Ryszard Koczura, D.Sc., Ph.D.,
Department of Microbiology, Faculty of Biology
Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6; 61-614 Poznań

Poznań, 21.11.2022 r.

Review of the doctoral dissertation by Martyna Buta-Hubeny, M.Sc., entitled „ Diversity and transmission of genetic resistance determinants in anthropogenically modified environments according to the "One Health" approach"

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 Dr. Ewa Felis, D.Sc., Ph.D., Associate Professor at Silesian University of Technology. The Candidate applies for **Ph.D. degree in the field of natural sciences, discipline biological sciences**.

The dissertation is presented in English. It includes a list of funding sources, a brief description of Candidate's scientific achievements, 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 four articles (with supplementary data) included in the dissertation with the accompanying authors' statements

The results of this dissertation were presented in the following articles published in 2019-2022 in journals indexed by Journal Citation Reports:

1. Buta M., Hubeny J., Zieliński W., Korzeniewska E., Harnisz M., Nowrotek M., Płaza G. 2019. The occurrence of integrase genes in different stages of wastewater treatment. *Journal of Ecological Engineering*, 20(10), 39-45 (Ministry of Education and Science points = 40)

2. Buta M., Hubeny J., Zieliński W., Harnisz M., Korzeniewska E., 20121. Sewage sludge in agriculture – the effects of selected chemical pollutants and emerging genetic resistance determinants on the quality of soil and crops – a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112070 (IF_{2021} 7.129; Ministry of Education and Science points = 100)
3. Buta M., Korzeniewska E., Harnisz M., Hubeny J., Zieliński W., Rolbiecki D., Bajkacz S., Felis E., Kokoszka K. 2021. Microbial and chemical pollutants on the manure-crops pathway in the perspective of "One Health" holistic approach. *Science of the Total Environment*, 785, 147411 (IF_{2021} 10.753; Ministry of Education and Science points = 200)
4. Buta-Hubeny M., Korzeniewska E., Hubeny J., Zieliński W., Rolbiecki D., Harnisz M., Paukszto Ł. 2022. Structure of the manure resistome and the associated mobilome for assessing the risk of antimicrobial resistance transmission to crops. *Science of the Total Environment*, 808, 152144 (IF_{2021} 10.753; Ministry of Education and Science points = 200)

These publications fit well into the research carried out at the Department of Water Protection Engineering and Environmental Microbiology. Cumulative Impact Factor of the journals in which they were published amounts to 28.635. Some of the articles are the effect of cooperation with Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice, and Silesian University of Technology in Katowice. Article no. 2 is a literature review; the remaining ones are experiment-based. The articles are thematically coherent and were presented in chronological order. The articles have five to nine authors. It should be noted that the Candidate is the first author in each case. Assessment of the authors' statements indicates that **the Candidate had significant contribution in their creation**, participating in conceptualization, planning and realization of experimental part, interpretation of the results, and manuscript preparation.

The layout of the dissertation is appropriate; it includes all parts necessary to evaluate it. The references used in the dissertation were published in recent 10 years and have been properly selected. The dissertation concerns still present problem of the spread of antimicrobial resistance in the environments. This is a multifaceted issue and the main objective of the research by Martyna Buta-Hubeny, M.Sc., was to characterize genetic determinants of antimicrobial resistance in fertilized soil and assess the risk of their transmission to groundwater and crops. In my opinion, such aim is important, because elucidation of the ways and dynamics of the dispersal of antibiotic-resistant bacteria and genes responsible for that resistance should

help developing strategy leading to limitation antibiotic resistance spread - one of the biggest threats of 21st century. This requires research conducted not only on materials originating from humans, especially clinical specimens, but also from the environment *sensu lato*, in accordance with the "One Health" approach.

