Toruń, 26.02.2024

Prof. dr hab. Maciej Walczak
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
i Biotechnologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

Recenzja dysertacji doktorskiej Pana mgr Damiana Rolbieckiego pod tytułem: „Ścieki szpitalne i komunalne jako źródło rozprzestrzeniania lekooporności w środowisku"

Recenzowana praca została wykonana w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej, Wydziału Geoinżynierii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Moniki Harnisz.

1. Komentarz ogólny

Problem narastającej lekooporności i rozprzestrzeniania się w środowisku naturalnym zarówno bakterii antybiotykoopornych jaki ich genów nie jest nowy. Mówi i pisze się o tym zjawisku od co najmniej 30 lat i od wielu lat pojawiają się informacje o super bakteriach opornych na wszystkie dostępne antybiotyki. W ślad za tymi informacjami idą przepowiednie apokalipsy ludzkości wynikającej z braku skutecznych leków oraz powrotu do czasów sprzed ery antybiotyków i powszechnego umierania na zapalenie ucha czy płuc.

Przedłożona mi do recenzji praca wpisuje się w ten niezwykle popularny dziś nurt badań. Autor podjął się w niej wykazania w oparciu o wielopłaszczyznowe analizy stanu faktycznego zagrożenia oraz ustalenia potencjalnych dróg rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki.

2. Ocena formalnej strony pracy

Dysertacja doktorska obejmuje cztery spójne tematycznie artykuły naukowe.

1. Rolbiecki, D., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Jałowiecki, Ł., & Płaza, G. (2020). Occurrence of fluoroquinolones and sulfonamides resistance genes in wastewater and sludge at different stages of wastewater treatment: a preliminary case study. Applied Sciences-Basel, 10, 1–13. https://doi.org/10.3390/app10175816 IF 2.474, punkty MEiN 100

2. Rolbiecki, D., Harnisz, M., Korzeniewska, E., Buta, M., Hubeny, J., & Zieliński, W. (2021). Detection of carbapenemase-producing, hypervirulent Klebsiella spp. In wastewater and their potential transmission to river water and WWTP employees. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 237, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2021.113831 IF 5.84, punkty MEiN 140

3. Rolbiecki, D., Korzeniewska, E., Czatzkowska, M., & Harnisz, M. (2022). The Impact of Chlorine Disinfection of Hospital Wastewater on Clonal Similarity and ESBL- Production in Selected Bacteria of the Family Enterobacteriaceae. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19, 1–19. https://doi.org/10.3390/ijerph192113868 IF 3.39, punkty MEiN 140

4. Rolbiecki, D., Paukszto, Ł., Krawczyk, K., Korzeniewska, E., Sawicki, J., & Harnisz, M. (2023). Chlorine disinfection modifies the microbiome, resistome and mobilome of hospital wastewater - A nanopore long-read metagenomic approach. Journal of Hazardous Materials, 459, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132298 IF 13.6, punkty MEiN 200.

Wszystkie prace mają klasyczną strukturę i są podzielone na abstrakt, wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusję oraz wnioski. Uzyskane wyniki bibliometryczne są na bardzo dobrym poziomie, łączna punktacja wymienionych prac to według MNiSW = 580 a sumaryczny IF = 25,3. Wszystkie prace wchodzące w skład dysertacji były przygotowane przez zespół autorów. Doktorant, Pan mgr Damian Rolbiecki załączył do każdej z prac oświadczenia współautorów z wykazem podziału prac jakie zostały wykonane przez poszczególnych współautorów. Przedłożone dokument wskazują, że udział Doktoranta była większościowy. Pozostali współautorzy wyrazili także zgodę na wykorzystanie dzieł wspólnych jako fragmentów dysertacji Doktoranta.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Dysertacja jest podzielona na wstęp, cel i zakres badań, hipotezy badawcze, opis stosowanych metod, podsumowanie, literaturę oraz streszczenie w języku polskimi angielskim.

