dr hab. Maria Swiontek Brzezinska, NCU Prof.
Faculty of Biological and Veterinary Sciences
Department of Environmental Microbiology and Biotechnology
Nicolaus Copernicus University in Toruń

NICOLAUS COPERNICUS
UNIVERSITY
IN TORUŃ

Review

doctoral thesis by M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński titled "Wastewater treatment plants as a source of antibiotic resistance transmission - an epidemiological threat to the aquatic environment and plant employees", was carried out in the Department of Water Protection Engineering and Environmental Microbiology UWM, under the scientific supervision of Prof. Ewa Korzeniowska and dr hab. Ewa Felis, SUT Prof.

The doctoral thesis submitted by M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński, presents the results of study of the occurrence of genes determining resistance to beta-lactam drugs, the antibiotic-resistant and virulent strains of the genus *Staphylococcus* and the transmission of antibiotic resistance genes. The research topic is very interesting and contributes very important information to biological sciences. Wastewater is a major source of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes, which, by entering the environment, can be further spread. At the same time, bioaerosols emitted during wastewater treatment in activated sludge chambers lead to the transfer of antibiotic-resistant genes into the upper respiratory tract of wastewater treatment plant workers. We currently have a serious problem with strains resistant to the antibiotics used. Transmission of antibiotic resistance genes is one of the many causes of resistant strains. I, therefore, believe that the results obtained by M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński are particularly important and relevant to the operation of wastewater treatment plants.

Structure of the doctoral thesis is very well thought out. At the beginning, the doctoral student provided a list of publications with current bibliometric parameters and a summary of the research in both English and Polish. The doctoral thesis was divided into 4 stages with a total of 4 scientific publications. All stages of the research form an integral whole and precisely written. The author has published the results of his research in high impact journals: 2 papers in Environment International (IF 13.352), 1

paper in Science of the Total Environment (IF 10.753) and 1 paper in Journal of Ecological Engineering (IF 1.339). These journals also have high scores from the Ministry of Science and Higher Education. Science of the Total Environment has 200 points, Environment International has 140 points. Journal of Ecological Engineering has the least, 40 pts. However, this does not detract from the contribution of M.Sc. Wiktor Zygmunt Zielinski. In all the publications, the PhD student is the first author and his contribution to the preparation of the papers was significant. In all the paper, the doctoral student was involved in planning the experiment, carrying out the experiments, analysing and interpreting the results. M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński, performed the literature search and prepared the first manuscript on his own. For each publication, the doctoral student included statements of co-authors of the papers.

In the first stage of the research, the doctoral student focused on analysing the occurrence of beta-lactam drug resistance genes in the water of the River Łyna, sewage sludge and wastewater obtained from all stages of treatment. In the study, he used standard PCR chain reaction techniques. Different beta-lactam antibiotic resistance genes were detected in the samples analysed, depending on the type of wastewater and sampling time. According to the doctoral student, wastewater treatment processes do not completely remove antibiotic-resistant genes from wastewater, which may pose a risk of transmission of these genes into the aquatic environment. The results of this research have been published in the lowest-ranked journal, the Journal of Ecological Engineering.

This stage of the research raises questions for me:

- why did the doctoral student sample in summer and autumn and not all seasons, why did the author omit spring and autumn, at which time the wastewater is also treated and may emit antibiotic resistance genes

- what could be the reason that the wastewater treatment process does not remove resistance genes

In the second stage, the doctoral student analysed the occurrence of antibiotic-resistant and virulent strains of *Staphylococcus* bacteria in river water (before and after wastewater discharge), wastewater (untreated, activated sludge chamber and treated) and swabs from the upper respiratory tract (nose and throat) of wastewater treatment plant employees. Samples were collected in winter, summer and autumn. Identification

of the nuclease gene and antibiotic-resistant genes was performed from the samples after isolation of genomic DNA. In this part, 249 bacterial strains were obtained and analysed. This stage of the research appears to be very labour-intensive and the doctoral student obtained interesting results that indicate that wastewater treatment is the source of antibiotic-resistant genes, while treated wastewater can affect their transmission in the aquatic environment. The doctoral student published the results of this research in a high-scoring journal (Environmental International). Methodologically and graphically, the publication is excellently prepared.

