

Wrocław, 14.05. 2023r.

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

RECENZJA

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

opracowana na podstawie pisma

Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny
inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka
Politechniki Śląskiej

Pana prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina z dnia 05.04.2023r.

(Promotor pracy: dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, prof. PŚ,
Promotor pomocniczy dr inż. Grzegorz Cema)

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr inż. Filipa Gamonia składa się z autoreferatu oraz załączników zawierających kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów. Wyniki będące przedmiotem dysertacji zawarto w cyklu trzech jednotematycznych współautorskich publikacji opublikowanych w latach 2022-2023 w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports (JCR) posiadających IF (*Environmental Science and Pollution Research, Journal of Water Process Engineering, Chemical Engineering Journal*).

1. Gamoń F., Cema G., Ziemińska-Buczyńska A., *The influence of antibiotics on the anammox process - a review. Environ Sci Pollut Res* 29, 8074–8090 (2022) DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17733-7> **IF = 5.190, MEiN = 100 points.**
2. Gamoń F., Banach-Wiśniewska A., Jaspreet Jandoo Kaur, Cema G., Ziemińska-Buczyńska A., *Microbial response of the anammox process to trace antibiotic concentration. Journal of Water Process Engineering*, Volume 46, 102607 (2022), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102607> **IF = 7.340, MEiN = 100 points.**
3. Gamoń F., Banach-Wiśniewska A., Poprawa I., Cema G., Ziemińska-Buczyńska A. *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(1), 138546 (2023). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138546> **IF = 16.744, MEiN = 200 points.**

Łączna wartość Impact Factor artykułów opublikowanych w ramach osiągnięcia naukowego Doktoranta to **29,274** a sumaryczna liczba punktów MEiN, zgodnie z rokiem opublikowania, dla tych prac naukowych wynosi **400**. Prace te zaistniały już w międzynarodowym obiegu informacji o czym świadczy liczba ich cytowań wg. bazy Web of Science Core Collection wynosząca 12, a wg. bazy Scopus 20. Badania zaprezentowane w

publikacjach zrealizowano na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej w Katedrze Biotechnologii Środowiskowej w ramach projektu dla młodych naukowców nr 08/080/BKM21/0006 wspieranego przez program Unii Europejskiej InterPOWER za pośrednictwem Europejskiego Funduszu Społecznego (grant POWR.03.05.00-00-Z305).

Wszystkie prace są wieloautorskie, co jest typowe dla tak obszernych prac badawczych, mają dwóch (praca 1) oraz czterech (praca 2 i 3) współautorów. We wszystkich publikacjach Pan mgr inż. Filip Gamoń jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Z oświadczeń złożonych przez Doktoranta oraz współautorów prac wynika, że miał znaczący udział w ich przygotowaniu, wynoszący od 60% (publikacja 3) do 70% (publikacja 1 i 2). Ponadto we wszystkich publikacjach Doktorant uczestniczył w najważniejszych etapach składających się na ich przygotowanie; czyli w: zaplanowaniu koncepcji pracy i eksperymentów, prowadzeniu badań laboratoryjnych, analizie i graficznym przedstawieniu wyników, pisaniu pracy wraz z interpretacją wyników i wnioskowaniem oraz korektą pracy przed złożeniem do druku.

Sylwetkę Doktoranta uzupełnia Jego dodatkowy dorobek naukowy w postaci 5 współautorskich publikacji również opublikowanych w czasopismach wyróżnionych przez JCR (*Water Quality Research, Arch. Environ. Prot.* - dwie prace, *Archives of Environmental Protection, International Journal of Environmental Science and Technology*) o sumarycznym IF równym 8,897 (390 punktów MEiN). W sumie Doktorant legitymuje się obecnością w bazie Web of Science Core Collection 7 publikacji cytowanych 30 razy i H-indeksiem równym 3 oraz 8 publikacji w bazie Scopus cytowanych 42 razy.

