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

Poznań, 01.12.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Wolak
pt. „ Wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na produkcję biogazu, rozpowszechnienie genów lekooporności oraz mikrobiom zaangażowany w procesy fermentacji metanowej gnojowicy bydlęcej”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Izabeli Wolak została wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód Wydziału Geoinżynierii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Korzeniewskiej. Rozprawa składa się z wykazu źródeł finansowania, wykazu publikacji składających się na rozprawę doktorską, streszczenia w języku polskim i angielskim, autoreferatu, kopii pięciu artykułów, w których przedstawiono wyniki oraz oświadczeń współautorów. Rezultaty będące przedmiotem dysertacji zawarto w następujących pracach, opublikowanych w latach 2020-23 w czasopismach z listy Journal Citation Reports:

1. Koniuszewska I., Korzeniewska E., Harnisz M., Czatzkowska M. 2020 Intensification of biogas production using various technologies: A review. *International Journal of Energy Research*. 2: 1–19 (IF=4,672, MEiN=100).
2. Koniuszewska I., Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E. 2021. The impact of antimicrobial substances on the methanogenic community during methane fermentation of sewage sludge and cattle slurry. *Applied Sciences*. 11: 369. (IF=2,838, MEiN=100).

3. Koniuszewska I., Harnisz M., Korzeniewska E., Czatzkowska M., Jastrzębski J.P., Paukszto Ł., Bajkacz S., Felis E., Rusanowska P. 2021. The effect of antibiotics on mesophilic anaerobic digestion process of cattle manure. *Energies*. 14: 1125. (IF=3,252, MEiN=140).
4. Wolak I., Czatzkowska M., Harnisz M., Jastrzębski J.P., Paukszto Ł., Rusanowska P., Felis E., Korzeniewska E. 2022. Metagenomic analysis of the long-term synergistic effects of antibiotics on the anaerobic digestion of cattle manure. *Energies*. 15: 1920. (IF=3,252, MEiN=140).
5. Wolak I., Bajkacz S., Harnisz M., Stando K., Męcik M., Korzeniewska E. 2023. Digestate from agricultural biogas plants as a reservoir of antimicrobials and antibiotic resistance genes – implications for the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 20: 2672. (IF=4,614, MEiN=140).

Prace te wpisują się w nurt badań realizowanych w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Geoinżynierii UWM w Olsztynie. Pierwsza nich to artykuł przeglądowy, pozostałe mają charakter doświadczalny. Wszystkie są wieloautorskie – mają od czterech do dziewięciu autorów. Z oświadczeń złożonych przez mgr Izabelę Wolak oraz współautorów prac wynika, że **Doktorantka miała znaczący udział w ich powstaniu**: w planowaniu badań i opracowaniu ich metodyki, realizacji części doświadczalnej oraz przygotowaniu manuskryptów. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF, Impact Factor) ww. artykułów wynosi 18,628, a suma punktów MEiN – 620. Przedstawione artykuły są spójne tematycznie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część badań finansowana była z grantu NCN PRELUDIUM, którym Doktorantka kieruje.

Układ rozprawy doktorskiej jest prawidłowy, zawiera ona wszystkie elementy niezbędne do jej oceny. **Piśmiennictwo** zastosowane ramach rozprawy pochodzi w przeważającej większości z ostatnich 10 lat i **zostało prawidłowo dobrane**.

Rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Wolak dotyczy problemów związanych z obecnością antybiotyków i chemioterapeutyków w gnojowicy bydlęcej stosowanej jako substrat w procesie fermentacji metanowej. Autorka postawiła sobie za cel pracy określenie wpływu wybranych leków na wydajność procesu biometanizacji, produkcję biogazu, skład populacji mikroorganizmów oraz występowanie genów oporności na antybiotyki. Jest to ważne zagadnienie z uwagi na fakt, że gnojowica bydlęca często zawiera antybiotyki i

produkty ich przemian, które mogą niekorzystnie wpływać nie tylko na sam proces biometanizacji, ale również przedostawać się do środowiska wraz z odpadem pofermentacyjnym stosowanym jako nawóz, co przyczynia się do rozprzestrzeniania się lekooporności bakterii. Dodam też, że zagadnienie to nie było do tej pory dogłębnie zbadane przez innych naukowców.

Aby zrealizować cel pracy Doktorantka sformułowała cztery hipotezy badawcze, które zweryfikowała w trzech etapach. **Pierwsza hipoteza badawcza** dotyczyła wpływu antybiotyków i chemioterapeutyków, dodawanych do substratu, poddawanego fermentacji osobno i w kombinacji, na wydajność biometanizacji i produkcję biogazu. Doktorantka przeanalizowała wpływ leków należących do pięciu klas (β-laktamy, tetracykliny, sulfonamidy, fluorochinolony i pochodne nitroimidazoli) i wykazała, że hamują one wydajność procesu oraz produkcję biogazu nawet o 75%. Ten hamujący wpływ był różny w zależności od klasy antybiotyku, dawki i sposobu wprowadzania do wsadu bioreaktora. Autorka zauważyła też, że w trakcie procesu biometanizacji antybiotyki ulegały degradacji w różnym stopniu, jednak nawet przy całkowitej degradacji, w pofermencie nadal były obecne produkty ich rozkładu.