At this stage, the questions that come to my mind are:

- why did the doctoral student sample in winter, summer and autumn, why were samples not taken in spring

- whether the seasons altered the concentration of resistance genes studied

In the third stage, the doctoral student investigated the degree of transmission of pollutants with the treated wastewater into the river water and with bioaerosol emitted during aeration and mixing of the wastewater into the upper respiratory tract of wastewater treatment plant employees. Samples were taken in winter, summer and autumn due to potential differences in antibiotic consumption. In different seasons,antibiotic resistance determinant genes, heavy metal resistance genes and integrase genes were identified in the material obtained. Analyses were carried out using qPCR methods. The results of this step showed a significant influence of environmental physicochemical parameters on the change in the number of antibiotic-resistant genes in water bodies and their transmission in the environment. The correlation between the concentration of antibiotic-resistant genes and the concentration of heavy metals, especially zinc and copper, was also significant. The results of this part of the study were also published in a high-scoring journal, Environment International. The publication was prepared with great precision. Materials and methods, the doctoral student described in detail and according to the techniques used in molecular biology. In this publication, M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński presented the results of his research in the form of figures and tables very clear. The tables presented as a supplement are valuable element of this paper. A publication prepared in this way demonstrates the scientific maturity and writing skills of the doctoral student.

In the fourth and final stage, the doctoral student considered two issues related to the transmission of antibiotic resistance agents together with the bioaerosol produced during wastewater treatment into the upper respiratory tract of wastewater treatment plant employees and the entry of antibiotic resistance agents together with cleaned wastewater into the river. The results of the research were published in a journal in a very high-scoring journal - Science of the Total Environment. Based on this research, the doctoral student indicated that the discharge of wastewater increases the pool of genetic determinants of antibiotic resistance in surface water and indicates the danger of their transmission to the upper respiratory tract of workers.The findings were certainly valuable. The research points indicatedthe need to implement protective and preventive measures for wastewater treatment plant workers, and to develop new wastewater treatment technologies to minimise bioaerosol emissions. In my opinion, these conclusions are crucial to the entire research project.

This stage of the research raises the question for me:

- what kind of new wastewater treatment technologies would minimise bioaerosol emissions and whether there are any options for treating the bioaerosol itself to ensure the safety of wastewater treatment plant workers

After the detailed analysis of the doctoral thesis andseeing the results published in good journals lead me to give a positive evaluation. Publishing research results in such a high-scoring journals requires a great deal of knowledge including literature, research methodologies discipline and humility as well. The publications were evaluated by numerous foreign reviewers and that must have required great responsibility for the results. The molecular techniques used demonstrate the doctoral student's scientific maturity and precision. The author has excellently fulfilled the research tasks undertaken. I consider the results of the present research work significant, which were also appreciated by foreign reviewers.The research work related to the bioaerosols generated at wastewater treatment plants is particularly relevant for the employees of wastewater treatment plants. My minor remark, which does not affect the final decision, concerns the lack of information concerning the doctoral student's achievements (list of publications not included in the spin-off, participation in conferences or scientific internships).

In view of the positive evaluation of the doctoral thesis, I submit to the Scientific Council of the Discipline of Biological Sciences of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn a motion to admit M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński to further stages of the doctoral procedure. The doctoral thesis meets the requirements set out in Article 187 of the Act of 20 July 2018. Law on Higher Education and Science (consolidated text: Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm).

At the same time, I request that an award be granted to M.Sc. Wiktor Zygmunt Zieliński for the results of his scientific work.

Toruń 3.11.2022 Krzysztof Bucziński

dr hab. Maria Swiontek Brzezinska, prof. UMK
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Wiktora Zygmunta Zielińskiego zatytułowana "Oczyszczanie ścieków jako źródło transmisji antybiotykooporności - zagrożenie epidemiologiczne dla środowiska wodnego i pracowników zakładu", wykonanej w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej UWM, pod opieką naukową prof. dr hab. Ewy Korzeniowskiej i dr hab. Ewy Felis, prof. PŚ.

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr inż. Wiktora Zygmunta Zielińskiego, przedstawia wyniki badań nad występowaniem genów determinujących oporność na leki beta-laktamowe, antybiotykoopornych i wirulentnych szczepów z rodzaju *Staphylococcus* oraz przekazywaniem genów oporności na antybiotyki w wodzie rzeki Łyna i ściekach na różnych etapach oczyszczania. Tematyka badań jest bardzo ciekawa i wnosi bardzo ważne informacje do nauk biologicznych. Ścieki są głównym źródłem bakterii antybiotykoopornych i genów antybiotykooporności, które dostając się do środowiska mogą być dalej rozpowszechniane. Jednocześnie bioaerozole emitowane podczas oczyszczania ścieków w komorach osadu czynnego prowadzą do przenoszenia genów antybiotykoopornych do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Obecnie mamy poważny problem ze szczepami opornymi na stosowane antybiotyki. Transmisja genów oporności na antybiotyki jest jedną z wielu przyczyn powstawania szczepów opornych. Dlatego uważam, że wyniki uzyskane przez mgr inż. Wiktora Zygmunta Zielińskiego są szczególnie ważne i istotne dla funkcjonowania oczyszczalni ścieków.

