

Wrocław, dn. 20.11.2023r.

Dr hab. inż. Katarzyna Piekarska, prof. uczelni
Politechnika Wrocławska
Wydział Inżynierii Środowiska
Katedra Inżynierii Ochrony Środowiska

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 bydłowej*”

opracowana na podstawie pisma

Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny
nauki biologiczne

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej z dnia 19.09.2023r.

(Promotor pracy: prof. dr hab. inż. Ewa Korzeniewska)

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Izabeli Wolak składa się z autoreferatu, zawierającego: (1) streszczenie w j. polskim (2) abstract w j. angielskim (3) wprowadzenie do tematyki badań (4) cel i hipotezy badawcze (5) zakres i metodykę pracy (6) omówienie wyników badań (7) podsumowanie i wnioski (8) literaturę- 29 pozycji oraz (9) pięć załączników zawierających kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów. Wyniki będące przedmiotem dysertacji zawarto w cyklu pięciu współautorskich publikacji naukowych, opublikowanych w latach 2020-2023, w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports (JCR) posiadających IF (*International Journal of Energy Research, Applied Sciences, Energies*- 2 prace, *International Journal of Environmental Research and Public Health*). Dysertacja doktorska została przygotowana zgodnie z wymogami odpowiedniej ustawy.

1. **Koniuszewska I**, Korzeniewska E, Harnisz M, Czatzkowska M, Intensification of biogas production using various technologies: A review. *International Journal of Energy Research*, 2020; 2:1–19. <https://doi.org/10.1002/er.533>; **IF=4.672**, **MEiN=100**.
2. **Koniuszewska I**, Czatzkowska M, Harnisz M, Korzeniewska E. The Impact of Antimicrobial Substances on the Methanogenic Community during Methane Fermentation of Sewage Sludge and Cattle Slurry. *Applied Sciences*, 2021; 11(1):369. <https://doi.org/10.3390/app11010369>; **IF=2.838**, **MEiN=100**.
3. **Koniuszewska I**, Harnisz M, Korzeniewska E, Czatzkowska M, Jastrzębski JP, Pauksto Ł, Bajkacz S, Felis E, Rusanowska P. The Effect of Antibiotics on Mesophilic Anaerobic Digestion Process of Cattle Manure. *Energies*, 2021; 14(4):1125. <https://doi.org/10.3390/en14041125>; **IF=3.252**, **MEiN=140**.
4. **Wolak I**, Czatzkowska M, Harnisz M, Jastrzębski JP, Pauksto Ł, Rusanowska P, Felis E, Korzeniewska E. Metagenomic Analysis of the Long-Term Synergistic Effects of Antibiotics on the Anaerobic Digestion of Cattle Manure. *Energies*, 2022; 15(5):1920. <https://doi.org/10.3390/en15051920>; **IF=3.252**, **MEiN=140**.
5. **Wolak I**, Bajkacz S, Harnisz M, Stando K, Męcik M, Korzeniewska E. 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*, 2023; 20(3): 2672. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032672>; **IF=4.614**, **MEiN=140**.

Łączna wartość Impact Factor artykułów opublikowanych w ramach dysertacji Doktorantki to **18.628**, a sumaryczna liczba punktów MEiN, zgodnie z rokiem opublikowania, dla tych prac wynosi **620**. Prace te zaistniały już w międzynarodowym obiegu informacji co równocześnie potwierdza trafność doboru tematyki rozprawy. Liczba ich cytowań wg. bazy Web of Science Core Collection wynosi **48**.

Badania zaprezentowane w publikacjach zrealizowano w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej na Wydziale Geoinżynierii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w ramach dwóch projektów:

1. Narodowe Centrum Nauki grant nr 2020/37/N/NZ9/00431, pt.: *Poferment z biogazowni rolniczych jako rezerwuuar lekooporności - realne zagrożenie dla środowiska?* pozyskany, co należy podkreślić, przez Doktorantkę w konkursie Preludium 19,
2. Narodowe Centrum Nauki grant nr 2016/23/B/NZ9/03669, pt.: *Wykorzystanie bioaugmentacji do intensyfikacji produkcji biogazu z substratów organicznych o wysokiej koncentracji antybiotyków* (kierownik projektu: prof. dr hab. inż. Monika Harnisz), którego Doktorantka była stypendystką.

