

Wrocław, 02.03.2021r.

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

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Sebastiana Niestępskiego
pt.: „Wpływ oczyszczania ścieków w technologii osadu czynnego na lekooporność
beztlenowych bakterii z grupy *Bacteroides fragilis*”

opracowana na podstawie pisma

Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny
inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka

Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego w Olsztynie

Pana prof. dr hab. inż. Wojciecha Janczukowicza z dnia 21.01.2021r.

(Promotor pracy: dr hab. inż. Monika Harnisz, prof. UWM,
Promotor pomocniczy dr hab. inż. Anna Gotkowska-Płachta)

1. Zasadność doboru tematyki

Przewód pokarmowy ssaków jest złożonym ekosystemem w którym relacje między fizjologiczną mikrobiotą a żywicielem mogą być zarówno symbiotyczne, jak i/lub patogenne. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* to Gram-ujemne beztlenowe pałeczki będące najliczniejszym, spośród wszystkich bakterii, fizjologicznym składnikiem przewodu pokarmowego ssaków. Wraz z innymi bakteriami symbiotycznymi, znajdującymi się w przewodzie pokarmowym, przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania organizmu, determinując m.in. homeostazę wśród bakterii jelitowych. W pewnych okresach i sytuacjach mogą jednak wykazywać działanie chorobotwórcze. Rozprzestrzenienie się tych bakterii do sąsiednich tkanek i do krwiobiegu może spowodować infekcję. Mogą powodować między innymi: ostre zapalenie wyrostka robaczkowego, bakterieję, zapalenie wsierdzia oraz ropnie jamy brzusznej, płuc i mózgu. Niektóre szczepy z tego rodzaju są również zdolne do wytwarzania enterotoksyn. Wytwarzające toksyny szczepy *B. fragilis*, określane jako enterotoksyczne *Bacteroides fragilis* (ETBF), są uznaną przyczyną chorób biegunkowych u ludzi.

Bacteroides fragilis (BFG) jest jednym z najczęściej izolowanych beztlenowców z niespecyficznymi zakażeniami występującymi u ludzi i zwierząt. Ma to szczególne znaczenie, ponieważ od wielu lat, obserwuje się wzrastającą częstotliwość występowania szczepów opornych, w tym szczepów wieloopornych, na środki przeciwdrobnoustrojowe, co może stanowić problemem terapeutycznym. Działanie antybiotyku skierowane jest nie tylko na patogen wywołujący zakażenie, ale również na inne bakterie stanowiące naturalną florę fizjologiczną organizmu. Jej niszczenie sprzyja dominacji gatunków niewrażliwych. Drobnoustroje mogą nabywać oporność na drodze tzw. horyzontalnego transferu genów, który polega na przyjmowaniu genów oporności od innych organizmów. Kluczowym problemem związanym z lekoopornością bakterii jest fakt, że geny związane z brakiem wrażliwości na antybiotyki są

zlokalizowane na elementach mobilnych (plazmidy, transpozony, bakteriofagi i integrony), które mogą się przemieszczać między bakteriami tego samego rodzaju, ale także między bakteriami niespokrewnionymi filogenetycznie. Temu zjawisku sprzyjają także szybko zachodzące zmiany w materiale genetycznym bakterii i ich ogromne możliwości przystosowawcze do niekorzystnych warunków otoczenia, jakim jest w tym przypadku obecność antybiotyków w wysokich stężeniach, albo zbyt niskich subinhibicyjnych dawkach. Jest to szczególnie groźne w odniesieniu do gatunków bakterii u których często występuje zjawisko antybiotykooporności i które odpowiadają za najczęstsze zakażenia u człowieka. Do takich gatunków, w miarę dobrze poznanych, często nazywanych alarmowymi, należą bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* np. względnie beztlenowe pałeczki *E. coli* stanowiące również fizjologiczną mikroflorę przewodu pokarmowego zwierząt i człowieka.

