dr hab. Joanna Mokracka, prof. UAM
Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6; 61-614 Poznań

Poznań, 21.11.2022 r.

Review of doctoral dissertation by Wiktor Zieliński, M.Sc.,
entitled „Wastewater treatment plant as a source of antibiotic resistance transmission – an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees

The doctoral dissertation submitted for review was prepared at the Department of Water Protection Engineering and Environmental Microbiology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, under supervision of Professor Ewa Korzeniewska and Ewa Feliś, D.Sc., Ph.D., Associate Professor at Silesian University of Technology. The Candidate applies for a **Ph.D. degree in the field of natural sciences, discipline biological sciences**.

The dissertation is presented in English. It includes the following sections: a list of funding sources, a list of abbreviations, a list of publications included in the doctoral dissertation, abstracts in English and Polish, introduction, research objectives and hypotheses, results, conclusions, and references, followed by publications included in the dissertation with accompanying authors' statements. **The dissertation is complete; it has all essential parts** in proper layout. The references used for introduction and discussion of the results are up to date, appropriately chosen and reflects current state of knowledge.

The results of this dissertation were presented in the following articles published in journals indexed by Journal Citation Reports:

1. **Zieliński W.**, Buta M., Hubeny J., Korzeniewska E., Harnisz M., Nowrotek M., Płaza G. 2019. Prevalence of beta-lactamases genes in sewage and sludge treated in mechanical-biological wastewater treatment plants. *Journal of Ecological Engineering.* 20(9):80–86.

2. **Zieliński W.,** Korzeniewska E., Harnisz M., Hubeny J., Buta M., Rolbiecki D. 2020. The prevalence of drug-resistant and virulent *Staphylococcus* spp. in a municipal wastewater treatment plant and their spread in the environment. *Environment International*. 143, 105914.
3. **Zieliński W.**, Korzeniewska, E., Harnisz M., Drzymała J., Felis E., Bajkacz S. 2021. Wastewater treatment plants as a reservoir of integrase and antibiotic resistance genes – An epidemiological threat to workers and environment. *Environment International*. 156, 106641.
4. **Zieliński W.**, Hubeny J., Buta-Hubeny M., Rolbiecki D., Harnisz M., Paukszto Ł., Korzeniewska E. 2022. Metagenomics analysis of probable transmission of determinants of antibiotic resistance from wastewater to the environment – A case study. *Science of the Total Environment*. 827, 154354.

Cumulative Impact Factor of the journals in which the abovementioned articles were published is 37.457. The publications have six (article 2 and 3) to seven (articles 1 and 4) authors. Mr. Wiktor Zieliński is the first author of each article. The statements of the doctoral student and the co-authors indicate that he participated essentially (51% share in article 1, 55% in article 2, and 60% in articles 3 and 4) in every stage of article preparations, from literature review, sampling, experimental part, interpretation and presentation of results, to manuscript drafting and preparing response to reviewers' comments. Such multidimensional participation proves solid theoretical and practical knowledge on the research subject and shows that the doctoral student is capable of solving scientific problems.

The aim of the dissertation of Wiktor Zieliński, M.Sc., was to determine if conventional wastewater treatment plants contribute to transmission of potentially pathogenic bacteria and antibiotic resistance determinants to aquatic environment and upper respiratory system of wastewater treatment plant workers.

The issue of the spread of antibiotic-resistant microorganisms through wastewater is actual and relevant, keeping in mind the threat posed to the public health by constantly growing pool of antibiotic-resistant bacteria (ARB). Wastewater treatment plants (like hospitals) seem to be an environment in which the transfer of antibiotic resistance genes (ARGs) between bacterial strains is common, which, together with selection pressure, increases the emergency of resistant bacteria in the treated wastewater. Identification and complex characteristics of the routes of antibiotic resistance spread and the variables that affect it are crucial elements for creating global strategy of preventing further expansion of that phenomenon. The novel aspect of studies on antibiotic

resistance spread was to assess the possibility of transmission of potentially pathogenic and antibiotic-resistant bacteria to human upper respiratory tract through bioaerosol associated with wastewater treatment. In my opinion it is very interesting but at the same time challenging especially when it comes to methodology and interpretation of the results.

