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, 15.11.2022 r.

Review of doctoral dissertation by Jakub Hubeny, M.Sc. entitled „Influence of wastewater origin on the spread of antibiotic resistance"

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 Monika Harnisz, D.Sc., Ph.D., Associate Professor at UWM and Sylwia Bajkacz, 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 list of publications included in the doctoral dissertation, abstracts in English and Polish, introduction, research objectives and hypotheses, results, conclusions, and five articles (with supplementary data) included in the dissertation with accompanying authors' statements. **The layout of the dissertation is appropriate** and includes all elements necessary to evaluate it. **The references** used in the dissertation **are up to date and properly chosen.**

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

1. **Hubeny J.**, Buta M., Zieliński W., Harnisz M., Korzeniewska E., Nowrotek M., Płaza G. 2019. The prevalence of *tet*(A) and *tet*(M) tetracycline resistance genes in municipal wastewater. *Journal of Ecological Engineering*, 20, 1-6 (Ministry of Education and Science points = 40)

2. **Hubeny J.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Buta M., Zieliński W., Rolbiecki D., Giebułtowicz J., Nałęcz-Jawecki G., Płaza G. 2021. Industrialization as a source of heavy metals and antibiotics which can enhance the antibiotic resistance in wastewater. *PLoS ONE*, 16, e0252691 (IF_{2021} 3.752; Ministry of Education and Science points = 100)
3. **Hubeny J.**, Ciesielski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Dulski T., Jałowiecki Ł., Płaza G. 2021. Impact of hospital wastewater on the occurrence and diversity of beta-lactamase genes during wastewater treatment with an emphasis on carbapenemase genes: a metagenomic approach. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 738158 (IF_{2021} 5.411; Ministry of Education and Science points = 100)
4. **Hubeny J.**, Korzeniewska E., Buta-Hubeny M., Zieliński W., Rolbiecki D., Harnisz M. 2022. Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland. *Science of the Total Environment*, 822, 153437 (IF_{2021} 10.753; Ministry of Education and Science points = 200)
5. Felis E., Buta-Hubeny M., Zieliński W., **Hubeny J.**, Harnisz M., Bajkacz S., Korzeniewska E. 2022. Solar-light driven photodegradation of antimicrobials, their transformation by-products and antibiotic resistance determinants in treated wastewater. *Science of the Total Environment*, 836, 155447 (IF_{2021} 10.753; Ministry of Education and Science points = 200)

Cumulative Impact Factor of the journals in which the abovementioned papers were published amounts to 30.669. Some of the articles resulted from cooperation with Institute for Ecology of Industrial Areas, Katowice (article no. 1), Warsaw Medical University (article no. 2), Silesian University of Technology, Katowice (article no. 2, 3 and 5) as well as other departments of University of Warmia and Mazury. The articles have six to nine authors. The Candidate is the first author of four of the five articles. Assessment of the authors' statements indicates that **Jakub Hubeny contributed significantly to their formation**, participating in conceptualization, laboratory analyzes, interpretation, data curation, and manuscript preparation.

The doctoral dissertation of Jakub Hubeny concerns the problem of dissemination of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment. Wastwater treatment plants (WWTPs) play an important role in the flow of ARB and ARGs, because they offer favorable conditions for the transfer of ARGs from pathogenic to environmental strains and vice versa. Hence, I consider it interesting and important that the aim of this work was to

determine if the origin of inflowing municipal wastewater affects antimicrobial resistance of bacteria in wastewater and the water of the river receiving final effluent. Additional goal was to estimate the effectiveness of photodegradation in removing antimicrobials and ARGs in municipal wastewater. To achieve this goal, the Candidate formulated three research hypotheses which he tested in four stages of the study.