Obecnie zjawisko narastania oporności bakterii na antybiotyki stanowi jeden z najpoważniejszych problemów medycznych, epidemiologicznych a nawet ekonomicznych. Dlatego należy stale poszerzać wiedzę na temat różnych mechanizmów nabywania oporności na antybiotyki przez drobnoustroje oraz na temat rezystomów, czyli środowisk będących zbiorem wszystkich genów oporności na antybiotyki, czyli tych które znajdują się w genomach bakterii chorobotwórczych i niechorobotwórczych, kryptycznych genów oporności oraz prekursorów genów oporności, mogących stać się źródłem wielolekooponych chorobotwórczych bakterii. Przyjmuje się, że większość środowisk i organizmów odgrywa istotną rolę w przepływie bakterii opornych i genów oporności na antybiotyki. Przepływ ten jest dwukierunkowy, związany z wprowadzaniem naturalnych genów oporności występujących u bakterii środowiskowych do bakterii patogennych dla człowieka i zwierząt i vice versa- genów oporności do mikroorganizmów środowiskowych.

Jednym z takich rezystomów jest przewód pokarmowy ssaków. U bakterii jelitowych stwierdza się oporność na wiele grup antybiotyków. Stają się one więc rezerwuarem determinantów oporności na antybiotyki. I tak bakterie z rodzaju *Bacteroides* odporne na leki beta-laktamowe, tetracykliny, makrolidy oraz fluorochinolony, mogą przekazać, poprzez horyzontalny transfer genów w jelitach geny oporności znacznie bardziej zjadliwym bakteriom występującym tylko okresowo w przewodzie pokarmowym, np. bakteriom układu oddechowego. Środowiskiem stanowiącym ważny rezerwuuar drobnoustrojów, w tym bakterii jelitowych, niosących ogromną pulę genów oporności, które mogą być potencjalnie, w dalszej kolejności, przenoszone na inne drobnoustroje są oczyszczalnie ścieków, a w szczególności rezystomy osadu czynnego czy złóż biologicznych. W ściekach dochodzi do wzmoczonej selekcji bakterii opornych na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych, występujących tutaj w niskich stężeniach (dawki subinhibitorowe). Pomimo tego, iż procesy jednostkowe, stosowane w ciągu technologicznym oczyszczalni ścieków, przyczyniają się do znacznej redukcji liczby bakterii, nawet o 99%, to jednak część z nich, w tym tych opornych na antybiotyki oraz same geny oporności, mogą pozostać w ściekach odpływających z oczyszczalni, przedostając się wraz z nimi do wód powierzchniowych, podziemnych oraz gleb i otaczającego ich powietrza. Wody powierzchniowe są z kolei w Polsce głównym źródłem wody ujmowanej na cele komunalne. W ten sposób drobnoustroje antybiotykooporne dostają się do systemów dystrybucji wody przeznaczonej do spożycia i tą drogą z powrotem do organizmu człowieka. Tak więc oczyszczalnie ścieków i ścieki oczyszczone przyczyniają się do zwiększania rezystomu środowiskowego opornego na środki przeciwdrobnoustrojowe.

To wszystko potwierdza aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Pana mgr inż. Sebastiana Niestępskiego i Jego promotora Panią dr hab. inż. Monikę Harnisz oraz promotora pomocniczego Panią dr hab. inż. Annę Gotkowską-Płachtę, bowiem badania te

dostarczają wiedzę na temat rezystomu osadu czynnego w kontekście występowania genów oporności na antybiotyki i genów wirulencji charakterystycznych dla środowiskowych bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* (BFG).

2. Charakterystyka pracy

Pan mgr inż. Sebastian Niestępski jako rozprawę doktorską, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r., poz. 882 z późn. zm), w związku z ustawą z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz.1669), przedstawił jednotematyczny cykl publikacji pt.: „Wpływ oczyszczania ścieków w technologii osadu czynnego na lekooporność beztlenowych bakterii z grupy *Bacteroides fragilis*”.

Na cykl publikacji składa się 6 prac: 4 opublikowane w renomowanych czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports JCR posiadających IF (Postępy Mikrobiologii, 2017; Environment International, 2019; Journal of Hazardous Materials, 2020; International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020) oraz 2 opublikowane w recenzowanych materiałach konferencyjnych w języku angielskim indeksowanych w Web of Science z nadanym numerem DOI (E3S Web Of Conferences)- 2018, 2019r.