The doctoral student formulated two research hypotheses that He verified in four stages of the study. **In stage 1**, he characterized the occurrence of antibiotic resistance genes in wastewater during different stages of the treatment, sewage sludge, and the waters of the river receiving final effluents from two wastewater treatment plants using activated sludge process. The treatment plants were localized in Silesia and Warmia and Mazury, two regions that differ in the level of industrialization. Wiktor Zieliński, M.Sc., used PCR method to detect three β-lactamase genes (*bla*$_{OXA}$, *bla*$_{SHV}$, and *bla*$_{GES}$) in metagenomic DNA isolated from samples taken in summer and autumn. He found those genes in most of the samples, including final effluents, proving that β-latamase genes are not efficiently removed during treatment process, regardless of treatment plant localization. Moreover, the emergence of *bla*$_{OXA}$ in the river downstream the treated wastewater discharge point proves transmission of ARGs to surface waters through wastewater.

In the next steps, the doctoral student focused on mechanical-biological wastewater treatment plant in Olsztyn. **In stage 2**, Wiktor Zieliński, M.Sc., analyzed occurrence of antibiotic-resistant and virulent strains of *Staphylococcus* spp. in sewage and river water as well as swabs from the nose and throat of wastewater treatment plant employees and a control group. During three sampling events, he isolated 249 unique strains of *Staphylococcus* spp. and determined the frequency of *Staphylococcus aureus* (upon the *nuc* gene), five virulence-associated genes (*pvl*, *hla*, *tst1*, *sec*, and *sasX*) and genes determining resistance to antibiotics (*mecA* and *vanA*) and disinfectants (*qacA/B*). *S. aureus* strains were noted in all sample types with different frequency: the *nuc* gene was found in 63% of strains from sewage and river water and in 82% of strains isolated from the workers. The *mec* gene determining methicillin resistance was rarely detected; it was not found in strains isolated from sewage, river water and control group, but it was present in those originated from the treatment plant workers. The vancomycin resistance *vanA* gene was detected in isolates from human samples, from untreated wastewater, and in almost half of isolates from sewage sludge. Virulence genes were present more frequently in strains isolated from humans; the most common one, regardless of sample type, was *hla*. Moreover, the doctoral student determined the copy number of the *nuc* gene and ARGs, finding highest values for

untreated sewage. Nevertheless, the genes were present in the final effluent as well, which confirms the hypothesis about transmission of ARGs to river water through wastewater.

In my opinion, the most interesting aspect of this stage was assembling the results of ERIC-PCR genetic fingerprints with the presence of virulence and antibiotic resistance genes in different seasons. Strains isolated from the upper respiratory system of the workers clustered together with those originating from active sludge bioreactor and untreated sewage, which may indicate their genetic relationship and a possibility of their transmission through bioaerosol.

The analysis of metagenomic DNA of wastewater and river water samples as well as nasal and throat swabs collected from WWTP employees were conducted **in the third stage** of the study. Wiktor Zieliński, M.Sc., analyzed the absolute and relative abundance of 17 antibiotic and three heavy metal resistance genes, as well as three classes of integron integrase genes. All of the genes were present in the wastewater at consecutive treatment stages, with *bla*, MLS, sulphonamide and tetracycline resistance genes in highest numbers. Significantly, in river water, 13 resistance genes were identified, and downstream the wastewater discharge point their concentration was higher than upstream the discharge site, which may prove ARGs transmission to the river via treated wastewater. Determination of selected physicochemical parameters, measurement of 16 antibiotics and seven heavy metal concentrations at different stages of wastewater treatment enabled estimating their removal and establishing correlation between variables. Among many significant correlations that the Candidate calculated, those between the concentration of 12 ARGs, three integron integrases genes and *cnrA* gene conferring resistance to cobalt and nickel, and between ARGs concentration and zinc and copper, were noteworthy.

Wiktor Zieliński, M.Sc., also estimated the risk of ARGs transmission to upper respiratory tract of WWTP employees. In DNA isolated from pooled swabs, the relative abundance of the majority of ARG and *intI1* gene was significantly higher than in the control group; besides, three genes were identified only in employees' samples. All of the ARGs present in employees' pooled DNA were identified also in DNA from activated sludge bioreactor.