1. Zasadność doboru tematyki

Rozprawa doktorska mgr inż. Filipa Gamonia dotyczy wpływu wybranych trzech antybiotyków, takich jak: klarytromycyna (CLA), cyprofloksacyna (CIP) i oksytetracyklina (OTC) na proces beztlenowego utleniania amoniaku (ang. anaerobic ammonia oxidation, anammox). Tematyka badawcza jest bardzo aktualna i wnosi nowe informacje do mikrobiologii środowiska związanej z procesem biologicznego oczyszczania ścieków. Azot należy do makroelementów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Z jednej strony jest niezbędny do syntezy biologicznie czynnych substancji komórkowych, tym samym może limitować w środowisku wodnym wzrost np. roślin czy mikroorganizmów heterotroficznych, z kolei z drugiej strony jego nadmierna ilość w zbiornikach wodnych powoduje eutrofizację, prowadząc do zachwiania równowagi ekologicznej. Znaczne ilości azotu, występującego głównie w związkach organicznych i w solach amonowych, znajdują się w ściekach dopływających do oczyszczalni. Jednak tylko część tego azotu jest wykorzystywana do budowy nowych komórek mikroorganizmów prowadzących biochemiczny rozkład zanieczyszczeń. W biologicznych oczyszczalniach ścieków dąży się więc do opracowania rozwiązań technologicznych umożliwiających odprowadzanie do środowiska wodnego jak najmniejszych ilości niewykorzystanych związków azotowych, opartych głównie na procesach biologicznych, nie obciążających nadmiernie biocenozy związkami chemicznymi wykorzystywanymi do ich usuwania. Obserwujemy więc zjawisko rozwijania nowoczesnych technologii usuwania związków azotowych, obok metod konwencjonalnych związanych z zastosowaniem glonów, czy bakterii nitryfikacyjnych i denitryfikacyjnych. Takim procesem jest odkryte w latach 90. XX wieku zjawisko beztlenowego utleniania amoniaku, czyli

anammox. Wysokoefektywne usuwanie azotu w procesie anammox możliwe jest w połączeniu z wcześniejszą częściową nitryfikacją. W porównaniu do standardowego procesu nitryfikacji-denitryfikacji, proces nitytacja- anammox charakteryzuje się znacznie mniejszym zapotrzebowaniem na tlen, nie wymaga zewnętrznego źródła węgla oraz generuje niewielkie ilości osadu nadmiernego. Bakterie anammox zapewniają niezwykle wysoką skuteczność w usuwaniu azotu, ale mają też niestety sporo wad. Wolny czas podziału komórkowego skutkuje bardzo długim czasem wpracowania procesu z ich udziałem w oczyszczalniach ścieków. Ponadto należą do tych kultur bakteryjnych, które możemy badać jedynie metodami biologii molekularnej, bowiem nie jest możliwe wyizolowanie ich w postaci czystych kultur metodami klasycznej mikrobiologii. Współegzystujące z innymi bakteriami przemian azotowych w złożonej biocenozie osadu czynnego są wrażliwe na wiele czynników fizykochemicznych mogących zakłócić ich funkcjonowanie, prowadząc w skrajnych przypadkach do znacznej przebudowy zbiorowiska bakteryjnego. Do związków chemicznych niekorzystnie wpływających na mikrobiologiczne przemiany związków azotowych, w tym na proces anammox, należą antybiotyki. Powszechność stosowania antybiotyków i chemioterapeutyków w leczeniu ludzi i zwierząt powoduje wzrost zawartości tych substancji oraz produktów ich przemian metabolicznych w środowisku, zwłaszcza wodnym, oraz narastanie zjawiska lekooporności mikroorganizmów. Oczyszczalnie ścieków są 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.

Wszystko to **potwierdza aktualność i trafność wyboru tematyki rozprawy doktorskiej przez Pana mgr inż. Filipa Gamonia**. Badania wpisują się bowiem w rosnące zainteresowanie usuwaniem związków azotowych ze ścieków metodami biologicznymi. Jednakże niekorzystne oddziaływanie antybiotyków na bakterie prowadzące proces anammox może utrudniać wdrożenie tego procesu w skali technicznej.

2. Charakterystyka pracy

Autoreferat, napisany w języku angielskim, zawiera spis skrótów i oznaczeń, listę publikacji stanowiących dysertację, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, tezę badawczą, cel i zakres pracy, metody badawcze, omówienie wyników badań, wnioski, kierunki przyszłych badań, bibliografię oraz spis rysunków i tabel. Doktorant w sposób zwięzły przedstawił założenia, metodykę a następnie krótko podsumował i przedyskutował wyniki badań. Strona formalna autoreferatu nie budzi zastrzeżeń.

Publikacje, stanowiące dysertację, obejmują trzy pozycje, z których **pierwsza (1)** jest pozycją przeglądową. Doktorant dokonał w niej przeglądu piśmiennictwa naświetlając zasadność podjęcia dalszych badań. Analizowana literatura dotyczyła informacji na temat procesu anammox oraz wrażliwości bakterii anammox na różne czynniki fizykochemiczne ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na ich metabolizm substancji antybiotycznych. Omówiono wpływ krótko- i długoterminowej ekspozycji zbiorowisk bakterii anammox na działanie różnych stężeń antybiotyków należących do różnych klas związków chemicznych. W przeglądzie piśmiennictwa uwzględniono związane z tym zmiany w aktywności metabolicznej tych bakterii oraz zmiany w bioróżnorodności ich zbiorowisk i w strukturze samej ich biomasy. Przedstawiono wpływ antybiotyków na funkcjonalne geny procesu anammox wraz z

omówieniem molekularnego mechanizmu hamowania beztlenowego usuwania amoniaku pod wpływem tych związków. Zwrócono także uwagę na główne mechanizmy obronne bakterii przed antybiotykami, czyli na zjawisko przenoszenia genów oporności na antybiotyki wśród społeczności mikroorganizmów anammox oraz na funkcję ochronną przed czynnikami stresogennymi zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS). Mechanizmy obronne umożliwiają, w pewnych warunkach, bakteriom przystosowanie się do stresu antybiotykowego wraz z możliwością przywrócenia aktywności biochemicznej po określonym czasie jego trwania. Ponadto substancje EPS odgrywają ważną rolę w agregacji biomasy anammox wpływając na jej właściwości fizykochemiczne i sedymentacyjne.

Przegląd literaturowy umożliwił dostrzeżenie luk w obecnym stanie wiedzy na temat wpływu antybiotyków na proces anammox i pozwolił Doktorantowi na sformułowanie w końcowej części artykułu kierunków dalszych badań nad tym procesem (poszerzenie wiedzy na temat: rodzaju i stężenia antybiotyków obecnych w ściekach, które mogą mieć wpływ na proces anammox; łącznego działania antybiotyków i innych zanieczyszczeń, które mogą współwystępować w ściekach; losów antybiotyków w systemach anammox; oceny wpływu rzeczywistego skażenia antybiotykami ścieków w systemach pilotażowych lub pełnoskalowych).

Tym samym Doktorant mógł sformułować tezę, cel i zakres rozprawy.

Sformulowano tezę, zgodnie z którą występujące w ściekach oksytetracyklina, cyprofloksacyna i klarytromycyna oddziałują z bakteriami anammox inaczej niż z pozostałymi bakteriami usuwającymi azot ze względu na ich specyficzną strukturę komórkową prowadzącą do obniżenia efektywności usuwania azotu ze ścieków i zmiany w ich metabolizmie.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Filipa Gamonia była ocena efektów działania oksytetracykliny, cyprofloksacyny i klarytromycyny na aktywność bakterii anammox.

Realizacja głównego celu naukowego miała zostać osiągnięta przez realizację poszczególnych **celów szczegółowych**. W ramach pracy określono:

1. działanie krótko- i długoterminowe niskiego stężenia antybiotyków (0,001 mg/L) oraz wzrastających stężeń antybiotyków (0,001-100 mg/L) na wydajność procesu anammox,
2. zmiany w strukturze zbiorowisk bakteryjnych anammox oraz analizę gatunków dominujących w obecności wybranych antybiotyków,
3. zmiany liczebności genów funkcjonalnych przemian azotowych w osadzie anammox,
4. efekt działania antybiotyków na właściwości mikroorganizmów i strukturę komórek bakterii anammox,
5. mechanizmy obronne bakterii anammox w odpowiedzi na obecność antybiotyków w oparciu o produkcję zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (ang. extracellular polymeric substances, EPSs) i wymianę genów oporności na antybiotyki (ang. antibiotic resistance genes, ARGs),
6. zależność między gatunkami dominującymi, genami funkcjonalnymi przemian związków azotu i genami oporności na wybrane antybiotyki.

