25th Oct 2022

Prof. UL, Dr. habil. Magdalena Urbaniak
UNESCO Chair on Ecohydrology and Applied Ecology
Faculty of Biology and Environmental Protection
University of Lodz
Magdalena.Urbaniak@biol.uni.lodz.pl

REVIEW

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

Introductory information

The submitted for evaluation doctoral dissertation by Martyna Buta-Hubeny was carried out at the Department of Water Protection Engineering and Environmental Microbiology at the Facility of Geoengineering of UWM in Olsztyn, under the supervision of prof. Ewa Korzeniewska and dr habil. Ewa Felis.

The reviewed work is prepared in the form of a hybrid of a classic doctoral dissertation with the layout introduced in recent years. The synopsis of the dissertation is, on the one hand, an introduction to the subject of the issue, and on the other, is a guide to the assemblage of the PhD candidate's publications which are the basis of this review.

Formal assessment

The synopsis of the evaluated dissertation consists of 43 pages. It describes, in a very synthetic way, the current state of knowledge, research objectives, used research methods and the

most important results of individual publications verifying the research hypotheses. This part is also supplemented with an abstract in Polish and English. The abstract in Polish is not free from minor errors (the PhD candidate uses direct translations of English words such as koncentracja instead of stężenie). These slight flaws however do not affect the overall picture of the dissertation and do not constitute an obstacle to correct understanding of its content.

The further part of the doctoral dissertation consists of a collection of 4 monothematic scientific articles published (with the exception of the first work printed in the Journal of Ecological Engineering) in leading journals from the JCR list in the discipline of biological sciences, i.e. Ecotoxicology and Environmental Safety (IF = 7.129, 1 thesis) and Science of the Total Environment (IF = 10.753, 2 papers). The total IF of the papers constituting the doctoral dissertation of M.Sc. Buta-Hubeny is 28.635. These works were published in the period 2019-2022: one in 2019, two in 2021, and one in 2022. All papers are multi-authored (5-9 authors). M.Sc. Martyna Buta-Hubeny's contribution in creation of these papers was leading, as evidenced by the fact that she is the first author in all of them, and her role was confirmed by the relevant statements of the co-authors. My doubt is related to the form of the above-mentioned statements - there is no indication of the percentage share of individual authors of the publications. In addition, in the case of publication no. 1, the authors do not specify their involvement limiting their contribution's description only to a general statement on the performance of "some" experimental analyzes and the interpretation of the obtained results. Thus, it is difficult to verify the actual role of the PhD candidate in preparation of the publication no. 1. The co-authors' statements of subsequent three papers are more precise.

The papers by M.Sc. Buta-Hubeny has been cited 134 according to the Google Scholar database, 110 times according to the Scopus database and 105 times according to the Web of Science database, and the Hirsch index is 6. Considering the fact that M.Sc. Buta-Hubeny is at the initial stage of her scientific career and most of her works have been published in the last two years, I consider her bibliometric indicators as high. It is worth emphasizing that in addition to the articles that build up the evaluated doctoral dissertation, the PhD candidate has co-authored nine other peer reviewed publications in reputable journals in the field of antibiotic resistance in an anthropogenically altered environment, which proves her strict scientific orientation.

Scientific assessment

The scientific publications constituting the evaluated doctoral dissertation by M.Sc. Buta-Hubeny, in addition to being a series of closely related articles, which is a statutory requirement, is also an example of a logical and comprehensive research trend implemented by the PhD candidate. The papers are oriented on monitoring (1 publication in the series), review (2 publication) and experimental research (3rd and 4th publications). The PhD candidate has used diverse methodologies including molecular (PCR, qPCR, NGS) and instrumental methods (HPLC-MS/MS, HGAAS, ICP-OES) to obtain a broad spectrum

of information on the diversity and transmission of genetic determinants of antibiotic resistance in an environment subjected to anthropogenic pressure. This indicates the interdisciplinary nature of the dissertation.

The justification for undertaking the research has been thoroughly described in the introductory chapter of the synopsis. This part aims to present and discuss the current state of knowledge in the field of the occurrence of the phenomenon of antibiotic resistance in the environment; it is also intended to present the goal of to the dissertation, which is to assess the impact of agricultural use of soil additives in the form of sewage sludge and manure on the diversity of antibiotic resistance determinants in soil and soil-dependent ecosystems (groundwater, vegetation).

The next stages of the work focus on the verification of the following research hypotheses:
H1: Organic fertilizers increase the abundance and diversity of ARGs in soil;
H2: The abundance and diversity of ARGs in fertilized soil is determined by the type of applied fertilizer;
H3: Micropollutants introduced to the soil with manure are transmitted to ground water;
H4: Growing plants in soil fertilized animal manure increases the diversity of ARGs and MGEs in the plant endomicrobiome.