In the fourth stage of the study, metagenomic DNA of the aforementioned samples was subjected to next-generation sequencing, and the results were used for taxonomic composition analysis, estimation of presence and abundance of ARGs and insertion sequences. The highest taxonomic diversity was noted in untreated and the lowest in treated wastewater. The NGS results supported the research hypothesis that treated wastewater discharge increases microbial taxonomic

diversity and results in higher relative abundance of almost all ARGs and eight out of ten analyzed IS families in river water.

The results concerning microbial transmission to the upper respiratory tract of WWTP employees are most interesting. The phylum *Actinobacteria* predominant in wastewater from activated sludge bioreactor was also dominant in the upper respiratory tract samples, which may suggest their transmission. The relative abundance of some ARGs was similar to ARGs relative abundance in wastewater, and there were significant correlations between the employees' ARGs relative abundance and the abundance of microbial taxa identified in swabs and wastewater from activated sludge bioreactor. It is worth mentioning that DNA derived from WWTP employees' samples contained IS families, namely IS*3*, IS*30*, IS*66*, and ISL*3*, that are not characteristic for human microbiota, and which were detected in untreated wastewater and wastewater from activated sludge bioreactor. All the data support the hypothesis that wastewater and the emitted bioaerosol presumably contribute to the transmission of microorganisms, in particular bacteria of the phylum *Actinobacteria* and the associated antibiotic resistance genes to the upper respiratory tract of WWTP employees.

Questions and critical comments

The presented doctoral dissertation is based upon a series of articles that have been published, so they already were subjected to peer review and passed critical evaluation. Nevertheless, I would like Mr. Wiktor Zieliński to address the following issues:

1. The *bla*$_{\text{OXA}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$ and *bla*$_{\text{TEM}}$ genes were chosen for evaluation of the dispersal of *bla* genes in aquatic environments (articles 1 and 3). Those genes emerged in the genomes of clinical strains long time ago and since then managed to spread in the genomes of environmental strains; hence, it is difficult to evaluate the dynamics of changes in their frequency. What was the reason for choosing those genes? Wouldn't *bla*$_{\text{CTX-M}}$ be a better choice? Moreover, in the case of article 1, quantitative analysis could have provided more information about the burden of those genes.

2. The result of ERIC-PCR analysis in the study concerning potentially pathogenic and antibiotic-resistant *Staphylococcus* spp. was a conclusion about genetic similarity of some groups of isolates. What was the percentage of that similarity? Wouldn't strains belonging to the same species, e.g. *S. aureus*, show more related fingerprints due to species similarity?

3. Insertion sequences atypical for physiological microbiota (IS*3*, IS*30*, IS*60*, and ISL*3*; article 4) were found in swab samples from the wastewater treatment plant workers, as well as in samples from untreated sewage and bioreactor. Can their presence be an effect of the transmission of microorganisms from bioaerosol created during wastewater treatment? Are there any other reasons?

Conclusions

The doctoral dissertation of Wiktor Zieliński, M.Sc., is a valuable contribution to the knowledge on transmission of antibiotic-resistant and potentially pathogenic bacteria from mechanical-biological wastewater treatment plants to aquatic environments and upper respiratory tract of the treatment plant workers. The articles included in the dissertation are thematically coherent in presenting the results in a logical way. In order to achieve the aim of the study, Mr Wiktor Zieliński had to become familiar with a variety of experimental methods, ranging from classic microbiological methods, molecular biology methods to advanced bioinformatic and statistical tools used for analyzing the results of metagenomic analyses. I highly appreciate the presented dissertation. Wiktor Zieliński, M.Sc., verified research hypotheses and achieved the aim of the study, additionally obtaining results that are valuable contribution to the knowledge on selection and co-selection processes in a mechanical-biological wastewater treatment plant.

The doctoral dissertation can (and should) trigger changes in protective measures for the wastewater treatment plant workers and lead to implementing procedures allowing effective removal and antibiotic-resistant bacteria and ARGs from treated wastewater.

