dr hab. Katarzyna Baldy-Chudzik, prof. UZ
Katedra Mikrobiologii i Biologii Molekularnej
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum
Uniwersytet Zielonogórski

Zielona Góra, 27.02.2024r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Damiana Rolbieckiego pt. "Ścieki szpitalne i komunalne jako źródło rozprzestrzeniania lekooporności w środowisku"

wykonanej w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej , Wydział Geoinżynierii , Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, pod kierunkiem promotor prof. dr hab. inż. Moniki Harnisz

Oporność bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe (z ang. antimicrobial resistance – AMR) to jeden z globalnych problemów stanowiący istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Aktualne działania związane z gromadzeniem informacji o AMR na świecie jednoznacznie wskazują, że bakterie lekooporne i geny lekooporności mogą rozprzestrzeniać się i cyrkulować nie tylko w bliskim otoczeniu człowieka ale też w szeroko pojętym środowisku naturalnym. Dla skutecznych działań zapobiegawczych istotne znaczenie ma zrozumienie wpływu gospodarki ściekowej na rozprzestrzenianie lekooporności w różnych sektorach aktywności człowieka, a w tym określenie roli ścieków komunalnych i szpitalnych. Zadanie to mieści się w ramach celu określonego w dysertacji doktorskiej Pana mgr Damiana Rolbieckiego .

Otrzymana do recenzji dysertacja doktorska została napisana w oparciu o cztery spójne tematycznie prace, opublikowane w latach 2020-2023 o łącznym IF w roku publikacji = 25,304 i 580 pkt. wg. punktacji MEiN. Pan mgr Damian Rolbiecki jest pierwszym autorem w każdej publikacji. Układ pracy pod względem formy jest typowy w odniesieniu do prac doktorskich z zakresu dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych i dyscypliny - Nauki biologiczne, opartych na spójnych tematycznie publikacjach. Napisana jest ona w języku polskim z prawidłowym użyciem nazewnictwa specjalistycznego.

Tekst przedstawionej do oceny pracy mieści się na 24 stronach, które obejmują: wyszczególnienie źródeł finansowania badań, wykaz opublikowanych artykułów składających się na rozprawę doktorską, spis treści rozprawy, abstrakt w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i zakres badań oraz hipotezy badawcze, krótki opis stosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników, podsumowanie, spis literatury oraz spis tabel, wykresów i rysunków. Dalszą część pracy stanowią kopie publikacji w formie pdf oraz oświadczenia współautorów.

Pierwszą część dysertacji stanowi **Wstęp,** w którym doktorant uzasadnia i charakteryzuje podjęty problem badawczy. Wskazuje na aktualne działania związane z gromadzeniem informacji o AMR na świecie. Wymienia postanowienia wielu światowych i europejskich organizacji, których celem są działania zmierzające do ograniczania szerzenia się mikroorganizmów lekoopornych. Przedstawia ideę koncepcji „Jedno Zdrowie" jako ogólnoświatowego planu przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Wskazuje, że ścieki są potencjalnie istotnym nośnikiem mikrozanieczyszczeń,w tym lekoopornych bakterii (ARB) i genów warunkujących oporność na antybiotyk (ARGs), łączącym środowisko antropogeniczne ze środowiskiem naturalnym. Podkreśla potencjalnie istotną rolę ścieków szpitalnych jako źródła istotnych klinicznie wielolekoopornych patogenów tzw. patogenów priorytetowych. Porusza problem chemicznej dezynfekcji ścieków szpitalnych przy użyciu związków chloru w przyszpitalnych stacjach dezynfekujących przed ich uwalnianiem do sieci kanalizacyjnych. Wskazuje też na nieliczne i często rozbieżne doniesienia w ustalaniu dokładnych powiązań między dezynfekcją chlorem a rozprzestrzenianiem się oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Rozdział ten jest zwartą i logiczną częścią pracy, co wskazuje na dobrą znajomość badanych zagadnień i piśmiennictwa z tego zakresu. Autor w przekonujący sposób uzasadnia również potrzebę podjęcia badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Drugą część pracy stanowi **Cel i zakres badań naukowych** oraz **hipotezy badawcze,** w którym Doktorant formułuje główny cel pojętych badań i wyznacza cztery zadania badawcze, których celem jest zweryfikowanie 5-ciu sformułowanych hipotez.

