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

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Izabeli Wolak zatytułowana „Wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na produkcję biogazu, rozpowszechnienie genów lekooporności oraz mikrobiom zaangażowany w procesy fermentacji metanowej gnojowicy bydlęcej" wykonanej w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Geoinżynierii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Korzeniowskiej.

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Izabeli Wolak, przedstawia wyniki wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na proces fermentacji beztlenowej prowadzonej w warunkach mezofilnych w układzie technologicznym na skalę laboratoryjną oraz bezpośrednio w biogazowniach rolniczych. Doktorantka badała obecność pozostałości antybiotyków należących do klasy beta-laktamów, tetracyklin, sulfonamidów, antybiotyków z grupy MLS (makrolidy – linkozamidy – streptograminy) i inhibitorów reduktazy dihydrofolianowej w pofermencie z wybranych biogazowni rolniczych w Polsce. Doktorantka badała także skład mikrobiomu masy pofermentacyjnej oraz zachodzące w mikrobiomie zmiany wśród społeczności drobnoustrojów należących zarówno do domeny *Bacteria* jak i *Archaea*. Ponadto doktorantka analizowała występowanie ARGs niosących lekooporność na antybiotyki należące do klasy betalaktamów, tetracyklin, fluorochinolonów, sulfonamidów, grupy MLS, oraz genów integrazy klasy 1 oraz 2 w pobranych próbkach pofermentu. Środowisko naturalne i antropogeniczne ma podstawowe znaczenie dla funkcjonowania i rozwoju ludzi oraz zwierząt i mikroorganizmów. Wprowadzenie do środowiska naturalnego dodatkowej materii organicznej wiąże się konsekwencjami i dlatego istotne jest przeciwdziałanie zanieczyszczeniom, monitorowanie stanu zanieczyszczenie oraz przywracanie elementów przyrodniczych do stanu właściwego.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę są bardzo intersujące i wartościowe ze względu na zagrożenia związane z lekoopornością antybiotyków i transferem genów oporności tych farmaceutyków do środowiska. Według autorki wdrożenie fermentacji beztlenowej w pełnowymiarowych biogazowniach zlokalizowanych w dużych gospodarstwach rolnych może być rozwiązaniem przyjaznym dla środowiska, zapewniającym bezpieczeństwo energetyczne gospodarstwa, pozwalającym na obniżenie kosztów transportu i zarządzania. Jednak konieczne jest racjonalne gospodarowanie antybiotykami i ograniczenie ich podaży zwierzętom oraz monitorowanie procesu fermentacji metanowej w biogazowniach, jak również pofermentu wprowadzanego do gleby.

Układ pracy jest bardzo dobrze przemyślany. Na początku, doktorantka podała spis publikacji z aktualnym parametrami bibliometrycznymi stanowiące rozprawę doktorską. Doktorantka jest współautorką 5 publikacji w czasopismach o wysokich parametrach: International Journal of Energy Research, IF=4.672, MEiN=100. Sciences., Applied Sciences, IF=2.838, Energies, IF=3.252, MEiN=140 i International Journal of Environmental Research and Public Health, IF=4.614, MEiN=140. We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem i brała współudział w opracowaniu metodyki, w przeprowadzeniu doświadczeń, analizie i interpretacji wyników oraz wykonywała przegląd literatury i przygotowywała pierwotny manuskrypt. Do każdej publikacji, doktorantka dołączyła oświadczenia współautorów prac.

Pani mgr Izabeli Wolak swoje badania podzieliła na trzy etapy, które stanowią integralną całość, dobrze przemyślaną i precyzyjnie napisane. Wykorzystywane przez doktorantkę techniki mikrobiologiczne są na wysokim poziomie i świadczą o dużej dojrzałości naukowej i precyzji. Doktorantka do każdego etapu postawiła cztery hipotezy badawcze, które weryfikowała w artykułach.

. **W pierwszej hipotezie badawczej** doktorantka określiła indywidualny i synergistyczny wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych oraz ich stężeń na efektywność produkcji biogazu i wydajność fermentacji metanowej gnojowicy bydlęcej. Wyniki tej hipotezy zweryfikowała w trzech artykułach. Doktorantka potwierdziła, że leki przeciwdrobnoustrojowe należące do klasy beta-laktamów, tetracyklin, sulfonamidów, fluorochinolonów oraz pochodne nitroimidazoli podane jednostkowo jak i synergistycznie do wsadu bioreaktorów fermentacji metanowej hamują wydajność

procesu oraz produkcję biogazu. W badaniach tych doktorantka wykorzystała techniki chromatografii gazowej oraz cieczowej, które charakteryzują się dużą dokładnością.

W tym etapie badań nasuwa mi się pytanie

- doktorantka podaje, że w przypadku farmaceutyków dodanych do gnojowicy bydlęcej, dla których zaobserwowano całkowity rozkład, produkty degradacji tych leków były obecne w fazie stałej przefermentowanej gnojowicy bydlęcej. Jeżeli jest całkowita degradacja to dlaczego są one wykrywane i jak można je usunąć ?

- według doktorantki antybiotyki zadawane synergistycznie do wsadu bioreaktorów wywołały niewielki i tymczasowy spadek wydajności CH_4 zależny od stężenia leków we wprowadzanej do bioreaktorów mieszaninie. Czy w związku z tym można opracować efektywniejsze dozowanie substratów do fermentacji lub też zmodyfikować mikroorganizmy, które zwiększały wydajność metanu.