In conclusion, **the dissertation of Wiktor Zieliński, M.Sc., meets the requirements for doctoral dissertations defined in Article 187 of the Act of 20 July 2018 "Law on higher education and science" (Journal of Laws, 2022, Item 574). Therefore, I ask the Scientific Council of Biological Sciences Discipline of University of Warmia and Mazury to admit Mr. Wiktor Zieliński to further stages of the defense of his doctoral thesis.** Taking into account a wide variety of experimental methods, overall high level of the research, publication of the results in renowned journal, and its application potential, I ask the Scientific Council of Biological Sciences Discipline of University of Warmia and Mazury to **recognize this dissertation with an appropriate award.**

Joanna Kotowska

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii

dr hab. Joanna Mokracka, prof. UAM
Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6; 61-614 Poznań

Poznań, 21.11.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Wiktora Zielińskiego
pt. „Wastewater treatment plant as a source of antibiotic resistance transmission - an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees"
„Oczyszczalnie ścieków jako źródło transmisji antybiotykooporności - zagrożenie epidemiologiczne dla środowiska wodnego i pracowników zakładu")

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Wiktora Zielińskiego została wykonana Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem promotorów: prof. dr hab. inż. Ewy Korzeniewskiej i profesor Politechniki Śląskiej dr hab. inż. Ewy Feliś. Kandydat ubiega się o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

Przedłożoną do oceny rozprawę przygotowano w języku angielskim. Składa się z wykazu źródeł finansowania, spisu skrótów, wykazu publikacji składających się na dysertację, streszczenia w języku angielskim i polskim, wstępu, celu i hipotez badawczych, metodyki i wyników badań, podsumowania i wniosków, oraz bibliografii. Do autoreferatu dołączono kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów. Rozprawa jest kompletna – zawiera wymagane części, a ich układ jest prawidłowy. Piśmiennictwo wykorzystane do opracowania i przedyskutowania rezultatów jest aktualne i zostało właściwie dobrane i odzwierciedla aktualny stan wiedzy dotyczący tematu.

Wyniki będące przedmiotem dysertacji zawarto w czterech pozycjach opublikowanych w latach 2019-2022 w czasopismach z listy Journal Citation Reports:

1. **Zieliński W.**, Buta M., Hubeny J., Korzeniewska E., Harnisz M., Nowrotek M., Płaza G. 2019. Prevalence of beta lactamases genes in sewage and sludge treated in mechanical-biological wastewater treatment plants. *Journal of Ecological Engineering.* 20(9): 80-86.

2. **Zieliński W.,** Korzeniewska E., Harnisz M., Hubeny J., Buta M., Rolbiecki D. 2020. The prevalence of drug-resistant and virulent *Staphylococcus* spp. in a municipal wastewater treatment plant and their spread in the environment. *Environment International*. 143, 105914.
3. **Zieliński W.**, Korzeniewska, E., Harnisz M., Drzymała J., Felis E., Bajkacz S. 2021. Wastewater treatment plants as a reservoir of integrase and antibiotic resistance genes – An epidemiological threat to workers and environment. *Environment International*. 156, 106641.
4. **Zieliński W.**, Hubeny J., Buta-Hubeny M., Rolbiecki D., Harnisz M., Paukszto Ł., Korzeniewska E. 2022. Metagenomics analysis of probable transmission of determinants of antibiotic resistance from wastewater to the environment – A case study. *Science of the Total Environment*. 827, 154354

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) czasopism, w których opublikowano ww. prace wynosi 37,457. Wszystkie prace są wieloautorskie – mają sześciu (prace 2 i 3) i siedmiu (praca 1 i 4) współautorów. Pan mgr Wiktor Zieliński jest pierwszym autorem wszystkich przedstawionych prac. Z oświadczeń złożonych przez Doktoranta oraz współautorów prac wynika, że **miał on istotny udział w ich przygotowaniu** (pierwsza praca 51%, druga 55%, trzecia i czwarta po 60%). Doktorant uczestniczył w przygotowaniu pracy na każdym etapie jej tworzenia, od zebrania i przeglądu literatury, poprzez pobory materiałów, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, analizę, interpretację i prezentację wyników, po przygotowanie manuskryptów oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów. Tak wielowymiarowy udział świadczy o rzetelnej teoretycznej i praktycznej znajomości zagadnienia i o przygotowaniu Doktoranta do rozwiązywania problemów badawczych.