Wszystkie prace są wieloautorskie, co jest typowe dla tak obszernych prac badawczych, mają czterech (praca 1 i 2), sześciu (praca 5), ośmiu (praca 4) oraz dziewięciu (praca 3) autorów. We wszystkich publikacjach Pani mgr Izabela Wolak jest pierwszym autorem. Z oświadczeń złożonych przez Doktorantkę oraz współautorów prac wynika, że miała znaczący udział w ich przygotowaniu uczestnicząc w najważniejszych etapach składających się na ich przygotowanie; czyli w opracowaniu metodyki, przeglądu literatury, wykonaniu analiz laboratoryjnych, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz w dalszych pracach edytorskich.

Sylwetkę Doktorantki uzupełnia Jej dodatkowy dorobek naukowy w postaci 8 współautorskich publikacji opublikowanych w czasopiśmie wyróżnionych przez JCR (*Ecohydrology & Hydrobiology*- 2 prace, *Energy Science & Engineering*, *Science of The Total Environment*, *Journal of Hazardous Materials*, *Energies*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *Applied Science*) oraz 1 pracy w materiałach międzynarodowych konferencji z nadanym numerem DOI i 13 doniesień konferencyjnych. *W sumie Doktorantka legitymuje się obecnością w bazie Web of Science Core Collection 13 prac cytowanych 204 razy (181 bez autocytowań)*. Ponadto Kandydatka uczestniczyła w międzynarodowej wymianie akademickiej PROM w Niemczech (11.06 – 8.07.2021, Leibniz University Hannover) oraz szkoliła swój warsztat badawczy uczestnicząc w 3 szkoleniach z obszaru inżynierii genetycznej i analiz bioinformatycznych.

1. Zasadność doboru tematyki

Problematyka badawcza rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Wolak dotyczy bardzo aktualnej tematyki związanej z potencjałem energetycznym i nawozowym odpadów organicznych poddawanych stabilizacji w warunkach beztlenowych (AD). Wraz ze wzrostem zainteresowania odnawialnymi źródłami energii fermentacja metanowa stała się jedną z bardzo szybko rozwijających się technologii konwersji energii chemicznej zawartej w biomasie. W biogazowniach na cele energetyczne mogą być wykorzystywane różne substraty, w tym głównie odpadowe, np. takie jak: gnojowica bydłęca, osady ściekowe, flotaty poubojowe, mączki mięsno- kostne, kiszonki roślinne czy odpady z przemysłu spożywczego. Z drugiej strony powstający po procesie biometanizacji poferment, bogaty w związki organiczne, mineralne, azotu i fosforu oraz makro- i mikroelementy, może zostać wykorzystany w

rolnictwie jako nawóz. Przed zastosowaniem rolniczym masy pofermentacyjnej należy zbadać jej parametry chemiczne, biologiczne oraz rolnicze. Oznacza się w niej oprócz substancji organicznych i mineralnych niezbędnych do wzrostu roślin, obecność metali toksycznych oraz bakterii chorobotwórczych i pasożytów. Jednak w pofermencie może być obecna cała gama związków chemicznych wpływających na ograniczenie i hamowanie beztlenowej biodegradacji produktów odpadowych. Tak więc różnego rodzaju mikrozanieczyszczenia mogą z pofermentem dostać się do gleby. Wśród takich związków możemy znaleźć substancje przeciwdrobnoustrojowe. Powszechność stosowania antybiotyków i chemioterapeutyków w leczeniu ludzi i zwierząt powoduje wzrost ich zawartości w środowisku co wiąże się także z ich kumulacją w substratach poddawanych stabilizacji beztlenowej. Substancje te wymienia się również wśród związków chemicznych mających inhibujący wpływ na przebieg samego procesu fermentacji metanowej. Biometanizacja to proces wymagający aktywności biochemicznej różnorodnych zespołów mikroorganizmów, mających kluczowe znaczenie dla produkcji biogazu, przeprowadzających kolejno poszczególne etapy jego powstawania, czyli procesy hydrolizy, acidogenezy, acetogenezy i metanogenezy. Wraz z substancjami przeciwdrobnoustrojowymi przemieszczają się także antybiotykooporne bakterie (ARB) oraz geny lekooporności (ARGs). Tak więc odpady organiczne podawane beztlenowej stabilizacji oraz masy pofermentacyjne mogą być ważnym rezerwuarem substancji chemioterapeutycznych oraz drobnoustrojów, w tym chorobotwórczych, niosących ogromną pulę genów oporności na antybiotyki, które mogą być potencjalnie, w dalszej kolejności, przenoszone na inne drobnoustroje środowiskowe na drodze horyzontalnego transferu genów.

