Łódź, 08.11.2022 r

Prof. Joanna Mankiewicz-Boczek
UNESCO Chair on Ecohydrology and Applied Ecology
Faculty of Biology and Environmental Protection
University of Lodz

Review

Doctoral thesis of Jakub Szymon Hubena, M.Sc.

entitled: **"Influence of wastewater origin on the spread of antibiotics resistance"**

completed at the Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, under the scientific supervision of Monika Harnisz, PhD., Prof. of University of Warmia and Mazury and Sylwia Bajkacz, Ph.D., Prof. of the Silesian University of Technology

1. Relevance of the choice of subject matter

The phenomenon of antibiotic resistance is a global problem, representing one of the greatest threats to public health. The source of this environmental threat is the use of antibiotics in medicine, veterinary medicine and agriculture, and its consequence is the ubiquitous presence of both antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes (ARGs).

A key site for the formation of antibiotic resistance and the spread of resistance are wastewater treatment plants. WWTPs process wastewater containing, among other things, antibiotics, metals, drug-resistant bacteria and antibiotic resistance genes from hospitals, households and industrial plants. Unfortunately, wastewater treatment systems are designed to remove organic compounds, suspended solids and bacterial cells, but none of the existing solutions/technologies can eliminate the released genetic material, including mobile genetic elements that mediate the transmission of ARGs. In addition, the

problem is compounded by the fact that the risk of spreading antibiotic resistance is not stable, is dependent on the type of wastewater generated in an area, and can also be related to the season of the year.

There is therefore an urgent need to improve knowledge of the impact of the origin of municipal wastewater on the antibiotic resistance of bacteria present in wastewater and river water receiving treated wastewater, taking into account regions with different degrees of urbanisation, industrialisation and exposure to hospital wastewater. As a next step, action should be taken to eliminate the above-mentioned risk by modifying current wastewater treatment technologies and introducing additional processes such for example photodegradation.

The above confirms the validity and relevance of the choice of the topic of the doctoral dissertation by Mr Jakub Hubeny, M.Sc. The dissertation presents **the results of research aimed at determining the influence of the origin of municipal wastewater on the antibiotic resistance of bacteria living in wastewater and river water receiving treated wastewater, and at determining the effectiveness of the process of photolysis affecting the degradation of antibiotics and determinants of antibiotic resistance in treated municipal wastewater.**

The research topic addresses a current global problem and brings new information to the assessment of the threat from antibiotic-resistant bacteria, their potential to spread, including the selection of appropriate marker genes, the impact of metals on the above process, **as well as the feasibility of methods to treat wastewater** for the elimination of antibiotics, their transformation products and ARGs.

2. Characteristics of the Doctoral thesis

Mr Jakub Hubeny, M.Sc., **presented a single-authored publication series entitled: "Influence of the origin of wastewater on the spread of antibiotic resistance" consisting of five articles containing original scientific research** published in international journals, including three of the JCR Jounal Citation Reports with high IF (PLoS One, Frontiers in Environmental Science and Science of the Total Environment).

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. J. Ecol. Eng. 20, 1–6. Number of points assigned by the Ministry of Education and Science: 40, IF: 0.

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, sewage sludge and river water. PLoS One 16, e0252691. Number of points assigned by the Ministry of Education and Science: 100, IF: 3.752.
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. Front. Environ. Sci. 9. Number of points assigned by the Ministry of Education and Science: 100, IF: 5.411.
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. Sci. Total Environ. 822. Number of points assigned by the Ministry of Education and Science: 200, IF: 10.753.
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. Sci. Total Environ. 836. Number of points assigned by the Ministry of Education and Science: 200, IF: 10.753.

All publications are co-authored, which is typical of complex research papers covering different research areas and multi-faceted analyses. Statements from the co-authors of the publications have been included. The PhD student is the first author in four publications, and his role was related to, among other things: study design, execution and interpretation of results, literature review and preparation of the first version of the manuscripts.

