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

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Martyny Buta-Hubeny pt: Zróżnicowanie i transmisja genetycznych determinantów oporności w środowisku zmienionym antropogenicznie zgodnie z podejściem „One Health"

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 i dr hab. inż. Ewy Felis, prof. Politechniki Śląskiej

Antybiotykooporność to poważne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi i zwierząt w obliczu rosnącej liczby wielolekoopornych patogenów. Nadmierne stosowanie antybiotyków w medycynie i weterynarii powoduje , że duże ilości tych związków oraz produktów ich transformacji pojawiają się w odchodach ludzi i zwierząt przez co trafiają one wraz z obornikiem lub poddanymi procesom stabilizacji osadami ściekowymi do gleby. Takie dodatki glebowe przyczyniają się do poprawy wartości użytkowej gleby, ale są też przyczyną kształtowania się antybiotykoodporności w środowisku glebowym, co stwarza realne ryzyko transferu tych zanieczyszczeń do wód gruntowych i upraw. Rozpowszechnianie determinant lekooporności w środowisku jest problemem globalnym. Wyrazem skali problemu jest tworzenie światowych inicjatyw takich jak „One Health", które promują działania na rzecz ograniczania antybiotykoodporności.

Stan rezistomu środowiska w Polsce jest niewystarczająco scharakteryzowany.
Dla skutecznych działań zapobiegawczych istotne znaczenie ma wiedza w zakresie zróżnicowania, częstości występowania i dróg transmisji determinant lekooporności i ich nośników. Zadanie to mieści się w ramach celu określonego w dysertacji doktorskiej Pani mgr Martyny Buta-Hubeny.

Otrzymana do recenzji dysertacja doktorska została napisana w oparciu o cztery spójne tematycznie prace, opublikowane w latach 2019-2022 o łącznym IF-=28,63 i 570 pkt. wg. punktacji MEiN. Pani mgr Martyna Buta-Hubeny jest pierwszym autorem 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 43 stronach, które obejmują: spis stosowanych w opracowaniu skrótów, abstrakt w języku polskim i angielskim, wstęp, cel badań, hipotezy badawcze, zakres badań, metodologię i wyniki z rozróżnieniem 4 etapów badania, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. Dalszą część pracy stanowią kopie czterech publikacji wraz z danymi z suplementów oraz oświadczenia współautorów.

W rozdziale Wstęp (**Introduction)** autorka przedstawia przyczyny kształtowania się antybiotykoodporności w środowisku glebowym. Wskazuje na istotną rolę mikroorganizmów glebowych w rozprzestrzenianiu determinant lekooporności i metali ciężkich w ekosystemie glebowym. Rozdział ten jest zwartą, logiczną i dobrze skomponowaną częścią pracy, co wskazuje na dobrą znajomość badanych zagadnień i piśmiennictwa z tego zakresu. Autorka w przekonujący sposób uzasadnia również potrzebę podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Następnie autorka formułuje cel badań, cztery hipotezy badawcze oraz zakres badania, który obejmuje cztery etapy odpowiadające czterem publikacjom stanowiącym podstawę rozprawy.

W pracach eksperymentalnych doktorantka precyzyjnie opisuje źródło pochodzenia materiału, sposób przeprowadzenia badań. Zastosowane metody są adekwatne do realizacji zadań. Doktorantka wykorzystuje szereg metod, takich jak metody molekularne (konwencjonalny PCR, qPCR - Etap I, III,IV), fizykochemiczne (Etap IIISLE-SPE-HPLC-MS/MS, HGAAS, ICP-OES), metagenomiczną analizę sekwencjonowania (Etap IV) oraz analizy statystyczne.

Odpowiednio do zakresu badań w część pracy dotyczącej **metodologii i wyników (Methodology and Results**) wyróżnione są 4 etapy. Etap I,III i IV stanowią badania oryginalne podsumowane trzema odrębnymi publikacjami. Etap II stanowi obszerna, jasno napisana i wyczerpująca praca przeglądowa, którą oceniam bardzo wysoko.

Etap I. obejmował badania dotyczące oceny wpływu oczyszczania ścieków w oczyszczalniach mechaniczno-biologicznych na jakość wody w rzekach przyjmujących te ścieki. W tym badaniu wykazano, że wybrane oczyszczalnie ścieków nie są skuteczne w eliminowaniu genów integrazy warunkującej rozprzestrzenianie integronów oporności w środowisku bakterii, co może sprzyjać rozprzestrzenianiu zjawiska antybiotykoodporności w środowisku wodnym i glebowym.

