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 of Jakub Szymon Hubena, M.Sc., entitled "The influence of wasterwater origin on the spread of antibiotic resistance", performed in the Department of Water Protection Engineering and Environmental Microbiology, under the scientific supervision of dr hab. Monika Harnisz, UWM Prof., and dr hab. Sylwia Bajkacz, SUT Prof.

The doctoral thesis of Jakub Szymon Hubena, M.Sc., submitted for evaluation, presents the results of a study on determining the influence of the origin of municipal wastewater on the antibiotic resistance of bacteria residing in river water receiving the treated wastewater. In addition, the doctoral thesis presents the effectiveness of photolysis affecting the degradation of antibiotics and determinants of antibiotic resistance in treated municipal wastewater. The research topics are of great interest and contribute very important information to biological sciences. The problem of antibiotic resistance is widespread and represents one of the most important public health threats. The misuse of antibiotics in medicine, veterinary medicine or agriculture and their presence in wastewater contribute to the emergence of resistant strains. Therefore, I believe that the results obtained by Jakub Szymon Hubena, M.Sc. are particularly important and relevant to society.

The structure of the doctoral thesis is well thought out. At the outset, the doctoral student presented a list of publications with up-to-date bibliometric parameters and a summary of the research in English and Polish as well. The dissertation was divided into 4 stages with a total of 5 scientific publications. All stages of the research form an integral whole, well thought and precisely written. The doctoral student has excelled in his ability to write scientific papers, as evidenced by papers published in high-scoring journals. The author has published the results of his research in journals:

1 paper in Environment International (IF 13.352), 2 papers in Science of the Total Environment (IF 10.753), 1 paper in PLOS ONE (3.752), Frontiers in Environmental Science (IF 5.411) and 1 paper in Journal of Ecological Engineering (IF 1.339). These are journals that also have high scores from the Ministry of Science and Higher Education (200 and 100 points). The Journal of Ecological Engineering has the least - 40 pts. However, this does not lessen the contribution of the work of Jakub Szymon Hubena, M.Sc. In most of the publications, the PhD student is the first author and his contribution to the preparation of the papers was significant. Only in one paper published in Science of the Total Environment, he is the fourth author. In all the papers, the PhD student was involved in the planning of the experiment as well as in the execution of the experiments, analysis and interpretation of the results. In addition, Jakub Szymon Hubena, M.Sc., independently performed the literature review and prepared the manuscript. For each publication, the doctoral student included statements from the co-authors of the papers.

The first step of the research by Jakub Szymon Hubena, M.Sc., focused on the occurrence of tetracycline resistance genes in sewage sludge and wastewater, as well as in the water of a river receiving treated wastewater from two different wastewater treatment plants. The doctoral student used standard PCR and qPCR chain reaction techniques in his research. Jakub Szymon Hubena, M.Sc., showed significant differences in the frequency of tetracycline resistance genes depending on the type of wastewater. At the same time, the results showed that resistance genes could not be removed during the treatment process. The results of the same research were published in the Journal of Ecological Engineering.

This step of the research raises questions for me:

- why did the doctoral student only sample in June and November and not all seasons, what guided the doctoral student in choosing the sampling time ?
- perhaps I missed which river the doctoral student was sampling
- in his research the doctoral student did not observe seasonal changes in the occurrence of the genes studied. Can the doctoral student indicate the reason ?
- for the efficient reduction of resistance genes from wastewater, the doctoral student suggests modifying the treatment technique. What kind of modifications does the doctoral student propose?

- why did the doctoral student focus on the occurrence of tetracycline resistance genes and not on other groups of antibiotics at this stage of the study ?

In the second step, the doctoral student investigated the contribution of industrial and hospital wastewater to the problem of antibiotic resistance in municipal wastewater in the two treatment plants studied. This step of the research used the results from the analyses of the relationship between antibiotic and heavy metal-containing pollutants and the determinants of antibiotic resistance, as well as the results determining the diversity of beta-lactam antibiotic resistance genes. But, the doctoral student did not observe a correlation between the concentration of antibiotics in the samples and the occurrence of resistance genes. However, he found a significant correlation between heavy metal concentration and the number of resistance genes. This is an important finding, as the study confirmed the promotion of the occurrence of drug resistance by heavy metals. At the same time, Jakub Szymon Hubena, M.Sc., showed differences in the occurrence of resistance genes depending on the type of wastewater. The results of these studies were published by the PhD student in PLOS ONE and Frontiers in Environmental Science. Methodologically, the work is prepared according to molecular biology and biochemical techniques. HPLC-MS/MS chromatography was used in this part of the study. The PhD student has prepared the data carefully, factually and clearly in the form of tables and figures.