The total IF of the articles published as part of the PhD thesis' scientific achievement is 30.669, and the total number of Ministry of Science and Higher Education points, according to the year of publication**, is 640. The publications in which the PhD student is the first author were cited 22 times based on the Scopus database,** which is worthy of mention, as they were published between 2021 and 2022. In addition, **two articles were published in a journal with the Ministry of Science and Higher Education score of 200 and the IF exceeding 10.**

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

In terms of formal aspects, this PhD thesis is based on a clear compilation of published articles, which clearly identifies the scope of the work carried out by the PhD student. Moreover, it is a very well prepared PhD thesis in the layout of a collection of publications forming a thematically unified whole with a properly planned chronology of research.

The layout of the thesis is typical of doctoral dissertations based on a set of articles. The title page is followed by a list of publications included in the dissertation, then information sources of funding for the research carried out and the 'Table of contents'. Further on, the following pages contain an 'Abstract' and an 'Introduction' providing an introduction to the research topic. This is followed by information on the 'Research objective', 'Research hypotheses', 'Scope of the study' and further reference is made to 'Results', dividing the entire publication cycle into four stages. Each of the stages described included a detailed 'Aim of the study', and an abbreviated description of 'Materials and methods' and 'Results' and provided a citation to the publication detailing all aspects of the particular stage of research detailed in the dissertation. Following the four stages of research thus presented, a 'Summary and Conclusions' and 'Literature' were prepared. The full versions of the five research articles, together with supplementary supplementary data, are included in the remainder of the dissertation. Each article was followed by statements regarding the co-authors' contributions to the publications forming the basis for the PhD. The PhD student then summarised all publications as well as conference reports in which He is a co-author and included information on participation in a research project, internship and courses taken.

Jakub Hubeny, M.Sc., divided the research included in the dissertation into four stages, in which the research area was a consistent element - a municipal wastewater treatment plant from the Warmia and Mazury region and a wastewater treatment plant from the Silesia region - in the first three publications. **Genetic, microbiological, chemical analyses were carried out on samples from different stages of wastewater treatment, as well as river water taken upstream and downstream of the treatment plant.**

In a first stage, which can be seen as a preliminary to further more advanced analyses**, the presence of tetracycline resistance genes,** representing one of the groups of most common antibiotics worldwide**, was qualitatively assessed.** The results indicated **the existence of differences in the frequency of resistance genes depending on the characteristics of the influent wastewater and the possibility of seasonal variations in the presence of the monitored genes at different stages of treatment and in the river water.**

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

In the second stage of the study, the impact of the contribution of industrial and hospital wastewater on the phenomenon of antibiotic resistance in municipal wastewater treated at the above-mentioned wastewater treatment plants was assessed quantitatively, based on the abundance of selected antibiotic resistance genes, after metagenome analyses and assessment of antibiotic concentrations were made, also. In addition, the concentration of heavy metals was determined. Few significant relationships were observed between antibiotic concentrations and the occurrence of ARGs. **Significant correlations were found between the abundance of integrase genes, and ARGs abundance and metal concentration.** When comparing wastewater samples from two treatment plants characterised by hospital wastewater influent at different levels**, a greater diversity of beta-lactam resistance determinant gene types was found in wastewater with a higher percentage of hospital wastewater.**

The third stage of the study determined the presence of ARGs in *Acinetobacter* sp. strains isolated from wastewater samples at different stages of the treatment process and river water samples. *Acinetobacter* was chosen as a group of opportunistic pathogens towards humans, which are resistant to many drugs and readily adopt in different environments. **Strains of *Acinetobacter* sp. and *A. baumannii* were most frequently identified in sewage and river water samples collected June and September.** Metagenome analysis indicated that **the *bla*OXA-58 gene (representing the beta-lactam resistance gene complex) was most abundant in the samples. Carbapenem-resistant strains were also found.**

In the fourth stage of the study, the removal efficiency of antibiotics and ARGs from treated wastewater due to the photodegradation process was determined. In laboratory tests, using material collected from the wastewater treatment plant (after the treatment process), showed that **exposure to sunlight and the additional use of a photocatalyst in the form of TiO_2 can reduce the amount of antibiotics, their transformation products and ARGs in the treated wastewater.**

