Puławy, dn. 10.11.2023 r.

dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB
Zakład Mikrobiologii Rolniczej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej

pt. „Wpływ antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodności mikroorganizmów i zjawisko antybiotykooporności”

Przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej została wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Geoinżynierii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Moniki Harnisz jako promotora oraz dr Pauliny Rusanowskiej jako promotora pomocniczego. Recenzję rozprawy doktorskiej przygotowano na prośbę Pana prof. dr hab. inż. Marcina Dębowskiego Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka (pismo z dnia 13.09.2023, nr pisma WG-IIiOS.53.7.2023).

1. Uwagi ogólne i znaczenie podjętej tematyki badań

Problematyka badawcza omawianej rozprawy doktorskiej dotyczy bardzo aktualnej tematyki związanej z oceną i udoskonaleniem technologii procesu fermentacji metanowej osadów ściekowych. Doktorantka podjęła się trudnej ale bardzo interesującej kwestii oceny wpływu antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodność mikroorganizmów i zjawisko antybiotykooporności.

Wzrost zapotrzebowania na energię spowodował w ostatnich latach znaczące zainteresowanie odnawialnymi źródłami energii (OZE). Polityka energetyczna Unii Europejskiej zobowiązuje kraje członkowskie do stopniowego zwiększania oddziału OZE w strukturze zużycia energii. Są to tzw. zielone, czyli obojętne dla środowiska źródła oparte także na lokalnych zasobach. Także Europejski Zielony Ład zawiera plan działań umożliwiających bardziej efektywne wykorzystanie zasobów dzięki przejściu na

gospodarkę o obiegu zamkniętym, przeciwdziałaniu utracie różnorodności biologicznej i zmniejszeniu poziomu zanieczyszczeń. Zakłada również zmniejszenie śladu środowiskowego i klimatycznego sektora produkcji żywności w UE. Do celów EZŁ należy znaczne zmniejszenie stosowania pestycydów i ryzyka z tym związanego oraz ograniczenie stosowania nawozów i strat składników nawozowych. Osiągniecie tych celów jest możliwe jedynie poprzez połączenie wielu jednoczesnych działań, takich jak precyzyjne rolnictwo, cyrkularne wykorzystanie odpadów, stosowanie w rolnictwie rozwiązań opartych na naturze a przede wszystkim regeneracja i pełne wykorzystanie naturalnego potencjału gleb. Zdecydowana większość produkowanych w UE osadów ściekowych jest wykorzystywana w rolnictwie, co przy braku odpowiednich narzędzi do kontroli może stwarzać poważny problem zanieczyszczenia zarówno gleb jak i wód.

Propagowany w ostatnich latach zwiększony potencjał badań w zakresie środków wspomagających rozwój roślin sprzyja także rozwojowi sektora biogazowego, poprzez możliwości oceny przydatności pofermentu oraz wykorzystania dostępnych zasobów źródeł odnawialnych. Zdecydowanie takim dostępnym zasobem odnawialnym w Polsce jest biomasa. Jedną z bardzo szybko rozwijających się obecnie technologii konwersji energii chemicznej, zawartej w biomasie jest fermentacja metanowa. Proces ten jest coraz bardziej rozpowszechniany na świecie stąd także istnieje realna potrzeba opracowania strategii na rzecz rozwoju biogospodarki w Polsce. Przewiduje się, że również w Polsce produkcja biogazu zawierającego biometan ulegnie przyśpieszeniu. Stąd też istotne jest podjęcie badań określających różne aspekty wytwarzania biogazu szczególnie w biogazowniach rolniczych i ocena efektów zagospodarowania zarówno biogazu jak i produktu ubocznego jakim jest poferment. Związane jest to także z zaostrzeniem przepisów unijnych związanych z ograniczeniem ryzyka zanieczyszczenia wód, w tym także ze źródeł rolniczych i powiązanych z rolnictwem a za takie należy uznać także biogazownie.

Doktorantka słusznie podejmuje zatem problem oceny wpływu antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodności mikroorganizmów i zjawisko antybiotykoodporności. Aspekt ten zdecydowanie poszerza wiedzę w tym zakresie oraz podnosi świadomości o biogospodarce oraz obiegu zamkniętym związanym z gospodarczym wykorzystaniem biomasy i produktów ubocznych jej przetwarzania.