The Candidate focused **the first stage** of the study on the occurrence of three classes of integron integrase genes in wastewater during consecutive stages of the treatment. This part of the dissertation slightly differs from the rest when it comes to sophistication level, because the Candidate only used conventional PCR to detect integron integrase genes in total DNA isolated from samples taken from two wastewater treatment plants. Nevertheless, Martyna Buta-Hubeny, M.Sc., showed that wastewater treatment does not eliminate integron integrase genes regardless of technological differences, localization or season. That way, the genes coding for integrases are released to aquatic and soil environments. It should be noted here that the presence of class 1 integrons in the genome is almost always associated with multiresistance of the host strain. Moreover, I appreciate taking into account class 3 integrase gene that is usually disregarded in studies concerning integrons.

The second stage resulted in article no 2, a systematic review of the current state of knowledge on the pollutants of sewage sludge and how they affect the quality of soil and crops. Taking into account than more that 50% of sewage sludge in Europe is used as a fertilizer, it is important to estimate risk associated with introduction and antibiotics and their transformation products, non-steroidal anti-inflammatory drugs, heavy metals as well as genes encoding resistance to heavy metals and antibiotics. Analysis of data presented in almost 200 research papers allowed the Candidate to find that the pollutants can interact in the soil, which not only may affect living organisms, but also lead to co-selection of bacteria resistant to both heavy metals and antibiotics.

Information gathered during stage 2 was a great introduction to the next two stages. **In stage 3**, described in article no. 3, Martyna Buta-Hubeny, M.Sc., focused on the assessment of the effect of poultry and bovine fertilizers on the concentration of antibiotics, heavy metals, integron integrase genes and selected antibiotic resistance genes in soil, groundwater and crops. That carefully planned research, carried out with the use of modern methods, allowed the Candidate to show that such fertilizing can increase the concentration of heavy metals in the soil, which consequently may lead to their accumulation in crops. Moreover, antibiotic resistance

genes and integrase gens introduced with the manure are another factor contributing to the spread of antibiotic resistance in the environment. This problem especially concerns manure originating from intensive farming.

Fourth stage of the study (described in article no. 4) was about the possibility of transmission of antibiotic-resistant bacteria and genes responsible for the resistance from the manure to soil and, consequently, crops. This stage involved the use of next-generation sequencing and a range of bioinformatic and statistical tools, which allowed getting full picture of the manure and fertilized soil resistomes. The Candidate also analyzed a part of the mobilome, including insertion sequences associated with clinically important pathogens of the ESKAPEE group. The results of this stage indicate that especially poultry manure poses a great threat of transfer of antibiotic resistance genes to the environment.

Questions and critical comments

The articles composing this dissertation have been already published, so they were subjected to critical review; nevertheless, I would like to ask the Candidate a few questions:

- A conclusion that in the wastewater treatment plants investigate, the *intI2* gene was "almost as prevalent" as *intI1* (article no. 1) is a bit misleading, because the approach used in that stage only allowed determining their presence in the same DNA samples.
- Do you plan a continuation of research presented in stage 3 to determine how long the pollutants introduced to the soil with poultry and bovine manure can remain in the soil?
- Are any of the insertion sequences analyzed (article no. 4) associated specifically (exclusively) with the ESKAPEE pathogens?
- Did NGS reads analysis allow determining which antibiotic resistance genes were associated with integrons?

Conclusions

The Candidate undertook still "hot" topic of the spread of antibiotic resistance determinants in the environment, with a focus on explaining the role of some natural fertilizers

in this phenomenon. The doctoral dissertation consists of four articles planned and presented in a logical sequence. **The aim of the study was clearly presented and accomplished, thanks to the use of appropriate methodology and references, and the dissertation presents an original solution of a scientific problem.** It is hard to not notice the use of more and more sophisticated methods in the consecutive stages of the research. The second stage, which resulted in a review article, also proves the Candidate's extensive theoretical knowledge and the following ones show that she can utilize that knowledge in a practical way. Keeping this in mind, I highly appreciate the doctoral dissertation of Mrs. Martyna Buta-Hubeny.

Summing up, in my opinion **the doctoral dissertation of Martyna Buta-Hubeny, 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 Mrs. Martyna Buta-Hubeny to further stages of the defense of his doctoral thesis.** Moreover, keeping in mind modern methodology, high merit level of the research, and first of all, publication of the results in renowned journal, **I ask the Scientific Council of Biological Sciences Discipline of University of Warmia and Mazury to recognize this dissertation with an appropriate award.**

Ryszard Kaczure

dr hab. Ryszard Koczura, 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 Martyny Buty-Hubeny pt. „ Diversity and transmission of genetic resistance determinants in anthropogenically modified environments according to the "One Health" approach" („Zróżnicowanie i transmisja genetycznych determinantów oporności w środowisku zmienionym antropogenicznie zgodnie z podejściem "One Health"")

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Martyny Buty-Hubeny została wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Korzeniewskiej i dr hab. inż. Ewy Felis, prof. Politechniki Śląskiej. Kandydatka ubiega się o **stopień doktora w dziedzinie nauk przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne**.

Rozprawa, przedstawiona w języku angielskim, składa się ona z wykazu źródeł finansowania, podsumowania osiągnięć naukowych Doktorantki, wykazu stosowanych skrótów, wykazu publikacji składających się na rozprawę doktorską, streszczenia w języku angielskim i polskim, wstępu, celu pracy, przedstawienia wyników, podsumowania, wykazu piśmiennictwa oraz kopii czterech artykułów, w których przedstawiono wyniki wraz z materiałami dodatkowymi. Do publikacji dołączono oświadczenia współautorów.

Rezultaty będące przedmiotem pracy doktorskiej zawarto w następujących pracach, opublikowanych w latach 2019-22 w czasopismach z listy Journal Citation Reports:

1. Buta M., Hubeny J., Zieliński W., Korzeniewska E., Harnisz M., Nowrotek M., Płaza G. 2019. The occurrence of integrase genes in different stages of wastewater treatment. *Journal of Ecological Engineering*, 20(10), 39-45 (MEiN 40 pkt.)

2. Buta M., Hubeny J., Zieliński W., Harnisz M., Korzeniewska E., 2021. Sewage sludge in agriculture – the effects of selected chemical pollutants and emerging genetic resistance determinants on the quality of soil and crops – a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112070 (IF_{2021} 7,129; MEiN 100 pkt.)
3. Buta M., Korzeniewska E., Harnisz M., Hubeny J., Zieliński W., Rolbiecki D., Bajkacz S., Felis E., Kokoszka K. 2021. Microbial and chemical pollutants on the manure-crops pathway in the perspective of "One Health" holistic approach. *Science of the Total Environment*, 785, 147411 (IF_{2021} 10,753; MEiN 200 pkt.)
4. Buta-Hubeny M., Korzeniewska E., Hubeny J., Zieliński W., Rolbiecki D., Harnisz M., Paukszto Ł. 2022. Structure of the manure resistome and the associated mobilome for assessing the risk of antimicrobial resistance transmission to crops. *Science of the Total Environment*, 808, 152144 (IF_{2021} 10,753; MEiN 200 pkt.)

Prace te wpisują się w nurt badań realizowanych w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Geoinżynierii UWM w Olsztynie. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF, Impact Factor) czasopism, w których je opublikowano wynosi 28,635. Niektóre z nich powstały we współpracy z Instytutem Ekologii Terenów Uprzemysłowionych oraz Politechniką Śląską. Artykuł 2 ma charakter przeglądowy, pozostałe to prace doświadczalne. Przedstawione artykuły są spójne tematycznie, zostały przedstawione w rozprawie chronologicznie. Wszystkie są wieloautorskie – mają od pięciu do dziewięciu autorów. Podkreślić należy, że Pani mgr Buta-Hubeny jest pierwszą autorką każdej z nich. Z oświadczeń złożonych przez nią oraz współautorów prac wynika, że **Doktorantka miała istotny udział w ich powstaniu**, partycypując w planowaniu i realizacji części doświadczalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów.