Wszystko to **potwierdza aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Panią mgr Izabelę Wolak**. Praca prezentuje bowiem wyniki badań, których celem było określenie wpływu wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na proces fermentacji beztlenowej prowadzonej w warunkach mezofilnych w układzie technologicznym na skalę laboratoryjną oraz bezpośrednio w biogazowniach rolniczych. Potencjały energetyczne związane z produkcją biogazu i nawozowe pofermentów są wciąż mocno niedocenione i niewykorzystane w stosunku do obecnych możliwości technologicznych oraz stanu wiedzy i nauki. Stąd też wszystkie próby podjęcia badań naukowych dotyczących oceny wpływu antybiotyków na proces metanogenezy i na zmiany w bioróżnorodności drobnoustrojów go przeprowadzających z uwzględnieniem ryzyka szerzenia zjawiska lekooporności uważam za bardzo cenne. Doktorantka zaplanowała bardzo unikatowe i kompleksowe badania naukowe zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i w biogazowniach rolniczych, dzięki temu uzyskane wyniki mają również znaczenie użytkowe.

2. Charakterystyka pracy

Publikacje, stanowiące dysertację, obejmują pięć pozycji stanowiących spójną całość. **Pierwsza praca (1)** jest pozycją przeglądową. Doktorantka dokonała w niej przeglądu piśmiennictwa (168 pozycji) naświetlając zasadność podjęcia dalszych badań. Analizowana literatura dotyczyła informacji na temat przebiegu biochemicznych procesów beztlenowych, stosowanych typów substratów, drobnoustrojów tworzących mikrobiotę procesu metanogenezy oraz przeglądu związków chemicznych będących inhibitorami tego procesu, z uwzględnieniem antybiotyków. W konkluzji pracy zwrócono uwagę, iż istnieje potrzeba poszukiwania technologii, również wykorzystujących rozwój biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, maksymalizujących ilość powstającego biogazu z odpadów biologicznych, których

wykorzystanie w tym celu obecnie zyskuje na znaczeniu. Ponadto przegląd literaturowy pozwolił Doktorantce na stwierdzenie, iż niewiele jest publikacji opisujących zależność między procesem fermentacji metanowej zachodzącym w obecności antybiotyków w powiązaniu z rozprzestrzenianiem się zjawiska antybiotykooporności. Dzięki temu mogła sformułować cel i zakres swojej pracy oraz hipotezy badawcze rozprawy zaprezentowane w autoreferacie.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Wolak było *określenie wpływu wybranych środków przeciwdrobnoustrojowych na wydajność procesu fermentacji metanowej, produkcję biogazu, zmiany w bioróżnorodności mikrobiomu zaangażowanego w procesy metanogenezy oraz na liczbę kopii ARGs w pofermencie.*