I have some questions:

- As in the previous stage, samples were taken in June and November. I wonder if sampling seasonally would not give a greater correlation of resistance gene occurrence.
- The doctoral student has stated that the discharge of treated wastewater from a wastewater treatment plant associated with an influent of industrial wastewater into the environment may still pose a risk to human health due to antibiotic resistance genes or heavy metals. In view of this statement, is treated effluent from a treatment plant linked to hospital effluent safe ?

In the third step, the doctoral student focused on determining the presence of antibiotic resistance determinants in Acinetobacter sp. isolated from wastewater at all stages of treatment and in river water. Using qualitative and quantitative PCR and metagenomic analysis, he determined the presence of bata-lactam antibiotic

resistance genes, ISAba1 insertion sequence, class I, II and III integrase genes and taxonomy. Based on the study, the doctoral student demonstrated a lack of reduction of Acinetopabcter sp. isolates carrying antibiotic resistance genes in treated wastewater, suggesting inefficient treatment. The results of this part of the study were also published in a high-scoring journal - Science of the Total Environment. The publication was prepared with great precision. The doctoral student described the materials and methods in detail and according to the techniques used in the molecular biology. In this publication, the doctoral student presented the results of his research in the form of figures and tables. The tables presented as a supplement are valuable element of this work. A publication prepared in this way testifies to the scientific maturity and writing skills of the doctoral student. Mr Jakub Szymon Hubeny, M.Sc., in this publication, in addition to contributing to the analyses, independently reviewed the literature, prepared the first version of the manuscript and took into account the reviewers' comments.

At this stage of the research, questions arise for me:

- why the doctoral student only studied the presence of antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter* sp. and not other strains e.g. *Salmonella* sp. or *Staphylococcus* sp.

In the fourth and final step, the doctoral student tested the removal efficiency of antibiotics and determinants of antibiotic resistance from wastewater treated by photodegradation. In this part, the doctoral student investigated the removal of various antibiotics from wastewater, including ampicillin, vancomycin, metronidazole, tylosin, trimethoprin, doxycyline, oxytotracycline and their genes using UHPLC and qPCR techniques. He published the results of this research in the journal Science of the Total Environment. This part of the research provides valuable information, i.e., exposure to sunlight and the use of a photocatalyst (TiO_2) significantly reduces antibiotics and their resistance genes. Studies by Jakub Szymon Hubny, M.Sc., and co-authors have shown up to 90 per cent elimination of resistance genes. By analysing the results of these studies, there is a hope of reducing the transmission of antibiotic resistance genes. The publication is very well prepared in terms of content and graphics.

This stage of the research raises the question for me:

- photodegradation offers the possibility of improving the quality of treated wastewater. I wonder if such an improvement in technology will allow more efficient treatment of wastewater throughout the year. Can environmental factors significantly influence the photodegradation of antibiotics and their genes ?

After a full analysis of the doctoral thesis, the results presented and published in very good journals lead me to give a positive evaluation. Obtaining such results required a great deal of knowledge, literature expertise, research work, discipline and also humility from the doctoral student and the other co-authors. The publications were evaluated by numerous foreign reviewers and this certainly required a great deal of responsibility for the results obtained and the correction of the work after review. The molecular techniques used demonstrate the doctoral student's scientific maturity and precision. The doctoral student has excellently fulfilled the research tasks undertaken. I consider the results of the research valuable and they have also been noted by foreign reviewers. The scientific output for a young scientist is impressive. Jakub Szymon Hubeny, M.Sc., is co-author of 13 renowned, high-scoring publications. In three publications he is the first author. Such a scientific output is very impressive.

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 Jakub Szymon Hubeny, M.Sc. 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 Jakub Szymon Hubeny, M.Sc. for the results of his scientific work.

Toruń, 4.11.2022 Sylwia Brzezińska

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

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Recenzja

pracy doktorskie mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny zatytułowana "Wpływ pochodzenia ścieków na rozprzestrzenianie się antybiotykooporności", wykonanej w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej, pod opieką naukową dr hab. inż. Moniki Harnisz i dr hab. Sylwii Bajkacz, prof. PŚ.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny, przedstawia wyniki badań nad określeniem wpływu pochodzenia ścieków komunalnych na antybiotykooporność bakterii bytujących w ściekach w wodzie rzecznej, która odbiera ścieki oczyszczone. Ponadto praca doktorska przedstawia efektywność fotolizy wpływającej na degradację antybiotyków i determinantów antybiotykoodporności w oczyszczonych ściekach komunalnych. Tematyka badań jest bardzo interesująca i wnosi bardzo ważne informacje do nauk biologicznych. Problem antybiotykoodporności jest szeroko rozpowszechniony i stanowi jedno z najważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego. Nadużycia antybiotyków w medycynie, weterynarii czy rolnictwie i ich obecność w ściekach przyczyniają się do powstawania szczepów opornych. Dlatego uważam, że wyniki uzyskane przez mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny są szczególnie ważne i istotne dla społeczeństwa.

