdy etap badania i formułuje dwa wnioski, wskazując, że zarówno oczyszczalnie mechaniczno-biologiczne jak i wykorzystujące technologię osadu czynnego przyczyniają się do rozpowszechniania lekoopornych mikroorganizmów w wodach będących odbiornikiem ścieków oczyszczonych oraz , że bioaerosol emitowany podczas mieszania i natleniania ścieków stwarza realne ryzyko transmisji lekoopornych mikroorganizmów do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Wnioski w pełni odzwierciedlają analizę uzyskanych wyników badania i walidują postawione hipotezy. W oparciu o wyniki badania, Doktorant wskazuje potrzebę wdrażania technologii oczyszczania ścieków z ograniczoną emisją bioaerozolu do środowiska.

Cytowana bibliografia obejmuje 45 pozycji literaturowych opublikowany w latach 2011-2021. Dobór w głównej mierze najnowszego piśmiennictwa wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu i dojrzałość naukową Autora.

W przedstawionej do recenzji dysertacji brakuje chociażby krótkiego rozdziału **Dyskusja wyników**, który byłby uzupełnieniem pracy oraz oceną uzyskanych wyników na tle dostępnej literatury światowej.

Po pełnej analizie pracy mam uwagi dotyczących błędów stylistycznych oraz edytorskich:

1. Badanie całkowitego DNA z danej próby wody lub ścieków, a tym bardziej ze spulowanych wymazów to badanie metagenomowego DNA/ środowiskowego DNA a nie genomowego – uwaga dotyczy całego tekstu pracy

2. W niektórych miejscach pracy pojawia się określenie „popularny antybiotyk/ popularne antybiotyki" – nie ma takiej kategorii, są tylko często stosowane antybiotyki np. ze względu na rodzaj patogenu wywołującego infekcję – np. str.33 wiersz 19

3. str.33, wiersz 2 – pomyłka w liczbie genów oporności: jest „23 ARGs" powinno być „17 ARGs"

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem. Wyniki badań dostarczają nowych informacji na temat przenoszenia determinant oporności przeciwbakteryjnej do wód powierzchniowych. Na podkreślenie zasługuje bogata metodyka oraz bardzo rzetelne przeprowadzenie badań. Treść dysertacji jednoznacznie wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną jak i umiejętności Doktoranta w zakresie prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Wiktora Zygmunta Zielińskiego pt.„Wastewater treatment plants as a source of antibiotic resistance transmission – an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees" spełnia wymogi przewidziane w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (DZ.U.z 2022r. poz.574 ze zm.). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie Pana mgr Wiktora Zygmunta Zielińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na duże znaczenie podjętego przez Doktoranta tematu, zakres przeprowadzonych badań, uzyskanie wartościowych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Katarzyna Bałdy-Chudzik