Doktorantka sformułowała również cztery **hipotezy badawcze**, zgodnie z którymi **(I)** *Leki przeciwdrobnoustrojowe zadane do wsadu bioreaktorów AD jednostkowo oraz synergistycznie, należące do klasy beta-laktamów, tetracyklin, sulfonamidów, fluorochinolonów oraz pochodnych nitroimidazoli, wpływają hamująco na wydajność procesu AD oraz produkcję biogazu* **(II)** *Skład jakościowy i ilościowy drobnoustrojów obecnych w systemach AD jest modyfikowany poprzez obecność środków przeciwdrobnoustrojowych we wsadzie bioreaktorów AD, zarówno w przypadku farmaceutyków zadawanych do układu technologicznego jednostkowo, jak i synergistycznie* **(III)** *Farmaceutyki, zadawane do wsadu bioreaktorów jednostkowo lub synergistycznie, a także te obecne w substratach poddawanych AD, wpływają istotnie na wzrost liczby kopii ARGs wśród społeczności drobnoustrojów odpowiadających za proces biometanizacji* **(IV)** *Pochodzenie substratu i skład materii organicznej w substracie AD wpływa na obecność środków przeciwdrobnoustrojowych oraz ARGs w masie pofermentacyjnej uzyskiwanej po procesie AD w biogazowniach rolniczych.*

W celu realizacji głównego celu naukowego rozprawy Doktorantka podzieliła eksperyment badawczy na trzy etapy, których wyniki zawarła w kolejnych publikacjach oraz przedyskutowała w autoreferacie. Informacje zawarte w poszczególnych rozdziałach autoreferatu, co należy podkreślić, znajdują swoje rozwinięcie w poszczególnych publikacjach weryfikując poszczególne hipotezy badawcze.

Publikacja druga (2) prezentuje wyniki badań laboratoryjnych, wstępnych w stosunku do całości dysertacji, które pozwoliły Kandydatce na dopracowanie metodyki dalszych badań oraz na wybranie do nich związków przeciwdrobnoustrojowych. Wykorzystane na tym etapie substraty, osad ściekowy i gnojownica bydłęca, różniły się składem zbiorowisk metanogennych drobnoustrojów oraz ich wrażliwością na badane antybiotyki. Wykazano zróżnicowany jednostkowy wpływ badanych stężeń (512, 1024 µg/g) czterech antybiotyków na wydajność procesu i produkcję biogazu oraz na zmiany struktury zespołu drobnoustrojów odpowiedzialnych za proces fermentacji. Obecność środków przeciwdrobnoustrojowych spowodowała znaczne obniżenie efektywności metanogenezy, przy czym największy negatywny wpływ na ten proces miał metronidazol w przypadku osadu ściekowego. W większości próbek pofermentu zaobserwowano spadek liczby kopii badanych genów charakterystycznych dla metanogenów.

W publikacji trzeciej (3) badano jednostkowy wpływ ośmiu wybranych antybiotyków na proces fermentacji obornika bydłęcego. Wykazano znaczący spadek produkcji biogazu w obecności antybiotyków, największy 75% w obecności amoksycyliny. Inne antybiotyki takie

jak: enrofloksacyna, tetracyklina, oksytetracyklina i chlorotetracyklina również zmniejszały ilość wytwarzanego biogazu odpowiednio o 36, 39, 45 i 53%. Obecność antybiotyków zmniejszała również liczebność wybranych do badań genów charakterystycznych dla organizmów przeprowadzających metanogenezę (*mcrA*, *MST*, *MSC*) oraz spowodowała wzrost liczby ARGs, zwłaszcza charakterystycznych dla oporności na tetracykliny. Przefermentowane osady mogą więc być źródłem rozprzestrzeniania ARB i ARGs w środowisku.