Ponadto problem oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe, staje się coraz bardziej rozpowszechniony na całym świecie. Dlatego potrzebne jest poszukiwanie nowych sposobów walki z bakteriami wielolekoopornymi. Przełożenie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* na różne środowiska *in situ* miałoby niewątpliwie rzeczywisty wpływ, otwierając nowe możliwości interwencji w celu wyeliminowania szczepów opornych na antybiotyki.

Stąd też wszelkie próby podjęcia badań dotyczących oceny wpływu antybiotyków obecnych w osadach ściekowych na proces fermentacji metanowej i bioróżnorodność mikroorganizmów za bardzo cenne i potrzebne w nauce. W ten nurt doskonale wpisuje się tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej.

W powyższym kontekście problematyka ocenianej pracy doktorskiej **ma znaczenie utylitarne i praktyczne** ze względu na możliwości wdrażania osiągniętych wyników badań do praktyki. Recenzowana rozprawa doktorska opiera się na szeroko zaplanowanych, kompleksowych badaniach z użyciem szeregu analiz laboratoryjnych. Warte podkreślenia jest również to, że w recenzowanej dysertacji jasno i profesjonalnie przedstawiono wyniki badań będące efektem bardzo rzetelnego przeprowadzenia szeregu kompleksowych analiz.

Przedstawiona powyżej problematyka pracy dotyczy istotnych i aktualnych zagadnień związanych z ochroną i jakością środowiska, a w oparciu o uzyskane rezultaty **bardzo wysoko** oceniam istotność, trafność i aktualność podjętej tematyki badawczej.

2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Opiniowana rozprawa doktorska ma postać spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. art. 13 (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), w związku z artykułem. 179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. i przepisach wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1669).

W skład rozprawy doktorskiej wchodzą cztery publikacje (trzy prace badawcze oraz jedna publikacja przeglądowa). Są to oryginalne prace naukowe. W wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o Jej znaczącym udziale w powstawaniu tych publikacji. Do dokumentacji zostały także dołączone oświadczenia pozostałych

autorów publikacji, potwierdzające znaczący udział Doktorantki w ich powstanie. Zbiór publikacji stanowiących osiągnięcie stanowi spójne omówienie rezultatów badań zawartych w następujących publikacjach:

1. **Czatzkowska M**., Harnisz M., Korzeniewska E., Koniuszewska I. 2020. Inhibitors of the methane fermentation process with particular emphasis on the microbiological aspect: A review. Energy Science & Engineering, 8, 1880-1897; https://doi.org/10.1002/ese3.609
2. **Czatzkowska M.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Rusanowska P., Bajkacz S., Felis E., Jastrzębski, J. P., Paukszto Ł., Koniuszewska I. 2021. The impact of antimicrobials on the efficiency of methane fermentation of sewage sludge, changes in microbial biodiversity and the spread of antibiotic resistance. Journal of Hazardous Materials, 416, 125773, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125773
3. **Czatzkowska M.,** Harnisz M., Korzeniewska E., Wolak, I., Rusanowska P., Paukszto Ł. Jastrzębski J.P., Bajkacz S. 2022. Long-Term, Simultaneous Impact of Antimicrobials on the Efficiency of Anaerobic Digestion of Sewage Sludge and Changes in the Microbial Community. Energies 2022, 15, 1826. https://doi.org/10.3390/en15051826
4. **Czatzkowska M.,** Wolak I., Korzeniewska E., Harnisz M. Anaerobic Digestion in the Presence of Antimicrobials—Characteristics of Its Parameters and the Structure of Methanogens. Appl. Sci. 2022, 12, 8422. https://doi.org/10.3390/ app12178422

Załączone do dysertacji publikacje zostały poprzedzone dwunastostronicowym opracowaniem w języku polskim i angielskim zawierającym następującą spójną i syntetyczną strukturę: Wstęp; Cel pracy; Hipotezy badawcze; Zakres badań, metodyka i wyniki; Podsumowanie, Literatura, Źródła finansowania.