3. Evaluation of the Doctoral thesis

The research problem undertaken by the PhD student is significant and actual on a global scale, taking into account the need for the use of effective drugs in medicine, veterinary medicine and agriculture. Unfortunately, the overuse of drugs, and consequently their introduction into the environment, e.g. through wastewater treatment plants, is causing an increase in antibiotic resistance, and with it the possibility of various types of infections by resistant microorganisms. **Therefore, the evaluation of the scale of this problem from the stage of wastewater treatment plants, through river waters, to the**

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

activation of this process by specific groups of bacteria residing in aquatic ecosystems, as proposed by M.Sc. Jakub Hubeny in the dissertation, is a necessary action. As a consequence of the knowledge gained, the next step, as the PhD student has done, is to look for effective tools to eliminate antibiotics and ARGs in treated water.

The planned and completed research in the present dissertation required the PhD student to master the research techniques based on genetic methods, including bioinformatics analyses, as well as classical microbiology. The scope of the experiments was planned correctly, adequately to the aims set. Therefore, in terms of content, the dissertation is not objectionable. The results of the research were published in good and very good scientific journals, and all the articles formed a thematically coherent whole.

Among the most important achievements of M.Sc. Jakub Hubeny, presented in this dissertation, was the demonstration that:

1. The composition of municipal wastewater treated at the monitored WWTPs significantly influenced the generation of antibiotic resistance;
2. The reported correlations between the abundance of integrase genes, ARGs and heavy metal concentrations indicate an important role of integrons as mobile genetic elements in the spread of antibiotic resistance and metals in the induction of antibiotic resistance;
3. The inflow of hospital sewage to WWTPs increased the prevalence of antibiotic resistance determinants of particular clinical importance in wastewater samples;
4. The presence of genes encoding resistance to antibiotics of last resort, associated with serious hospital outbreaks, has been reported in municipal wastewater with a higher proportion of hospital sewage;
5. WWTPs play an important role in the spread of antibiotics, drug-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the environment;
6. The use of additional wastewater treatment methods, such as photocatalysis in the presence of TiO_2, can significantly increase the removal efficiency of antibiotics and ARGs from treated wastewater and reduce the contribution of WWTPs to environmental pollution.

The Doctoral thesis submitted for evaluation, in the form of set of five articles, has already been critically evaluated by reviewers in accordance with journal publishing requirements, but nevertheless, **after reading the above dissertation, several comments and questions arose regarding the research presented. In the case of points 4-7, I would like to ask for an answer from the PhD student during**

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

the dissertation defense:

1. The title is appropriate to the content of the Doctoral thesis, although it could have included information on the last element on which the PhD student worked, i.e. the possibility of using photodegradation to eliminate the studied threat.
2. In the English version of the 'Abstract' on page 6, in the sixth line of the last paragraph, the word 'concentration of the *tet*(M)' should not be used, as the PhD student only used qualitative analysis in the detection of the above-mentioned gene, in the publication referred to.
3. In the summary to the 'Abstract' in the last paragraph, it is rather possible to state that the process of photolysis and photodegradation could be a promising tool for reducing the spread of resistance through the degradation of antibiotics ..., as this was a laboratory experiment, only one type of sample was studied - after purification, from one WWTP.
4. **Regarding the first stage of the research - please explain, suggest reasons for the differences in amplification between the *tet*(A) and *tet*(M) genes, apart from the possibility of dilution of the studied water, both with regard to the place of sampling and the time of sampling. Why, in general, were these two genes selected from the *tet* cluster?**
5. **Regarding the second stage of the study - please explain in more detail the role of metals in the antibiotic resistance process, what mechanism is involved?**
6. **In the publication annex 2, are the fig. 5 and 6 correct? Please clarify this point.**
7. **Regarding the third stage of the study - please explain why the *rec*A gene was used to identify *Acinetobacter* species and not e.g: 16S rRNA, *rpo*B, or ITS region?**

4. **Final conclusion**

In conclusion, I would like to state that the Doctoral thesis presented to me for evaluation entitled: "Influence of the origin of wastewater on the spread of antibiotic resistance", fulfils all the requirements for doctoral dissertations set out in the Article 187 of the Act of 20 July 2018. Law on higher education and science (consolidated text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended). In addition, the above dissertation provides an original solution to a scientific question and demonstrates the Author's necessary general theoretical knowledge and ability to conduct scientific work independently.