Publikacja czwarta (4) prezentuje wyniki badań prowadzonych w skali laboratoryjnej długoterminowego, synergistycznego wpływu mieszaniny wybranych antybiotyków (amoksycylina, enrofloksacyna, metronidazol) na beztlenową fermentację obornika bydłęcego. Poszczególne parametry analizowano w odpowiedzi na działanie zmieniających się stężeń kombinacji antybiotyków w różnych okresach ekspozycji na nie (w sumie siedem serii eksperymentu). Stężenia farmaceutyków, dużo niższe niż te stosowane w poprzednich badaniach, stopniowo zwiększano w kolejnych seriach doświadczalnych. Ekspozycja zawartości bioreaktorów na antybiotyki inhibitowała wzrost i rozwój mikroorganizmów metanogennych, takich jak badane *Methanothrix* i *Methanosarcina* oraz rząd *Methanomassiliicoccales* co przekładało się na spadek produkcji metanu. Ciekawą obserwacją było zjawisko zminimalizowania spadku produkcji CH₄ wywołanego antybiotykami w obecności wysoce lekoopornych mikroorganizmów w bioreaktorach AD. Stwierdzono bowiem, iż stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe znacząco wpłynęły na całkowitą ilość i częstość występowania ARGs w pofermencie. Najliczniej występowały geny kodujące oporność na tetracykliny, antybiotyki makrolidowe, linkozamidowe, streptograminy i aminoglikozydy, a także geny oporności wielolekowej.

W celu stwierdzenia czy antybiotyki i geny oporności na nie obecne w organicznych substratach przetwarzanych w biogazowniach rolniczych mogą przedostać się do pofermentu i potem dalej razem z nim do gleby rolnej w **publikacji piątej (5)** badaniom poddano próbki różnych substratów i pofermentów z trzech biogazowni. Stwierdzono, że proces metanogenezy nie eliminuje antybiotyków obecnych w różnych substratach organicznych. Poferment może być więc rezerwuarem ARGs oraz metali toksycznych, które także były przedmiotem tego badania. Stwierdzono także wysoki poziom genów integrazy klasy 1 i 2 w badanych próbkach pofermentu wskazujący na możliwość nabywania przez bakterie w tym środowisku genów oporności na antybiotyki.

3. Ocena rozprawy

Podjęta przez Panią mgr Izabelę Wolak tematyka rozprawy jest bardzo ważna i aktualna oraz wnosi nowe informacje do dyscypliny *nauki biologiczne*. Nie znajdziemy w literaturze tematu wielu prac łączących w jednym spójnym opracowaniu tak szeroko zakrojonych badań związanych z wpływem substancji przeciwdrobnoustrojowych na proces fermentacji metanowej różnych substratów organicznych wykorzystywanych powszechnie w biogazowniach rolniczych. Badania podjęte przez Doktorantkę wpisują się więc bardzo dobrze w poszukiwanie wiedzy dotyczącej optymalizacji procesu stabilizacji różnych odpadów organicznych w powiązaniu z coraz większym zainteresowaniem energią odnawialną oraz narastającym zjawiskiem rozprzestrzeniania się antybiotyków w środowisku wywołującym wzrost liczebności drobnoustrojów lekoopornych, też chorobotwórczych, i genów oporności na chemioterapeutyki. Optymalizacja procesu metanogenezy w obecności antybiotyków wymaga poznania zmian zachodzących w bioróżnorodności konsorcjów drobnoustrojów

przeprowadzających ten proces oraz zrozumienia molekularnych mechanizmów wpływu chemioterapeutyków na ich aktywność oraz na mechanizm zwiększania się ilości ARB i ARGs w pofermencie. Zdobycie tej wiedzy podstawowej jest niezwykle istotne bowiem poferment może być cennym materiałem nawozowym lecz z drugiej strony może być niestety także źródłem antybiotyków, ARB, ARGs czy metali toksycznych, które wraz z nim mogą rozprzestrzenić się w środowisku. Wciąż niewiele jest danych na ten temat. Rozwiązane przez Doktorantkę problemy badawcze mają więc nie tylko znaczenie poznawcze ale również użytkowe.

Na podkreślenie zasługuje poprzedzenie zasadniczych prac eksperymentalnych publikacją przeglądową. Przegląd najnowszego piśmiennictwa pozwolił Doktorantce na dostrzeżenie ograniczonej/brakującej wiedzy z zakresu wpływu antybiotyków na proces metanogenezy oraz umożliwił właściwie zaplanować eksperymenty w celu weryfikacji zagadnień szczegółowych. Dzięki przeglądowi piśmiennictwa Doktorantka mogła sformułować odpowiednie hipotezy badawcze. Osiągnięcie głównego celu pracy oraz potwierdzenie postawionych hipotez badawczych wymagało od Doktorantki realizacji dużego zakresu pracy, co wiązało się z przeprowadzeniem pracochłonnych prac doświadczalnych.

Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze opanowany przez Panią mgr Izabelę Wolak warsztat badawczy obejmujący techniki badań fizykochemicznych, biochemicznych, molekularnych oraz analizy bioinformatycznej. Doktorantka prowadziła beztlenowe mezofilne hodowle odpadów organicznych w reaktorach laboratoryjnych z zastosowaniem różnych stężeń, najczęściej stosowanych w leczeniu ludzi i zwierząt, antybiotyków mierząc produkcję metanu i analizując jakość powstającego biogazu oraz innych parametrów fizykochemicznych hodowli. Substratami dla metanogenezy były osady ściekowe z OŚ, gnojowica bydłęca oraz obornik bydłowy, a inokulum stanowił beztlenowy osad z OŚ. Podczas swoich eksperymentów identyfikowała beztlenowy mikrobiom oraz określała zmiany zachodzące w mikrobiocie metanogenezy pod wpływem wybranych chemioterapeutyków. Doktorantka określała między innymi: stężenia genu kodującego reduktazę metylokoenzymu M (*mcrA*) katalizującego ostatni etap fermentacji metanowej, określała stężenia genów rRNA charakterystycznych dla metanogenicznych rodzin *Archaea*: *Methanosaetaceae* (*MST*) i *Methanosarcinaceae* (*MSC*). Ponadto mierzyła zmiany stężeń badanych antybiotyków w odpadach organicznych przy pomocy chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią masową oraz wykrywała geny kodujące oporność na badane antybiotyki: beta-laktamy (*blaTEM*, *blaOXA*, *blaSHV*, *cfxA*), tetracykliny (*tetA*, *tetM*, *tetQ*), makrolidy, antybiotyki linkozamidowe i streptograminowe (*MLS*) (*ermF*, *linA*, *mefA*), sulfonamidy (*sul1*), fluorochinolony (*aac(6')-Ib-cr* i *qepA*) oraz genów kodujących integrazy klasy 1 i 2 (*intI1* i *intI2*). W opracowaniu wyników badań Doktorantka wykorzystwała różne obliczenia/ metody/ testy statystyczne wykorzystując dostępne programy komputerowe.

Zakres eksperymentów laboratoryjnych został zaplanowany prawidłowo pod względem metodycznym, odpowiednio do celu i zakresu dysertacji. Doktorantka zweryfikowała i potwierdziła hipotezy dotyczące wpływu chemioterapeutyków na mikrobiom metanogenezy zachodzącej w obecności różnych odpadów organicznych oraz dotyczące występowania genów lekooporności w pofermencie i jego roli jako potencjalnego rezerwuaru drobnoustrojów antybiotykoopornych. Pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Wyniki badań są oryginalne i zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych czasopismach wyróżnionych przez JCR posiadających IF. W związku z powyższym rozprawa doktorska Pani

mgr Izabeli Wolak, ze względu na swój charakter, była co do zasady recenzowana przez niezależnych ekspertów na etapie procesu ubiegania się o publikację wybranych manuskryptów. Lektura przedstawionych do oceny publikacji oraz autoreferatu pozwala stwierdzić, iż Doktorantka posiada wiedzę teoretyczną w obszarze swojej aktywności naukowej pozwalającą Jej właściwie zaplanować i przeprowadzić badania laboratoryjne oraz poprawnie ocenić i zinterpretować otrzymane wyniki eksperymentów naukowych oraz wyciągnąć z nich logiczne wnioski. Wykorzystany przez Doktorantkę warsztat naukowo-badawczy jest bardzo szeroki, co również przyczyniło się do osiągnięcia celu pracy i zweryfikowania hipotez badawczych.