Łączna wartość Impact Factor artykułów opublikowanych w ramach osiągnięcia naukowego Doktoranta to 20,184 a sumaryczna liczba punktów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania, dla tych prac naukowych wynosi 455. Prace te zaistniały już w międzynarodowym obiegu informacji o czym świadczy liczba ich cytowań (4 prace) wg. bazy Web of Science Core Collection wynosząca 31.

1. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A., Dziuba B., Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A., Dziuba B. *Bacteroides spp.* – znaczenie kliniczne, lekooporność i metody jej oznaczania, Postępy Mikrobiologii, 56(1): 67-76, **2017**; (wkład Doktoranta 51%, IF=0,354, liczba punktów MNiSW 15, 2 razy cytowana).
2. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A. The occurrence of specific markers of *Bacteroides fragilis* group, *B. dorei* and antibiotic-resistance genes in the wastewater treatment plants, E3S Web of Conferences. 44: 00124. 10th Conference on Interdisciplinary Problems in Environmental Protection and Engineering, EKO-DOK 2018; Polanica-Zdroj; Poland; Code 138214, April, **2018**; (wkład Doktoranta 51%, IF=0, liczba punktów MNiSW 15).
3. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A. Isolation of anaerobic bacteria of the *Bacteroides fragilis* group from environmental samples, E3S Web of Conferences 100 00061, **2019**; (wkład Doktoranta 51%, IF=0, liczba punktów MNiSW 15, raz cytowana).
4. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Aguilera-Arreola M.G., Contreras-Rodríguez A., Filipkowska Z., Osińska A., The emergence of antimicrobial resistance in environmental strains of the *Bacteroides fragilis* group, Environment International 124, 408-419, **2019**; (wkład Doktoranta 55%, IF=7,943, liczba punktów MNiSW 140, 19 razy cytowana).
5. Niestępski S., Harnisz M., Ciesielski S., Korzeniewska E., Osińska A., Environmental fate of *Bacteroidetes*, with particular emphasis on *Bacteroides fragilis* group bacteria and their specific antibiotic resistance genes, in activated sludge wastewater treatment plants, Journal of Hazardous Materials, 394, 122544, **2020**; (wkład Doktoranta 55%, IF=9,038, liczba punktów MNiSW 200, 9 razy cytowana).
6. Niestępski, S.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E.; Osińska, A. Markers Specific to *Bacteroides fragilis* Group Bacteria as Indicators of Anthropogenic Pollution of Surface Waters. Int. J. Environ. Res. Public Health, 17, 7137, **2020**; (wkład Doktoranta 60%, IF=2,849, liczba punktów MNiSW 70).

Przedstawiony jednotematyczny cykl publikacji jest zbiorem publikacji opublikowanych na przestrzeni 2 lat (2018-2020). Badania zaprezentowane w publikacjach nr 2-6 były finansowane z projektu NCN (konkurs Preludium 12) nr 2016/23/N/NZ9/02167 pt.: „Środowiskowe, beztlenowe bakterie z grupy *Bacteroides fragilis*- badania pionierskie ” pozyskanego i kierowanego przez Doktoranta.

Wszystkie publikacje są współautorskie, co jest typowe dla tak obszernych prac badawczych. Do pracy zostały dołączone oświadczenia współautorów publikacji. Procentowy udział Doktoranta w powstaniu artykułów zawierał się między 51-60%. We wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem oraz uczestniczył w prowadzeniu badań laboratoryjnych i w najważniejszych etapach składających się na przygotowanie publikacji do druku, czyli: zaplanowanie koncepcji pracy (2,3,4,5,6), pisanie pracy (1,2,3,4,5,6), zaplanowanie badań (2,3,4,5,6), graficzne przedstawienie wyników (1,2,3,4,5,6), prowadzenie badań laboratoryjnych (2,3,4,5,6), interpretacja wyników i wnioskowanie (1,2,3,4,5,6), korekta pracy przed złożeniem do druku (4,5,6). Zwiększający się wkład Doktoranta w badania i w poszczególne etapy prac nad publikacjami świadczy o Jego prawidłowym rozwoju naukowym.

