



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ INŻYNIERII LĄDOWEJ
I ŚRODOWISKA



UCZELNIA
BADAWCZA
INICJATYWA DOŚWIADCZAJĄCA

dr hab. inż. Aneta Łuczkiwicz
Politechnika Gdańska
Wydział Inżynierii Lądowej i Środowiska
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

Gdańsk, 19.06.2023 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Filipa Gamonia
pt.: "The influence of chosen antibiotics on the anammox process"**

Podstawa opracowania

Podstawą do przygotowania niniejszej recenzji jest pismo prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej. Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska pana mgr inż. Filipa Gamonia pt. „The influence of chosen antibiotics on the anammox process”. Promotorem rozprawy jest dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, prof. PŚ, a promotorem pomocniczym: dr inż. Grzegorz Cema. Dysertacja została zrealizowana w formie cyklu trzech jednotematycznych publikacji o sumarycznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor) równym 29,274 i łącznej ilości punktów MEiN – 400, liczba cytowań wynosi 42 a wskaźnik Hirscha (*h*-index) – 3.

Zasadność podjętej tematyki badawczej

W ostatnich latach obserwuje się zwiększone zainteresowanie zagrożeniami jakie niosą dla mikroorganizmów subinhibitorowe stężenia antybiotyków i chemioterapeutyków obecne w środowiskach pozaszpitalnych. Doniesienia naukowe wskazują, iż mogą one negatywnie wpływać na procesy metaboliczne mikroorganizmów, lub pełnić rolę tzw. związków sygnałowych, powodujących ekspresję genów (niekoniecznie związanych z docelową funkcją antybiotyków), jak i intensyfikować horyzontalny transfer determinant oporności między komórkami bakteryjnymi. Konsekwencją tych zjawisk może być m.in. ograniczenie bioróżnorodności konsorcjów mikroorganizmów, inhibicja ich aktywności biochemicznej lub pojawianie się nowych fenotypów o znaczeniu adaptacyjnym. W tym kontekście analiza wpływu związków antybakteryjnych na efektywność procesów oczyszczania ścieków, zwłaszcza zależności pomiędzy ładunkiem zanieczyszczeń, stosowanym układem technologicznym, a strukturą zbiorowisk mikroorganizmów prowadzących procesy biologiczne wydaje się zasadna.

Proces beztlenowego utleniania amoniaku (anammox, z ang. anaerobic ammonia oxidation) między innymi ze względu na wysoką wydajność w usuwaniu azotu, niskie zużycie energii, brak zapotrzebowania na materię organiczną oraz ograniczoną produkcję osadu stanowi obiecującą alternatywę dla „tradycyjnych” procesów nityfikacji i denityfikacji. Jednakże implementacja procesu anammox nadal generuje wiele wyzwań. Jednym z nich jest powolne tempo wzrostu bakterii anammox oraz konkurencyjny wzrost innych bakterii np. utleniających azotyny (NOB). Nie bez znaczenia jest również wrażliwość bakterii anammox na temperaturę, pH i skład ścieków, w tym stosunek głównych substratów (np. azotu do węgla - N/C), obecność rozpuszczonego tlenu czy mikrozanieczyszczeń, takich jak antybiotyki, nanomateriały, czy mikroplastiki.

Dane literaturowe podają, że obecność antybiotyków może negatywnie wpływać na proces anammox, np. poprzez hamowanie syntezy białek, aczkolwiek w niskich stężeniach bakterie anammox mogą uruchamiać mechanizmy obronne. Jednym z nich jest np. wzmożona synteza polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS, z ang. extracellular polymeric substances), pozwalającą na opóźnienie penetracji antybiotyków do komórek bakteryjnych. Co więcej, antybiotyki mogą ulegać biodegradacji w wyniku aktywności enzymatycznej bakterii wchodzących w skład konsorcjów anammox, np. bakterii nityfikacyjnych i heterotroficznych. Obecność antybiotyków może również indukować mechanizmy oporności.

Wpływ mikrozanieczyszczeń obecnych w ściekach, w tym substancji przeciwbakteryjnych, na wydajność procesów anammox jest zatem zagadnieniem istotnym pod względem technologicznym. Do tej pory jednak w większości prowadzonych prac badawczych stosowano stężenia antybiotyków daleko wyższe niż rzeczywiście stwierdzone w ściekach. Ponadto badania prowadzono zazwyczaj w krótkim horyzoncie czasowym, co ze względu na powolne tempo wzrostu bakterii anammox nie pozwalało na uzyskanie wiarygodnych wyników. Informacje na powyższe tematy są ponadto fragmentaryczne. Utrudnia to właściwą interpretację wyników oraz określenie rzeczywistego wpływu antybiotyków, zarówno na wydajność jak i mechanizmy metaboliczne bakterii anammox.