The above mentioned hypotheses were tested on the basis of: monitoring study carried out at two wastewater treatment plants (work no. 1), field experiments using poultry and bovine manure (work no. 3 and 4) and a review of the latest literature in the field of agricultural use of sewage sludge (work no. 2). The obtained results constitute a response to the posted hypotheses. The main conclusions and observations achieved on the basis of the conducted research confirm the research hypotheses indicated in the introduction part. The results reveal not only the risk of transmission of antibiotic resistance determinants in soil fertilized with organic fertilizers, i.e. sewage sludge and manure, but most of all confirm the determining role of heavy metals as antibiotic resistance promoters in environmental matrices. PhD candidate emphasizes the importance of this phenomenon, especially in the abstracts, raising the need to amend the existing legal acts regarding the agricultural use of natural fertilizers. Unfortunately, I can not find similar statements and recommendations in the dissertation summary section, which should clearly and concisely highlight either the results and the recommendations or the gaps in the current knowledge. In my opinion, supplementing the dissertation with the subchapter "Perspectives for the future" would constitute as an interesting “added value” to the results and conclusions of the doctoral dissertation, especially since the PhD candidate continues the chosen scientific path, which is confirmed by her latest publications.

Despite this slight remark, I find the dissertation (both theoretical and experimental part) convincing and properly prepared. The discussed topic is innovative and interesting. The research was carried out thoroughly, and the work itself is marked with a number of valuable results that represent an interesting advancement in the field of natural sciences and

agriculture (particularly in the discipline of biological sciences) by providing key information on the impact of natural soil fertilizers (i.e. sewage sludge and manure) on the diversity of a number of antibiotic resistance determinants in soil, groundwater, and crops. In addition, the work brings new information on the contamination of manure with heavy metals and their further accumulation in crops and groundwater. The conclusion on the determining role of heavy metals in promoting antibiotic resistance in the environment and the need for remedial action is of crucial value. Thus, the evaluated doctoral dissertation is a response to the need to narrow the missing data gap in this topic.

Summary

My overall impression of the M.Sc. Buta-Hubeny's doctoral dissertation is very positive. The PhD candidate has conducted a range of detailed research and obtained new, original results that broaden our understanding of the diversity and transmission of genetic determinants of antibiotic resistance in an anthropogenically altered environment. M.Sc. Martyna Buta-Hubeny showed excellent analytical skills and high quality work, as evidenced by four published peer-reviewed papers in reputable journals in which she is the first author. The dissertation writing is clear, measurements are described properly and discussion is consequent and essential. The research was performed at a high level with the use of a number of modern research methods and an interdisciplinary approach to the presented issues.

Considering the above, I conclude that submitted to me for evaluation scientific achievements of Martyna Buta-Hubeny, who applied for the award of the doctoral degree, meets all the criteria of a doctoral dissertation in accordance with the provisions of the Art. 187 of the Act of July 20th 2018 Law on Higher Education and Science (uniform text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended), hence I am applying for admission of the dissertation to further stages of the doctoral process.

Urbaniak Magdalena

Prof. UL, Dr. habil. Magdalena Urbaniak

Banacha 12/16, 90-237 Lodz
e-mail: Magdalena.Urbaniak@biol.uni.lodz.pl
www.biol.uni.lodz.pl

25.10.2022 r.

Dr hab. Magdalena Urbaniak, prof. UŁ
Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Magdalena.Urbaniak@biol.uni.lodz.pl

RECENZJA

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

Informacje wstępne

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Martyny Buta-Hubeny została wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej na Wydziale Geoinżynierii UWM w Olsztynie, pod kierunkiem prof. Ewy Korzeniewskiej i dr hab. Ewy Felis.

Recenzowana praca ma formę hybrydy klasycznej rozprawy doktorskiej z układem wprowadzonym w ostatnich latach, w którym manuskrypt rozprawy stanowi z jednej strony wprowadzenie w tematykę zagadnienia, a z drugiej jest przewodnikiem po zbiorze publikacji Doktorantki będących podstawą recenzji.

Ocena formalna

Autoreferat przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej liczy 43 strony. Opisuje on w sposób bardzo syntetyczny aktualny stan wiedzy, cele badań, zastosowane metody badawcze oraz

najważniejsze wyniki poszczególnych publikacji, które jednocześnie weryfikują postawione hipotezy badawcze. Część ta opatrzona jest również streszczeniem w języku polskim i angielskim. Streszczenie w języku polskim nie jest wolne od drobnych błędów (Doktorantka używa spolszczonych wersji słów anglojęzycznych takich jak: koncentracja zamiast stężenie), które jednak nie wpływają na prawidłowy odbiór pracy i nie stanowią przeszkody w merytorycznym zrozumieniu jej treści.