Celem rozprawy doktorskiej Pana mgr. Wiktora Zielińskiego było określenie czy konwencjonalne oczyszczalnie ścieków przyczyniają się do transmisji potencjalnie chorobotwórczych bakterii i determinant antybiotykooporności do środowiska wodnego i do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni.

Zagadnienie związane z rozprzestrzenianiem się antybiotykoopornych mikroorganizmów poprzez ścieki oczyszczone jest aktualne i zasadne, wziąwszy pod uwagę zagrożenie, jakie dla zdrowia publicznego stwarza ciągle powiększająca się pula bakterii lekoopornych w środowisku. Oczyszczalnie ścieków wydają się być środowiskiem, w którym, podobnie jak w szpitalnym, wymiana genów oporności na antybiotyki pomiędzy bakteriami

jest procesem powszechnym a towarzysząca temu selekcja powoduje, że w ścieku oczyszczonym bakterie oporne pojawiają się ze zwiększoną częstością. Identyfikacja, pełna charakterystyka dróg i zmiennych wpływających na rozprzestrzenianie się antybiotykooporności jest jednym z kluczowych elementów tworzenia globalnej strategii ograniczenia jej narastania. Wyznaczony przez Doktoranta cel dotyczący zbadania możliwości transmisji potencjalnie chorobotwórczych bakterii i bakterii lekoopornych do dróg oddechowych ludzi poprzez bioaerozole towarzyszące procesom oczyszczania jest w mojej ocenie nowym i bardzo interesującym aspektem badań. Dodać należy, że jest to metodycznie i interpretacyjnie niezwykle wymagające zadanie.

Doktorant sformułował dwie hipotezy badawcze, które zweryfikował w czterech etapach badań. W **pierwszej części** mgr Wiktor Zieliński scharakteryzował występowanie genów oporności w ściekach z różnych etapów oczyszczania, osadzie ściekowym, i wodzie odbiornika ścieków, z dwóch oczyszczalni wykorzystujących technologię osadu czynnego, a zlokalizowanych na terenach różniących się stopniem uprzemysłowienia (Śląsk i Warmia i Mazury). Oznaczając w metagenomowym DNA prób pobranych dwukrotnie (latem i jesienią) metodą PCR trzy geny β-laktamaz (*bla*$_{OXA}$, *bla*$_{SHV}$ i *bla*$_{TEM}$) mgr Wiktor Zieliński stwierdził występowanie *bla*$_{OXA}$ i *bla*$_{TEM}$ w większości prób; w tym w ściekach oczyszczonych, czym wykazał, że w przypadku obu oczyszczalni, niezależnie od ich lokalizacji, w procesie oczyszczania ścieków geny ww. β-laktamaz nie są skuteczne usuwanie, przy czym pojawienie się genów *bla*$_{OXA}$ w wodzie odbiornika po zrzucie ścieków, dowodzi transmisji ARG do wód powierzchniowych poprzez ścieki oczyszczone.

W dalszych kolejności Doktorant skupił się na badaniach dotyczących mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków w Olsztynie. W **drugim etapie badań** mgr Wiktor Zieliński analizował występowanie antybiotykoopornych i wirulentnych szczepów *Staphylococcus* spp. w ściekach i wodzie rzecznej oraz w wymazach z nosa i gardła pracowników oczyszczalni oraz grupy kontrolnej w trzech sezonowych poborach. Efektem było wyizolowanie 249 unikalnych izolatów *Staphylococcus* spp., które Doktorant scharakteryzował pod względem częstości *Staphylococcus aureus* (gen *nuc*), występowania pięciu genów wirulencji (*pvl, hla, tst1, sec, sasX*), genów oporności na antybiotyki (*mecA, vanA*) i środki dezynfekcyjne (*qacA/B*). Szczepy *S. aureus* występowały we wszystkich próbach z różną częstością: gen *nuc* stwierdzono u 63% szczepów ze ścieków i wody rzecznej i 82% wyizolowanych od pracowników. Gen oporności na meticylinę, *mecA*, odnotowano stosunkowo rzadko, nie wykryto go u szczepów wyizolowanych ze ścieków, wody rzecznej i

