

Wrocław, dn. 30.10.2023r.

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

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej

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

opracowana na podstawie pisma

Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny  
*inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka*

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Pana prof. dr hab. inż. Marcina Dębowskiego z dnia 13.09.2023r.

(Promotor pracy: prof. dr hab. inż. Monika Harnisz,  
Promotor pomocniczy dr Paulina Rusanowska)

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej składa się z autoreferatu w języku polskim i angielskim oraz załączników zawierających kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów. Wyniki będące przedmiotem dysertacji zawarto w cyklu czterech jednotematycznych współautorskich publikacji opublikowanych w latach 2020-2022 w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports (JCR) posiadających IF (*Energy Science and Engineering, Journal of Hazardous Materials, Energies, Applied Sciences*).

1. Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E., Koniuszewska I. Inhibitors of the methane fermentation process with particular emphasis on the microbiological aspect: A review. *Energy Science & Engineering* 2020;8:1880–1897, <https://doi.org/10.1002/ese3.609>. **IF= 4.035, MEiN = 100 pkt.**
2. Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E., Rusanowska P., Bajkacz S., Felis E., Jastrzębski J.P., Paukszto Ł., Koniuszewska I. 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*, Volume 416, 2021, 125773, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125773>. **IF= 14.224, MEiN = 200 pkt.**
3. Czatzkowska M., Harnisz M., Korzeniewska E., Wolak I., Rusanowska P., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Bajkacz S. 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>. **IF= 3.252, MEiN = 140 pkt.**
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>. **IF= 2.838, MEiN = 100 pkt.**

Łączna wartość Impact Factor artykułów opublikowanych w ramach osiągnięcia naukowego Doktorantki to **24.349** a sumaryczna liczba punktów MEiN, zgodnie z rokiem opublikowania, dla tych prac naukowych wynosi **540**. Prace te zaistniały już w międzynarodowym obiegu informacji o czym świadczy liczba ich cytowań wg. bazy Web of Science Core Collection wynosząca **79**. Tak liczne cytowania prac opublikowanych w ostatnich czterech latach świadczą o dużym zainteresowaniu badaniami Kandydatki, co również wskazuje na trafność doboru tematyki dysertacji.

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. NCN, 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);

2. MNiSzW w ramach programu Regionalna Inicjatywa Doskonałości na lata 2019-2022, projekt nr 010/RID/2018/19, pt.: *Innowacyjna żywność wysokiej jakości dla zdrowia społeczeństwa i zrównoważonego rozwoju- zintegrowany program rozwoju badań naukowych i innowacji w zakresie nauk rolniczych i nauk weterynaryjnych na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie* (kierownik: prof. dr hab. Małgorzata Darewicz).

Wszystkie prace są wieloautorskie, co jest typowe dla tak obszernych prac badawczych, mają czterech (praca 1 i 4), ośmiu (praca 3) oraz dziewięciu (praca 2) współautorów. We wszystkich publikacjach Pani mgr inż. Małgorzata Czatzkowska 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 analizie i interpretacji danych literaturowych, planowaniu eksperymentów laboratoryjnych, aktywnym przeprowadzaniu eksperymentów i prac bioinformatycznych, interpretacji i opracowaniu wyników badań oraz ich graficznym przedstawieniu, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu do publikacji oraz w jego korektach po recenzji

Sylwetkę Doktorantki uzupełnia Jej dodatkowy dorobek naukowy w postaci 12 współautorskich publikacji również opublikowanych w czasopismach wyróżnionych przez JCR (*Int. J. Environ. Res. Public Health*- cztery prace, *Ecohydrology & Hydrobiology*- trzy prace, *Energies*- dwie prace, *International Journal of Energy Research* (jedna praca), *Science of The Total Environment* (dwie prace) oraz 2 prac w materiałach międzynarodowych konferencji z nadanym numerem DOI. **W sumie Doktorantka legitymuje się obecnością w bazie Web of Science Core Collection 18 prac cytowanych 210 razy.**

## **1. Zasadność doboru tematyki**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej prezentuje wyniki badań, których celem było określenie wpływu wybranych antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadu ściekowego pochodzącego z miejskiej oczyszczalni ścieków *Łyna* w Olsztynie. Badania podjęte przez Doktorantkę wpisują się bardzo dobrze w nurt badań dotyczących sposobu stabilizacji osadów ściekowych w powiązaniu z coraz większym zainteresowaniem energią odnawialną oraz narastającym zjawiskiem rozprzestrzeniania się substancji przeciwdrobnoustrojowych w środowisku wywołującym wzrost liczebności drobnoustrojów lekoopornych i genów oporności na chemioterapeutyki.