Układ rozprawy doktorskiej jest prawidłowy, zawiera ona wszystkie elementy niezbędne do jej oceny. Piśmiennictwo zastosowane ramach rozprawy pochodzi w niemal wyłącznie z ostatnich 10 lat i zostało prawidłowo dobrane. Rozprawa dotyczy wciąż aktualnego problemu rozprzestrzeniania się w środowisku oporności bakterii na antybiotyki. Problem ten ma wiele aspektów, a głównym celem badań Pani mgr Buty-Hubeny było scharakteryzowanie genetycznych determinant oporności w nawożonej glebie i ocena ryzyka

ich transmisji do wód gruntowych oraz roślin uprawnych. Uważam za ważne wyznaczenie takiego celu, bowiem wyjaśnienie dróg i dynamiki transferu bakterii opornych na antybiotyki i genów warunkujących tę oporność powinno pomóc w opracowaniu strategii mającej ograniczyć rozprzestrzenienie się lekooporności, jednego z największych zagrożeń XXI w. Potrzeba do tego badań nie tylko na materiale pochodzącym od ludzi, ale również z szeroko rozumianego środowiska, co jest zgodne z koncepcją „One Health".

Doktorantka **w pierwszym etapie** badań poświęciła się też badaniu występowania genów integraz integronowych trzech klas w ściekach podczas kolejnych etapów ich oczyszczania. Ta część nieco odbiega od reszty pod względem stopnia zaawansowania stosowanych metod, bowiem Autorka do wykrywania ww. genów w całkowitym DNA izolowanym z próbek pobranych z dwóch oczyszczalni ścieków stosowała tylko metodę konwencjonalnego PCR. Nie mniej jednak Pani mgr Buta-Hubeny wykazała, że proces oczyszczania ścieków nie eliminuje genów integraz bez względu na modyfikacje technologiczne, lokalizację oczyszczalni, czy porę roku. W ten sposób geny integraz integronowych są uwalniane do środowiska wodnego i glebowego. Dodać należy, że obecność w genomie integronów klasy 1 niemal zawsze wiąże się z wieloopornością zawierających je szczepów bakterii. Warto też podkreślić uwzględnienie w badaniach genu integrazy klasy 3, zwykle pomijanego w badaniach dotyczących integronów.

Drugi etap pracy, którego efekty opisano w przeglądowym artykule 2, miał za zadanie usystematyzowanie wiedzy dotyczącej zanieczyszczenia osadów ściekowych wpływu tych zanieczyszczeń na jakość gleby i roślin uprawnych. Biorąc pod uwagę, że ponad połowa osadów ściekowych jest w Europie wykorzystywana jako nawóz, ważne jest oszacowanie ryzyka wiążącego się z wprowadzaniem do gleby wraz osadami antybiotyków i produktów ich rozpadu, niesteroidowych leków przeciwzapalnych, metali ciężkich, a także genów oporności na metale ciężkie i antybiotyki, jest to zagadnienie niewątpliwie warte uwagi. Analiza danych z blisko 200 publikacji pozwoliła Doktorantce stwierdzić, że w glebie może dochodzić do interakcji między poszczególnymi zanieczyszczeniami, co nie tylko może wpływać na bezpieczeństwo organizmów zasiedlających glebę, ale też prowadzić do ko-selekcji bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie.

