



Olsztyn, 01.06.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Monika Harnisz
Katedra Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Geoinżynierii
UWM w Olsztynie

R e c e n z j a

pracy doktorskiej mgr inż. Filipa Gamonia pt. „The influence of chosen antibiotics on the anammox process” wykonanej w Katedrze Biotechnologii Środowiskowej Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej, pod opieką naukową dr hab. Aleksandry Ziemińskiej -Buczyńskiej, prof. PŚ

1. Zasadność doboru tematyki

Odkrycie i wdrożenie środków przeciwdrobnoustrojowych jest uważane za jedno z najważniejszych osiągnięć XX wieku, które, wraz z poprawą higieny i programów szczepień, zrewolucjonizowało zarówno medycynę, jak i weterynarię. W Unii Europejskiej w 2021 r. średnie całkowite spożycie (łącznie w środowisku szpitalnym i poza szpitalnym) leków przeciwbakteryjnych do stosowania ogólnoustrojowego wyniosło 16,4 DDD (zdefiniowanej dawki dziennej) na 1000 mieszkańców dziennie. Zużycie ogółem w Polsce było stosunkowo wysokie (20,2 DDD na 1000 mieszkańców dziennie), co skutkowało 6 miejscem wśród krajów europejskich.

Stosowanie antybiotyków w leczeniu powoduje „presję selekcyjną”, co skutkuje większymi możliwościami rozwoju bakteryjnej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (antimicrobial resistance - AMR), która jest definiowana jako wyraz „oporności nabytej” w populacji bakterii, pierwotnie wrażliwej na związek przeciwdrobnoustrojowy.

Niezmetabolizowane przez ludzi i zwierzęta środki przeciwdrobnoustrojowe, produkty ich transformacji, a także bakterie lekooporne (antibiotic resistant bacteria – ARB) i geny oporności na antybiotyki (antibiotic resistance genes - ARGs) trafiają do wszystkich komponentów środowiska naturalnego, takich jak woda, gleba i powietrze. Występowanie tych





mikrozanieczyszczeń stwierdza się także w środowiskach kształtowanych antropogenicznie takich jak ścieki szpitalne, ścieki komunalne nieoczyszczone i oczyszczone, osady ściekowe, gleby nawożone nawozami pochodzenia zwierzęcego, a nawet w roślinach, które na takich glebach są uprawiane.

Obecność antybiotyków w ściekach komunalnych i osadach ściekowych może powodować zahamowanie biologicznych procesów ich oczyszczania/przetwarzania. Szczególnie wrażliwe na ich obecność mogą być bakterie nityfikacyjne i denityfikacyjne, drobnoustroje przeprowadzające proces anammox czy też wytwarzające biogaz podczas fermentacji metanowej. O ile wpływ antybiotyków na standardowe procesy usuwania azotu ze ścieków są dość dobrze opisane w literaturze naukowej, o tyle w przypadku procesu anammox, odkrytego stosunkowo niedawno, dane te są wciąż fragmentaryczne i wymagają uzupełnienia.

To wszystko potwierdza aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Pana mgr inż. Filipa Gamoń i jego promotora Panią dr hab. Aleksandrę Ziemińską-Buczyńską, prof. PŚ. Przedstawiona do oceny praca prezentuje wyniki badań, których celem była analiza wpływu trzech antybiotyków (oksytetracykliny, ciprofloksacyny i klarytromycyny) na: (I) aktywność bakterii anammox, (II) odpowiedź systemu anammox. Tematyka badawcza jest bardzo interesująca i wnosi nowe informacje do biotechnologii środowiskowej i inżynierii środowiska.

2. Charakterystyka pracy

Pan mgr inż. Filip Gamoń jako rozprawę doktorską przedstawił jednotematyczny cykl publikacji pt. The influence of chosen antibiotics on anammox proces. Rozprawę napisano w języku angielskim. Składa się ona z wykazu publikacji składających się na dysertację, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, metodyki, przedstawienia wyników, podsumowania, propozycji dalszych badań naukowych, wykazu piśmiennictwa oraz kopii trzech artykułów, w których przedstawiono wyniki wraz z materiałami uzupełniającymi. Do publikacji dołączono oświadczenia współautorów. Na końcu Doktorant zestawil publikacje, niewchodzące w zakres rozprawy, których także jest współautorem. **Układ rozprawy doktorskiej jest prawidłowy**, zawiera ona wszystkie elementy niezbędne do jej oceny.