Fermentacja metanowa należy do najbardziej rozpowszechnionych metod stabilizacji osadów ściekowych w oczyszczalniach komunalnych zarówno w Polsce, jak i krajach Unii Europejskiej. Jej stosowanie jest ekonomicznie i technologicznie uzasadnione, ponieważ stanowi atrakcyjną metodę przetwarzania odpadów przy jednoczesnym wykorzystaniu ich na cele energetyczne. Przetwarzanie osadów na drodze fermentacji metanowej nabrało szczególnego znaczenia w związku z wzrostem popularności metody biologicznego oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Tak więc eksploatacja biologicznej oczyszczalni ścieków jest ściśle związana z koniecznością prowadzenia odpowiedniej gospodarki osadowej. Powstające w procesie oczyszczania osady ściekowe muszą być poddawane procesom przeróbki, a następnie właściwie unieszkodliwiane lub zagospodarowywane. Głównym zadaniem przeróbki osadów ściekowych w oczyszczalni ścieków to: minimalizacja objętości powstających osadów ściekowych, maksymalny odzysk zawartych w osadach ściekowych substancji energetycznych, związków biogenych, związków węgla oraz przygotowanie osadów do ostatecznego ich wykorzystania, które odbywa się poza granicami oczyszczalni. Potencjały energetyczne, związane z produkcją biogazu, i nawozowe osadów są wciąż mocno niedocenione i niewykorzystane w stosunku do obecnych możliwości technologicznych oraz stanu wiedzy i nauki.

Technologię fermentacji metanowej, polegającą na biochemicznym rozkładzie związków organicznych w warunkach beztlenowych, w ogólnym zarysie, opracowano już w latach trzydziestych poprzedniego stulecia. W ujęciu przemian biochemicznych jest to szeregowy proces wielofazowy, w którym produkty jednej fazy są substratami kolejnej. Każda faza tego procesu wymaga aktywności biochemicznej różnorodnych zespołów mikroorganizmów przeprowadzających kolejno procesy hydrolizy, acidogenezy, acetogenezy i metanogenezy. Jednym z głównych czynników wpływających na ograniczenie i hamowanie beztlenowej biodegradacji produktów odpadowych jest obecność w osadach ściekowych różnorodnych substancji toksycznych. Wśród związków chemicznych mających inhibujący wpływ na fermentację metanową wymienia się 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. Tak więc zarówno oczyszczalnie ścieków jak i osady ściekowe mogą być ważnym rezerwuarem substancji chemioterapeutycznych oraz drobnoustrojów, zwłaszcza bakterii jelitowych, 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 inż. Małgorzatę Czatkovską**. Badania wpisują się bowiem w rosnące zainteresowanie biometanacją osadu nadmiernego powstającego podczas biologicznego oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Jednakże niekorzystne oddziaływanie antybiotyków na mikroorganizmy prowadzące ten proces może utrudniać przetwarzanie odpadów tą drogą oraz możliwość odzysku z nich energii.

## **2. Charakterystyka pracy**

Publikacje, stanowiące dysertację, obejmują cztery pozycje, z których **pierwsza (1)** jest pozycją przeglądową. Doktorantka dokonała w niej przeglądu piśmiennictwa naświetlając zasadność podjęcia dalszych badań. Na podstawie 168 artykułów dokonała podsumowania

aktualnych badań nad hamowaniem procesów beztlenowych przez niektóre specyficzne substancje toksyczne oraz przedstawiła wpływ tych inhibitorów na mikroorganizmy biorące udział w biometanacji. W konkluzji pracy możemy przeczytać, iż wiedza na temat zjawiska inhibicji aktywności metabolicznej mikrobioty zaangażowanej na poszczególnych etapach fermentacji metanowej jest niewielka. Najlepiej poznanym inhibitorem procesu jest amoniak. W przypadku pozostałych wymienionych w przeglądzie substancji, w tym antybiotyków, dane literaturowe są niewielkie lub wymagają weryfikacji. Dlatego istnieje potrzeba dalszych badań w tym temacie w celu rozpoznania mechanizmów hamowania fermentacji metanowej, ze szczególnym uwzględnieniem aspektu mikrobiologicznego opartego na nowoczesnych narzędziach badawczych (np. sekwencjonowanie NGS), co może przyczynić się do poprawy efektywności procesu.