In view of the above, **I would like to appeal to the Honorable Scientific Council of the discipline of biological sciences of the Faculty of Biology and Biotechnology of the University of Warmia and Mazury to admit Mr Jakub Szymon Hubeny, M.Sc. to further stages of the Doctoral thesis, as well as to award the above mentioned dissertation.**

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

Reasons for requesting a distinction for the Doctoral thesis

The following points should be given special attention in this dissertation:

1. Excellent preparation of the PhD student within the research subject area and commitment to conducting experiments, as evidenced by the PhD student's position as first author in four of the five publications forming the basis of the submitted dissertation.
2. Insightful and mature scientific discussion supported by original, valuable, own research results, as evidenced by the very good acceptance of the published works by the international scientific environment through visible citation - 24 citations for the four articles published in 2021-2022.
3. The complementarity of all publications included in the PhD, forming a chronological whole with the development of the research scope, its detail and its validity.

All this has made it possible to gain new knowledge, still scarce at international level, about the impact of industrial areas (with different levels of pollution, including hospital sources) on the qualitative and quantitative spread of ARGs and drug-resistant bacteria, together with an assessment of the effectiveness of the wastewater treatment technologies used and determination of the threat directly to river water. In addition, from the scope of specific knowledge, it was pointed out, for the first time, the possible involvement of bacteria from the family *Fusobacteriaceae* in the spread of antibiotic resistance in the environment.



prof. Joanna Mankiewicz-Boczek

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

Prof. dr hab. Joanna Mankiewicz-Boczek
Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

R e c e n z j a

pracy doktorskiej mgr. Jakuba Szymona Hubeny

pt. „Influence of wastewater origin on the spread of antybiotics resistance"

(Wpływ pochodzenia ścieków na rozprzestrzenianie się antybiotykooporności),

wykonanej na Wydz. Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod opieką naukową dr hab. inż. Moniki Harnisz, prof. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego oraz dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. Politechniki Śląskiej

1. Zasadność doboru tematyki

Zjawisko antybiotykooporności to problem natury globalnej, stanowiący jedno z największych zagrożeń zdrowia publicznego. Źródłem ww. zagrożenia dla środowisko jest wykorzystywanie antybiotyków w medycynie, weterynarii oraz rolnictwie, a jego konsekwencją wszechobecność zarówno lekoopornych bakterie jak i genów antybiotykooporności (ARG, *ang*. antibiotic resistance genes).

Kluczowym miejscem tworzenia się oporności na antybiotyki oraz rozprzestrzeniania się oporności są oczyszczalnie ścieków. Oczyszczalnie ścieków przetwarzają ścieki zawierające m.in. antybiotyki, metale, bakterie lekooporne i geny antybiotykooporności pochodzące ze szpitali, gospodarstw domowych i zakładów przemysłowych. Niestety systemy oczyszczania ścieków są tak zaprojektowane aby usuwać związki organiczne, zawiesinę i komórki bakteryjne, ale żadne z istniejących rozwiązań/technologii nie jest w stanie wyeliminować uwolnionego materiału genetycznego, w tym mobilnych elementów genetycznych, które pośredniczą w przenoszeniu ARG. Dodatkowo, problem potęguje fakt, iż zagrożenie rozprzestrzeniania się antybiotykoodporności nie jest stabilne, jest zależne od rodzaju ścieków generowanych w danym obszarze, jak również może być związane z porą roku.

Dlatego też, istnieje pilna potrzeba poszerzenia wiedzy na temat wpływu pochodzenia ścieków komunalnych na antybiotykooporność bakterii bytujących w ściekach i wodzie rzecznej odbierającej ścieki oczyszczone, z uwzględnieniem regionów o różnym stopniu urbanizacji, uprzemysłowienia oraz narażenia na ścieki szpitalne. W kolejnym etapie należy podjąć działania mające na celu eliminację ww.

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

zagrożenia, poprzez modyfikację obecnych technologii oczyszczania ścieków i wprowadzenie dodatkowych procesów tak jak np. fotodegradacja.