Na cykl publikacji składają się trzy prace opublikowane w renomowanych czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports posiadających IF:

1. **Gamoń, F.**, Cema, G., Ziemińska-Buczyńska, A., 2022. The influence of antibiotics on the anammox process — a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(6), pp. 8074–8090 (IF 5,190; 100 pkt. MEiN).
2. **Gamoń, F.**, Banach-Wiśniewska, A., Kaur, J.J., Cema, G., Ziemińska-Buczyńska, A. 2022. Microbial response of the anammox process to trace antibiotic concentration. *Journal of Water Process Engineering*, 46: 102607 (IF 7,340; 100 pkt. MEiN).
3. **Gamoń, F.**, Banach-Wiśniewska, A., Poprawa, I., Cema, G., Ziemińska-Buczyńska, A., 2022. Insight into the microbial and genetic response of anammox biomass to broad range concentrations of different antibiotics: Linking performance and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 451: 138546 (IF 16,744; 200 pkt. MEiN).

Na podkreślenie zasługuje fakt opublikowania przez Doktoranta wszystkich artykułów w czasopismach o bardzo wysokiej randze.

Wszystkie publikacje są współautorskie, co jest typowe dla kompleksowych prac badawczych. Do rozprawy zostały dołączone oświadczenia współautorów publikacji. Udostępniono czytelnikom zarówno podział procentowy wkładów poszczególnych autorów jak i szczegółowy zakres prac Doktoranta i pozostałych współautorów, stanowiący ich wkład w powstanie manuskryptów. Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich trzech artykułów wchodzących w skład rozprawy oraz uczestniczył w najważniejszych etapach tworzenia artykułów naukowych jak: formułowanie koncepcji pracy, przechowywanie danych, analizy formalne, analizy eksperymentalne, wizualizacja i walidacja danych, pisanie pierwotnej wersji manuskryptu. Wkład procentowy Doktoranta w powstanie tych artykułów wynosi od 60 do 80%.

Łączna wartość Impact Factor artykułów opublikowanych w ramach osiągnięcia naukowego Doktoranta to 29,274, a sumaryczna ilość punktów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 400. Łączna wartość Impact Factor artykułów opublikowanych w ramach osiągnięcia naukowego Doktoranta po podziale zgodnie z deklarowanym udziałem współautorów to 18,817, a sumaryczna ilość punktów MNiSW 260. Artykuły Doktoranta wchodzące w skład rozprawy doktorskiej były cytowane dwudziestokrotnie i





dwunastokrotnie odpowiednio w oparciu o bazy Scopus i Web of Science Core Collection. Tak liczne cytowania artykułów Doktoranta świadczą o dużym zainteresowaniu badaniami młodego naukowca, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie artykuły zostały opublikowane w roku 2022.

Badania eksperymentalne dotyczące wpływu antybiotyków na proces anammox poprzedza szczegółowa analiza literatury, która ujawniła kierunki, w których obecnie dostępna wiedza z zakresu działania antybiotyków na proces anammox była ograniczona. **Wyniki tej wyczerpującej analizy dostępnej literatury naukowej zostały opublikowane w publikacji oznaczonej powyżej numerem 1.**

Badania opublikowane w artykułach oznaczonych numerem 2 i 3 dotyczą luk w istniejącej wiedzy wskazanych we wcześniejszym artykule. W artykułach nr 2 i 3 Doktorant opisał odpowiednio wpływ niskiej koncentracji antybiotyków oraz rosnących stężeń antybiotyków na proces anammox, zarówno w krótko- jak i długoterminowych eksperymentach. Do opisu procesu anammox Pan mgr inż. Filip Gamoń wykorzystał szereg metod badawczych obejmujących analizę parametrów fizyko-chemicznych, badanie genów funkcjonalnych procesu anammox, genów lekooporności oraz integrazy metodą ilościowej reakcji PCR, analizę zmian w społecznościach bakteryjnych opartą na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA, produkcję zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych oraz polisacharydów i białek za pomocą zmodyfikowanych metod Lowry'ego i Anthrone'a. W badaniach wykorzystano także metody mikroskopowe.