Dalsza część pracy doktorskiej to monotematyczny zbiór 4 artykułów naukowych, opublikowanych, z wyjątkiem pierwszej pracy z *Journal of Ecological Engineering*, w wiodących czasopismach z listy JCR w dyscyplinie nauk biologicznych, tj.: *Ecotoxicology and Environmental Safety* (IF=7,129, 1 praca) oraz *Science of the Total Environment* (IF=10,753, 2 prace). Sumaryczny IF prac będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr Buta-Hubeny wynosi 28,635. Prace te zostały opublikowane w latach 2019-2022, z czego jedna praca powstała w roku 2019, dwie w 2021 i jedna w 2022. Wszystkie prace są wieloautorskie (5-9 autorów). Wkład mgr Martyny Buta-Hubeny w powstanie tych prac był wiodący o czym świadczy fakt, iż we wszystkich artykułach jest ona pierwszym autorem, a Jej udział został potwierdzony stosownymi oświadczeniami współautorów. Moje zastrzeżenie budzi jedynie forma wyżej wspomnianych oświadczeń – brakuje określenia procentowego udziału poszczególnych autorów publikacji. Dodatkowo w przypadku publikacji nr 1 autorzy nie precyzują swojego wkładu ograniczając się jedynie do ogólnego oświadczenia na temat wykonania części analiz eksperymentalnych i interpretacji uzyskanych wyników. Tym samym utrudniona jest weryfikacja rzeczywistego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji nr 1. Oświadczenia współautorów kolejnych prac są już bardziej precyzyjne.

Prace mgr Buta-Hubeny cytowane były 134 wg bazy Google Scholar, 110 razy wg bazy Scopus i 105 wg bazy Web of Science, a indeks Hirscha wyniósł 6. Uzyskane wskaźniki bibliometryczne uważam za wysokie, biorąc pod uwagę fakt, iż mgr Buta-Hubeny jest w początkowym etapie pracy naukowej, a większość prac Jej autorstwa lub współautorstwa ukazała się w ciągu ostatnich dwóch lat. Ponadto warto podkreślić, iż oprócz prac będących podstawą przedłożonej mi do oceny dysertacji, Doktorantka jest autorem lub współautorem 9 innych wysokopunktowanych publikacji poruszających tematykę antybiotykooporności w środowisku zmienionym antropogenicznie, co świadczy o ścisłym ukierunkowaniu Jej aktywności naukowej.

Ocena merytoryczna

Cykl publikacji naukowych przedłożonych do oceny jako podstawa dysertacji doktorskiej mgr Buta-Hubeny, oprócz tego, że jest układem ściśle powiązanych tematycznie artykułów, co stanowi wymóg ustawowy, jest też przykładem logicznego, kompleksowego nurtu badawczego, zrealizowanego przez Doktorantkę. Prace te mają charakter zarówno monitoringowy (1 publikacja z cyklu) jak i przeglądowy (2 publikacja) i eksperymentalny (3 i 4 publikacja), a łącząc zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej (PCR,

qPCR, NGS) i chemii analitycznej (HPLC-MS/MS, HGAAS, ICP-OES) dla uzyskania szerokiego spektrum informacji na temat zróżnicowania i transmisji genetycznych determinantów oporności na antybiotyki w środowisku poddanym presji antropogenicznej, stanowią o interdyscyplinarnym charakterze rozprawy.

Uzasadnienie podjęcia badań zostało rzetelnie opisane w rozdziale wstępnym autoreferatu. Część ta stanowi przyczynek do nie tylko do omówienia aktualnego stanu wiedzy w zakresie występowania zjawiska antybiotykooporności w środowisku, ale też do przedstawienia głównego celu pracy, którym ocena wpływu rolniczego zastosowania dodatków glebowych w postaci osadów ściekowych i obornika na zróżnicowanie determinantów antybiotykoodporności w glebie i ekosystemach od niej zależnych (wody gruntowe, roślinność).

Kolejne etapy pracy skupiają się na weryfikacji postawionych hipotez badawczych:
H1: Nawozy organiczne podnoszą ilość i różnorodność genów oporności na antybiotyki w glebie;
H2: Ilość i różnorodność genów antybiotykoodporności w nawożonej glebie jest deteminowana rodzajem zastosowanego nawozu;
H3: Mikrozanieczyszczenia wprowadzane do gleby wraz z obornikiem przedostają się do wód gruntowych;
H4: Rośliny rosnące w glebie nawożonej obornikiem wykazują wzrost różnorodności genów oporności na antybiotyki i mobilnych elementów genetycznych w endomikrobiomie.