Na podkreślenie zasługuje jeszcze opublikowanie przez Pana mgr inż. Sebastiana Niestępskiego wyników swoich badań w dwóch czasopismach o bardzo wysokim Impact Factor (IF=9,038 i 7,943) jakimi były *Journal of Hazardous Materials* (5) i *Environment International* (4).

Sylwetkę Doktoranta uzupełnia dorobek naukowy w postaci 8 publikacji (4 w ramach przedstawionej rozprawy) znajdujących się w bazie JCR, 1 publikacji nieposiadającej IF, 6 publikacji (2 w ramach przedstawionej rozprawy) w recenzowanych materiałach konferencyjnych w języku angielskim indeksowanych w Web of Science z nadanym numerem DOI, 12 rozdziałów w monografiach konferencyjnych w języku polskim i 1 w języku angielskim, 24 doniesień konferencyjnych, udział w charakterze kierownika w 3 projektach badawczych oraz udział w stażu naukowym na Narodowym Technicznym Uniwersytecie w Kijowie i w trzech szkoleniach z zakresu mikrobiologii i inżynierii genetycznej. **Doktorant legitymuje się obecnością w bazie Web of Science Core Collection 14 publikacji cytowanych 122 razy oraz H-indeksm równym 6.**

Jednotematyczny cykl publikacji, stanowiący rozprawę doktorską, został opatrzony opracowaniem obejmującym streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzeniem do tematyki badań, celem i hipotezami badawczymi, zakresem i metodyką badań, omówieniem wyników badań, podsumowaniem i wnioskami oraz spisem pozycji literaturowych.

W wprowadzeniu do tematyki badań Doktorat przedstawił informacje literaturowe dotyczące bakterii bytujących w przewodzie pokarmowym człowieka ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* u których coraz częściej wykrywa się geny oporności na antybiotyki, co może stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi. Pan mgr inż. Sebastian Niestępski, opisał również w tym rozdziale, powszechność stosowania antybiotyków co przyczynia się do wzrostu ilości bakterii opornych na te związki we wszystkich elementach środowiska naturalnego oraz zwrócił uwagę, że jednym ze źródeł takich szczepów bakteryjnych, w tym tych należących do rodzaju *Bacteroides* i innych bakterii jelitowych, oraz genów odpowiedzialnych za antybiotykooporność są oczyszczalnie ścieków pracujące w technologii osadu czynnego.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Sebastiana Niestępskiego była ocena wpływu oczyszczania ścieków w technologii osadu czynnego na lekooporność bakterii z grupy *Bacteroides fragilis*, Gram-ujemnych beztlenowych pałeczek

będących najliczniej występującymi, spośród wszystkich bakterii, fizjologicznym składnikiem przewodu pokarmowego ssaków oraz na ich rozprzestrzenianie w środowisku.

Doktorant sformułował dwie hipotezy badawcze: 1) profil lekooporności oraz różnorodność genów kodujących mechanizmy lekooporności wśród szczepów z grupy *Bacteroides fragilis* wyizolowanych ze ścieków oczyszczanych metodą osadu czynnego jest bardziej różnorodny w porównaniu ze szczepami pochodzącymi z innych próbek środowiskowych 2) Oczyszczanie ścieków w technologii osadu czynnego nie eliminuje całkowicie genów specyficznych dla beztlenowych bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* oraz charakterystycznych dla nich genów antybiotykooporności.

Do realizacji celów pracy Pan mgr inż. Sebastian Niestępski wykorzystywał szereg metod badawczych obejmujących klasyczne metody mikrobiologiczne oraz techniki inżynierii genetycznej. Metody te wykorzystywał w badaniach próbek pobieranych na terenie 12 oczyszczalni ścieków pracujących w różnym reżimie technologicznym w technologii osadu czynnego zlokalizowanych na terenie województwa warmińsko-mazurskiego, w tym na terenie olsztyńskiej oczyszczalni ścieków „Łyna”, oraz w badaniach próbek ścieków szpitalnych, próbek fekalii ludzkich i kału szczurów laboratoryjnych.