Zastosowane metody badań pozwoliły Doktorantowi na osiągnięcie zaplanowanych celów dysertacji. Pan mgr inż. Filip Gamoń udowodnił, iż antybiotyki w niskich stężeniach, zbliżonych do stężeń występujących w środowisku, nie wpływają na efektywność procesu anammox, z kolei wysokie stężenia badanych leków silnie obniżają jego efektywność. Obecność leków w poddanych procesowi anammox ściekach, niezależnie od stężenia, wpływała też na zmiany w strukturze bakterii oraz rozprzestrzenianie niewrażliwości na leki.





4. Ocena rozprawy

Podjęty przez Doktoranta problem badawczy jest istotny i aktualny. W porównaniu do klasycznych metod usuwania azotu opartych na nityfikacji i denityfikacji, anammox jest znany jako innowacyjna i ekonomiczna metoda usuwania tego pierwiastka ze ścieków. Bakterie przeprowadzające proces anammox mogą być wrażliwe na toksyczny wpływ obecności antybiotyków w oczyszczanych ściekach, co może prowadzić do zahamowania ich wzrostu a tym samym efektywności samego procesu. Ponadto obecność leków może prowadzić do propagacji zjawiska lekooporności wśród bakterii. **Biorąc pod uwagę powyższe, podjęty przez Doktoranta temat uważam za niezwykle ważny zarówno ze względu na możliwy wpływ na efektywność procesu jak i potencjalne zagrożenie zdrowia i życia ludzi.**

Na podkreślenie zasługuje dobrze opanowany przez Doktoranta warsztat badawczy obejmujący zarówno podstawowe techniki badania parametrów fizyko-chemicznych jak i zaawansowane metody mikrobiologii molekularnej takie jak ilościowa reakcja PCR czy sekwencjonowanie. Zakres eksperymentów został zaplanowany prawidłowo, odpowiednio do celów dysertacji. Pod względem merytorycznym praca nie budzi zastrzeżeń. Wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych, bardzo wysoko punktowanych czasopismach posiadających Impact Factor. Ich lektura pokazuje, iż zbiór prac jest spójny tematycznie. **Doktorant właściwie interpretuje wyniki badań oraz sprawnie porusza się w literaturze tematu właściwie rozwiązując problemy badawcze i wyciągając z nich logiczne wnioski.**

Do najważniejszych osiągnięć mgr inż. Filipa Gamonia, poza osiągnięciem celów postawionych w pracy, zaliczam

1. wniosek o braku wpływu środowiskowych stężeń antybiotyków na efektywność procesu anammox,
2. wkład w poznanie zmian w składzie zbiorowisk bakterii anammox zachodzących pod wpływem obecności leków,
3. komplementarność wszystkich prac wchodzących w zakres pracy doktorskiej, tworzących chronologiczną całość z rozwojem zakresu badań, ich szczegółowości oraz ważności.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w postaci zbioru trzech artykułów podlegała już krytycznej ocenie przez recenzentów zgodnie z wymogami wydawniczymi





czasopism, pozwolę sobie jednak zamieścić kilka pytań i komentarzy, które, mam nadzieję, przyczynią się do dyskusji na obronie dysertacji:

1. Do substancji inhibitujących procesy biologiczne takie jak anammox, oprócz antybiotyków, należą także metale ciężkie. Ponadto, geny oporności na metale ciężkie są często kodowane na tych samych elementach mobilnych co antybiotyki. W dysertacji podkreślono rolę zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych w ochronie komórek bakteryjnych przed antybiotykami. Czy EPS może pełnić rolę ochronną również w przypadku działania metali ciężkich?
2. Prace eksperymentalne wykonane na rzecz ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczyły wpływu pojedynczych antybiotyków na efektywność procesu anammox, jednak ścieki poddawane oczyszczaniu nie zawierają jednego antybiotyku a raczej mieszaninę najczęściej używanych w danym kraju antybiotyków. Bazując na tej szeroko rozpowszechnionej wiedzy proszę o odpowiedź na pytanie dlaczego w takim razie Doktorant nie badał wpływu mieszaniny wybranych antybiotyków? Ponadto, dlaczego do badań nie włączono beta-laktamów, które są najczęściej używanymi antybiotykami na świecie zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynarii?