Układ pracy jest bardzo dobrze przemyślany. Na początku, doktorat podał spis publikacji z aktualnym parametrami bibliometrycznymi oraz streszczenie badań w języku angielskim i polskim. Praca doktorska została podzielona na 4 etapy, w których łącznie ukazały się 4 publikacje naukowe. Wszystkie etapy badań stanowią integralną

całość, dobrze przemyślaną i precyzyjnie napisane. Autor opublikował wyniki swoich badań w czasopismach o wysokich parametrach: 2 prace w Environment International (IF 13,352), 1 praca w Science of the Total Environment (IF 10,753) oraz 1 praca w Journal of Ecological Engineering (IF 1,339). Są to czasopisma, które mają również wysoką punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Science of the Total Environment ma 200 pkt, Environment International ma 140 pkt. Journal of Ecological Engineering ma najmniej - 40 pkt. Nie umniejsza to jednak wkładu pracy mgr inż. Wiktora Zygmunta Zielińskiego. We wszystkich publikacjach doktorat jest pierwszym autorem, a jego udział w przygotowaniu prac był znaczący. We wszystkich pracach, doktorat brał współudział w planowaniu doświadczenia, w przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników. Mgr inż. Wiktor Zygmunt Zieliński samodzielnie wykonywał przegląd literatury i przygotowywał pierwotny manuskrypt. Do każdej publikacji, doktorant dołączył oświadczenia współautorów prac.

W pierwszym etapie badań doktorant skupił się na analizie występowania genów oporności na leki beta-laktamowe w wodzie rzeki Łyna, osadzie ściekowym i ściekach pozyskanych z wszystkich etapów oczyszczania. W badaniach wykorzystał standardowe techniki reakcji łańcuchowej PCR. W analizowanych próbach, w zależności od rodzaju ścieków i czasu poboru próby, wykryto różne geny oporności na antybiotyki beta-laktamowe. Według doktoranta procesy oczyszczania ścieków nie usuwają całkowicie genów antybiotykoopornych ze ścieków, co może stwarzać ryzyko transmisji tych genów do środowiska wodnego. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie najsłabiej punktowanym - Journal of Ecological Engineering.

W tym etapie badań nasuwają mi się pytania:

- dlaczego doktorant pobierał próby latem i jesienią, a nie przez wszystkie sezony, dlaczego autor pominął wiosnę i jesień, w tym czasie również ścieki są oczyszczane i mogą emitować geny antybiotykooporności

- co może być przyczyną, że proces oczyszczania ścieków nie usuwa genów oporności

W drugim etapie doktorant analizował występowanie antybiotykoopornych oraz wirulentnych szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus* w wodzie rzecznej (przed i po zrzucie ścieków), ściekach (nieoczyszczonych, z komory napowietrzania i oczyszczonych) oraz wymazach z górnych dróg oddechowych (nosa i gardła)

pracowników oczyszczalni ścieków. Próbki pobierano zimą, latem i jesienią. Z badanych próbek po wyizolowaniu genomowego DNA wykonano identyfikację genu nukleazy oraz genów antybiotykoopornych. W tej części uzyskano 249 szczepów bakteryjnych, które poddano analizie. Ten etap badań wydaje się bardzo pracochłonny, a doktorant uzyskał ciekawe wyniki, które wskazują, że oczyszczanie ścieków są źródłem genów antybiotykooporości, natomiast ścieki oczyszczone mogą wpływać na transmisję ich w środowisku wodnym. Wyniki tych badań doktorant opublikował w wysoko punktowanym czasopiśmie (Environmental International). Publikacja pod względem metodycznym i graficznym jest doskonale przygotowana.

W tym etapie nasuwają mi się pytania:

- dlaczego doktorant pobierał próbki zimą, latem i jesienią, dlaczego nie pobierano próbek wiosną.