In **Stage 1**, described in article no. 1, the Candidate focused on determination of the prevalence of genes determining two mechanisms of resistance to tetracyclines in wastewater sampled at two WWTPs as well as in the waters of the receiving river sampled upstream and downstream the point the discharge of final effluents. The WWTPs chosen for this study were located in Silesia and Warmia and Mazury – two regions with different level of industrialization, which was reflected by the composition of municipal wastewater incoming to the WWTPs. The presence of *tet*(A) and *tet*(M) genes was determined by conventional PCR. Mr. Jakub Hubeny found that wastewater treatment does not eliminate those genes and WWTPs may contaminate the environment with ARGs. He also indicated the need for modifying the treatment process in order to solve that problem. Unfortunately, the Candidate did not carry out a quantitative analysis by real-time PCR, which should have allowed getting more information about the differences between the two WWTPs analyzed. Moreover, I would be more cautious in formulating conclusions regarding seasonality of the *tet* gene presence upon two sampling events.

The results of **Stage 2** were presented in articles no. 2 and 3. The Candidate undertook an assessment of the effect of incoming municipal sewage on the prevalence of ARGs. The study material, like in stage 1, was sampled in two WWTPs: one with relatively high proportion of incoming industrials wastewater, and the other with relatively high proportion of incoming hospital wastewater. In this stage, the research was carried out with the use of advanced methods of molecular biology (including qPCR and next-generation sequencing) and statistics. The Candidate performed quantitative analysis of genes conferring resistance to antibiotics and integron-integrase genes that are related with antimicrobial resistance. He also determined correlations between the presence and concentration of ARGs with concentrations of antibiotics, heavy metals as well as the taxonomic composition of bacterial populations. It is worth to emphasize that the Candidate attempted to explain the fate of genes coding for carbapenemases – enzymes that hydrolize carbapenems regardes as "last resort" drugs in the treatment of infections caused by Gram-negative bacteria – during wastewater treatment process.

Third stage of the study (described in article no. 4) concerned the characteristics of carbapenem-resistance genes in bacteria of the genus *Acinetobacter* in samples originated from a wastewater treatment plant in Olsztyn and the receiver of its treated wastewater. The Candidate worked with both bacterial isolates and total DNA isolated directly from the samples. The genus *Acinetobacter* includes clinically important bacteria rarely investigated in studies on municipal wastewater resistome. Carbapenem-resistant *A. baumannii* strains have been recognized by WHO as critical-priority pathogens that require new antibiotics. Hence, I give credit to Mr. Jakub Hubeny for undertaking a study on the issue of their presence in wastewater and the environment, which was logical continuation of the research presented in article no. 3.

Stage 4 (article no. 5) of the doctoral thesis focused on determination of the effectiveness of degradation of antibiotics and ARGs in treated wastewater by solar-driven photolysis combined with TiO_2-based photocatalysis. Results obtained in this stage have application potential, as Mr. Hubeny showed that these additional methods of sewage treatment significantly reduce the concentration of antimicrobial drugs, ARGs, and integron-integrase genes. Introduced into the technology of wastewater treatment, they may improve the quality on the final effluents discharged to the receiving water courses, decreasing that way the participation of WWTPs in the spread of antimicrobial resistance. I do hope this research will be continued in future.

Questions and critical comments

The presented doctoral thesis comprises a series of journal articles that were already subjected to peer review and published in (mostly) renowned journals, so they get through critical evaluation. Nevertheless, I would like the Candidate to address the following issues:

- How would you explain the lack of *tet*(M) gene in samples originated from biological reactor (P3) of the Warmia and Mazury WWTP, while you got positive results from P4 and P5 samples (article no 1)?
- Keeping in mind that antibiotic presence should create selective pressure, how would you explain the of correlation between the concentration of sulfonamides and *sul1* and *sul2* gene copy numbers (article no. 2)?

- During Stage 2 (in article no. 3) you put special attention to three bacterial families explaining the choice by the fact that their representatives often produce beta-lactamases. Could you elaborate this issue for the family *Fusobacteriaceae*?
- In the description of the methods used in confirmation of *Acinetobacter* spp., there in an information that it was done upon the presence of *recA* gene. This gene is present in the genomes of most bacteria, I think it was rather about amplification of a gene fragment with highly conserved *Acinetobacter*-specific sequences targeted by the primers.