Do najistotniejszych osiągnięć naukowych Doktorantki zaliczyłabym:

- Wkład w poznanie wpływu różnych stężeń i klas antybiotyków oraz sposobu ich suplementacji na proces metanogenezy odpadów organicznych stosowanych najczęściej w biogazowniach rolniczych.
- Wkład w poznanie zmian w strukturze konsorcjów drobnoustrojów metanogennych zachodzących pod wpływem badanych antybiotyków.
- Stwierdzenie, iż badane antybiotyki powodowały spadek liczby kopii genów *mcrA* (genu kodującego reduktazę metylokoenzymu katalizującego ostatni etap fermentacji metanowej) oraz genów *MST* i *MSC* (charakterystycznych dla metanogennych rodzin *Archaea: Methanosaetaceae* i *Methanosarcinaceae*). Tak więc w wyniku presji selektywnej środki przeciwdrobnoustrojowe doprowadziły do znacznego obniżenia efektywności procesu fermentacji metanowej i wywołały zmiany w strukturze bioróżnorodności mikrobioty metanogennej.
- Stwierdzenie, iż badane farmaceutyki wpływają istotnie na wzrost liczby kopii ARGs wśród społeczności drobnoustrojów odpowiadających za proces fermentacji metanowej. Najliczniej występowały geny kodujące oporność na tetracykliny, antybiotyki makrolidowe, linkozamidowe i streptograminowe oraz aminoglikozydy, a także geny oporności wielolekowej.
- Potwierdzenie, iż poferment może być miejscem horyzontalnego transferu genów pomiędzy bakteriami oraz źródłem bakterii leko- i wielolekoopornych w środowisku w przypadku jego rolniczego wykorzystania.
- Stwierdzenie, iż proces fermentacji metanowej nie eliminuje badanych chemioterapeutyków i metali toksycznych z odpadów organicznych.

Przedstawione do oceny artykuły podlegały już krytycznej ocenie recenzentów przed ich opublikowaniem, pozwolę sobie więc zamieścić kilka pytań będących przyczynkiem do dyskusji w trakcie publicznej dyskusji nad rozprawą doktorską:

1. Czy surowe odpady organiczne wykorzystywane do fermentacji metanowej były również badane pod kątem występowania w nich antybiotyków? Jeżeli tak, to jaki był stosunek stężeń występujących w nich antybiotyków w stosunku do tych dodawanych do komory przez Doktorantkę?

2. Czym kierowała się Autorka w wyborze stężeń antybiotyków do badań i jak je można odnieść do tzw. „stężeń środowiskowych”? W niektórych badaniach stosowano bardzo duże stężenia na poziomie 512 lub 1024 $\mu\text{g/g}$.
3. Które grupy antybiotyków są obecnie najczęściej w odpadach organicznych? Czy ma znaczenie pochodzenie odpadu? Czy znane są mechanizmy molekularne ich działania na metanogeny?
4. Czy ekspozycja mikroorganizmów na metale toksyczne może wspierać antybiotykooporność u bakterii? Proszę o komentarz w tej sprawie.
5. Proszę o komentarz do stwierdzenia, iż wywołany antybiotykami spadek produkcji metanu został zminimalizowany w obecności wysoce lekoopornych mikroorganizmów w bioreaktorach beztlenowych.
6. Czy istnieje możliwość, na podstawie uzyskanych wyników badań, zaproponowania parametru lub grupy parametrów mogących stanowić marker do monitorowania aktywności metanogenów?

4. Wniosek końcowy

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Wolak pt.: *„Wpływ wybranych leków przeciwdrobnoustrojowych na produkcję biogazu, rozpowszechnienie genów lekooporności oraz mikrobiom zaangażowany w procesy fermentacji metanowej gnojowicy bydłowej”* przedstawiona w postaci jednotematycznego cyklu pięciu publikacji stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie *nauki biologiczne* i wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. Opiniowana praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. z póź.zm. - *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2023r. poz. 742). Wobec tego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny *nauki biologiczne* Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie opiniowanej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Izabeli Wolak do publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie ze względu na wysoki poziom merytoryczny i użyteczny rozprawy wnoszę o wyróżnienie pracy.