Sumaryczny Impact Factor publikacji stanowiących zbiór artykułów według roku publikacji wynosi **23,535**, zaś liczba punktów wg wykazu MEiN wynosi **540**. Są to zatem bardzo dobre wskaźniki i dowodzą, że oryginalne publikacje twórcze stanowią istotną i bardzo wartościową część rozprawy doktorskiej. Wszystkie prace są współautorskie, a wkład Kandydatki w ich powstanie jest znaczący. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz potwierdza Jej kluczową rolę na wszystkich etapach powstawania rozprawy. Udział Doktorantki w opracowaniu tych publikacji polegał m.in. na współudziale

w planowaniu eksperymentów laboratoryjnych, przeprowadzeniu eksperymentów dotyczących analizy rozpowszechniania genów oporności na antybiotyki w osadach ściekowych, współuczestnictwie w analizie i interpretacji wyników badań oraz pracach bioinformatycznych, Doktorantka miała także wiodący udział w przeprowadzeniu systematycznego przeglądu literatury, opracowaniu statystycznym wyników badań, opracowaniu przeglądu literatury i przygotowaniu manuskryptów. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej ukazały się drukiem w renomowanych czasopismach, takich jak: *Journal of Hazardous Materials, Energy Sciences & Engineering, Energies, Applied Sciences.* Do dokumentacji zostały dołączone oświadczenia o udziale Doktorantki oraz współautorów publikacji. Z oświadczeń wynika, że wkład Doktorantki był istotny, zarówno w wykonaniu części eksperymentalnej, jaki opracowaniu i interpretacji wyników.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Pierwszy rozdział pracy doktorskiej zatytułowany „Wstęp" to dwunastostronicowy opis tematyki przedmiotu wprowadzający czytelnika w zakres prowadzonych badań, który syntetycznie przedstawia analizowany problem, zastosowane metody badawcze oraz otrzymane wyniki.

Doktorantka precyzyjnie przedstawia cel główny pracy oraz cztery główne i słusznie postawione hipotezy badawcze. Za cel badań podjętych w ramach niniejszej pracy doktorskiej Doktorantka przyjęła określenie wpływu obecności antybiotyków w osadzie ściekowym poddanym fermentacji metanowej z uwzględnieniem czterech aspektów stanowiących cele dodatkowe: (1) wydajność produkcji metanu, (2) los ARGs oraz rozpowszechnianie zjawiska AR, (3) zmiany jakościowe i ilościowe w konsorcjach mikroorganizmów odpowiadających za właściwy przebieg procesu oraz (4) występowanie mikroorganizmów metanogennych. Powyższe cele badań zostały poprawnie zaplanowane z oparciu o postawione hipotezy badawcze. Doktorantka przyjęła następujące hipotezy badawcze, których weryfikację szczegółowo omówiła w szczególnych publikacjach:

1. Ekspozycja osadów ściekowych na antybiotyki wpływa na efektywność produkcji metanu podczas ich stabilizacji beztlenowej.

2. Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych nie eliminuje ARGs.

3. Obecność antybiotyków w osadzie ściekowym poddanym fermentacji metanowej oddziałuje na zmiany w strukturze społeczności bakterii właściwych.

4. Substancje przeciwdrobnoustrojowe obecne w osadach ściekowych wywierają wpływ na aktywność i bioróżnorodność mikroorganizmów metanogennych zaangażowanych w proces stabilizacji beztlenowej.

W mojej opinii cel badań oraz hipotezy badawcze zostały poprawnie zaplanowane a w toku realizacji badań Doktoranta uzyskała wyniki dające na nie odpowiedź. Co ważne na końcu dysertacji Doktorantka jasno i precyzyjnie weryfikuje postawione wcześniej hipotezy badawcze. Weryfikację hipotezy badawczej poparto otrzymanymi na kolejnych etapach badań wynikami.

Kolejny rozdział „Zakres badań, metodyka i wyniki" obejmuje opis materiału badawczego oraz metodyk, które zostały wykorzystane w przedstawionych publikacjach składających się na rozprawę doktorską. Na szczególne podkreślenie zasługuje odpowiedni dobór nowoczesnych metod i technik badawczych, które pozwoliły na precyzyjne ich przeprowadzenie i weryfikację otrzymanych wyników. Doktorantka bardzo dokładnie opisuje wykorzystane w toku prowadzenia badań metody. Problem badawczy został przez Doktorantkę bardzo słusznie oraz logicznie podzielony na trzy etapy badań, które zostały szczegółowo opisane w kolejnych publikacjach. Należy także podkreślić, iż kolejne etapy badań zostały także zaprezentowane na dodatkowych schematach, co ułatwia zarówno zrozumienie zagadnienia oraz syntetyzuje podjęte kroki badawcze. Wstępem do poszczególnych etapów badawczych jest publikacja przeglądowa stanowiąca załącznik nr 1 w recenzowanej dysertacji, która doskonale wprowadza czytelnika w omawiane zagadnienie jego potrzebę i znaczenie.