Conclusions

I highly appreciate the doctoral dissertation on Mr. Jakub Hubeny. The Candidate focus on an important issue concerning the resistome of municipal wastewater and the participation of wastewater in the spread of antimicrobial resistance. The results were published in five thematically coherent articles that were presented in the dissertation in chronological and, at the same time, logical way. **The aim of the study was clearly presented and accomplished, thanks to the use of appropriate methodology** that included state-of-the-art metagenomic approach. Not only the candidate proved he is capable of doing experiments with various techniques, but also showed extensive theoretical knowledge that he effectively used in data iinterpretation.

The doctoral dissertation of Mr. Jakub Hubeny **presents an original solution of a scienfific problem**. Summing up, in my opinion the doctoral dissertation of Jakub 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 Mr. Jakub Hubeny to further stages of the defense of his doctoral thesis**. Moreover, keeping in mind a broad spectrum of methods used, high merit level of the research which led to 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 award.

Rygmard Kraczura

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii

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

Poznań, 15.11.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Jakub Hubenego pt. „Influence of wastewater origin on the spread of antibiotic resistance" („Wpływ pochodzenia ścieków na rozprzestrzenianie się antybiotykooporności")

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Jakuba Hubenego została wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr hab. inż. Moniki Harnisz, prof. UWM i dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. Politechniki Śląskiej. Kandydat ubiega się o **stopień doktora w dziedzinie nauk przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne**.

Rozprawę przedstawiono w języku angielskim. Składa się ona z wykazu źródeł finansowania, wykazu publikacji składających się na rozprawę doktorską, streszczenia w języku angielskim i polskim, wstępu, celu pracy, przedstawienia wyników, podsumowania, wykazu piśmiennictwa oraz kopii pięciu artykułów, w których przedstawiono wyniki wraz z materiałami dodatkowymi. Do publikacji dołączono oświadczenia współautorów. **Układ rozprawy doktorskiej jest prawidłowy**, zawiera ona wszystkie elementy niezbędne do jej oceny. **Piśmiennictwo** zastosowane ramach rozprawy pochodzi w zdecydowanej większości z ostatnich 10 lat i **zostało właściwie dobrane**.

Wyniki będące przedmiotem dysertacji zawarto w następujących pracach, opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports:

1. **Hubeny J.**, Buta M., Zieliński W., Harnisz M., Korzeniewska E., Nowrotek M., Płaza G. 2019. The prevalence of *tet*(A) and *tet*(M) tetracycline resistance genes in municipal wastewater. *Journal of Ecological Engineering*, 20, 1-6 (MEiN 40 pkt.)

2. **Hubeny J.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Buta M., Zieliński W., Rolbiecki D., Giebułtowicz J., Nałęcz-Jawecki G., Płaza G. 2021. Industrialization as a source of heavy metals and antibiotics which can enhance the antibiotic resistance in wastewater. *PLoS ONE*, 16, e0252691 (IF_{2021} 3,752; MEiN 100 pkt.)
3. **Hubeny J.**, Ciesielski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Dulski T., Jałowiecki Ł., Płaza G. 2021. Impact of hospital wastewater on the occurrence and diversity of beta-lactamase genes during wastewater treatment with an emphasis on carbapenemase genes: a metagenomic approach. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 738158 (IF_{2021} 5,411; MEiN 100 pkt.)
4. **Hubeny J.**, Korzeniewska E., Buta-Hubeny M., Zieliński W., Rolbiecki D., Harnisz M. 2022. Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and *Acinetobacter* spp. isolates from wastewater and river water in Poland. *Science of the Total Environment*, 822, 153437 (IF_{2021} 10,753; MEiN 200 pkt.)
5. Felis E., Buta-Hubeny M., Zieliński W., **Hubeny J.**, Harnisz M., Bajkacz S., Korzeniewska E. 2022. Solar-light driven photodegradation of antimicrobials, their transformation by-products and antibiotic resistance determinants in treated wastewater. *Science of the Total Environment*, 836, 155447 (IF_{2021} 10,753; MEiN 200 pkt.)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF, Impact Factor) ww. prac wynosi 30,669. Niektóre z nich powstały we współpracy z Instytutem Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (artykuł 1 i 3) w Katowicach, Warszawskim Uniwersytetem Medycznym (artykuł 2) oraz Politechniką Śląską (artykuł 2, 3 i 5), a także innymi jednostkami UWM. Wszystkie są wieloautorskie – mają od sześciu do dziewięciu autorów. Pan mgr Jakub Hubeny jest pierwszy autorem czterech z pięciu artykułów. Z oświadczeń złożonych przez Doktoranta oraz współautorów prac wynika, że **mgr Jakub Hubeny miał istotny udział w ich powstaniu**: w planowaniu i realizacji części doświadczalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów.