Testowanie ww. hipotez wykonano w oparciu o badania monitoringowe przeprowadzone na dwóch oczyszczalniach ścieków (praca nr 1), eksperymenty polowe z wykorzystaniem obornika drobiowego i bydlęcego (praca nr 3 i 4) oraz przeglądu najnowszej literatury tematu w zakresie rolniczego wykorzystania osadów ściekowych (praca nr 2), których wyniki zawarto w artykułach będących jednocześnie odpowiedzią na postawione hipotezy badacze. Główne wnioski i obserwacje uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzają postawione we wstępie pracy hipotezy badawcze. Uzyskane dane wskazują nie tylko na ryzyko transmisji determinantów oporności na antybiotyki w glebie nawożonej nawozami organicznymi tj. zarówno osadami ściekowymi jak i obornikiem, ale też potwierdzają determinującą rolę metali ciężkich jako promotorów antybiotykooporności w matrycach środowiskowych. Doktorantka podkreśla wagę tego zjawiska zwłaszcza w streszczeniu w języku polskim i abstrakcie anglojęzycznym, podnosząc konieczność nowelizacji istniejących aktów prawnych dotyczących rolniczego wykorzystania nawozów naturalnych. Niestety podobnych stwierdzeń i zaleceń nie odnajdziemy w sekcji podsumowującej, która powinna w sposób klarowny acz zwięzły uwypuklić zarówno osiągnięte wyniki jak i rekomendacje i luki w obecnej wiedzy. Moim zdaniem uzupełnienie rozprawy o podrozdział *„Perspektywy na przyszłość"* stanowiłoby ciekawe uzupełnienie wyników i wniosków będących rezultatem rozprawy doktorskiej, zwłaszcza iż Doktoranka kontynuuje obrany nurt badawczy, czego potwierdzeniem są Jej najnowsze publikacje.

Pomimo tej drobnej uwagi uważam, że rozprawa od strony zarówno teoretycznej jak i eksperymentalnej jest przekonująca i odpowiednio przygotowana. Podjęty temat jest nowatorski i interesujący. Badania zostały przeprowadzone rzetelnie, a sama praca jest opatrzona szeregiem interesujących wyników, które stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych oraz rolniczych, a w szczególności dyscypliny nauk biologicznych, m.in. dostarczają kluczowych informacji na temat wpływu nawożenia gleby nawozami pochodzenia naturalnego tj. osadami ściekowymi i obornikiem na zróżnicowanie szeregu determinantów antybiotykoodporności zarówno w glebie jak i wodach gruntowych i roślinach uprawnych. Dodatkowo praca wnosi nowe informacji w zakresie zanieczyszczenia obornika metalami ciężkimi i ich kumulacji w roślinach uprawnych i wodach gruntowych, a także ich determinującej roli w promowaniu antybiotykooporności w środowisku i potrzeby podjęcia działań zaradczych. Tym samym oceniana rozprawa doktorska jest odpowiedzią na potrzebę uzupełnienia brakującej luki w danych w tym temacie.

Podsumowanie

Moje ogólne wrażenie po przeczytaniu rozprawy doktorskiej mgr Martyny Buta-Hubeny jest bardzo pozytywne. Doktorantka przeprowadziła wiele szczegółowych badań i uzyskała nowe, oryginalne wyniki, które poszerzają naszą wiedzę na temat zróżnicowania i transmisji genetycznych determinantów oporności na antybiotyki w środowisku zmienionym antropogenicznie. Mgr Martyna Buta-Hubeny wykazała się doskonałymi umiejętnościami analitycznymi oraz wysoką jakością swojej pracy, czego dowodem są opublikowane cztery recenzowane prace w renomowanych czasopismach, w których Doktorantka występuje jako pierwszy autor. Rozprawa została napisana przejrzystym językiem, zastosowane metody prawidłowo opisane, a wyniki i ich opis przygotowane w sposób rzetelny i konsekwentny. Badania zostały wykonane na wysokim poziomie z zastosowaniem szeregu nowoczesnych metod badawczych i interdyscyplinarnego podejścia do przedstawionej problematyki.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że przedstawione mi do oceny osiągnięcia naukowe mgr Martyny Buta-Hubeny, ubiegającej się o nadanie stopnia doktora, odpowiadają 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.), stąd wnioskuję o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Urbaniak Magdalena

Dr hab. Magdalena Urbaniak, prof. UŁ

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
e-mail: Magdalena.Urbaniak@biol.uni.lodz.pl