Za cel pierwszego etapu badań Doktorantka przyjęła wyznaczenie substancji przeciwdrobnoustrojowych, wywierających najbardziej istotny wpływ na fermentację metanową. W tym celu do wsadu bioreaktorów indywidualnie zadawano kolejne antybiotyki. W analizach uwzględniono zarówno efektywność produkcji metanu, jak również strukturę drobnoustrojów oraz losy ARGs podczas beztlenowej stabilizacji osadów ściekowych. Wyniki tych prac badawczych zostały szeroko opisane w publikacji drugiej stanowiącej załącznik nr 2 dysertacji. Doktorantka udowodniła, że fermentacja metanowa została istotnie zahamowana w bioreaktorach, w których wsad suplementowany był

metronidazolem (MET), amoksycyliną (AMO), cefuroksymem (CEF), oksytetracykliną (OXY), doksycykliną (DOXY), oraz ciprofloksacyną (CIP). Analiza sekwencji DNA w próbkach ze wszystkich bioreaktorów wykazała, że dominującymi typami mikroorganizmów w pofermencie byli przedstawiciele typów Bacteroidetes, Firmicutes i Proteobacteria. Ważnym wynikiem jest także stwierdzenie, że geny kodujące integrazę odgrywają ważną rolę w przenoszeniu ARGs podczas fermentacji metanowej.

W tym miejscu chciałabym zapytać, które grupy antybiotyków są obecnie najczęściej występujące w osadach ściekowych? Czy ich obecność jest zmienna sezonowo np. czy obserwuje się zwiększenie zawartości antybiotyków w osadach ściekowych w sezonach o zwiększonych zachorowań? Czy są opracowane normy zawartości antybiotyków w osadach ściekowych? Czy stężenie antybiotyków na poziomie 512 lub 1024 µg/g podane jest w gramie świeżej czy suchej masy osadu ściekowego? Proszę o przybliżenie skąd wynikają te zastosowane wartości. Proszę także o doprecyzowanie informacji, czy sekwencjonowanie wykonywano w powtórzeniach?

W publikacji trzeciej stanowiącej załącznik nr 3 w niniejszej dysertacji Doktorantka podjęła się kontynowania wcześniejszych badań celem oceny jednoczesnego, długoterminowego wpływu środków przeciwbakteryjnych na fermentację metanową osadów ściekowych. Badania objęły trzy substancje przeciwdrobnoustrojowe, które indywidualnie wywarły największy istotny wpływ na stabilizację beztlenową, z uwzględnieniem aspektów mikrobiologicznych procesu – MET, AMO i CIP. W publikacji tej Doktorantka otrzymała wyniki badań, które istotnie pozwoliły na weryfikację pierwszych trzech hipotez badawczych. Doktorantka potwierdziła, że ekspozycja na wzrastające dawki mieszaniny antybiotyków wywołała istotne zmiany w strukturze mikrobiomu. Ekspozycja wsadu bioreaktora na AMO (36 µg/mL), CIP (16 µg/mL) i MET (16 µg/mL) znacząco hamowała wzrost przedstawicieli Acidobacteria. Analiza liczebności OTU charakterystycznych dla metanogenów pozwoliła na identyfikację w próbkach wsadu czterech głównych rzędów metanogenów: Methanosarcinales i Methanomicrobiales z klasy Methanomicrobia, Methanomassiliicoccales z klasy Thermoplasmata i Methanobacteriales z klasy Methanobacteria. W czasie trwania całego eksperymentu Doktorantka zaobserwowała istotne różnice w obfitości przedstawicieli Methanosarcinales i

Methanomassiliicoccales, zarówno w próbkach z bioreaktora procesowego, jak i kontrolnego.

Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka przeprowadziła kolejne badania, które przedstawiła w publikacji czwartej stanowiący załącznik nr 4 do rozprawy doktorskiej. W tej pracy zweryfikowano ostatnią, czwartą hipotezę badawczą. Aktywność mikroorganizmów metanogennych oceniono poprzez określenie stężenia genu kodującego reduktazę metylokoenzymu M (mcrA), katalizującego ostatni etap fermentacji metanowej - metanogenezę. Doktorantka na podstawie wyników molekularnej analizy efektywności stabilizacji beztlenowej, uwzględniającej koncentrację funkcjonalnego genu mcrA, potwierdziła, że stężenia tego genu w próbkach wsadu z bioreaktorów procesowych i kontrolnych, różniły się w całej serii eksperymentalnej. Jednak nie wykazała, że produkcja metanu była skorelowana z występowaniem genu mcrA podczas długotrwałej stabilizacji beztlenowej, bez względu na ekspozycję na leki bądź jej brak.