Powyższe, **potwierdza zasadność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Pana mgr. Jakuba Hubeny**. Przedstawiona do oceny praca prezentuje wyniki badań, **których celem było określenie wpływu pochodzenia ścieków komunalnych na antybiotykooporność bakterii bytujących w ściekach i wodzie rzecznej będącej odbieralnikiem ścieków oczyszczonych oraz określenie efektywności procesu fotolizy wpływającej na degradacje antybiotyków i determinantów antybiotykooporności w oczyszczonych ściekach komunalnych.**

Tematyka badawcza odnosi się do aktualnego problemu o zasięgu globalnym i wnosi nowe informacje do oceny zagrożenia ze strony bakterii antybiotykoodpornych, ich potencjału do rozprzestrzeniania się, w tym doboru właściwych genów markerowych, wpływu metali na powyższy proces, **jak i możliwości zastosowania metod umożliwiających doczyszczanie ścieków** pod kątem eliminacji antybiotyków, produktów ich transformacji oraz ARG.

2. Charakterystyka pracy

Pan mgr Jakub Hubeny przedstawił **jednotematyczny cykl publikacji pt. „Wpływ pochodzenia ścieków na rozprzestrzenianie się antybiotykooporności" składający się z pięciu artykułów, zawierających oryginalne badania naukowe**, opublikowane w międzynarodowych czasopismach, w tym w trzech wyróżnionych przez Jounal Citation Reports JCR posiadających wysoki IF (PLoS One, Frontiers in Environmental Science i Science of the Total Environment).

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. J. Ecol. Eng. 20, 1–6. MNiSW: 40, IF: 0.
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, sewage sludge and river water. PLoS One 16, e0252691. MNiSW: 100, IF: 3,752.
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

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

Genes:
A Metagenomic Approach. Front. Environ. Sci. 9. MNiSW: 100, IF: 5,411.

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. Sci. Total Environ. 822. MNiSW: 200, IF: 10,753.
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. Sci. Total Environ. 836. MNiSW: 200, IF: 10,753.

Wszystkie publikacje są wieloautorskie, co jest typowe dla kompleksowych prac badawczych, obejmujących różne tereny badań oraz wieloaspektowe analizy. Do pracy zostały dołączone oświadczenia współautorów publikacji. Doktorant jest pierwszym autorem w czterech publikacjach, jego rola związana była m.in. z: planowaniem badań, wykonaniem i interpretacją wyników, przeglądem literatury i przygotowaniem pierwszej wersji manuskryptów.

Łączna wartość IF artykułów opublikowanych w ramach osiągnięcia naukowego Doktoranta to 30,669, a sumaryczna ilość punktów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania **wynosi 640. Publikacje, w których Doktoranta jest pierwszym autorem były cytowane 22 razy w oparciu o bazę Scopus,** co zasługuje na wyróżnienie, gdyż zostały one opublikowana w latach 2021-2022. Ponadto, **dwa artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie o liczbie punktów MNiSW wynoszącej 200 i IF przekraczającym 10**.

Pod względem formalnym niniejszy doktorat oparty jest na czytelnym zestawieniu opublikowanych artykułów, który w jednoznaczny sposób pozwala określić zakres prac wykonanych przez Doktoranta. Ponadto, jest to bardzo dobrze przygotowany doktorat w układzie zbioru publikacji tworzących tematycznie jednolitą całość z właściwie zaplanowaną chronologią badań.

Układ pracy jest typowy dla doktoratów opartych na zbiorze artykułów. Po stronie tytułowej znajduje się lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, następnie informacje o źródłach finansowania zrealizowanych badań oraz „Spis treści". Dalej, na kolejnych stronach umieszczono „Streszczenie" i „Wstęp" zawierający wprowadzenie do tematyki badawczej. Kolejno zamieszczono informacje dotyczące „Celu badań", „Hipotezy badawcze", „Zakres badań" i dalej