Etap II. to praca przeglądowa: Osad ściekowy w rolnictwie – wpływ wybranych zanieczyszczeń chemicznych na jakość gleby i upraw.

Etap III. Dotyczył określenia wpływu nawożenia obornikiem drobiowym i bydlęcym na zawartość antybiotyków, metali ciężkich oraz występowania genów integrazy i oporności

na antybiotyki w glebie, wodzie gruntowej i uprawach hodowanych na poletkach nawożonych. Wyniki wykazały , że obornik zwierzęcy powoduje wzrost tych zanieczyszczeń w glebie.

Etap IV. Obejmował oszacowanie ryzyka transmisji genów antybiotykoodporności (ARGs) i nośników bakteryjnej oporności na leki do nawiezionej gleby i endomikrobiomu upraw przeznaczonych do konsumpcji w nieprzetworzonej formie. Te wyniki wykazały, że nawożenie zarówno poddanym stabilizacji osadem ściekowym jak i obornikiem pochodzenia zwierzęcego stwarza ryzyko kontaminacji środowiska naturalnego zanieczyszczeniami o wysokiej trwałości, sprzyjającymi szerzeniu się zjawiska antybiotykoodporności.

Wyniki uzyskane na każdym etapie badań są jasno opisane. Doktorantka odnosi je też do literatury co daje efekt dyskusji.

Omówienie wyników kończy **Podsumowaniem (Summary)** i przedstawieniem czterech wniosków wskazujących, że nawożenie nawozami organicznymi zwiększa rozpowszechnianie determinant oporności w glebie, ponadto zróżnicowanie determinant lekooporności zależy od rodzaju stosowanego nawozu. Wprowadzone do gleby wraz z nawozem mikrozanieczyszczenia są transmitowane do wód gruntowych i endomikrobiomu roślin wzrastających w glebie nawożonej.

Załączona bibliografia obejmuje 86 pozycji literatury, która w większości została opublikowana po 2016 roku. Jej dobór wskazuje to na dużą znajomość literatury.

Po pełnej analizie pracy mam niewielkie uwagi dotyczące błędów stylistycznych oraz edytorskich:

1. W abstrakcie napisanym w języku polskim, str.13, wiersz 29: „....Spośród wszystkich badanych genów, najbardziej popularnymi były....." – określenie „popularne" w odniesieniu do genów jest niewłaściwe, powinno być: powszechnie występujące lub najczęściej występujące, bo nie ma mniej lub bardziej popularnych genów

2. W rozdziale: Introduction, str.15 wiersz 16: ...." resistant infection"... - to niewłaściwe określenie, powinno być: infection caused by resistant bacteria , bo nie infekcja jest lekooporna a drobnoustrój powodujący infekcję

3. W rozdziale: References,
- str. 35. Escudero J.A. i wsp. – nazwa czasopisma nie jest wymieniona
- str.39. Möller K. i wsp. – nazwa czasopisma nie jest wymieniona

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem. Na podkreślenie zasługuje bogata metodyka oraz bardzo rzetelne przeprowadzenie badań. Treść dysertacji jednoznacznie wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną jak i umiejętności doktorantki w zakresie prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Buta-Hubeny pt." Diversity and transmission of genetic resistance determinants in anthropogenically modified environments according to the "One Health" approach " 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 Pani mgr Martyny Buta-Hubeny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Katarzyna Balsby - Chmielik

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

Martyna Buta-Hubeny's doctoral dissertation: Diversity and transmission of genetic determinants of resistance in an anthropogenically changed environment according to the "One Health" approach

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

Antibiotic resistance poses a serious threat to the life and health of humans and animals in the face of the growing number of multidrug-resistant pathogens. Excessive use of antibiotics in human and veterinary medicine causes large amounts of these compounds and their transformation products appear in the faeces of humans and animals, which means that they end up in the soil with manure or stabilized sewage sludge. Such soil additives contribute to the improvement of the utility value of the soil. Still, they are also the cause of the development of antibiotic resistance in the soil environment, which creates a real risk of transferring these pollutants to groundwater and crops. Dissemination of drug resistance determinants in the environment is a global problem. The problem's scale does reflect the creation of international initiatives such as One Health, which promote activities to reduce antibiotic resistance.

The state of the environmental resistome in Poland does insufficiently characterized. Knowledge of drug resistance determinants' differentiation, frequency, and transmission routes and

their carriers is essential for practical preventive actions. This task is within the framework of the objective formulated in the doctoral dissertation of Ms Martyna Buta-Hubeny.