Wielu autorów potwierdza, że aktywność genu kodującego reduktazę metylokoenzymu M (mcrA) można by traktować jako czuły wskaźnik do oceny wpływu antybiotyków na zahamowanie procesu fermentacji metanowej. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę nie potwierdziły tej zależności. Czym można to tłumaczyć?

W podsumowaniu Doktorantka sformułowała cztery stwierdzenia odpowiadające na cel badań oraz postawione hipotezy badawcze.

Konkludując ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że publikacje składające się na dysertację powstały na podbudowie bardzo dobrej i spójnej koncepcji badań. Zostały starannie opracowane i dostosowane do wymagań czasopism. Wszystkie badania zostały wykonane poprawnie pod względem metodycznym. Wyniki badań są oryginalne. Zostały one poprawnie opracowane statystycznie i dobrze zilustrowane. Wnoszą nowe wartości do mikrobiologii oraz nauk inżynieryjno-technicznych a tym samym poszerzają wiedzę z dyscypliny inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka. Doktorantka udowodniła, że posiada wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Pani mgr inż. Małgorzata Czatzkowska udowodniła także, że posiada umiejętność syntetycznego opisywania i właściwego analizowania otrzymanych wyników oraz problematyki badawczej zaprezentowanej w zbiorze publikacji, którą zatytułowała „*Wpływ antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodności*

mikroorganizmów i zjawisko antybiotykooporności". Bardzo dobrze zaprojektowane doświadczenia, oryginalna koncepcja badań, szeroki wachlarz precyzyjnych i nowoczesnych metod badawczych oraz odpowiednie przygotowanie Doktorantki umożliwiło osiągnięcie wielu cennych i wartościowych wyników.

4. Wniosek końcowy

Podsumowując przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i potwierdza szeroką wiedzę teoretyczną Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej. Jednocześnie stanowi **kompleksowe i spójne opracowanie** dotyczące oceny wpływu antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodności mikroorganizmów i zjawiska antybiotykoodporności.

Doktorantka dowiodła, iż posiada wiedzę w powyższej tematyce, jak również potrafi zaplanować i właściwie przeprowadzić badania metodyczne związane z powyższą tematyką. Moim zdaniem sformułowany problem badawczy został w pełni osiągnięty. Lektura dysertacji oraz oryginalnych publikacji naukowych wchodzących w jej skład robi bardzo dobre wrażanie. Wykorzystany przez Doktorantkę warsztat naukowo-badawczy jest bardzo szeroki, a uzyskane wyniki umożliwiły osiągnięcie zakładanego na wstępie celu pracy. Praca nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym i merytorycznym. Na uznanie zasługuje bardzo dobrze przemyślany plan badań i dobór odpowiednich metod badawczych, w tym także nowoczesnych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej i oceny zróżnicowania mikroorganizmów.

W świetle powyższej oceny stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca **spełnia** wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z obowiązującą podstawą prawną. Wnoszę więc do Rady Naukowej Dyscypliny inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

Jednocześnie ze względu na duże walory poznawcze i aplikacyjne otrzymanych wyników badań oraz zwracając szczególną uwagę na aktualność i trafność problematyki badawczej oraz wyróżniający się poziom merytoryczny pracy wykonanej przy zastosowaniu

nowoczesnych metod i narzędzi badawczych, wnoszę **wniosek o wyróżnienie** pracy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej stosowną nagrodą. W mojej ocenie wartość dysertacji podnoszą także oryginalne wyniki badań opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, w których Doktorantka ma znaczący udział i jest pierwszym autorem. O znaczeniu i aktualności tych badań świadczy także wysoka cytowalność tych prac. Według bazy Scopus publikacja w Energy Sciences & Engineering (z roku 2020) została zacytowana 71 razy, zaś publikacja w Journal of Hazardous Materials (z roku 2021) 15 razy.

dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB

Jednostka organizacyjna IUNG-PIB Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Osoba do kontaktu: dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB
Telefon: 814786950
Adres e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl