



dr hab. Joanna Mokracka, prof. UAM  
Zakład Mikrobiologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6; 61-614 Poznań

Poznań, 10.04.2021 r.

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. inż. Sebastiana Niestępskiego została wykonana na Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej, Wydziału Geoinżynierii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, pod kierunkiem prof. UWM dr hab. inż. Moniki Harnisz. Promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej była dr hab. inż. Anna Gotkowska-Płachta. Przedłożona do oceny rozprawa składa się ze streszczenia w języku angielskim i polskim, autoreferatu zawierającego wstęp, cel i hipotezy badawcze pracy, metodykę i wyniki badań, podsumowanie i wnioski, spis literatury oraz kopii publikacji wraz z oświadczeniami współautorów. Wyniki będące przedmiotem dysertacji zawarto w sześciu pozycjach: trzech pracach oryginalnych i jednej przeglądowej opublikowanych w latach 2017-2020 w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports oraz dwóch recenzowanych doniesieniach konferencyjnych:

1. **Nięstępski S.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A., Dziuba B. 2017. *Bacteroides* spp. – znaczenie kliniczne, lekooporność i metody jej oznaczania. *Postępy Mikrobiologii*, 56: 67-76.
2. **Nięstępski S.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A. 2018 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.

3. **Niestępski S.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A. 2019 Isolation of anaerobic bacteria of the *Bacteroides fragilis* group from environmental samples, *E3S Web of Conferences*. 100, 00058.
4. **Niestępski S.**, Harnisz M., Korzeniewska E., Aguilera-Arreola M.G., Contreras-Rodríguez A., Filipkowska Z., Osińska A. 2019 The emergence of antimicrobial resistance in environmental strains of the *Bacteroides fragilis* group. *Environment International*. 124, 408–419.
5. **Niestępski S.**, Harnisz M., Ciesielski S., Korzeniewska E., Osińska A. 2020. 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*. *Journal of Hazardous Materials*. 394, 122544.
6. **Niestępski, S.**, Harnisz, M., Korzeniewska, E., Osińska, A. 2020. Markers specific to bacteroides fragilis group bacteria as indicators of anthropogenic pollution of surface waters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17(19), 7137.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) czasopism, w których opublikowano ww. prace wynosi 19,819, a suma punktów MEiN 430. Przedstawione artykuły są tematycznie spójne. Wszystkie prace są wieloautorskie – mają od czterech (prace 2, 3 i 6) poprzez pięciu (prace 1 i 5) do siedmiu (praca 4) współautorów. Pan mgr inż. Sebastian Niestępski jest pierwszym autorem wszystkich przedstawionych prac. Z oświadczeń złożonych przez Doktoranta oraz współautorów prac wynika, że miał on znaczący i wzrastający w kolejnych publikacjach udział (od 51 do 60%) w ich przygotowanie. Obejmował on, w większości prac, współudział w tworzeniu koncepcji, planowaniu i przeprowadzeniu badań, analizie i prezentacji wyników, wnioskowaniu, pisaniu i przygotowaniu manuskryptów oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów. Tak znaczny udział Doktoranta w całości badań, zwłaszcza w tworzeniu koncepcji świadczy nie tylko o zaangażowaniu, lecz o potencjale naukowym i wzrastającej w kolejnych latach samodzielności doktoranta. Szczególnie godnym docenienia jest fakt pozyskania przez doktoranta środków na badania będące przedmiotem rozprawy – wszystkie prace eksperymentalne (publikacje 2-6) finansowano ze środków uzyskanych w konkursie NCN PRELUDIUM, którym Doktorant kierował.

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Sebastiana Niestępskiego dotyczy kompleksowej oceny występowania i lekooporności bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* (BFG) pochodzących z prób ścieków, wód odbiornika oraz kału ludzi i szczurów, jak również analiz środowiskowego DNA

związanych ze składem populacji *Bacteroides* spp., ilościową oceną genów markerowych i genów lekooporności charakterystycznych dla badanej grupy bakterii.