W związku z powyższym tematykę badawczą podjętą w pracy doktorskiej przez pana mgr inż. Filipa Gamonia uważam za aktualną i w pełni uzasadnioną, tak z poznawczego jak i potencjalnie aplikacyjnego punktu widzenia.

Głównym celem naukowym dysertacji była ocena wpływu oksytetracykliny, ciprofloksacyny i klarytromycyny na aktywność bakterii anammox. Został on osiągnięty poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

- analiza gatunków dominujących oraz genów funkcjonalnych bakterii cyklu azotowego w odpowiedzi na supresję antybiotykową,
- określenie zmiany w liczebności genów oporności na antybiotyki stosowane w pracy,
- badanie wpływu antybiotyków na wydajność procesu anammox w długim horyzoncie czasowym,
- określenie zmiany struktury komórek bakteryjnych pod wpływem supresji antybiotykowej, w tym badanie produkcji polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS),
- analiza związku między gatunkami dominującymi, genami funkcjonalnymi i genami oporności na antybiotyki wśród konsorcjów bakteryjnych prowadzących proces anammox.

Krótką charakterystyką recenzowanej rozprawy doktorskiej

Opiniowana rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim, zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, a jej układ jest następujący:

- Rozdział 1: Introduction, w którym doktorant syntetycznie zarysowuje problem i wprowadza czytelników w zagadnienia związane z rozprawą doktorską.
- Rozdział 2: Thesis, aim, and scope of dissertation, w którym sformułowana zostaje hipoteza badawcza i cele pracy.
- Rozdział 3: Research Methodology, w którym w przejrzysty sposób opisano metodyki analityczne oraz metodologię przeprowadzania eksperymentów.
- Rozdział 4: Results, w którym przedstawiono najważniejsze wyniki badań.
- Rozdział 5: Conclusion, w którym podsumowano najważniejsze wnioski z pracy.
- Rozdział 6: Further research proposals, w którym Doktorant formułuje rekomendację wynikającą z przeprowadzonych badań i obserwacji.
- Rozdział 7: Articles constituting the basis of the dissertation, w którym zestawiono manuskrypty wchodzące w skład jednotematycznego cyklu publikacji.
- Rozdział 8: Authors contribution statements, w którym współautorzy publikacji deklarują swój wkład w powstanie manuskryptów.

Ponadto w pracy zostały zawarte: zestawienie literatury, figur i tabel, zestawienie użytych skrótów oraz listę manuskryptów opublikowanych przez mgr inż. Filipa Gamonia w czasie trwania doktoratu, ale nie będących częścią jego rozprawy doktorskiej.

Opiniowana rozprawa jest pracą głównie eksperymentalną. Została zrealizowana w formie cyklu trzech jednotematycznych publikacji. Publikacje są współautorskie. W każdej z publikacji doktorant jest pierwszym autorem, a oświadczenia współautorów wyraźnie wskazują na jego wiodący udział w zarówno w prowadzeniu prac badawczych, jak w opracowaniu wyników badań i w przygotowaniu manuskryptów. Manuskrypt nr 1 to szczegółowy przegląd literatury. Stanowi on wgląd zarówno w obecny stan wiedzy dot. trudności w implementacji procesu anammox ze względu na jakość ścieków, jak i wskazuje na brak danych w tym zakresie, które byłyby niezbędne, do stworzenia właściwych mechanizmów zaradczych. W związku z powyższym Manuskrypt nr 1 był niejako wskazówką, na podstawie której wybrana została tematyka badawcza oraz sformułowane cele pracy. Manuskrypt nr 2 i nr 3 stanowią natomiast główny trzon badawczy rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że ww. prace zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania.

W związku z powyższym rozprawa doktorska mgr inż. Filipa Gamonia, ze względu na swój charakter, była co do zasady recenzowana przez niezależnych ekspertów na etapie procesu ubiegania się o publikację wybranych manuskryptów. W dysertacji prace te zostały skróto, ale bardzo przejrzysto opisane. Układ pracy jest logiczny i spójny, co odpowiada dobrem standardom przyjętym dla rozpraw

i świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta Na tej podstawie można było stwierdzić, że główny cel pracy został osiągnięty.

Kwestie dyskusyjne i inne uwagi

Podczas lektury rozprawy doktorskiej mgr inż. Filipa Gamonia nasunęło mi się kilka pytań, które moim zdaniem wymagające doprecyzowania. Przedstawiam je poniżej:

1. Aktywność procesów anammox zależy bezpośrednio od ilości biomasy bakterii prowadzących proces. Ponieważ związki przeciwbakteryjne mogą hamować wzrostu bakterii anammox, chciałam zapytać, czy analiza stabilności biomasy była prowadzona podczas trwania eksperymentów i czy ewentualne zmiany były brane pod uwagę w określaniu efektywności procesu?
2. Jednym z głównych wyzwań podjętych w pracy była analiza zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS) pod kątem ich roli w ochronie bakterii anammox przed stosowanymi w pracy antybiotykami. Warunkiem koniecznym do odzyskania wiedzy i właściwej identyfikacji białek i polisacharydów budujących EPS jest ich właściwa ekstrakcja. Ponieważ nie ma znormalizowanych metod zarówno ekstrakcji jak i charakterystyki składu EPS, proszę uzasadnić podjętą w pracy metodykę badawczą w tym zakresie, opisać jej zalety i ograniczenia oraz porównywalność z innymi obecnie stosowanymi metodami badawczymi.
3. Szybki rozwój technologii sekwencjonowania otworzył nowy wymiar w analizie różnorodności biologicznej różnych nisz środowiskowych. Podobnie jak w przypadku innych szybko rozwijających się metodologii, pojawia się wiele pytań i wątpliwości. W manuskryptach nr 2 i 3, zastosowano system MiSeq Illumina. Analizowane fragmenty genu 16S uznawane są jednak za zbyt krótkie, aby można je było dokładnie sklasyfikować na poziomie rodzaju/gatunku, jak to ma miejsce w prezentowanych pracach. Proszę o komentarz w tej sprawie.
4. W pracy badawczej oceniano wpływ oksytetracykliny, ciprofloksacyny i klarytromycyny na aktywność bakterii anammox. Proszę o informację dlaczego w pracy zostały pominięte antybiotyki betalaktamowe, które w Polsce jak i innych krajach europejskich są najczęściej stosowaną grupą antybiotyków, zarówno w podstawowej opiece zdrowotnej jak i w sektorze szpitalnym (na podstawie: „Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) Annual Epidemiological Report for 2021”).
5. Antybiotyki z grupy tetracyklin mają zdolność łączenia się z jonami metali dwu- i trójwartościowymi (np. solami wapnia, żelaza, glinu i magnezu). Połączenia takie są bardzo trudno rozpuszczalne w wodzie. W związku z powyższym, czy sprawdzano potencjalne interakcje antybiotyków wykorzystywanych w pracy doktorskiej z syntetycznymi ściekami zasilającymi układy anammox.

Powyższe pytania stanowią zaproszenie do dyskusji i nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Pozostałe, mniej istotne uwagi szczegółowe, zostały naniesione na tekst rozprawy i zostaną przekazane Doktorantowi w bezpośredniej rozmowie. Pragnę jednak zaznaczyć, iż praca jest napisana bardzo starannie, a ilość błędów nomenklaturowych, stylistycznych i edytorskich jest niewielka.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska pana mgr inż. Filipa Gamonia jest pracą na wysokim poziomie merytorycznym. Należy podkreślić, że zaplanowano i zrealizowano bardzo rozbudowany program badawczy, a zagadnienia technologiczne połączono z elementami rozbudowanej analizy mikrobiologicznej. To jest mocna strona rozprawy, pozwalająca na holistyczne podejście do tematu.

Podsumowanie

Pan mgr inż. Filip Gamoń zrealizował przemyślany program badań. Całościowe i oryginalne ujęcie tematyki badawczej oraz wykorzystanie nowoczesnych metod analitycznych świadczy o bardzo starannym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska potwierdza ponadto jego umiejętności w zakresie: przeglądu literatury, planowania i przeprowadzenia eksperymentalnych badań naukowych, właściwej analizy danych i poprawnego wnioskowania oraz efektywnego publikowania w czasopiśmie naukowych o wysokim współczynniku wpływu (IF).

Rozprawa doktorska pana mgr inż. Filipa Gamonia spełnia zatem wymagania wskazane w ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz.1669). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr inż. Filipa Gamonia do publicznej obrony. Wnoszę również o wyróżnienia recenzowanej rozprawy, ze względu na jej wysoką wartość naukową i poznawczą.

Podpisała Aneta Łuczkiwicz