Wstęp pracy wprowadza czytelnika z problematykę badawczą. W tej części pracy autor opisuje istotność problemu badawczego, narastającą lekooporność, podaje dane cytowane za WHO dotyczące poruszanej problematyki. W dalszej części wstępu Autor opisuje również możliwości przenoszenia problemu lekooporności w środowisku ściekowym, zwłaszcza ścieków pochodzących w ośrodków szpitalnych. Ta część pracy jest napisana, można by rzec , jak horror Hitchcocka. Z każdą linijką napięcie rośnie. Generalnie wszystkie te informacje są jak najbardziej prawdziwe a jedyny zarzut jaki może się pojawić to dlaczego Doktorant oparł się wyłącznie na pracach nowych i bardzo nowych. Tak, wiem

takie jest dziś podejście – najlepsza literatura tylko z ostatniej dekady. Rodzi się jednak pytanie czy przy takim podejściu młodzi adepci nauki za chwile nie zaczną odkrywać koła. Problem antybiotykooporności jest z pewnością starszy niż same antybiotyki i myślę, że konieczne jest, jak to sam Doktorant ujmuje – holistyczne spojrzenie na problem, czego moim zdaniem nie da się zrobić korzystając jedynie z literatury z ostatniej dekady. We wstępie pada na przykład przytłaczająca informacja o prawie 2 milionach zgonów w skali świata wywołanych bakteriami antybiotykoopornymi. Tak, to dużo, nawet bardzo dużo. Ale żeby podejść do tej liczby z dystansem trzeba wiedzieć w ilu przypadkach w skali świata stosuje się rocznie antybiotykoterapię. Zakładam, że jest to kilka miliardów. Te około 2 mln zgonów to więc zaledwie promil. Żeby być jednak sprawiedliwym zgadzam się z Doktorantem, że problem jest i może wymknąć się spod kontroli, czego konsekwencje będą nieobliczalne. Problem badawczy jest więc jak najbardziej uzasadniony, tyle że nie jest konieczne tworzenie wizji apokaliptycznych.

Zastosowane przez Autora metody badawcze nie budzą żadnych wątpliwości, są jak najbardziej poprawne i właściwie dobrane. Na podkreślenie zasługuje stosunkowo duża ich różnorodność, od metod klasycznej mikrobiologii, wiele różnych technik biologii molekularnej umożliwiających uzyskiwanie wyników na wielu płaszczyznach, np.: identyfikacja mikroorganizmów, różnorodność klonów, obecność i częstość poszczególnych genów.

Natomiast mam zastrzeżenia do przedstawionych hipotez badawczych. W mojej ocenie hipotezy 1, 2, 3 i 5 nie spełniają wymogów hipotez. Z definicji hipoteza musi być weryfikowalna pozytywnie lub negatywnie. Natomiast w tym przypadku zaraz po postawieniu hipotezy (wadliwej) można od razu udzielić poprawnej odpowiedzi bez jakichkolwiek badań. Na przykład Hipoteza 1: **Ścieki komunalne są rezerwuarem genów lekooporności oraz bakterii lekoopornych i przyczyniają się do rozprzestrzeniania determinantów lekooporności w środowisku** – a czy można wyobrazić sobie, że tak nie jest? To jest stwierdzenie faktów potwierdzonych przez tysiące publikacji z ostatnich dziesięcioleci. Podobnie w pozostałych przypadkach. Chcę podkreślić, że hipoteza nie jest obowiązkowym elementem doktoratu, obowiązkowy jest poprawnie przedstawiony cel. Dlatego w pracach takich jak ta, gdzie istnieje ogromna ilość danych i wyników z lat wcześniejszych, czasami zdecydowanie lepiej nie silić się na hipotezy.