Przegląd literaturowy przyczynił się do sformułowania celu pracy oraz hipotez badawczych rozprawy zaprezentowanych w autoreferacie.

**Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej** Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej *było określenie wpływu obecności antybiotyków w osadzie ściekowym poddanym fermentacji metanowej, zarówno na (1) wydajność produkcji metanu, jak również (2) los ARGs oraz rozpowszechnianie zjawiska AR (3) zmiany jakościowe i ilościowe w konsorcjach mikroorganizmów odpowiadających za właściwy przebieg procesu oraz (4) występowanie organizmów metanogennych.* Sformułowano również **hipotezy badawcze**, zgodnie z którymi *(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 celu realizacji głównego celu naukowego rozprawy Doktorantka podzieliła eksperyment badawczy na trzy etapy badań, których wyniki zawarto w kolejnych publikacjach, a w autoreferacie, oprócz ich opisu, Kandydatka zamieściła bardzo czytelny ich schemat graficzny.

W publikacji **drugiej (2)**, odnoszącej się do wszystkich hipotez badawczych, przedstawiono wyniki badań pierwszego etapu eksperymentu, dotyczące wyboru antybiotyków do dalszych badań. Badano wpływ wysokich dawek (512– 1024 µg/g) 8 najczęściej stosowanych w leczeniu ludzi antybiotyków należących do różnych grup substancji przeciwdrobnoustrojowych na efektywność beztlenowej fermentacji osadów ściekowych pobranych z miejskiej oczyszczalni ścieków Łyna w Olsztynie. W trakcie tych badań określano również: zmiany jakościowe i ilościowe w konsorcjach drobnoustrojów odpowiedzialnych za proces fermentacji; obecność mikroorganizmów metanogennych; losy genów oporności na antybiotyki (ARGs) oraz skuteczność degradacji antybiotyków podczas beztlenowej stabilizacji osadu ściekowego. Badania prowadzono w laboratoryjnych bioreaktorach beztlenowych przez 40 dni w warunkach mezofilnych w dwóch powtórzeniach. W podsumowaniu pracy stwierdzono, iż największy negatywny wpływ na proces fermentacji miały metronidazol (MET), amoksycylina (AMO) i cyprofloksacyna (CIP). Zahamowanie metanogenezy spowodowało akumulację lotnych kwasów tłuszczowych (LKT). Obecność środków przeciwdrobnoustrojowych w bioreaktorach wpłynęła także na skład filogenetyczny bakterii i profil ARGs. Największe zmiany w strukturze

beztlenowej mikrobioty zaobserwowano w osadach ściekowych narażonych na działanie metronidazolu (MET), gdzie zmniejszenie odsetka bakterii typu *Bacteroidetes* spowodowało wzrost udziału bakterii rodzaju *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Analiza ilościowa genów charakterystycznych dla rodzin metanogenów (w tym genu funkcjonalnego *mcrA*) nie odzwierciedlała rzeczywistej efektywności procesu metanogenezy zachodzącego w obecności substancji przeciwdrobnoustrojowych, mimo, że ich stężenie było niższe w porównaniu do kontroli. W trakcie eksperymentu odnotowano znaczny wzrost liczby kopii genów kodujących oporność wobec antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, tetracyklinowych i fluorochinolonowych. Nie zaobserwowano jednak rozwoju bakteryjnej oporności specyficznej dla badanych ARGs. Wykazano jednak, iż geny kodujące integrasę odgrywają ważną rolę w przenoszeniu ARGs w trakcie procesu biometanacji. Skuteczność usuwania badanych antybiotyków nie korelowała z wpływem badanych leków na bioróżnorodność drobnoustrojów oraz na stężenie ARGs i wydajność procesu. Najbardziej podatne na degradację (100% efektywność procesu) były metronidazol (MET), amoksycylina (AMO), cefuroksym (CEF) i sulfametoksazol (SMO), natomiast najmniej podatne na degradację okazały się cyprofloksacyna (CIP) i kwas nalidyksowy (NA).