Tradycyjne metody pozwalały na izolację, hodowlę i selekcję badanych bakterii oraz oznaczanie oporności otrzymanych izolatów na wybrane antybiotyki. Metody biologii molekularnej posłużyły Doktorantowi do określania łącznej liczby komórek bakteryjnych w badanych próbkach metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), izolacji genomowego i środowiskowego materiału genetycznego, identyfikacji izolatów na podstawie sekwencjonowania genu 16SrRNA oraz na podstawie metody MALDI-TOF MS, określania obecności genów specyficznych badanych bakterii, genów determinujących mechanizmy oporności na najczęściej stosowane antybiotyki w leczeniu zakażeń wywołanych omawianymi bakteriami, genu kodującego ich cechy wirulencji, genów integrazy integronów klasy 1 i 2 odpowiedzialnych za horyzontalny transfer genów z zastosowaniem metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qPCR). Ponadto Doktorant określał strukturę populacji bakterii obecnych w próbkach środowiskowych z zastosowaniem sekwencjonowania hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16SrRNA metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji Illumina Miseq. W swoich badaniach Pan mgr inż. Sebastian Niestępski wykorzystywał także analizę bioinformatyczną uzyskanych sekwencji oraz stosował analizę statystyczną otrzymanych wyników korzystając z pakietu oprogramowania STATISTICA 13,2.

Pierwszy etap badań Pana mgra inż. Sebastiana Niestępskiego dotyczył zebrania informacji literaturowych na temat bakterii grupy *Bacteroides fragilis*, które następnie zostały zebrane w publikacji przeglądowej nr 1 stanowiącej wraz z badaniami wstępnymi opisanymi w artykule nr 2 podstawę do wybrania metodyki badawczej umożliwiającej weryfikację postawionych w rozprawie hipotez naukowych. W pracy nr 2 izolowano materiał genetyczny z próbek ścieków przy pomocy dwóch zestawów komercyjnych do izolacji genomowego DNA (Fast DNA SPIN Kit for Soil i zestawu Genomic Micro AX Bacteria Gravity Kit) oraz porównywano jakość tak wyizolowanego materiału genetycznego pod kątem wykrywania genów specyficznych dla bakterii z rodzaju *Bacteroides* oraz genów kodujących oporność na charakterystyczne dla tej grupy bakterii antybiotyki.

Drugi etap badań (publikacje nr 3 i 4) dotyczył weryfikacji pierwszej hipotezy badawczej. Na tym etapie Doktorant izolował bakterie grupy *Bacteroides fragilis* na podłożu wybiórczo-różnicującym BBE z próbek ludzkich odchodów, ścieków szpitalnych, ścieków dopływających i odpływających z oczyszczalni ścieków pracujących w technologii osadu czynnego oraz z

odchodów szczurów laboratoryjnych, które stanowiły kontrolę negatywną, w celu monitorowania całej drogi przenoszenia szczepów BFG od ludzi do środowiska.

Wyrosłe na pożywce hodowlanej charakterystyczne kolonie Doktorant sprawdził pod kątem ich naturalnej odporności na trzy antybiotyki: kanamycynę, kolistynę i wankomycynę. Otrzymane kolonie Doktorant identyfikował za pomocą metod PCR i MALDI-TOF MS. Z agaru BBE łącznie wyizolowano 319 szczepów tworzących charakterystyczne kolonie, z czego 250 kolonii było opornych na kanamycynę, kolistynę i wankomycynę. Badania PCR pokazały, że tylko 135 szczepów zawierało gen *bfr* specyficzny dla BFG. W analizie MALDI-TOF MS tylko 123 izolaty zostały zaliczone do BFG. Najczęściej izolowanymi gatunkami z grupy BFG z badanych próbek były *B. fragilis* i *P. distasonis*. 100% wyizolowanych szczepów z odchodów ludzkich i szczurzych na agarze BBE zostało zakwalifikowanych do BFG. Z kolei skuteczność izolacji szczepów BFG ze ścieków szpitalnych oraz nieoczyszczonych i oczyszczonych ścieków z oczyszczalni była dużo niższa (odpowiednio 20%, 19%, 40%). Zjawisko to może wynikać z występowania w ściekach szczepów bakterii o zmodyfikowanych cechach fenotypowych wymagających innych warunków hodowlanych niż szczepy kliniczne.