Kontynuacją tej części jest rozdział: **Krótki opis stosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników**, w którym w sposób czytelny została przedstawiona charakterystyka miejsc poboru materiału biologicznego służącego do realizacji każdego z czterech zadań badawczych: ścieki i osady czynne z komunalnej oczyszczalnia ścieków i ścieki z przyszpitalnej stacji dezynfekcji ścieków. Wyszczególniono sezony, w których dokonywano poboru prób; dobrze scharakteryzowano też sposób poboru materiału od pracowników oczyszczalni ścieków (wymazy z nosa i gardła) i liczebność grupy badanej oraz grupy kontrolnej.

Zastosowane metody są adekwatne do realizacji zadań badawczych. Wykorzystana metodyka badań obejmuje zarówno klasyczne techniki PCR do identyfikacji genów lekooporności, markerów gatunkowych (ITS 16S-23S) drobnoustrojów i oceny zróżnicowania genomowego (ERIC-PCR) na matrycy genomowego DNA analizowanych izolatów bakteryjnych oraz matrycy DNA środowiskowego/ metagenomowego pozyskanego metodą filtracji (zadania badawcze I, II i III), jak i analizy sekwencji metagenomowego DNA z użyciem nanoporów umożliwiających uzyskiwanie odczytu sekwencji długich odcinków

DNA.(zadanie badawcze IV) z wykorzystaniem adekwatnych narzędzi bioinformatycznych (zadanie IV) jak i dobrze skomponowane analizy statystyczne.

Każde zadanie badawcze zostało zaprojektowane tak, aby wykazać występowanie określonych genetycznych uwarunkowań antybiotykooporności i lekoopornych mikroorganizmów w ściekach komunalnych i szpitalnych. Szacowano też możliwości transmisji szczepów lekoopornych zarówno do rzek otrzymujących ścieki jak i górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni wraz z bioaerozolem emitowanym w procesie oczyszczania ścieków. Dla każdego z zadań badawczych została przeprowadzona szczegółowa analiza uzyskanych wyników.

Zadanie I. Obejmowało ocenę rozpowszechnienia wybranych ARGs w ściekach komunalnych i w środowisku naturalnym. W pracy badano obecność genów kodujących oporność na sulfonamidy (sul1, sul2) i fluorochinolony (qepA, aac(6′)-Ib-cr) na różnych etapach oczyszczania ścieków w dwóch oczyszczalniach. Wyniki wykazały, że procesy biologicznego oczyszczania nie usuwają całkowicie genów antybiotykoodporności ze ścieków. Redukcja ARGs obserwowana była tylko w przypadku genów mniej rozprzestrzenionych w środowisku (sul2, qepA), które mogły mniej licznie występować również w ściekach dopływających do oczyszczalni.

Zadanie II. W tym badaniu analizowano występowanie szczepów – producentów karbapenemaz z rodzaju *Klebsiella* w próbkach ścieków, wody rzecznej oraz w wymazach z górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni ścieków. Wyniki tego badania ujawniły, że środowisko oczyszczalni ścieków jest miejscem występowania tych krytycznych patogenów alarmowych, a komora osadu czynnego (bioreaktor) jest najbardziej prawdopodobnym miejscem transmisji bakterii do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Obecność w ściekach oczyszczonych produkujących karbapenemazy i obarczonych czynnikami wirulencji żywych szczepów *K. pneumoniae* potwierdza, że ścieki przyczyniają się do rozprzestrzeniania w środowisku tych patogenów.