W publikacji **trzeciej (3)**, weryfikującej pierwsze trzy hipotezy badawcze, - drugi etap eksperymentu- Doktorantka skupiła się na badaniu jednoczesnego, długotrwałego (268 dni) wpływu wzrastającego stężenia mieszaniny trzech wybranych wcześniej (I etap) antybiotyków mających najbardziej znaczący negatywny wpływ na proces, należących do  $\beta$ -laktamów, fluorochinolonów i nitroimidazoli (MET, AMO, CIP) na efektywność beztlenowej fermentacji osadów ściekowych, na jakościowe i ilościowe zmiany w strukturze drobnoustrojów biorących udział w procesie oraz na losy genów oporności na wybrane antybiotyki (ARGs). W badaniach zastosowano sześć serii eksperymentalnych różniących się stężeniami badanych antybiotyków. Każda seria trwała 45 dni, a stężenia poszczególnych antybiotyków zmieniały się w mieszaninie w zakresie od 0,25 do 36  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i były podobne do stężeń tych leków w ściekach dopływających do olsztyńskiej oczyszczalni. Badania pokazały, iż długotrwałe dodawanie do osadów ściekowych kombinacji MET, AMO i CIP w różnych stężeniach nie spowodowało istotnych zmian parametrów procesu, w tym stężeń lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) oraz całkowitej liczebności ARGs. Analiza produkcji metanu pokazała, iż narażenie mikrobioty na przedłużoną ekspozycję na wybrane antybiotyki może sprzyjać adaptacji mikroorganizmów do zastosowanych stężeń. Narażenie na antybiotyki znacznie jednak zmniejszyło produkcję metanu i zmodyfikowało skład mikrobiologiczny. Analiza wyników pokazała, że liczebność operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU) charakterystycznych dla *Archaea* nie była skorelowana z wydajnością produkcji biogazu. Badania wykazały też, że zależny od wodoru szlak metanogenezy metylotroficznej może znacząco przyczynić się do stabilności fermentacji beztlenowej w obecności środków przeciwdrobnoustrojowych. Największe zmiany w różnorodności biologicznej drobnoustrojów odnotowano w trakcie narażenia ich na działanie najwyższych badanych stężeń antybiotyków w porównaniu z badaniem kontrolnym. W próbkach pobieranych z bioreaktorów badawczych i kontrolnych stwierdzono obecność genów wielolekooporności oraz genów nadających oporność na antybiotyki MLS.

Publikacja **czwarta (4)**- etap trzeci eksperymentu weryfikujący czwartą hipotezę badawczą- miała na celu poszerzenie wiedzy dotyczącej długoterminowego wpływu wzrastających stężeń badanej w etapie drugim mieszaniny antybiotyków na występowanie

mikroorganizmów metanogennych oraz ich genów funkcjonalnych. W tym celu materiał genetyczny wyizolowany w drugim etapie badań Doktorantka poddała analizie na obecność genów charakterystycznych dla metanogenów z rodzin *Methanosaetaceae* (MST) i *Methanosarcinaceae* (MSC) należących do rzędu *Methanosarcinales* biorących bezpośredni udział w syntezie metanu. Aktywność mikroorganizmów metanogennych oceniano poprzez określenie stężenia genu kodującego reduktazę metylokoenzymu M (*mcrA*) katalizującego ostatni etap fermentacji metanowej- metanogenezę. Analizy wykazały, iż liczba kopii genu *mcrA*, funkcjonalnego markera metanogenezy, nie była wiarygodnym wskaźnikiem wydajności produkcji metanu. Pod koniec długotrwałego procesu fermentacji metanowej metanogeny z rodziny *Methanosarcinaceae* (MST) były bardziej powszechne niż metanogeny z rodziny *Methanosaetaceae* (MSC). W ostatecznym efekcie obie rodziny metanogenów dobrze zaadaptowały się do warunków panujących w bioreaktorze z dominacją MST.