W dalszej kolejności uzyskane 123 izolaty Doktorant poddał analizie wrażliwości na sześć grup najczęściej stosowanych w praktyce leczniczej w stosunku do bakterii BFG antybiotyków metodami hodowlanymi (beta-laktamy, tetracykliny, grupa MLS- makrolidy, linkozamidy streptograminy, fluorochinolony, nitroimidazole oraz chloramfenikol). Dodatkowo za pomocą metody PCR Doktorant określał obecność w izolatach 25 genów kodujących oporność na te antybiotyki. Badane szczepy różniły się fenotypową opornością na badane antybiotyki. Najpowszechniej obserwowana była oporność (97,56% szczepów) na cyprofloksacynę należącą do fluorochinolonów drugiej generacji (49,59% dla erytromycyny, 44,71% dla ampicyliny, 35,77% dla tetracykliny, 32,52% dla amoksycyliny/kwasu klawulanowego, 26,83% dla chloramfenikolu, 26,01% dla klindamycyny, 11,38% dla moksyflokscyny i 8,94% dla metronidazolu). Najwyższe poziomy lekooporności zaobserwowano w szczepach izolowanych z próbek ścieków, zarówno surowych jak i oczyszczonych, pochodzących z oczyszczalni wykorzystujących metodę osadu czynnego. Z kolei badania metodą PCR wykazały powszechną obecność genów kodujących oporność na chloramfenikol (100%), tetracykliny (97,78%), a następnie na makrolidy, linkozamidy i streptograminy (81,97%). Geny kodujące oporność na β -laktamy i fluorochinolony były mniej rozpowszechnione. Również w tych badaniach szczepy BFG izolowane z próbek ścieków surowych i oczyszczonych charakteryzowały się największą różnorodnością genów oporności na antybiotyki i były najczęściej lekooporne i wielolekooporne.

W trzeciej części badań, zaprezentowanej w publikacjach nr 5 i 6, weryfikowano drugą hipotezę badawczą.

Publikacja nr 5 przedstawia wyniki badań polegające na określaniu udziału bakterii z rodzaju *Bacteroides* w całej strukturze społeczności bakteryjnej obecnej w ściekach pochodzących z 12 oczyszczalni Warmii i Mazur, pracujących w technologii oczyszczania osadem czynnym, różniących się rozwiązaniami technologicznymi i oczyszczającymi zarówno ścieki bytowo- gospodarcze jak i ścieki szpitalne oraz ścieki z przemysłu spożywczego. Skład typów i klas bakterii w próbkach ścieków analizowano metodą wysokoprzepustowej techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Z kolei za pomocą techniki qPCR Doktorant analizował obecność genów specyficznych dla bakterii BFG (gen *bfr*, związany z występowaniem 10 gatunków bakterii BFR oraz gen HF183/BacR287, świadczący o występowaniu odludzkich bakterii z gatunku *B. dorei*), genów antybiotykoodporności (ARG) i genów kodujących integrazę klasy 1. Z kolei w publikacji nr 6 określano przydatność specyficznych markerów, jakim były geny specyficzne dla bakterii BFG oraz geny specyficzne dla bakterii uznanych jako gatunki wskaźnikowe dla zanieczyszczeń fekalnych, czyli dla

bakterii *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis*. W tym celu Doktorant badał obecność tych specyficznych genów w próbkach ścieków surowych i oczyszczonych dopływających/ odpływających z olsztyńskiej oczyszczalni ścieków „Łyna”, w wodzie powierzchniowej rzeki Łyny powyżej i poniżej miejsca zrzutu ścieków oraz w próbkach ścieków szpitalnych. Badano również w tych próbkach obecność 11 genów antybiotykooporności (ARG) i 2 genów kodujących integrazę. Wszystkie badania charakterystycznych genów prowadzono za pomocą techniki qPCR, natomiast badania ogólnej liczby komórek bakteryjnych w badanych próbkach określano metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH).