Podjęty przez Doktoranta temat jest niezwykle aktualny i ambitny. Zrozumienie mechanizmów rozprzestrzeniania się bakterii opornych i genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki w środowisku jest wg. Światowej Organizacji Zdrowia kluczowym elementem stworzenia skutecznej kontroli i strategii ograniczenia lekooporności mikroorganizmów. Ścieki i oczyszczalnie ścieków wydają się być środowiskiem, w którym, podobnie jak w szpitalnym, wymiana genów oporności na antybiotyki (ARG) pomiędzy bakteriami jest procesem powszechnym. Bezwzględnie beztlenowe bakterie z grupy *Bacteroides fragilis*, będąc częścią mikrobioty jelitowej człowieka, a równocześnie wykazując potencjał chorobotwórczy, podlegają w jelicie procesom mutacji, horyzontalnego transferu genów i selekcji, co prowadzi do pojawiania się i rozprzestrzeniania szczepów wieloopornych. Publikacje dotyczące *Bacteroides* spp. skupiają się głównie na patogeniczności i lekooporności szczepów wywołujących zakażenia u ludzi, natomiast losy bakterii tej grupy, zwłaszcza dynamika zmian występowania i lekooporności w ściekach są praktycznie nieznane i w tym zakresie praca jest prekursorska.

Podjęte przez Doktoranta zadania były wymagające, choćby ze względu na specyficzne wymagania wzrostowe i brak procedur dotyczących izolacji i identyfikacji bakterii BFG ze środowiska. Do realizacji postawionych celów pracy doktorskiej Pan mgr inż. Sebastian Niestępski opanował bardzo różnorodny i nowoczesny warsztat badawczy obejmujący tradycyjne metody stosowane w mikrobiologii do hodowli, selekcji i izolacji bezwzględnie beztlenowych mikroorganizmów, oznaczania lekooporności, jak i szereg metod biologii molekularnej służących m.in. do wyznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów (FISH), izolacji genomowego i środowiskowego DNA, identyfikacji szczepów w oparciu o obecność genów markerowych, określeniu polimorfizmu genetycznego wyizolowanych szczepów bakterii (ERIC-PCR), wykrywaniu genów kodujących oporność na antybiotyki, oraz genu wirulencji *bft*, identyfikacji izolatów na podstawie analiz z użyciem MALDI-TOF i sekwencjonowania 16S rRNA. Ponadto, w środowiskowym DNA pochodzącym ze ścieków Doktorant oznaczał badane geny ilościowo metodą qPCR, jak również określił skład populacji z wykorzystaniem sekwencjonowaniem nowej generacji (NGS). Do opracowania danych sekwencyjnych wykorzystał analizy bioinformatyczne.

Wstępem do części doświadczalnej było znakomicie przygotowane opracowanie dotyczącego aktualnej taksonomii, chorobotwórczości i lekooporności, z obszerną charakterystyką

mechanizmów warunkujących poszczególne fenotypy oporności *Bacteroides* spp. i metod oznaczania (praca 1). Publikacja o charakterze przeglądowym stanowi doskonałe wprowadzenie do badań i świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym mgr inż. Sebastiana Niestępskiego do części eksperymentalnej. Zachęcam w tym miejscu do stosowania aktualnego nazewnictwa taksonów, mianowicie domena i typ zamiast królestwo i gromada.

Pierwszy etap badań dotyczył izolacji i identyfikacji szczepów BFG – spośród 319 potencjalnych izolatów *Bacteroides* spp. pochodzących ze ścieków: szpitalnych, dopływających i odpływających z oczyszczalni wykorzystującej technologię osadu czynnego w Olsztynie oraz z próbek kału pochodzących od ludzi i szczurów, Doktorant zidentyfikował 123 szczepy grupy *Bacteroides fragilis* (prace 3 i 4). Na docenienie zasługuje metodyczne podejście do izolacji i identyfikacji szczepów BFG z wykorzystaniem metod hodowlanych, w tym selekcji antybiotykowej, metod molekularnych (oznaczenie obecności genu *bfr* i fragmentu HF183/BacR287 specyficznych dla BFG i analiz z wykorzystaniem MALDI-TOF). Trzeba jeszcze raz w tym miejscu podkreślić znaczny stopień trudności izolacji i identyfikacji środowiskowych BFG. Jakkolwiek bowiem dla szczepów tej grupy izolowanych z materiałów od chorych ludzi istnieją sprawdzone procedury hodowlane, to szczepy izolowane ze środowiska wykazują znacznie większe zróżnicowanie fenotypowe i genetyczne, co stwarza problemy z ich identyfikacją metodami stosowanymi w diagnostyce bakteriologicznej (łącznie z MALDI-TOF). Znaczącą wartością poznawczą jest określenie składu gatunkowego BFG poszczególnych prób środowiskowych oraz oznaczenie profilu lekooporności szczepów. Badane materiały różnią się zarówno dominującymi gatunkami jak i ich różnorodnością. Co interesujące, w ścieku szpitalnym odnotowano tylko *Parabacteroides distasonis*, natomiast najbardziej różnorodnie były ścieki oczyszczone i próby kału ludzkiego – w obu dominującym gatunkiem był *B. fragilis* – najczęściej izolowany patogen z zakażeń ludzi. W ścieku surowym stwierdzono trzy gatunki: *P. distasonis*, *B. fragilis* i *B. thetaiotaomikron* i pierwszy z nich był dominujący.