Układ pracy jest bardzo dobrze przemyślany. Na początku, doktorat przedstawił 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 5 publikacji naukowych. Wszystkie etapy badań stanowią integralną całość, dobrze przemyślaną i precyzyjnie napisane. Doktorant znakomicie osiągnął umiejętność pisania prac naukowych, czego dowodem są prace opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach. Autor opublikował wyniki swoich badań w czasopismach: 1 praca w Environment International (IF 13,352), 2 praca w Science of the Total Environment (IF 10,753), 1 praca w PLOS ONE (3,752),

Frontiers in Environmental Science (IF 5,411) oraz 1 praca w Journal of Ecological Engineering (IF 1,339). Są to czasopisma, które mają również wysoką punktację Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (200 i 100 pkt). Journal of Ecological Engineering ma najmniej - 40 pkt. Nie umniejsza to jednak wkładu pracy mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny. W większości publikacjach doktorat jest pierwszym autorem, a jego udział w przygotowaniu prac był znaczący. Jedynie w jednej pracy opublikowanej w Science of the Total Environment jest czwartym autorem. We wszystkich pracach, doktorat brał współudział w planowaniu oraz w przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników. Ponadto mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny samodzielnie wykonywał przegląd literatury i przygotowywał manuskrypt. Do każdej publikacji, doktorant dołączył oświadczenia współautorów prac.

W pierwszym etapie badań mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny skupił się występowaniu genów oporności na tetracykliny w osadach ściekowych i ściekach oraz wodzie rzeki będącej odbiornikiem ścieków oczyszczonych z dwóch różniących się ściekami oczyszczalni. W badaniach doktorant wykorzystał standardowe techniki reakcji łańcuchowej PCR oraz qPCR. Mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny wykazał istotne różnice w częstości pojawienia się genów oporności na tetracykliny w zależności od rodzaju ścieków. Jednocześnie wyniki badań wykazały brak możliwości usuwania genów oporności w procesie oczyszczania. Wyniki tych badań zostały opublikowane w Journal of Ecological Engineering.

W tym etapie badań nasuwają mi się pytania:

- dlaczego doktorant pobierał próby tylko w czerwcu i w listopadzie, a nie przez wszystkie sezony, czym doktorant kierował się wyborem czasu poboru prób ?
- być może umknęło mi, z jakiej rzeki doktorant pobierał próby
- w swoich badaniach doktorant nie obserwował zmian sezonowych występowania badanych genów. Czy doktorant może wskazać przyczynę ?
- doktorant do wydajnego redukowania genów oporności ze ścieków wskazuje modyfikację techniki oczyszczania. Jakiego rodzaju modyfikacje doktorant proponuje ?
- dlaczego doktorant w tym etapie badań skupił się na występowaniu genów oporności na tetracykliny, a nie innych grupach antybiotyków ?

W drugim etapie doktorant badał udział ścieków przemysłowych i szpitalnych na zjawisko antybiotykooporności w ściekach komunalnych w dwóch badanych oczyszczalniach. W tym etapie badań wykorzystano wyniki z przeprowadzonych analiz zależności między zanieczyszczaniami zawierające antybiotyki i metale ciężkie a determinantami antybiotykoodporności a także wyniki określające różnorodność genów oporności na antybiotyki beta-laktamowe. Doktorat nie obserwował zależności między stężeniem antybiotyków w badanych próbkach a występowaniem genów oporności. Jednak stwierdził istotną zależność miedzy stężeniem metali ciężkich a ilością genów oporności. To jest istotny wniosek, ponieważ badania potwierdziły promowanie występowania zjawiska lekooporności przez metale ciężkie. Jednocześnie mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny wykazał różnice w występowaniu genów oporności w zależności od rodzaju ścieków. Wyniki tych badań doktorant opublikował w PLOS ONE i Frontiers in Environmental Science. Pod względem metodycznym prace są przygotowane zgodnie z technikami biologii molekularnej oraz biochemicznymi. W tej części badań wykorzystano chromatografię HPLC-MS/MS. Doktorant starannie, rzeczowo i przejrzyście opracował dane w postaci tabel i wykresów.

W tym etapie nasuwają mi się pytania:

- podobnie jak w poprzednim etapie próby pobierano w czerwcu i listopadzie. Zastanawiam się czy pobieranie prób sezonowo nie dałyby większej zależności występowania genów oporności.
- doktorant stwierdził, że zrzut ścieków oczyszczonych z oczyszczalni powiązanej z dopływem ścieków przemysłowych do środowiska naturalnego może stanowić ciągle zagrożenie dla zdrowia człowieka ze względu na geny antybiotykoodporności czy metali ciężkich. Czy w związku z tym stwierdzeniem ścieki oczyszczone pochodzące z oczyszczalni powiązane ze ściekami szpitalnymi są bezpieczne ?