The doctoral dissertation received for review was written based on four papers published in 2019-2022 with a total IF = 28.63 and 570 points according to MEiN scoring. Ms Martyna Buta-Hubeny is the first author of each publication. The dissertation layout 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 work submitted for evaluation consists of 43 pages, which include: a list of abbreviations used in the study, abstract in Polish and English, introduction, research purpose, research hypotheses, research scope, methodology and results with the distinction of four research stages, summary and conclusions and a bibliography. The rest of the work consists of copies of four publications together with data from supplements and statements of co-authors.

In the chapter **Introduction**, the doctoral student presents the reasons for developing antibiotic resistance in the soil environment. It shows the vital role of soil microorganisms in the spread of drug-resistance determinants and heavy metals in the soil ecosystem. This chapter is a compact, logical and well-composed part of the work, which indicates a good knowledge of the issues studied and the literature in this field. The author also convincingly justifies the need to undertake the research being the subject of the doctoral dissertation.

Then, the PhD student formulates the aim of the research, four research hypotheses, and the scope of the study, which includes four stages corresponding to 4 publications that constitute the base of the dissertation.

The doctoral student describes the material's source and research method in the experimental work. The methods used are adequate for the performance of the tasks. The PhD student did use many techniques, such as molecular (conventional PCR, qPCR; Stages I, III, IV) and physicochemical methods (Stage III; SLE-SPE-HPLC-MS / MS, HGAAS, ICP-OES), then metagenomic sequencing analysis (Stage IV) and statistical analyses (Stages I –IV).

According to the scope of the research, four stages distinguish in the part of **Methodology and Results**. Stage I, III, and IV are original studies summarized by three separate publications. Stage II is an extensive, clearly written, exhaustive review work that I rate highly.

Stage I. included studies on assessing the impact of wastewater treatment in mechanical-biological treatment plants on water quality in rivers receiving this wastewater. This study showed that selected wastewater treatment plants are ineffective in eliminating the integrase genes that determine the spread of resistance integrons in the bacterial environment, which may promote antibiotic resistance in the water and soil environment.

Stage II.is a review work: Sewage Sludge in Agriculture - The Effects of Selected Chemical Pollutants on the Quality of Soil and Crops.

Stage III. concerned with determining the effect of fertilization with poultry and cattle manure on the content of antibiotics, heavy metals, and the presence of integrase genes and antibiotic resistance genes in soil, groundwater, and crops grown on fertilized plots. The results showed that animal manure increases these pollutants in the ground.

Stage IV. included an estimation of the risk of transmission of antibiotic-resistance genes (ARGs) and carriers of bacterial drug resistance to fertilized soil and the endomicrobiome of crops intended for consumption in unprocessed form. These results showed that fertilization with both stabilized sewage sludge and manure of animal origin poses a risk of contamination of the natural environment with pollutants of high persistence, favouring the spread of the phenomenon of antibiotic resistance.

The results obtained at each stage of the research does clearly described. The doctoral student also applies them to literature, which gives the effect of a discussion.

The dissertation ends with the chapter **Summary** with the presentation of four conclusions showing that fertilization with organic fertilizers increases the dissemination of resistance determinants in the soil; moreover, the differentiation of drug resistance determinants depend on the type of fertilizer used. The micropollutants derived from fertilizer can contaminated not only soil but may also be transmitted both to groundwater and to the endomicrobiom of plants growing in fertilized soil. The results significantly enrich the understanding of the spread of antibiotic resistance in anthropogenically altered environments.

The attached bibliography includes 86 references, most of which did public after 2016.
Its selection indicates an excellent knowledge of literature.

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

1. In an abstract written in Polish, page 13, line 29: ".... Among all the genes studied, the most popular were ....." - the term "popular" concerning genes is inappropriate; it should be: common or the most common, because there are no more or less famous genes

2. In Introduction, pp.15 line 16: .... ". Resistant infection" ... - this is a wrong term because it is not the infection that is drug-resistant but the microorganism causing it; it should be: an infection caused by resistant bacteria,

3. In References:
- pp. 35. Escudero J.A. et all. - The name of the journal was omitted
- pp. 39. Möller K. at all.- The name of the journal was omitted

In summary, the assessed doctoral dissertation is an original and valuable study. 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 Ms Martyna Buta-Hubena entitled " Diversity and transmission of genetic resistance determinants in anthropogenically modified environments according to the "One Health" approach " meets the requirements provided for in Article 187 of the ACT of July 20, 2018. 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 Ms Martyna Buta-Hubena 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 Bolsy - Chmielik