Informacje przedstawione w etapie drugim stanowią świetne wprowadzenie do dwóch kolejnych. W **trzecim etapie pracy**, w którym Pani mgr Buta-Hubeny zajęła się oceną

wpływu nawożenia gleby obornikiem na zawartość antybiotyków, metali ciężkich, genów integraz i wybranych genów oporności n antybiotyki w glebie, wodzie gruntowej oraz roślinach uprawnych. Te starannie zaplanowane i przeprowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych metod badania pozwoliły Doktorantce wykazać, że nawożenie obornikiem może zwiększać stężenie metali ciężkich w glebie, prowadząc w efekcie do ich kumulacji w roślinach. Ponadto, wprowadzanie do gleby wraz z obornikiem genów oporności na antybiotyki i integronów oporności jest kolejnym czynnikiem przyczyniającym się do szerzenia się w środowisku oporności na antybiotyki. Problem ten dotyczy przede wszystkim obornika pochodzącego z intensywnych hodowli.

Czwarty etap pracy dotyczył określenia możliwości transmisji bakterii opornych na antybiotyki i genów warunkujących tę oporność z obornika do gleby i w konsekwencji do uprawianych na niej roślin. W etapie tym wykorzystano sekwencjonowanie nowej generacji i szereg analiz bioinformatycznych i statystycznych, co dało pełen obraz rezystomu obornika i nawożonej nim gleby. Autorka przeprowadziła też częściową analizę mobilomu, w tym sekwencji insercjnych związanych z ważnymi z klinicznego punktu widzenia patogenami z grupy ESKAPEE. Wyniki tego etapu wskazują, że szczególnie obornik pochodzenia drobiowego stwarza duże ryzyko transferu determinant oporności do środowiska.

Pytania i uwagi krytyczne

Artykuły, na których opiera się przedstawione do oceny rozprawa doktorska zostały opublikowane, więc były już oceniane przez innych naukowców, niemniej jednak mam kilka uwag i pytań:

- Stwierdzenie, że w badanych oczyszczalniach gen *intI2* był "niemal tak samo rozpowszechniony" jak *intI1* (artykuł 1) jest nieco mylące, bowiem zastosowane podejście pozwoliło tylko na stwierdzenie, że był obecny w tych samych próbkach DNA.
- Czy planowana jest kontynuacja badań przedstawionych w etapie 3 na tym samym poletku? Mam na myśli określenie jak długo mogą utrzymywać się zanieczyszczenia wprowadzone do gleby wraz z obornikiem.
- Czy któreś z analizowanych sekwencji insercyjnych (artykuł 4) są charakterystyczne wyłącznie dla patogenów z grupy ESKAPEE?

- Czy odczyty NGS pozwoliły stwierdzić, które geny oporności związane były z integronami (artykuł 4)?

Podsumowanie

Doktorantka podjęła wciąż "gorący" temat rozprzestrzenianiu się determinant antybiotykooporności w środowisku, skupiając się na wyjaśnieniu roli niektórych nawozów naturalnych w tym zjawisku. Na ocenianą rozprawę składają się cztery opublikowane już artykuły, które są spójne tematycznie i stanowią logiczny ciąg. **Cel pracy został jasno określony i osiągnięty dzięki zastosowaniu właściwie dobranych metod i dobrze dobranego piśmiennictwa, a rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Nie sposób nie zauważyć, jak w kolejnych etapach pracy stosowała coraz bardziej zaawansowane metody, stale poszerzając swój warsztat badawczy. Drugi etap pracy, którego efektem był artykuł przeglądowy dowodzi też dużej wiedzy teoretycznej Kandydatki do stopnia doktora, a etapy kolejne tego, że potrafi tę wiedzę w praktyczny sposób wykorzystać. Mając to na uwadze, wysoko oceniam pracę doktorską Pani mgr Martyny Buty-Hubeny.

Reasumując, uważam, że **rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Buty-Hubeny 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 Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Biorąc pod uwagę zastosowanie nowoczesnych technik badawczych, wysoki poziom merytoryczny zaprezentowanych badań i przede wszystkim opublikowanie wyników w uznanych czasopismach, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej odpowiednią nagrodą**.

Ryszard Kaczorek