### 3. Ocena rozprawy

Tak jak wspomniano na początku, podjęta przez Panią mgr inż. Małgorzatę Czatzkowską tematyka rozprawy jest bardzo ważna i aktualna oraz wnosi nowe informacje do dyscypliny naukowej *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka*. Przedstawiona przez Doktorantkę rozprawa doktorska zawiera wyniki badań opublikowanych w formie czterech spójnych tematycznie publikacji w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku wpływu. Autoreferat w języku polskim i angielskim poprzedzający kopie publikacji składa się z wstępu, celu pracy, hipotez badawczych, zakresu badań ich metodyki wraz z ich omówieniem, podsumowania oraz spisu cytowanej literatury liczącego 18 pozycji. Strona formalna autoreferatu nie budzi zastrzeżeń. Szkoda, że nie został opracowany w formie mini dysertacji doktorskiej, zwłaszcza w zakresie dyskusji otrzymanych wyników z innymi autorami.

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 zagadnień wymagających weryfikacji na drodze właściwie zaplanowanych eksperymentów. Dzięki tym spostrzeżeniom Doktorantka mogła sformułować odpowiednie hipotezy badawcze. Z jednej strony Pani mgr inż. Małgorzata Czatzkowską zwróciła uwagę na to, iż zjawisko ciągłego wzrostu zużycia antybiotyków i ich uwalnianie do ścieków i osadów ściekowych powinno skutkować intensyfikacją badań nad wpływem tego typu inhibitorów na fermentację metanową oraz, że badania takie powinny uwzględniać najczęściej spożywane przez człowieka substancje przeciwdrobnoustrojowe. Z drugiej strony, zgodnie z najlepszą swoją wiedzą, stwierdziła, iż jednoczesny wpływ kilku szeroko stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych na fermentację metanową osadów ściekowych – uwzględniony w Jej pracy- nie był dotychczas badany.

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 inż. Małgorzatę Czatzkowską warsztat badawczy obejmujący techniki badań fizykochemicznych, biochemicznych, molekularnych oraz analizy bioinformatycznej.

W swoich badaniach Doktorantka prowadziła beztlenowe laboratoryjne hodowle osadów ściekowych mierząc produkcję metanu oraz analizując jakość powstającego biogazu z wykorzystaniem chromatografu gazowego, wyposażonego w detektor przewodności cieplnej.

Próbki pobierane z bioreaktorów analizowano pod kątem zawartości lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), pH, stosunku FOS/TAC (TAC- szacunkowa pojemność buforowa próbek; FOS- zawartość LKT) oraz zawartości substancji stałych (TS), substancji lotnych (VS), azotu całkowitego (TN) i fosforu ogólnego (TP). Ponadto mierzono zmiany stężeń badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych przy pomocy chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią masową. Doktorantka izolowała również z przefermentowanych próbek osadu DNA za pomocą zestawu FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals). Różnorodność mikrobiomu analizowano poprzez wysokowydajne sekwencjonowanie regionu hiperzmiennego V3-V4 genu 16 S rRNA za pomocą instrumentu Illumina MiSeq (Illumina Inc. USA) i zestawu MiSeq Re-agent v3 Kit (Macrogen, Korea). Łącuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR- qPCR) Kandydatka wykorzystywała do analizy występowania w próbkach osadów (1) wybranych genów antybiotykooporności- antybiotyki β-laktamowe (blaTEM, blaSHV, blaOXA, cfxA), antybiotyki makrolidowo-linkozamidowo-streptograminowe (MLS) (ermF, linA, mefA), chinolony (qepA, aac(6')-Ib-cr), tetracykliny (tetA, tetM, tetQ), sulfonamidy (sul1) i gen kodujący pompę usuwającą oporność wielolekową (bexA) (2) genów kodujących integrazy klasy 1 i 2 (intl1, intl2) (3) genów charakterystycznych dla rodzin metanogenów *Methanosarcinaceae* (MSC) i *Methanosaetaceae* (MST) domeny *Archaea* oraz (4) funkcjonalnego genu metanogenów mcrA, kodującego reduktazę metylokoenzymu M katalizującą metanogenezę. Aby zrozumieć związek między parametrami fermentacji metanowej, gatunkami dominującymi, genami funkcjonalnymi, genami oporności na wybrane antybiotyki oraz genami integrazy Doktorantka wykorzystwała różne obliczenia/metody/ testy statystyczne wykorzystując dostępne programy komputerowe.