W badanych próbkach ścieków wykazano dominację 4 gromad: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*. Sekwencjonowanie nowej generacji pokazało podobny udział bakterii *Bacteroidia* (<1,0-8,2% wszystkich bakterii) w ściekach surowych i oczyszczonych, co sugerowało, że mikroorganizmy te nie są całkowicie eliminowane w procesie oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Średnia liczba kopii genów specyficznych dla genomu bakterii BFG wyniosła 106 i 104 kopii odpowiednio w 1 ml ścieków surowych i ścieków oczyszczonych. Stwierdzono także pozytywną korelację między liczebnością bakterii BFG a genami specyficznymi dla BFG kodującymi oporność na antybiotyki. Obserwowane zmiany w występowaniu genów specyficznych dla BFG i ARG w ściekach nieoczyszczonych i oczyszczonych wskazywały na to, że proces osadu czynnego powoduje zmniejszenie liczby kopii genów w ściekach oczyszczonych odprowadzanych do środowiska, ale nie eliminuje ich całkowicie. Wśród bakterii wykrywanych w ściekach szpitalnych dominowały geny specyficzne dla BFG, a liczba ich kopii była zbliżona do liczby genów specyficznych dla *E. coli* i *E. faecalis* wykrywanych w pozostałych próbkach. Liczba genów charakterystycznych dla BFG była silnie skorelowana z liczebnością genów specyficznych dla *E. coli* i *E. faecalis* oraz wszystkich analizowanych genów ARG i genów kodujących integrazę. Odnotowano także znaczący wzrost liczby kopii genów specyficznych dla BFG, *E. coli* i siedmiu z 11 analizowanych ARG w próbkach wody rzecznej pobranych poniżej punktu zrzutu ścieków, co sugeruje, że oczyszczalnie ścieków są źródłem tych genów w środowisku naturalnym.

3. Ocena rozprawy

Podjęty przez Pana mgra inż. Sebastiana Niestępskiego problem naukowy jest bardzo istotny i aktualny, bowiem dotyczy globalnego problemu zdrowotnego jakim jest obecność w środowisku życia człowieka bakterii i/lub genów opornych na antybiotyki. Problem ten związany jest z powszechnym stosowaniem leków przeciwdrobnoustrojowych w terapii ludzi i zwierząt oraz w ich hodowli. Oporność na antybiotyki nie jest już dzisiaj tylko ograniczona do środowiska szpitalnego. Istnieje wiele badań nad opornością na antybiotyki wśród szczepów środowiskowych, co sugeruje, że szczepy kliniczne bakterii o większej oporności często pochodzą ze środowiska naturalnego, w tym z siedlisk wodnych. Dlatego identyfikacja źródeł genów oporności na leki i poznanie dróg ich transmisji jest niezbędna do opracowania strategii zwalczania oporności na antybiotyki.

Doktorant w swoich badaniach skupił się na biologicznych oczyszczalniach ścieków pracujących w technologii osadu czynnego chcąc odpowiedzieć na pytania: 1) czy wpływają one istotnie na lekooporność beztlenowych bakterii z grupy *Bacteroides fragilis*, fizjologicznie obecnych w przewodzie pokarmowym ssaków? 2) oraz czy wpływają na rozprzestrzenianie tych bakterii w środowisku?