- czy pory roku wpływały na zmianę koncentracji badanych genów oporności

W trzecim etapie, doktorant badał stopień transmisji zanieczyszczeń wraz ze ściekami oczyszczonymi do wody rzecznej oraz z bioaerozolem emitowanym podczas napowietrzania i mieszania ścieków do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Próby pobierano zima, latem i jesienią ze względu potencjalne różnice w spożyciu antybiotyków. W uzyskanym materiale identyfikowano geny warunkujące antybiotykooporność, geny oporności na metale ciężkie oraz geny integrazy. Analizy były prowadzone w oparciu o metody qPCR. Wyniki badań tego etapu wykazały istotny wpływ środowiskowych parametrów fizykochemicznych na zmianę ilości genów antybiotykoopornych w zbiornikach wodnych oraz ich transmisję w środowisku. Istotne znaczenie miała również korelacja między stężeniem genów antybiotykoopornych, a stężeniem metali ciężkich, szczególnie cynku i miedzi. Wyniki badań tej części zostały opublikowane również w wysoko punktowanym czasopiśmie – Environment International. Publikację przygotowano z ogromną precyzją. Materiały i metody, doktorant opisał szczegółowo i zgodnie z technikami stosowanymi w biologii molekularnej. W omawianej publikacji, mgr inż. Wiktor Zygmunt Zieliński wyniki swoich badań przedstawił w postaci wykresów i tabel w sposób czytelny i klarowny. Bardzo cennym elementem tej pracy są tabele przedstawione w suplemencie. Tak przygotowana publikacja świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności pisania doktoranta.

W czwartym, ostatnim etapie, doktorant rozważał dwa zagadnienia związane z transmisją czynników antybiotykooporności wraz z bioaerozolem wytwarzanym podczas oczyszczania ścieków do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni oraz przedostaniem się czynników antybiotykoodporności wraz ze ściekami czyszczonymi do rzeki. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie w bardzo wysoko punktowanym czasopiśmie - Science of the Total Environment. Na podstawie tych badań, doktorat wskazał, że odprowadzenie ścieków zwiększa pulę genetycznych determinantów antybiotykoodporności w wodach powierzchniowych i wskazuje na niebezpieczeństwo ich transmisji do górnych dróg oddechowych pracowników. Są to bardzo cenne wnioski, badania wskazują na potrzebę wdrożenia środków ochronnych i zapobiegawczych dla pracowników oczyszczalni ścieków, a także opracowania nowych technologii oczyszczania ścieków w celu zminimalizowania emisji bioaerozolu. Według mojej opinii te wnioski są kluczowe dla całego projektu badawczego.

W tym etapie badań nasuwa mi się pytanie:

- jakie nowe technologie oczyszczania ścieków pozwoliłyby na zminimalizowanie emisji bioaerozolu oraz czy istnieją możliwości oczyszczania samego bioaerozolu, aby zapewnić bezpieczeństwo pracownikom oczyszczalni ścieków

Po pełnej analizie pracy doktorskiej, przedstawione i opublikowane wyniki w bardzo dobrych czasopismach skłaniają mnie do wydania pozytywnej oceny. Opublikowanie wyników badań w tak wysoko punktowanych czasopismach wymagało od doktoranta ogromnej wiedzy, znajomości literatury, pracy i dyscypliny, a także pokory. Publikacje były oceniane przez licznych recenzentów zagranicznych i to z pewnością wymagało dużej odpowiedzialności za uzyskane wyniki. Zastosowane techniki molekularnych świadczą o dojrzałości naukowej doktoranta i ogromnej precyzji. Autor wywiązał się znakomicie z realizacji podjętych zadań badawczych. Wyniki badań uważam za bardzo cenne i zostały one docenione również przez zagranicznych recenzentów. Biorąc pod uwagę, że w badaniach brane były pod uwagę zagadnienia związane z bioaerozolem wytwarzanym na terenie oczyszczalni ścieków, wyniki badań są szczególnie istotne dla pracowników oczyszczalni. Moja drobna uwaga, która nie wpływa na ostateczną decyzję dotyczy braku informacji dotyczącej dorobku doktoranta (spis publikacji nie wchodzące w spinkę, udział w konferencjach czy staże naukowe).

W związku z pozytywną oceną rozprawy doktorskiej, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Wiktora Zygmunta Zielińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska odpowiada wymaganiom określonym 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.).

Jednocześnie wnioskuję o przyznanie nagrody dla mgr inż. Wiktora Zygmunta Zielińskiego za uzyskane wyniki pracy naukowej.

Toruń, 3.11.2022 Stanisław Brzeziński