Zadanie III. Obejmowało ocenę skuteczności procesu dezynfekcji ścieków z wykorzystaniem związków chloru w przyszpitalnej stacji dezynfekującej ścieki szpitalne, na podstawie zdolności do przeżywania dezynfekcji bakterii, producentów ESBL, z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zbadano również wpływ dezynfekcji na podobieństwo klonalne przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*. Uzyskane wyniki wskazują, że proces dezynfekcji prowadzony w przyszpitalnej stacji nie jest w pełni skuteczny, a bakterie z rodziny Enterobacteriaceae, w tym ESBL+, mogą przetrwać proces dezynfekcji i trafiać do miejskiego systemu kanalizacji. Ponadto, rezultaty tego badania sugerują, że stosowana w obiekcie dezynfekcja na bazie chloru może faworyzować przeżywalność bakterii wytwarzających ESBL i/lub przenoszenie ARGs na drodze HGT, a szczepy *Klebsiella pneumoniae* mogą stanowić główne źródło oporności na antybiotyki w rodzinie *Enterobacteriaceae*. Analizy podobieństwa klonalnego wskazują, że środowisko komory dezynfekcyjnej ścieków może sprzyjać zmienności genetycznej bakterii.

Zadanie IV. Celem badań ujętych w tym zadaniu była analiza zmian w mikrobiomie, rezystomie i mobilomie bakterii, spowodowanych procesem chemicznej dezynfekcji z wykorzystaniem związków chloru. Badania pozwoliły na identyfikację głównych nosicieli ARGs obecnych w próbkach ścieków dezynfekowanych i określenie mechanizmów mobilności determinantów lekooporności. Szczególną uwagę poświęcono identyfikacji w mikrobiomie krytycznych patogenów alarmowych. Oszacowano wpływ dezynfekcji chlorem na ryzyko przeniesienia ARGs do ludzkich patogenów bytujących w ściekach dezynfekowanych. Wyniki wskazują, że związki chloru stosowane do dezynfekcji ścieków szpitalnych mogą być czynnikiem faworyzującym przeżywalność klinicznie istotnych lekoopornych bakterii. Ponadto powodowały istotne zmiany w metagenomie bakterii, wskazujące na wzrost zdarzeń transferu ARGs do ludzkich patogenów w ściekach dezynfekowanych.

Pracę kończy rozdział **Podsumowanie**, w którym doktorant umiejętnie podsumowuje każdy etap badania i formułuje wnioski, wskazując, że zarówno ścieki komunalne, jak i dezynfekowane szpitalne pełnią istotną rolę w rozprzestrzenianiu lekooporności w środowisku poprzez transmisję ARGs i żywych lekoopornych priorytetowych patogenów alarmowych. Bioaerosol emitowany podczas mieszania i natleniania ścieków w procesie oczyszczania stwarza realne ryzyko transmisji lekoopornych mikroorganizmów do górnych dróg oddechowych pracowników oczyszczalni. Aktualnie stosowane metody dezynfekcji ścieków szpitalnych z wykorzystaniem związków chloru nie są skuteczne w dezaktywacji klinicznie istotnych ARB, a nawet mogą faworyzować przeżywalność lekoopornych bakterii.

Cytowana **Literatura** obejmuje 26 pozycji opublikowany w latach 2011-2023. Dobór piśmiennictwa wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu i dojrzałość naukową Autora.