Zakres eksperymentów laboratoryjnych został zaplanowany prawidłowo, odpowiednio do celu i zakresu dysertacji. Pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych czasopismach wyróżnionych przez JCR posiadających IF. W związku z powyższym rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej, 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 pozwala stwierdzić, iż Doktorantka właściwie interpretuje wyniki eksperymentów naukowych oraz sprawnie porusza się w literaturze tematu, właściwie rozwiązując problemy badawcze, wyciągając z nich logiczne wnioski, które potwierdzają zrealizowanie celu tej pracy badawczej. Ponadto dostrzega również na podstawie uzyskanych wyników możliwe dalsze kierunki badań które zamieściła na końcu swojego autoreferatu.

**Do najistotniejszych osiągnięć naukowych Doktorantki, poza potwierdzeniem tej pracy, zaliczyłabym:**

- Wkład w poznanie wpływu długotrwałego kontaktu osadu ściekowego z kombinacją szeroko stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych (metronidazol, amoksycylina i ciprofloksacyna) dozowanych do laboratoryjnego beztlenowego bioreaktora w różnych stężeniach, zbliżonych do tych dopływających do oczyszczalni ścieków, na proces fermentacji metanowej. Badane środki przeciwdrobnoustrojowe znacząco zmniejszały produkcję metanu oraz modyfikowały strukturę populacji drobnoustrojów.

- Potwierdzenie, iż liczba kopii genu *mcrA*, kodującego reduktazę metylokoenzymu M katalizującego ostatni etap fermentacji metanowej- metanogenezę, nie jest wiarygodnym wskaźnikiem wydajności produkcji metanu. Gen ten jest proponowany w literaturze jako marker monitorowania aktywności metanogenów.
- Potwierdzenie, iż do czynników mogących przeciwdziałać hamującemu wpływowi związków organicznych na proces fermentacji metanowej należy adaptacja mikroorganizmów biorących udział w tym procesie.
- Wkład w poznanie zmian w strukturze konsorcjów drobnoustrojów metanogennych zachodzących pod wpływem badanych antybiotyków.
- Stwierdzenie w badaniach wybranych genów antybiotykooporności i genów kodujących integrazy, iż osad ściekowy może być miejscem horyzontalnego transferu genów pomiędzy bakteriami oraz źródłem bakterii leko- i wielolekoopornych.

**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. Osad ściekowy wykorzystywany w badaniach pochodził z oczyszczalni ścieków. W badaniach laboratoryjnych dozowano do niego wybrane antybiotyki w określonych stężeniach. Jednak czy osad ten był badany pod kątem obecności w nim antybiotyków i innych substancji np. metali mogących wpływać na badany proces? Niektóre antybiotyki mogą również wchodzić w reakcje z metalami. W publikacji pojawia się także stwierdzenie, iż stężenia antybiotyków do badań dobrano na podstawie rzeczywistych ich stężeń dopływających do oczyszczalni, co już sugeruje ich kumulację w osadzie. Proszę o komentarz w tej sprawie.
2. W autoreferacie pojawia się informacja na temat pośredniego wpływu chemioterapeutyków na potencjał energetyczny biogazu. Czy na podstawie uzyskanych wyników dotyczących produkcji metanu oraz analizy jakości powstającego biogazu można coś powiedzieć o wpływie leków na jego potencjał energetyczny?
3. Czy zauważono wpływ analizowanych parametrów wykorzystywanych w badaniach osadów takich jak: zawartość lotnych kwasów tłuszczowych, zawartość substancji stałych, substancji lotnych, azotu całkowitego i fosforu ogólnego na przebieg procesu metanogenezy i zmiany w konsorcjach mikroorganizmów?
4. Jak zmieniało się stężenie biomasy osadu w trakcie metanogenezy? Czy ewentualne zmiany były brane pod uwagę w ilościowych analizach badanych parametrów?
5. Czy obserwowane zjawisko adaptacji mikroorganizmów biorących udział w fermentacji metanowej może w dłuższym czasie wpłynąć na poprawę efektywności metanogenezy?
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 inż. Małgorzaty Czatzkowskiej pt.: „*Wpływ antybiotyków na proces fermentacji metanowej osadów ściekowych, bioróżnorodność mikroorganizmów i zjawisko antybiotykooporności*” przedstawiona w postaci jednotematycznego cyklu czterech publikacji stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie naukowej *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* 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 2022r. poz.574). Wobec tego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie opiniowanej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Czatzkowskiej do publicznej obrony pracy doktorskiej.