odniesiono się do „Wyników" dzieląc cały cykl publikacji na cztery etapy. W każdym z opisywanych etapów zamieszczono szczegółowy „Cel badań", oraz skrócony opis „Materiały i metody" i „Wyniki" oraz zamieszczono cytowanie do publikacji, w której opisano szczegółowo wszystkie aspekty danego etapu badań wyszczególnionego w dysertacji. Po tak przedstawionych czterech etapach badań, przygotowano „Podsumowanie i Wnioski" oraz „Literaturę". W dalszej części pracy zamieszczono pełne wersje pięciu artykułów naukowych wraz z dodatkowymi danymi (Supplementary Information). Po każdym z artykułów zamieszczono oświadczenia dotyczące udziału współautorów w publikacjach stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia doktora. Następnie Doktorant zestawił wszystkie publikacje, a także doniesienia konferencyjne, w których jest współautorem oraz umieścił informacje o udziale w projekcie badawczym, stażu i odbytych kursach.

Pan mgr Jakub Hubeny podzielił badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej na cztery etapy, w których elementem spójnym był teren badań – komunalna oczyszczalnia ścieków z regionu Warmii i Mazur oraz oczyszczalnia ścieków z regionu Śląska - w pierwszych trzech publikacjach. **Analizom genetycznym, mikrobiologicznym, chemicznym poddane zostały próbki z różnych etapów oczyszczania ścieków, jak i woda rzeczna pobrana przed i za oczyszczalnią.**

W pierwszym etapie, który można potraktować jako wstęp do dalszych bardziej zaawansowanych analiz, **jakościowo oceniono obecność genów oporności na tetracykliny**, reprezentujące jedną z grup najbardziej rozpowszechnionych antybiotyków na świecie. Wyniki wskazały na **występowanie różnice w częstości pojawiania się genów oporności w zależności od charakterystyki ścieków dopływających oraz możliwość sezonowych zmian w obecności monitorowanych genów na poszczególnych etapach ich oczyszczania oraz w wodzie rzecznej.**

W drugim etapie badań oceniono: ilościowo – na podstawie liczebności wybranych genów antybiotykoodporności, analiz metagenomu oraz oceny stężenia antybiotyków, wpływ udziału ścieków przemysłowych oraz szpitalnych na zjawisko antybiotykooporności w ściekach komunalnych oczyszczanych w ww. oczyszczalniach ścieków. Dodatkowo oznaczono stężenie metali ciężkich. Zaobserwowano niewiele istotnych zależności pomiędzy stężeniem antybiotyków, a występowaniem ARG. **Wykazano istotne zależności pomiędzy liczebnością genów integrazy, a liczebnością genów ARG i stężeniem metali.** Porównując próbki ścieków z dwóch oczyszczalni charakteryzujących się dopływem ścieków szpitalnych na różnym poziomie, **stwierdzono większą różnorodność typów genów warunkujących oporność na beta-laktamy w ściekach z wyższym udziałem procentowym ścieków szpitalnych**.

W trzecim etapie badań określono obecności ARG u szczepów *Acinetobacter* sp. wyizolowanych z próbek ścieków w poszczególnych etapach procesu oczyszczania oraz próbek wody rzecznej. Wybrano *Acinetobacter* jako grupę oportunistycznych patogenów względem człowieka, które są oporne na wiele leków i łatwo adoptują się w różnym środowisku. **Szczepy *Acinetobacter* sp. oraz *A. baumannii* były najczęściej identyfikowane w próbkach ścieków i wody rzecznej pobranych w czerwcu i wrześniu**. Analiza metagenomu wskazała, że **gen *bla*OXA-58 (reprezentujący zespół genów oporności na beta-laktamy) występował najliczniej w badanych próbkach. Stwierdzono również obecność szczepów opornych na karbapenemy.**

W czwartym etapie badań określono efektywność usuwania antybiotyków oraz ARG ze ścieków oczyszczonych wskutek zastosowania procesu fotodegradacji. W badaniach laboratoryjnych, z udziałem materiału pobranego z oczyszczalni ścieków (po procesie oczyszczania), wykazano, że **naświetlanie światłem słonecznym oraz wykorzystanie dodatkowo fotokatalizatora w postaci TiO_2 może zmniejszyć ilość antybiotyków, produktów ich transformacji oraz ARG w oczyszczonych ściekach.**