Rozprawa doktorska mgr. Jakuba Hubenego dotyczy problemu rozprzestrzeniania się w środowisku bakterii opornych na antybiotyki (ARB) i genów determinujących tę oporność (ARG). Ważną rolę w przepływie ARB i ARG pełnią oczyszczalnie ścieków, bowiem panują w nich warunki sprzyjające przekazywaniu ARG z bakterii chorobotwórczych do środowiskowych

i odwrotnie. Stąd też uważam za ciekawy i jednocześnie ważny cel rozprawy, którym było określenie, czy rodzaj ścieków doprowadzanych do oczyszczalni wpływa na antybiotykooporność bakterii w ściekach oraz wodach odbiornika ścieków oczyszczonych. Dodatkowym celem było zbadanie skuteczności fotodegradacji w usuwaniu antybiotyków i ARG w ściekach miejskich. Do realizacji tych celów Doktorant sformułował trzy hipotezy badawcze, które zweryfikował w czterech etapach pracy.

W **pierwszym etapie**, opisanym w artykule 1, Doktorant skupił się na analizie występowania genów warunkujących dwa mechanizmy oporności bakterii na tetracykliny w ściekach pobranych z dwóch oczyszczalni ścieków, a także w wodach odbiornika pobranych przed i za miejscem zrzutu ścieków oczyszczonych. Oczyszczalnie, z których pobierano próbki zlokalizowane były w województwie śląskim i warmińsko-mazurskim, a więc na terenach o różnym stopniu uprzemysłowienia, co miało odzwierciedlenie w charakterystyce ścieków dopływających. Obecność badanych genów *tet*(A) i *tet*(M) była określana metodą konwencjonalnego PCR. Pan mgr Hubeny stwierdził m.in, że proces oczyszczania ścieków nie eliminuje z nich ww. genów, a oczyszczalnie ścieków mogą być potencjalnym źródłem zanieczyszczenia nimi środowiska. Wskazał też na potrzebę modyfikacji procesu oczyszczania w celu rozwiązania tego problemu. Trochę szkoda, że Doktorant nie spróbował ilościowej analizy metodą real-time PCR, która powinna pozwolić na pełniejszy obraz różnic w poziomie tych genów między oczyszczalniami. Ostrożny byłbym też w formułowaniu wniosków nt. sezonowości występowania genów gdy badania przeprowadzono na próbkach pobranych dwukrotnie.

Wyniki **drugiego etapu badań** przedstawiono w artykułach 2 i 3. Doktorant podjął się w nim oceny wpływu charakteru ścieków dopływających na występowanie ARG. Materiał do badań, podobnie jak w pierwszym etapie, pobierano w dwóch oczyszczalniach; do jednej z nich dopływają ścieki stosunkowo dużym udziale ścieków przemysłowych, do drugiej – o stosunkowo większym udziale ścieków szpitalnych. Badania przeprowadzone w tym etapie były prowadzone już z użyciem bardziej zaawansowanych metod biologii molekularnej (w tym qPCR i NGS) i statystycznych. Doktorant przeprowadził ilościową analizę zawartości genów warunkujących oporność na antybiotyki i związanych z opornością genów integraz integronowych. Skorelował też obecność i stężenie ARG ze stężeniem antybiotyków i metali ciężkich w ściekach, jak również ze składem taksonomicznym populacji bakterii. Na

podkreślenie zasługuje podjęcie się próby wyjaśnienia tego co dzieje się w podczas oczyszczania ścieków z genami odpowiedzialnymi za produkcję karbapenemaz – enzymów degradujących antybiotyki „ostatniej szansy" w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi.