W trzecim etapie, doktorant skupił się na określeniu obecności determinantów oporności na antybiotyki u *Acinetobacter* sp. wyizolowanych ze ścieków na wszystkich etapach oczyszczania oraz w wodzie rzecznej. Stosując jakościową i ilościową technikę PCR oraz analizę metagenomiczną określił obecność genów oporności na antybiotyki bata-laktamowe, sekwencji insercyjnej *ISAba*1, genów integrazy klasy I, II

i III oraz taksonomię. Na podstawie badań doktorant wykazał brak redukcji izolatów *Acinetopabcter* sp. niosących geny oporności na antybiotyki w ściekach oczyszczonych, co sugeruje na nieefektywne oczyszczanie. Wyniki badań tej części zostały opublikowane również w wysoko punktowanym czasopiśmie – Science of the Total Environment. Publikację przygotowano z ogromną precyzją. Materiały i metody, doktorant opisał szczegółowo i zgodnie z technikami stosowanymi w biologii molekularnej. W omawianej publikacji, doktorant wyniki swoich badań przedstawił w postaci wykresów i tabel. Bardzo cennym elementem tej pracy są tabele przedstawione jako suplement. Tak przygotowana publikacja świadczy o dojrzałości naukowej i umiejętności pisania doktoranta. Pan mgr inż. Jakub Szymon Hubeny w tej publikacji oprócz współudziału w wykonaniu analiz, samodzielnie dokonał przeglądu literatury, przygotował pierwszą wersję manuskryptu oraz uwzględniał uwagi recenzentów.

Na tym etapie badań nasuwają mi się pytania:

- dlaczego doktorant obecności determinantów oporności na antybiotyki u *Acinetobacter* sp. a nie innych szczepów np. *Salmonella* sp. czy *Staphylococcus* sp.

W czwartym, ostatnim etapie, doktorant sprawdzał efektywność usuwania antybiotyków oraz determinantów antybiotykoodporności ze ścieków oczyszczonych wskutek fotodegradacji. W tej części, doktorant badał usuwanie ze ścieków różnych antybiotyków, m.in. ampicylinę, wankomycynę, metronidazol, tylozynę, trymetoprin, doksycylinę, oksytotracyklinę oraz ich genów stosując techniki UHPLC oraz qPCR. Wyniki tych badań opublikował w czasopiśmie Science of the Total Environment. Ta część badań dostarcza bardzo cennych informacji, ponieważ naświetlanie światłem słonecznym oraz wykorzystanie fotokatalizatora (TiO_2) znacząco zmniejsza ilość antybiotyków oraz ich genów oporności. Badania mgr inż. Jakuba Szymona Hubnego oraz współautorów wykazały nawet w 90% eliminacji genów oporności. Analizując wyniki tych badań jest nadzieja na zmniejszenie transmisji genów oporności na antybiotyki. Publikacja pod względem merytorycznym i graficznym jest bardzo dobrze przygotowana.

W tym etapie badań nasuwa mi się pytanie:

- fotodegradacja daje możliwość poprawy jakości ścieków oczyszczonych. Zastanawiam się czy takie ulepszenie technologii pozwoli na efektywniejsze oczyszczenie ścieków przez cały rok. Czy czynniki środowiskowe mogą istotnie wpływać fotodegradację antybiotyków i ich genów ?

Po pełnej analizie pracy doktorskiej, przedstawione i opublikowane wyniki w bardzo dobrych czasopismach skłaniają mnie do wydania pozytywnej oceny. Uzyskanie takich wyników wymagało od doktoranta i pozostałych współautorów ogromnej wiedzy, znajomości literatury, pracy badawczej, dyscypliny, a także pokory. Publikacje były oceniane przez licznych recenzentów zagraniczny i to z pewnością wymagało dużej odpowiedzialności za uzyskane wyniki oraz poprawienia pracy po recenzji. 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 zauważone również przez zagranicznych recenzentów. Dorobek naukowy dla młodego naukowca jest imponujący. Pan mgr inż. Jakub Szymon Hubeny jest współautorem 13 renomowanych, wysoko punktowanych publikacji. W trzech publikacjach jest pierwszym autorem. Taki dorobek naukowy robi ogromne wrażenie.

W związku z pozytywną oceną rozprawy doktorskiej, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Jakuba Szymona Hubeny 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. Jakuba Szymona Hubeny za uzyskane wyniki pracy naukowej.

Toruń, 4.11.2022 Swiatlana Brzezińska