Po przeczytaniu artykułów wchodzących w skład dysertacji nasuwają mi się pewne krytyczne uwagi, które, choć nie mogą już wpłynąć na kształt opublikowanych artykułów, to być może pomogą Doktorantowi przy pisaniu kolejnych prac naukowych:

Publikacja 1

1. W artykule pojawiają się często skróty myślowe, których należy unikać np. jeden z podrozdziałów nosi tytuł „Mechanism of anammox bacteria inhibition by antibiotics” W tytule jest mowa o inhibicji ale nie wiadomo czego ta inhibicja dotyczy. Wzrostu bakterii anammox? Ich efektywności?
2. Szkoda, że w podrozdziale podsumowującym zmiany w społecznościach bakteryjnych zachodzące pod wpływem antybiotyków nie porównano składu zmienionych społeczności bakterii anammox do składu społeczności bakterii anammox niepoddanych wpływowi antybiotyków.

Publikacja 2





1. Jako powód wyboru oxtetracykliny, ciprofloksacyny i klarytromycyny do badań podano ich wysoką konsumpcję w leczeniu ludzi oraz dodawanie tych leków jako promotorów wzrostu do paszy dla zwierząt. W krajach członkowskich Unii Europejskiej nie wolno stosować antybiotyków jako promotorów wzrostu zwierząt już od roku 2004, i takie informacje należy wziąć pod uwagę.
2. Jakiego rodzaju ścieki zastosowano w eksperymencie? Czy były to ścieki syntetyczne czy też komunalne? Brak jest tej informacji w artykule, co znacząco wpływa na możliwość dalszego wykorzystania uzyskanych wyników.
3. Brak opisu metody zastosowanej do izolacji DNA. Ta część metody została całkowicie pominięta w artykule. Ponadto nie wiadomo, z jakich próbek wyizolowano DNA do dalszych badań.
4. W rozdziale 2.4 brak jest informacji, że analizę ilościową PCR wykonywano również dla genu kodującego integrazę choć w sekcji rezultatów opisano jej wyniki.
5. Zastosowano mylne nazewnictwo – gen *intI1* nie jest genem funkcjonalnym bakterii anammox a systemem genetycznym pozwalającym bakteriom nabywać geny oporności na antybiotyki. Ponadto startery użyte w reakcji PCR nie kodują genów lekooporności, a jedynie krótkie fragmenty umożliwiające ich amplifikację.
6. Jaka metodę zastosowano do filtracji uzyskanych po sekwencjonowaniu OTU w kierunku bakterii anammox?
7. Figury S1, S2 i S3 nie zostały ani zacytowane ani opisane w tekście manuskryptu.

Publikacja 2 i 3

1. Dobrym zwyczajem jest zdeponowanie uzyskanych sekwencji w odpowiednich bazach danych. Brak umieszczenia tych informacji w prezentowanych pracach.
2. Autorzy opisują wyniki relatywnej koncentracji badanych genów. Szkoda, że w materiałach dodatkowych do artykułów nie pojawiają się dane ich absolutnej koncentracji. Takie dane ułatwiają innym autorom porównania wyników badań.
3. Szkoda również, że nie zastosowano, żadnej metody statystycznej do porównania ilości kopii genów funkcjonalnych, ARGs i *intI1* próbkach, pomimo, że w tekście manuskryptu posługiwano się zwrotem „istotnego spadku/wzrostu”. Do oceny czy





wzrost ten w rzeczywistości jest istotny potrzebne jest zastosowanie metod statystycznych.

3. Wniosek końcowy

Pomimo tych niedociągnięć oceniam przedłożoną mi dysertację wysoko. Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa Pana mgr inż. Filipa Gamonia pt. „The influence of chosen antibiotics on the anammox process” przedstawiona w postaci jednotematycznego cyklu artykułów naukowych stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka i wskazuje na wysoki poziom wiedzy Kandydata a także na umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Niego prac naukowych. Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Wobec tego przedkładam Radzie Dyscypliny Inżynieria środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr inż. Filipa Gamonia do publicznej obrony pracy doktorskiej.

Olsztyn 01.06.2023 r.

prof. dr hab. inż. Monika Harnisz