Opis wyników przedstawiony przez Doktoranta jest bardzo dobry, jasny, przejrzysty, zrozumiały. Dotyczy to zarówno tego co jest zawarte w skrócone wersji w języku polskim jak i opisu wyników w poszczególnych publikacjach. W opisie wyników dotyczących obecności w rzece genów sul2, qepA , Autor pisze, że ich obecność w wodach nie dotkniętych zanieczyszczeniem może być efektem dopływu z innych źródeł lub pochodzić z autochtonicznej mikrobioty rzeki. **Chciałbym, żeby Doktorant rozwinął tę myśl i przedstawił jakieś swoje przemyślenia na temat obecności genów lub mikroorganizmów antybiotykoopornych w środowiskach nie dotkniętych antropopresją**. Chce również zwrócić uwagę,

na niepotrzebną w wielu miejscach ostrożność w wyrażaniu myśli lub opisywaniu faktów. Na przykład Doktorant pisze: „Procesy grawitacyjnego zagęszczania i odwodniania osadów ściekowych **mogą** powodować kumulację ARGs w stałych odpadach produkowanych przez WWTPs". Dlaczego **mogą**? Tak się dzieje, to jest potwierdzone i pewne. W takich sytuacjach jakiekolwiek przypuszczenia są w mojej ocenie zbędne.

Ciekawe wyniki Autor uzyskał podczas prac prowadzonych w kolejnych cyklu badawczym (publikacja 2). Stwierdził w ściekach oczyszczonych bakterie *Klebsiella*, ale tylko raz udało się je stwierdzić w próbach pobieranych od pracowników oczyszczalni. W gruncie rzeczy ten wynik w ogóle mnie nie dziwi, jest zgodny z logiką. **Chciałbym jednak, żeby Doktorant spróbował wyjaśnić dlaczego jego zdaniem tak było.** Przecież w bioaerozolu na teranie oczyszczalni tych bakterii i innych również jest ogrom.

W tym miejscy chciałbym zapytać Doktoranta **czy próbował korelować wyniki ilości szczepów antybiotykoopornych w ściekach lub rzekach z aktualnie sprzedawaną ilością antybiotyków w danej miejscowości czy gminie?** Wydaje się, że taka korelacja powinna występować.

Jednym z najistotniejszych wyników jakie uzyskał Doktorant jest w mojej ocenie wykazanie, że obecnie stosowane metody dezynfekcji ścieków szpitalnych są nieskuteczne i co więcej prowadzą do zwiększenia puli ARGs w ściekach.

Ponadto uważam, że na szczególne podkreślenie zasługuje jakość graficznego przedstawienia wyników. Niezależnie od publikacji, za każdym razem jakość graficznej prezentacji materiały faktograficznego jest na absolutnie najwyższym poziomie. Mało tego prawie w każdej z załączonych prac sposób prezentacji jest za każdym razem inny. Nie jest to łatwe dla czytelnika, ale świadczy o bardzo rozbudowanym warsztacie Doktoranta.

Podsumowanie

Doktorant przeprowadził bardzo szczegółowe badania dotyczące problematyki rozprzestrzeniania bakterii i genów antybiotykoodporności. Wykonała ogromną pracę, analizując bardzo dużą liczbę różnorodnych prób środowiskowych. Analizy prowadził bardzo zróżnicowaną i szeroką paletą metod badawczych. Uzyskał ogromną ilość wyników, które poddał zaawansowanej analizie statystycznej oraz przedstawił w różnorodnej formie graficznej.

W oparciu o wyniki badań potwierdził występowanie w badanych materiałach mikroorganizmów lekoopornych oraz rozprzestrzenianie się ich genów a także ryzyko przenoszenia bakterii patogennych i antybiotykoopornych na ludzi. Oznaczył faktyczny stan ryzyka dotyczący różnorodności mikrobiomiu, rezystomu i mobilomu ścieków szpitalnych, zwłaszcza poddanych nieskutecznej dezynfekcji.

Wykazał tym samym duże ryzyko sanitarne związane z tym zjawiskiem. W związku z powyższym zrealizował postawiony cel badawczy.

Na dodatkową uwagę zasługuje fakt, że Doktorant pracował w sporych zespołach badawczych skupionych w projektach finansowanych z NCNu, a jednogo z nich był autorem i wnioskodawcą. Wnioskuję więc o znacznej samodzielności Doktoranta oraz dużej dojrzałości naukowej.

W świetle powyższych faktów przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia obowiązującą wymogi formalne, które określa *art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2023.742 ze zm.).*

Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pana mgr **Damiana Rolbieckiego** do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Maciej Walczak