3. Ocena rozprawy

Podjęty przez Doktoranta problem badawczy jest istotny i aktualny w skali globalnej, biorąc pod uwagę potrzebę wykorzystywania skutecznych leków w medycynie, weterynarii i rolnictwie. Niestety nadużywanie leków, a co za tym idzie wprowadzanie ich do środowiska, choćby poprzez oczyszczalnie ścieków powoduje, iż rośnie antybiotykooporność, a w raz z nią możliwość różnego rodzaju zakażeń przez oporne drobnoustrojów. Dlatego też, **zaproponowana w pracy doktorskiej przez mgr. Jakuba Hubeny, ocena skali tego problemu od etapu oczyszczalni ścieków, poprzez wody rzeczne, aż do aktywowania tego procesu przez konkretne grup bakterii bytujących w ekosystemach wodnych jest niezbędnym działaniem.** W konsekwencji zdobytej wiedzy, **w kolejnym etapie, tak jak to uczynił Doktorant, należy poszukać efektywnych narzędzi eliminujących antybiotyki i ARG w oczyszczonej wody.**

Zaplanowane i zrealizowane badania w prezentowanej dysertacji wymagały opanowania przez Doktoranta warsztatu badawczego opartego na metodach genetycznych, w tym analizach bioinformatycznych, a także technik mikrobiologii klasycznej. Zakres eksperymentów został zaplanowany prawidłowo, odpowiednio do postawionych celów. Dlatego też, pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Wyniki badań zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych, a wszystkie prace utworzyły spójną tematycznie całość.

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

Do najważniejszych osiągnięć mgr. Jakuba Hubeny, przedstawionych w niniejszej dysertacji należało wykazanie, iż:

1. Skład ścieków komunalnych oczyszczanych w monitorowanych oczyszczalniach ścieków znacząco wpłynął na generowanie zjawiska antybiotykooporności;
2. Odnotowane korelacje pomiędzy liczebnością genów integraz, genów antybiotykooporności i stężeniem metali ciężkich wskazują na istotną rolę integronów jako mobilnych elementów genetycznych w rozprzestrzenianiu się antybiotykooporności oraz metali w indukowaniu oporność na antybiotyki;
3. Dopływ ścieków szpitalnych do oczyszczalni ścieków zwiększył częstość występowania w próbkach ścieków determinantów oporności na antybiotyki o szczególnym znaczeniu klinicznym;
4. Obecność genów kodujących oporność na antybiotyki ostatniej szansy, związane z groźnymi ogniskami szpitalnymi, odnotowano w ściekach komunalnych o wyższym udziale ścieków szpitalnych.
5. Oczyszczalnie ścieków odgrywają ważną rolę w rozprzestrzenianiu antybiotyków, bakterii lekoopornych oraz genów antybiotykooporności w środowisku naturalnym;
6. Zastosowanie dodatkowych metod oczyszczania ścieków, takich jak fotokataliza w obecności TiO_2, może znacząco zwiększyć skuteczność usuwania antybiotyków i genów antybiotykooporności z oczyszczonych ścieków oraz zmniejszyć udział oczyszczalni ścieków w zanieczyszczeniu środowiska.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, w postaci zbioru pięciu artykułów, została już poddana krytycznej ocenie przez recenzentów zgodnie z wymogami wydawniczymi czasopism, jednakże **mimo wszystko po przeczytaniu powyższej dysertacji pojawiło się kilka uwag, pytań tyczących przedstawionych badań. W przypadku pkt. 5-8 proszę o odpowiedź Doktoranta podczas obrony rozprawy doktorskiej**:

1. Tytuł jest adekwatny do treści pracy doktorskiej, chociaż mógłby zawierać informacje na temat ostatniego elementu nad którym pracował doktorant, tzn. możliwości zastosowania fotodegradacji do eliminacji badanego zagrożenia.
2. W wersji angielskie „Streszczenia" („Abstract") na stronie 6, w szóstej linijce ostatniego akapitu, nie powinno być użyte słowo „concentration of the *tet*(M)" ponieważ doktorant zastosował tylko analizę jakościową w detekcji ww. genu, w cytowanej publikacji.
3. Proszę mimo wszystko, w języku polskim, unikać słowa „koncentracja" zamiast „stężenie",

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

ponieważ słowo koncentracja odnosi się do czego innego np. «gromadzenie ludzi, obiektów itp. w jednym miejscu»; «skupienie działań dla osiągnięcia jakiegoś celu»; «intensywne skupienie uwagi na wybranym przedmiocie, zjawisku czy sytuacji».