W drugiej hipotezie badawczej doktorantka określiła skład jakościowy i ilościowy drobnoustrojów obecnych w systemach fermentacji metanowej, który jest modyfikowany poprzez obecność środków przeciwdrobnoustrojowych we wsadzie bioreaktorów, zarówno w przypadku farmaceutyków zadawanych do układu technologicznego jednostkowo, jak i synergistycznie. Doktorantka badała również synergistyczny wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych oraz ich stężeń na mikrobiom zaangażowany w proces fermentacji metanowej gnojowicy bydlęcej, w której określiła skład jakościowy i ilościowy drobnoustrojów. Weryfikację tej hipotezy doktorantka przedstawiła w czterech artykułach. Zastosowana wysokowydajna analiza sekwencjonowania świadczy o dużej doskonałości metodycznej doktoranki. Uzyskane przez nią wyniki pokrywały się z badaniami innych naukowców. Główną społecznością mikroorganizmów były *Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes* i *Tenericutes*. Autorka stwierdziła, że bakterie typu *Bacteroidetes* i *Firmicutes* w obecności antybiotyków nie dostarczały odpowiednich ilości substratów dla mikroorganizmów metanogennych wytwarzających biogaz, stąd też produkcja biogazu była mniejsza. Według doktorantki wykorzystanie pofermentu w postaci nawozu może zaburzać mikrobiom glebowy.

W ramach tej hipotezy nasuwa mi się pytanie

- skoro pofermentu nie można wykorzystać jako nawozu, jakie proponuje się rozwiązanie tego problemu ?

W ramach trzeciej hipotezy badawczej doktorantka przeprowadziła analizy mające na celu określenie wpływu ośmiu różnych środków przeciwdrobnoustrojowych na obecność i liczbę genów lekooporności (aniu/.g. ARGs – antibiotic resistance genes) w próbkach pofermentu pochodzącego z bioreaktora, w którym jako substrat w procesie wykorzystano gnojowicę bydlęcą. Ta hipoteza została zweryfikowana w czterech artykułach. Zastosowane techniki molekularne jednoznacznie wykazały, że zwiększone stężenie antybiotyków w fermentacji metanowej mogą istotnie wpływać zmianę różnorodności biologicznej drobnoustrojów zaangażowanych w ten proces. Wyniki tych badań wydawałyby się niepokojące, ponieważ obecności wszystkich trzech badanych antybiotyków w procesie fermentacji metanowej może modyfikować profil opornościowy i zwiększać względną obfitość poszczególnych ARGs w pofermencie. Istnieje także ryzyko rozprzestrzeniania genów lekooporności z pofermentu gleby, do wód powierzchniowych, a także do roślin i dalej do łańcucha pokarmowego zwierząt gospodarskich i ludzi.

W tej części nasunęły mi się pytania

- według doktorantki i innych badaczy gnojowica bydlęca jest rezerwuarem genów oporności m.in. tetracykliny. Jakie można opracować rozwiązania w celu zmniejszenia rozprzestrzeniania genów oporności antybiotyków. Biorąc pod uwagę fakt, że geny oporności mogą docierać do innych patogennych mikroorganizmów, co może zmniejszyć skuteczność dostępnych antybiotyków. Czy nie grożą nam problemy, związane z pojawieniem się „super bakterii", które będą oporne na dostępne antybiotyki ?

W ramach czwartej hipotezy badawczej doktorantka oceniała wpływ pochodzenia substratu i skład materii organicznej w substracie fermentacji metanowej na obecność środków przeciwdrobnoustrojowych oraz wzrost liczby genów lekooporności w masie pofermentacyjnej uzyskiwanej po fermentacji metanowej. Ta hipoteza została zweryfikowana w jednym artykule. Doktorantka w tym etapie badała próbki pofermentu pochodzącego z fermentacji metanowej prowadzonego in vivo, w biogazowniach rolniczych na bazie osadu ściekowego, mieszanki gnojowicy bydlęcej

i kiszonki z kukurydzy oraz mieszaniny flotatu poubojowego, kiszonki kukurydzy, masy cukierniczej oraz ścieru ziemniaczanego. Geny oporności na antybiotyki określała ilościowo z wykorzystaniem metody qPCR w aparacie LightCycler®system. Wyniki niniejszej dysertacji sugerują, że ryzyko zanieczyszczenia gleby ARGs jest wysokie w gospodarstwach, w których poferment jest używany jako nawóz.

W tej części badań nasunęły mi się pytania

- Doktorantka zasugerowała, że farmaceutyki, w tym antybiotyki, są często nadużywane i stosowane bez wskazówek lekarza, co może znacznie zwiększyć ich stężenie w osadach ściekowych. Z pewnością nadużycia stosowania antybiotyków są obserwowane. W jaki sposób doktorantka zaproponowałaby rozwiązanie tego problemu ? Czy istnieje na szeroką skalę alternatywa dla antybiotyków ?

Pani mgr Iwona Wolak, jak na młodego człowieka, ma bardzo imponujący dorobek. Jest współautorem 10 prac posiadający wysoki IF oraz współautorem dwóch monografii w języku polskim i angielskim. Doktorantka ma 13 doniesień konferencyjnych zarówno polskich jak i zagranicznych. Brała udział w trzech projektach badawczych, w jednym z nich była kierownikiem w konkursie Preludium. Doktorantka brała również udział w szkoleniach związane z analizami molekularnymi i bioinformatycznymi oraz odbyła staż zagraniczny w Niemczech. W związku z pozytywną oceną rozprawy doktorskiej, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr Izabeli Wolak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Rozprawa doktorska odpowiada wymaganiom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.).

Jednocześnie wnioskuję o przyznanie nagrody dla mgr Izabeli Wolak za uzyskane wyniki pracy naukowej.

Maria Swiontek Brzezinska

Toruń, 20. 11.2023

dr hab. Maria Swiontek Brzezinska, prof. UMK