Podobnie zastanawiającym było, że w analizie lekooporności ww. szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki ( $\beta$ -laktamy, tetracykliny, MLS, nitroimidazol i chinolony) szczepy pochodzące ze ścieków dopływających i odpływających z oczyszczalni wykazywały wyższą częstość lekooporności niż te z pozostałych materiałów. Największą częstość oporności odnotowano dla ciprofloksacyny, erytromycyny, tetracykliny i ampicyliny. O istniejącej presji selekcyjnej w środowisku oczyszczalni świadczyć może wzrost oporności szczepów na metronidazol w trakcie procesu oczyszczania

ścieków (z 16,67% do 31,25%), oraz występowanie oporności na chloramfenikol wyłącznie u szczepów wyizolowanych ze ścieków i, w niewielkim stopniu, z kału ludzkiego. Kolejnym interesującym wynikiem jest wystąpienie niezwykle niebezpiecznego z punktu widzenia terapii zjawiska wielolekooporności, które to również pojawiło się w przypadku szczepów ściekowych, a procent szczepów wielolekoopornych był prawie identyczny w ściekach oczyszczonych jak w ściekach dopływających. Większość obserwowanej fenotypowo oporności znajdowała uwarunkowanie genetyczne; największą różnorodnością genów charakteryzowały się znowu ścieki z oczyszczalni ścieków wykryto u nich 21 z 28 badanych genów (szczepy ze ścieków szpitalnych miały 4, a z kału ludzkiego 10 genów).

W analizie składu populacji ścieków dopływających i odpływających z 13 oczyszczalni ścieków z czterema rodzajami modyfikacji technologii oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego oznaczonych NGS, klasa *Bacteroidia* stanowiła średnio nie więcej niż 2,5% (od 1,0%-8,2%) wszystkich bakterii, a występujące różnice miały prawdopodobnie związek z modyfikacjami technologicznymi oczyszczania ścieków. Brak istotnych statystycznie różnic w udziale *Bacteroidia* względem pozostałych bakterii wskazuje, że bakterie tej klasy przeżywają proces oczyszczania ścieków, choć liczba kopii genów specyficznych dla grupy BFG (*bfr* i fragmentu HF183/BacR287) pomiędzy ściekami dopływającymi a odpływającymi wykazuje dla większości oczyszczalni znaczącą redukcję.

Do najistotniejszych w mojej ocenie osiągnięć rozprawy zaliczyć można wyniki wpływu modyfikacji technologii oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego na dynamikę zmian ilościowych genów specyficznych dla grupy BFG (*bfr* i HF183/BacR287) i wybranych genów lekooporności (*cfx*, *tetQ* i *tetX*, *mefA*, *ermF*, *linA*, *bexA* i *int11*) oznaczonych metodą qPCR w środowiskowym DNA. Jakkolwiek w poszczególnych próbach ilość genów była zróżnicowana, w większości badanych oczyszczalni nastąpiła znacząca redukcja liczby kopii badanych genów po procesie oczyszczania ścieków. Wyjątkiem była oczyszczalnia ścieków wykorzystująca sekwencyjny reaktor biologiczny (SBR), charakteryzująca się długim wiekiem osadu – Doktorant wykazał wzrost liczby kopii 11 z 12 badanych genów procesie oczyszczania. Natomiast oczyszczalnie z systemem podwyższonego usuwania biogenów charakteryzowały się wysoką zdolnością redukcji (>93%) liczby kopii genów. Wyniki te stanowią bardzo ważny przyczynek do rekomendacji określonych technologii w procesie oczyszczania w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się BFG i genów oporności

Bardzo ważne osiągnięcie rozprawy stanowi wykazanie, że w wodzie odbiornika pobranej za miejsce zrzutu ścieków oczyszczonych następuje istotny statystycznie wzrost liczby kopii genów specyficznych dla BFG (równoległe z genem *uid* specyficznym dla *Escherichia coli*) i genów lekooporności (praca 6). Ścisła korelacja pomiędzy liczbą kopii genów *bfr* i HF183/BacR287 oraz genów markerowych dla *E. coli* i *Enterococcus faecalis*, świadczy nie tylko o współwystępowaniu tych grup mikroorganizmów, ale o możliwości ich wykorzystania jako alternatywnego wskaźnika kałowego zanieczyszczenia wody. Ze względu również na wykazaną przez Doktoranta korelację liczbą kopii genów specyficznych dla BFG z genami oporności, oznaczenie genów markerowych dla wskaźników zanieczyszczenia kałowego wody, można przekładać również na informację o obciążeniu genami oporności.