4. W podsumowania do „Sreszczenia"/"Abstract" w ostatnim akapicie raczej można stwierdzić, że proces fotolizy i fotodegradacji może być obiecującym narzędziem dla ograniczenia rozprzestrzeniania się zjawiska oporności poprzez degradację antybiotyków …, ponieważ to był eksperyment laboratoryjny, badano tylko jeden rodzaj próbki – po oczyszczeniu, z jednej oczyszczalni.
5. **Odnoście pierwszego etapu badań – proszę wyjaśnić, zasugerować skąd różnice w amplifikacji pomiędzy genami *tet*(A) i *tet*(M), poza możliwością rozcieńczenia badanej wody, zarówno względem miejsca poboru próbek jak i czasu poboru. Dlaczego, w ogóle, te dwa geny zostały wybrane spośród zespołu *tet*?**
6. **Odnośnie drugiego etapu badań – proszę o bardziej szczegółowe wyjaśnienie roli metali w procesie antybiotykooporności, jaki mechanizm jest z tym związany?**
7. **Czy w publikacji będącej aneksem nr 2, wykresy – „fig. 5 i 6" są poprawne? Proszę wyjaśnić tę kwestie.**
8. **Odnośnie trzeciego etapu badań – proszę wyjaśnić dlaczego w celu identyfikacji gatunków bakterii *Acinetobacter* został użyty gen *rec*A, a nie np.: 16S rRNA, *rpo*B, czy ITS region?**

4. Wniosek końcowy

Reasumując pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zatytułowana: "Wpływ pochodzenia ścieków na rozprzestrzenianie się antybiotykooporności", spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim 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.). Ponadto, powyższa rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autora i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Dlatego też, **zwracam się do szanownej Rady Naukowej dyscypliny nauki biologiczne Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego z prośbą o dopuszczenie Pana mgr. Jakuba Szymona Hubeny do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jak też zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.**

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy

W niniejszej pracy doktorskiej należy w sposób szczególny zwrócić uwagę na następujące kwestie:

1. Doskonałe przygotowanie merytoryczne Doktoranta w obrębie tematyki badawczej i zaangażowanie w prowadzenie eksperymentów, czego dowodem jest pozycja Doktoranta jako pierwszego autora w czterech z pięciu publikacji stanowiących podstawę przedłożonej rozprawy doktorskiej.
2. Wnikliwa i dojrzała dyskusja naukowa poparta oryginalnymi, wartościowymi, własnymi wynikami badań, czego dowodem jest bardzo dobre przyjęcie opublikowanych prac przez międzynarodowe środowisko naukowe poprzez widoczne cytowanie – 24 cytacje dla czterech artykułów opublikowanych w latach 2021-2022.
3. Komplementarność wszystkich prac wchodzących w zakres doktoratu, tworzących chronologiczną całość z rozwojem zakresu badań, ich szczegółowości oraz ważności.

Powyższe umożliwiło zdobycie nowej wiedzy, nadal znikomej w skali międzynarodowej, na temat wpływu terenów uprzemysłowionych (z różnym poziomem zanieczyszczeń, w tym źródeł szpitalnych) na jakościowe oraz ilościowe rozprzestrzenianie się genów antybiotykooporności oraz bakterii lekoopornych, wraz z oceną efektywności wykorzystywanych technologii oczyszczania ścieków i wyznaczeniem zagrożenia bezpośrednio dla wód rzecznych. Ponadto, z zakresu wiedzy szczegółowej, wskazano, po raz pierwszy, na możliwość zaangażowania bakterii z rodziny *Fusobacteriaceae* w rozprzestrzenianie się antybiotykooporności w środowisku.



prof. dr hab. Joanna Mankiewicz-Boczek

042 635 44 38
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
joanna.mankiewicz@biol.uni.lodz.pl