od osób z grupy kontrolnej, ale pojawił się u tych pochodzących od pracowników oczyszczalni. Gen *vanA,* warunkujący oporność na wankomycynę, wykryto u szczepów ze ścieku nieoczyszczonego, u prawie połowy z osadu ściekowego, i u pracowników. Geny wirulencji występowały z większą częstością u szczepów wyizolowanych od ludzi, a najczęściej występującym u szczepów izolowanych zarówno od ludzi jak i ze ścieków i wody rzecznej był *hla.* W metagenomowym DNA Doktorant oznaczył liczbę kopii genu *nuc* i badanych ARG, których najwięcej było w ściekach nieoczyszczonych, ale obecne były także w ściekach oczyszczonych, co potwierdza hipotezę o ich transmisji do wody rzecznej.

W mojej ocenie najbardziej interesującym było złożenie wyników analizy podobieństwa genetycznego ERIC-PCR i występowania genów wirulencji i lekooporności u badanych szczepów w zależności od sezonu. Szczepy wyizolowane z górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni utworzyły skupienie z pochodzącymi ze ścieków z bioreaktora z osadem czynnym, oraz ścieków nieoczyszczonych, co może świadczyć o ich podobieństwie genetycznym i możliwej transmisji poprzez bioaerozole.

Oznaczenia w metagenomowym DNA ścieków i wody rzecznej oraz połączonych prób z wymazów od pracowników oczyszczalni były kontynuowane **w trzecim etapie pracy**. Doktorant badał częstość absolutną i względną 17 genów oporności na antybiotyki, trzech oporności na metale ciężkie i genów integraz trzech klas integronów. Wszystkie geny oporności były wykryte w ściekach na różnych etapach oczyszczania, najwięcej było genów *bla*, oporności na MLS, sulfonamidy i tetracykliny. Istotnym jest, że w wodzie rzecznej zidentyfikowano 13 genów i po zrzucie ścieków było ich więcej niż przed co świadczy o ich transmisji poprzez ścieki oczyszczone. Oznaczenia wybranych czynników fizykochemicznych i stężenia 16 antybiotyków i siedmiu metali ciężkich umożliwiło określenie stopnia usuwania tych substancji w trakcie procesu oczyszczania ścieków i było podstawą do wyznaczenia zależności pomiędzy zmiennymi. Doktorant wyznaczył szereg istotnych korelacji wśród nich te między liczbą kopii 12 genów oporności i genów 3 klas integraz a genem oporności na kobalt i nikiel, *cnrA*, oraz między liczbą kopii genów oporności a stężeniem cynku i miedzi.

Mgr Wiktor Zieliński oceniał również ryzyko transmisji ARG do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. W próbach DNA z łączonych wymazów od pracowników oczyszczalni odnotowano większe częstości większości badanych genów niż u osób z grupy kontrolnej, a trzy genów z nich odnotowano wyłącznie u pracowników. Wszystkie te geny były identyfikowane w ściekach z bioreaktora.

W czwartym etapie badań metagenomowy DNA z ww. materiałów został poddany sekwencjonowaniu nowej generacji, a uzyskane dane analizie składu taksonomicznego populacji oraz częstości genów ARG i sekwencji insercyjnych. Największe zróżnicowanie taksonomiczne odnotowano w ściekach nieoczyszczonych, najmniejsze w oczyszczonych. Wyniki analiz potwierdziły hipotezę, dotycząca transmisji mikroorganizmów do wody rzecznej: zrzut ścieków zwiększył różnorodność taksonomiczną mikroorganizmów i względną częstość prawie wszystkich genów lekooporności i ośmiu z 10 badanych rodzin sekwencji insercyjnych. W wodzie rzecznej po zrzucie ścieków oczyszczonych wykryto ARG, których nie było przed zrzutem ścieków.