Reasumując Doktorant zweryfikował sformułowane hipotezy dotyczące większego zróżnicowania lekooporności i warunkujących ją genów u szczepów grupy *Bacteroides fragilis* wyosobnionych ze ścieków oczyszczanych metodą osadu czynnego w porównaniu ze szczepami z pozostałych materiałów, jak również roli i udziału oczyszczalni ścieków w uwalnianiu zarówno BFG jak i genów oporności do środowisku.

#### Pytania i uwagi krytyczne

Przedstawione do oceny artykuły zostały już opublikowane, więc podlegały krytycznej ocenie recenzentów, niemniej jednak pozwolę sobie zamieścić kilka uwag i pytań:

- W pracy oznaczano liczbę kopii genów integraz integronów klasy 1 i 2 w metagenomowym DNA ścieku. W wielu miejscach rozprawy pojawiają się również uwagi o roli integronów w HTG. Czy podjęto próby zbadania czy w genomach szczepów grupy *Bacteroides fragilis* występują integrony i jaka jest ich zawartość genowa?
- W przypadku oporności na chloramfenikol, odnotowano ją u szczepów pochodzących ze ścieków surowych i oczyszczonych, oraz w mniejszym stopniu z kału ludzkiego, natomiast izolaty ze ścieków szpitalnych i pochodzące z kału szczurzego były wrażliwe na ten antybiotyk. Proponowanym przez Doktoranta wytłumaczeniem tego zjawiska jest nabywanie oporności przez bakterie kolonizujące systemy kanalizacji (HTG, selekcja, mutacje?). Czy istnieją doświadczalne dowody na tego rodzaju mechanizm? Czy bardziej prawdopodobnym

wyjaśnieniem tego zjawiska nie byłoby po prostu pochodzenie szczepów opornych na chloramfenikol od ludzi i zwierząt?

- Nie do końca jest dla mnie jasny fragment autoreferatu dotyczący wyższej częstości wielolekoopornych szczepów BFG w ścieku oczyszczonym. Częstości te w ścieku oczyszczonym wynosiły 93,75%, zaś ogólnie w ścieku 95,65%, czyli wnioskuję, że w ścieku dopływającym częstość szczepów MDR musiała być wyższa niż w ścieku oczyszczonym?
- gen wirulencji *bft* obecny był u wszystkich szczepów BFG wyizolowanych z kału szczurzego (które *de facto* stanowiły kontrolę negatywną w badaniach), natomiast w niewielkim u szczepów z pozostałych materiałów. Jakże może być wytłumaczenie zwiększonej częstości tego genu u szczepów z kału szczurzego?

Rozprawę doktorską mgr. inż. Sebastiana Niestępskiego oceniam bardzo wysoko. Strona formalna nie budzi zastrzeżeń. Na uwagę zasługuje staranne zaplanowanie strony eksperymentalnej, bardzo szeroki zakres analiz mikrobiologicznych, genomicznych, bioinformatycznych i statystycznych. W pracy uzyskano ważne i oryginalne rezultaty, znacznie poszerzające wiedzę na temat metod identyfikacji, występowania i lekooporności środowiskowych bakterii grupy *Bacteroides fragilis*, ich rozprzestrzeniania się w środowisku poprzez ścieki oczyszczone jak również wpływu modyfikacji technologii oczyszczania ścieków na obciążenie wód odbiornika bakteriami BFG i wreszcie możliwości aplikacyjne dotyczące wykorzystania markerów specyficznych dla BFG jako wskaźników zanieczyszczenia kałowego wody.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w Ustawie o Stopniach i Tytułach Naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami i **wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Biorąc pod uwagę prekursorski charakter badań dotyczących środowiskowych szczepów grupy *Bacteroides fragilis*, szeroki zakres badań dotyczący lekooporności środowiskowych szczepów BFG, różnorodność zastosowanych technik badawczych, wysoki poziom merytoryczny (potwierdzony ich opublikowaniem w uznanych czasopismach naukowych) oraz wysoką wartość poznawczą związaną z wykazaniem roli środowiskowych bakterii BFG w rozprzestrzenianiu lekooporności, **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą**.

Joanna Rokwańska