Osiągnięcie tak postawionych celów oraz udowodnienie postawionych przez Doktoranta tez wymagało realizacji dużego zakresu pracy, co wiązało się z przeprowadzeniem

skomplikowanych i pracochłonnych prac doświadczalnych. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze opanowany przez Doktoranta warsztat badawczy obejmujący techniki klasycznej mikrobiologii, w tym hodowli beztlenowych szczepów bakterii, oraz technik inżynierii genetycznej i analizy bioinformatycznej. Zakres eksperymentów laboratoryjnych został zaplanowany prawidłowo, odpowiednio do celów dysertacji. Pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports (JCR) posiadających IF oraz w recenzowanych materiałach konferencyjnych w języku angielskim indeksowanych w Web of Science. Zbiór tych prac został poprzedzony spójnym opracowaniem mającym charakter dysertacji doktorskiej. Lektura jego treści pokazuje iż zbiór 6 prac naukowych jest spójny tematycznie, a Doktorant właściwie interpretuje wyniki eksperymentów naukowych oraz sprawnie porusza się w literaturze tematu, właściwie rozwiązując problemy badawcze, wyciągając z nich logiczne wnioski, które potwierdzają zrealizowanie celów tej pracy badawczej.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych Doktoranta, poza potwierdzeniem tez postawionych na początku pracy, zaliczyłabym:

- podjęcie pionierskich badań nad lekoopornością obecnych w środowisku szczepów z grupy *Bacteroides fragilis* (BFG), stanowiących fizjologiczną, dominującą mikrobiotę przewodu pokarmowego ssaków,
- wykazanie, że środowiskowe szczepy BFG charakteryzują się dużą opornością na antybiotyki oraz dużą różnorodnością genów kodujących mechanizmy oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe,
- wykazanie, że oczyszczalnie ścieków pracujące w technologii osadu czynnego nie usuwają całkowicie w procesie oczyszczania ścieków beztlenowych bakterii BFG,
- wykazanie, że biologiczne oczyszczalnie ścieków pracujące w technologii osadu czynnego stanowią rezerwuar środowiskowy lekoopornych i wielolekoopornych szczepów BFG, które charakteryzują się często większą opornością na badane antybiotyki niż szczepy izolowane z kału ludzi oraz z ścieków szpitalnych,
- wykazanie możliwości zastosowania bakterii BFG jako alternatywnego wskaźnika sanitarnego czystości wód powierzchniowych poprzez badanie obecności specyficznych genów dla tej grupy bakterii w analizach zanieczyszczenia wód fekaliami oraz jako wskaźnika zanieczyszczenia środowiska wodnego genami oporności na antybiotyki (ARGs).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w postaci cyklu 6 publikacji podlegała już krytycznej ocenie przez recenzentów, zgodnie z wymogami wydawniczymi czasopism, tak więc pozwolę sobie zamieścić kilka pytań będących punktem wyjścia do dyskusji na obronie pracy:

- 1) Jakimi układami technologicznymi charakteryzowały się oczyszczalnie ścieków występujące w badaniach oraz jaki wpływ miały te różnice technologiczne pomiędzy nimi na usuwanie bakterii BFG i ARGs oraz na wzrost zjawiska antybiotykoodporności tych bakterii w ściekach oczyszczonych?
- 2) Dlaczego w ściekach szpitalnych obserwowano zwykle niższą oporność badanych szczepów na antybiotyki w porównaniu do tych obecnych w ściekach pochodzących z oczyszczalni?

- 3) Dzięki jakiemu mechanizmowi beztlenowe bakterie BFG przeżywają w ściekach surowych, napowietrzanej komorze osadu czynnego oraz w ściekach oczyszczonych i wodach powierzchniowych?

4. Wniosek końcowy

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgra inż. Sebastiana Niestępskiego pt.: „*Wpływ oczyszczania ścieków w technologii osadu czynnego na lekooporność beztlenowych bakterii z grupy *Bacteroides fragilis**” przedstawiona w postaci jednotematycznego cyklu sześciu publikacji stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie naukowej *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* i wskazuje na wysoki poziom wiedzy teoretycznej Kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Opiniowana praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r., poz. 882 z późn. zm), w związku z ustawą z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz.1669). Wobec tego przedkładaam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie opiniowanej rozprawy i dopuszczenie Pana mgra inż. Sebastiana Niestępskiego do publicznej obrony pracy doktorskiej.