W **drugiej hipotezie badawczej** mgr Izabela Wolak założyła, że leki przeciwdrobnoustrojowe dodawane do wsadu bioreaktorów modyfikują skład populacji mikroorganizmów obecnych w systemie, w tym archeonów przeprowadzających proces metanogenezy. W celu weryfikacji tej hipotezy zastosowała sekwencjonowanie nowej generacji i określanie metodą real-time PCR liczby kopii genów specyficznych dla określonych grup metanogenów. Doktorantka wykazała, że dominującymi typami bakterii były *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*, a więc grupy, które dominują w większości siedlisk, natomiast procentowy udział odczytów dla poszczególnych typów wykazywał zmiany różniące się w zależności od rodzaju antybiotyku (lub ich kombinacji) dodawanego do układu i mogące powodować spadek wydajności biometanizacji. Z kolei najczęściej występującymi archeonami metanogennymi były te z rodzajów *Methanosarcina* i *Mathanosaeta* (*Methanothrix*).

Trzecia hipoteza badawcza pracy zakładała, że obecność antybiotyków w substracie poddawanym biometanizacji, jak również ich dodatek do wsadu bioreaktorów powoduje

zwiększenie liczby kopii genów odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki. Pani mgr Izabela Wolak udowodniła, że leki przeciwdrobnoustrojowe obecne w bioreaktorze powodują istotny wzrost liczby kopii genów oporności na antybiotyki (ARGs) w pofermencie. Stosowanie takiego odpadu pofermentacyjnego jako np. nawóz będzie w tej sytuacji skutkować rozprzestrzenianiem się oporności na antybiotyki w środowisku, co jest bardzo ważnym spostrzeżeniem. Ponadto, przeprowadzona analiza statystyczna sugeruje, że nosicielami ARGs mogą też być archeony metanogenne.

Weryfikację **czwartej hipotezy badawczej**, w myśl której pochodzenie i skład substratu używanego do biometanizacji wpływa na obecność antybiotyków i ARGs w pofermencie, przeprowadzono dzięki wynikom przedstawionym w Załączniku 5. Doktorantka m.in. wykazała, że stężenie ARGs różni się w zależności od rodzaju substratu, jednak bez względu na te różnice zawsze są one obecne w masie pofermentacyjnej. Ponadto mgr Izabela Wolak stwierdziła, że najwięcej leków przeciwbakteryjnych występuje w pofermencie powstałym z osadów ściekowych, co może być spowodowane m.in. zanieczyszczeniem substratu.

Pytania i uwagi

Przedstawione do oceny artykuły zostały już opublikowane, więc podlegały krytycznej ocenie recenzentów, niemniej jednak pozwolę sobie zamieścić kilka pytań i uwag, przedstawionych poniżej.

- Jak można wyjaśnić spadek wydajności produkcji metanu w przypadku dodania do substratów niektórych antybiotyków przy jednoczesnym stałym poziomie liczby kopii genu *mcrA* (Załącznik 2)?
- W części opisu dotyczącej składu populacji bakterii (Weryfikacja II hipotezy badawczej) w pofermencie pojawiają się niewłaściwe sformułowania np. „liczne rodzaje *Bacteroides* i *Paludibacter*", „liczne rodzaje *Pseudomonas*", „Inne ważne typy bakterii to *Spiralles*"(?), „Bakterie z rodzaju *Firmicutes*", itp.
- Hipoteza badawcza nr III raczej nie była poddana weryfikacji poprzez doświadczenia, których wyniki opisano w Załączniku 2 – artykuł ten nie przedstawia rezultatów dotyczących liczby kopii ARGs

- W opisie dotyczącym hipotezy badawczej nr III pojawia się stwierdzenie, że „mikroorganizmy metanogenne obecne w pofermencie mogły być lekooporne". Czy mogłaby Pani przybliżyć informacje dotyczące lekooporności metanogennych archeonów?
- Czy znane są dane doświadczalne potwierdzające sugestię, że *Fermentimonas caenicola*, *Proteiniclasticum ruminis* i *Methanosarcina thermophila* są oporne na tetracykliny lub inne antybiotyki?
- W przypadku artykułów nr 3, 4 i 5 brakuje oświadczeń niektórych autorów. Nie jest to jednak poważny zarzut, bowiem można określić ich wkład dzięki deklaracjom „Author Contributions" zamieszczonym w tekście.

Wniosek końcowy

Rozprawę doktorską Pani mgr Izabeli Wolak oceniam wysoko. Doktorantka podjęła ważny temat związany z wpływem antybiotyków na proces produkcji biogazu i rozprzestrzenianiem się antybiotykooponości. Wyniki opisano w pięciu artykułach, które są spójne tematycznie i zostały przedstawione w rozprawie w logicznie sposób. **Cel pracy został jasno określony i osiągnięty dzięki zastosowaniu właściwie dobranych metod**, z dużym udziałem nowoczesnych technik badawczych, w tym sekwencjonowania NGS. Doktorantka nie tylko wykazuje się umiejętnościami czysto laboratoryjnymi, ale **ma też dużą wiedzę teoretyczną**, co pokazała pisząc artykuł przeglądowy, który jest doskonałym wprowadzeniem do tematyki pracy. Przedstawione w niniejszej dysertacji dane mają ważne praktyczne implikacji dotyczące konieczności monitorowania procesu biometanizacji pod kątem obecności antybiotyków, bakterii opornych na antybiotyki i genów lekooporności.

Przedstawiona do oceny **rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Podsumowując, uważam, że **rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Wolak spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 r., poz. 742 ze zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie *stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne*.**

Rynard Koczura