Przedstawiona do oceny praca doktorska opiera się na artykułach już recenzowanych i opublikowanych w renomowanych wydawnictwach o czym świadczą wysokie współczynniki wpływu. Pomimo to, po pełnej analizie dysertacji i załączonych publikacji mam następujące uwagi :

1. Odnośnie zadania badawczego II, artykuł pt: "Detection of carbapenemase-producing, hypervirulent Klebsiella spp. in wastewater and their potential transmission to river water and WWTP employees":

a/ Dlaczego zarówno w tekście rozprawy jak i w publikacji nie wspomina się o zgodzie komisji bioetycznej na pozyskiwanie wymazów od pracowników oczyszczalni ścieków i osób z grupy kontrolnej?

b/ Komentarz odnośnie definiowania szczepów Hvr *Klebsiella pneumoniae*. Określenie hiperwirulencji dotyczy wyłącznie gatunku *K.pneumoniae* stąd określenia Hvr *Klebsiella spp.*, które widnieją w tekście, nie są prawidłowe bo nie wskazują jednoznacznie gatunku. Ponadto , określenie hiperwirulencji w przypadku tego patogenu obejmuje nie tylko określony zestaw sideroforów, genów kapsularnych czy też tych które warunkują fenotyp śluzowy ale przede wszystkim relacje patogen-gospodarz. Bez objawów chorobowych nie można mówić

o hiperwirulencji. Organizm o sprawnie funkcjonującym układzie odpornościowym jest w stanie zwalczyć infekcję powodowaną przez szczepy niosące geny wirulencji w przeciwieństwie do obniżonej odporności czy też wielochorobowości. Dla potwierdzenia przynależności *K.pneumoniae* do typu Hvr stosuje się też badanie modelowe indukcji sepsy w modelu mysim. Dlatego też określenie typu Hvr *K.pneumoniae* odnosi się do badań klinicznych i epidemiologicznych populacji ludzkiej [Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF,Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, Van Tyne D. 2021. Finding order in the chaos: outstanding questions in Klebsiella pneumonia pathogenesis. Infect Immun 89:e00693-20.https://doi.org/10.1128/IAI.00693-20].
W odniesieniu do badań prezentowanych w ocenianej dysertacji doktorskiej i przy ich kontynuacji, gdzie analizowane są genotypy czynników wirulencji i lekooporności - bardziej trafne i „bezpieczne" jest stosowanie określenia szczepów o potencjalnie podwyższonej wirulencji, ze względu na obecność nagromadzenia adekwatnych genów wirulencji. Innym referencyjnym i nie budzącym kontrowersji sposobem jest określanie typów sekwencyjnych (ST) w oparciu o metodę MLST z wykorzystaniem 7 genów metabolizmu podstawowego.

2. Odnośnie III zadania badawczego, praca pt: "The Impact of Chlorine Disinfection of Hospital Wastewater on Clonal Similarity and ESBL-Production in Selected Bacteria of the Family Enterobacteriaceae", Rycina 5, która obrazuje relacje podobieństwa genomowego ERIC-PCR w obrębie różnych gatunków *Enterobactericeae.* Szkoda, że w dendrogramie nie umieszczono skali podobieństwa. Istotne jest czy podobieństwo genomowe między analizowanymi gatunkami tej rodziny, pozwalające na wyodrębnienie grup, obejmowało zakres do 20% czy wyżej. Relacje podobieństwa mogą świadczyć o sile dyskryminacji stosowanej metody w analizach porównawczy różnych gatunków w obrębie tej rodziny.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem. Wyniki badań dostarczają nowych informacji na temat przeżywalności szczepów lekoopornych w procesach dezynfekcji związkami chloru ścieków szpitalnych jak i bardzo wartościowych danych dotyczących transmisji determinant oporności i szczepów lekoopornych do wód powierzchniowych w wyniku uwalniania ścieków oczyszczonych.. Na podkreślenie zasługuje bogata metodyka oraz bardzo rzetelne przeprowadzenie badań. Treść dysertacji jednoznacznie wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną jak i umiejętności Doktoranta w zakresie prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Damiana Rolbieckiego pt.„ Ścieki szpitalne i komunalne jako źródło rozprzestrzeniania lekooporności w środowisku" spełnia wymogi przewidziane w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie Pana mgr Damiana Rolbieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na duże znaczenie podjętego przez Doktoranta tematu, zakres przeprowadzonych badań, uzyskanie wartościowych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

K. Bałdy - Chudzik