Trzeci etap pracy (opisany w artykule 4) dotyczył scharakteryzowania genów oporności na karbapenemy u bakterii z rodzaju *Acinetobacter* w próbkach pobranych z oczyszczalni ścieków w Olszynie oraz z wód odbiornika ścieków oczyszczonych. Doktorant prowadził badania zarówno na izolatach bakterii, jak na próbkach całkowitego DNA izolowanego bezpośrednio z próbek materiałów. Rodzaj *Acinetobacter* to ważna z klinicznego punktu widzenia grupa bakterii, stosunkowo rzadko brana pod uwagę w badaniach dotyczących rezystomu ścieków miejskich. Szczepy *A. baumannii* oporne na karbapenemy zostały uznane przez WHO za patogeny przeciw którym najpilniej należy opracować nowe leki. Stąd doceniam, że mgr Hubeny pochylił się nad zagadnieniem ich obecności w ściekach i środowisku, logicznie kontynuując badania przedstawione w artykule 3.

Etap czwarty (artykuł 5) Doktorant poświęcił na określenie skuteczności fotodegradacji z wykorzystaniem światła słonecznego i TiO_2 jako fotokatalizatora w usuwaniu antybiotyków i ARG ze ścieków oczyszczonych. Wyniki uzyskane w tym etapie **mają potencjał aplikacyjny**, bowiem mgr Hubeny wykazał, że te dodatkowe metody oczyszczania ścieków znacząco redukują stężenie leków przeciwbakteryjnych, ARG i genów integraz integronowych, a więc wdrożenie ich do ciągu technologicznego oczyszczania ścieków spowodowałoby poprawienie pod tym względem jakości ścieków odprowadzanych do wód odbiornika, a więc do środowiska, ograniczając udział oczyszczalni ścieków w rozprzestrzenianiu się zjawiska antybiotykooporności bakterii. Liczę, że badania w tym kierunku będą w przyszłości kontynuowane.

Pytania i uwagi krytyczne

Przedstawione do oceny rozprawa doktorska opiera się na cyklu artykułów, które zostały już opublikowane, więc podlegały krytycznej ocenie recenzentów, niemniej jednak pozwolę sobie zamieścić kilka pytań i uwag:

- Jak można wyjaśnić brak genu *tet*(M) w próbkach ścieku z bioreaktora (P3) pobranych z warmińsko-mazurskiej oczyszczalni w czerwcu, przy dodatnich wynikach dla próbek P4 i P5 (artykuł 1)?
- Biorąc pod uwagę, że obecność antybiotyków powinna stwarzać presję selekcyjną, jak można wyjaśnić brak korelacji między poziomem sulfonamidów a liczbą kopii genów *sul1* i *sul2* (artykuł 2)?
- W etapie 2 (artykuł 3) skupił Pan uwagę na trzech rodzinach bakterii, których przedstawiciele często wytwarzają beta-laktamazy. Czy mógłby Pan przybliżyć tę kwestię dla rodziny *Fusobacteriaceae*?
- W metodach dotyczących identyfikacji *Acinetobacter* spp. pojawia się informacja, że przynależność izolatów do tego rodzaju potwierdzano na podstawie obecności genu *recA*. Gen ten występuje u większości bakterii, chodzi raczej o amplifikację fragmentu tego genu o silnie zakonserwowanych, specyficznych dla *Acinetobacter* spp. sekwencjach, które są komplementarnych do zastosowanych starterów.

Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską Pana mgr. Jakuba Hubenego oceniam wysoko. Doktorant podjął ważny temat związany z rezystomem ścieków miejskich i udziałem ścieków w rozprzestrzenianiu się antybiotykooporności. Wyniki opisano w pięciu artykułach, które są spójne tematycznie, zostały przedstawione w rozprawie chronologicznie i w logicznie sposób. **Cel pracy został jasno określony i osiągnięty dzięki zastosowaniu właściwie dobranych metod** z dużym udziałem nowoczesnego podejścia metagenomicznego. Doktorant udowodnił, że nie tylko potrafi wykonywać eksperymenty z zastosowaniem różnych technik i narzędzi, ale **ma też dużą wiedzę teoretyczną**, która potrafi wykorzystać do interpretacji wyników.

Przedstawiona do oceny **rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Podsumowując, uważam, że **rozprawa doktorska Pana mgr. Jakuba Hubenego 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**.

Bernard Kocurek