Niezwykle interesujące są wyniki dotyczące transmisji mikroorganizmów i genów do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Częstości niektórych ARG uzyskanych w preparatach z nosogardzieli były zbliżone do częstości tych genów w ściekach, a między częstościami ARG i liczebnością taksonów zidentyfikowanych w nosogardzieli i w ściekach z bioreaktora mgr Wiktor Zieliński otrzymał pozytywne korelacje. Na uwagę zasługuje to, że próbach od pracowników oczyszczalni zidentyfikowano sekwencje insercyjne, które nie są typowe dla mikrobioty fizjologicznej, a były wykryte w próbkach ścieków nieoczyszczonych i w ściekach z bioreaktora mianowicie IS*3*, IS*30*, IS*66* i ISL*3*, co świadczyć może o transmisji bakterii z bioaerozolu do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Uzyskane wyniki wspierają hipotezę o możliwości transmisji mikroorganizmów, w szczególności z typu *Actinobacteria*, z genami oporności na antybiotyki z bioaerozolu towarzyszącemu WWTP do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni.

Pytania i uwagi krytyczne

Przedstawione do oceny artykuły podlegały krytycznej ocenie recenzentów, niemniej jednak pozwolę sobie zamieścić kilka uwag i pytań:

1. Do oceny rozprzestrzeniania się genów *bla* w środowisku wodnym wybrano geny *bla*$_{OXA}$, *bla*$_{SHV}$ i *bla*$_{TEM}$ (praca 1 i 3). Geny te pojawiły się stosunkowo dawno w genomach szczepów klinicznych i rozprzestrzeniły się szeroko w genomach szczepów środowiskowych, stąd często trudno określić dynamikę zmian ich częstości. Czym uzasadnić taki wybór i czy lepszym wyborem do oceny różnic nie byłby *bla*$_{CTX-M}$? Dodatkowo czy w

przypadku pierwszej pracy oznaczenia ilościowe nie dostarczyłyby pełniejszych informacji o obciążeniu środowiska tymi genami?

2. W badaniach dotyczących chorobotwórczych i opornych szczepów *Staphylococcus* spp. efektem analizy ERIC były wnioski o wysokim podobieństwie genetycznym grup izolatów. Jaki był procent tego podobieństwa? Czy szczepy należące do tego samego gatunku, np. *S. aureus*, nie dają w tej metodzie zbliżonych profili ze względu na podobieństwo gatunkowe?

3. W próbkach wymazów od pracowników zidentyfikowano sekwencje insercyjne, które nie są typowe dla mikrobioty fizjologicznej, a były wykryte w próbkach ścieku nieoczyszczonych i w ściekach z bioreaktora mianowicie IS*3*, IS*30*, IS*66* i ISL*3* (praca 4). Czy i jeśli tak, to jakie inne przesłanki świadczą, że ich obecność to efekt transmisji mikroorganizmów z bioaerozolu towarzyszącego oczyszczaniu ścieków?

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pana mgr. Wiktora Zielińskiego stanowi cenny wkład w wiedzę dotyczącą rozprzestrzeniania się poprzez mechaniczno-biologiczną oczyszczalnie ścieków bakterii lekoopornych i potencjalnie chorobotwórczych w środowisku wodnym oraz ich transmisji do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Przedstawione artykuły są tematycznie spójne, i w uporządkowany sposób prezentują wyniki. Do realizacji postawionych celów pracy doktorskiej Pan mgr Wiktor Zieliński opanował różnorodny i nowoczesny warsztat badawczy, od mikrobiologicznych metod hodowlanych, przez analizy biologii molekularnej, po zaawansowane metody bioinformatyczne i statystyczne służące do opracowania wyników analiz metagenomicznych. Przedłożoną do oceny dysertację oceniam wysoko. Rozprawa realizuje postawiony cel, mgr Wiktor Zieliński zweryfikował postawione hipotezy badawcze, dodatkowo wykonując szereg analiz, które stanowią wartościowy wkład do wiedzy o procesach selekcji i koselekcji w mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków.

Rozprawa może i powinna stać się przyczynkiem do zmian w ochronie pracowników oczyszczalni ścieków, jak i wdrożenia procedur prowadzących do efektywniejszego usuwania bakterii lekoopornych i genów ARG ze ścieku oczyszczonego

Podsumowując, uważam, że **rozprawa doktorska Pana mgr Wiktora Zielińskiego spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Biorąc pod uwagę szeroki wachlarz zastosowanych technik badawczych, wysoki poziom merytoryczny zaprezentowanych badań skutkujący ich opublikowaniem w uznanych czasopismach, ich wartość poznawczą i aplikacyjną, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą**.

Joanna Mokrzycka.