W publikacji **drugiej (2)** przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu wybranych antybiotyków (OTC, CIP, CLA) na efektywność procesu anammox prowadzonego w czterech (jeden kontrolny bez dodatku antybiotyku) sekwencyjnych reaktorach porcjowych typu SBR o

pojemności 1L każdy przez 30 dni w reżymie 1 cykl na dobę. Stosowane w badaniach stężenie każdego antybiotyku wynosiło 0,001 mg/L i było zbliżone do stężeń tych substancji obserwowanych w komunalnych oczyszczalniach ścieków. W trakcie eksperymentów Doktorant przeanalizował wpływ każdego z antybiotyków na szybkość usuwania azotu oraz na aktywność procesu anammox. Wykonał również analizę molekularną (po 1 i 30 dniu) próbek osadów pod kątem obecności funkcjonalnych genów przemian azotowych i genów niosących oporność na badane antybiotyki. Z kolei supernatant analizowano pod kątem produkcji EPSs. W podsumowaniu pracy stwierdzono znikomy wpływ niskich stężeń badanych antybiotyków na usuwanie azotu z reaktorów przy jednoczesnym negatywnym wpływie na proces anammox na poziomie genów. Ponadto antybiotyki obecne w środowisku reakcji indukowały uruchomienie mechanizmów obronnych komórek bakterii anammoks poprzez produkcję EPSs oraz wzrost liczebności ARGs.

W publikacji **trzeciej (3)** Doktorant skupił się na badaniu długiego czasu ekspozycji procesu anammox na te same antybiotyki, wynoszącego 340 dni. Badania prowadzone były również w czterech sekwencyjnych reaktorach porcjowych typu SBR, lecz tym razem o pojemności 5 L każdy. Do układów dozowano pożywkę zawierającą wzrastające stężenia antybiotyków w zakresie od 0,001 do 100 mg/L. Każdy reaktor pracował w reżymie 4 cykli na dobę. Okres eksploatacji reaktorów podzielono na pięć faz. W każdej fazie dozowano inne stężenie antybiotyku: 0 mg/L (1-48d); 0,001 mg/L (49-111d); 1 mg/L (112-201d); 10 mg/L (202-288); 100 mg/L (289-340d). Na starcie eksperymentu oraz na końcu każdej fazy Doktorant pobierał próbki do badań biologicznych, takich jak w publikacji 2, oraz dodatkowo do badań mikroskopowych. Wykorzystanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej umożliwiło badanie wpływu antybiotyków na ultrastrukturę komórek bakterii anammox. Długoterminowe badania wykazały istotny wpływ badanych antybiotyków na efektywność usuwania azotu z hodowli wtedy gdy ich stężenie wynosiło powyżej 1 mg/L. Zaobserwowano także, pod wpływem każdego z antybiotyków, rozwój bakterii należących do typu *Planctomycetes* jednak, podobnie jak w badaniach opisanych w publikacji 2, większość bakterii anammox nie była zdolna do prowadzenia tego procesu. W tym samym czasie, wraz ze wzrostem stężenia antybiotyków, wzrastała liczebność bakterii z rodzaju *Nitrospira*, mogących przeprowadzać proces całkowitej nityfikacji. Odnotowano także wzrost liczebności badanych ARGs oraz syntezę EPSs w celu ochrony komórek przed antybiotykami.

Do realizacji celów pracy Pan mgr inż. Filip Gamoń **wykorzystywał szereg metod badawczych** obejmujących metody chemiczne, biochemiczne, mikroskopowe oraz techniki inżynierii genetycznej.

W badaniach Doktorant analizował zmiany stężeń trzech form azotu (amoniowy, azotynowy, azotanowy) w dopływach i w odpływach reaktorów za pomocą testów fotometrycznych (MERCK Millipore). Na podstawie testów porcjowych mierząc zmiany stężeń azotu ogólnego kalkulował szybkość usuwania azotu (ang. nitrogen removal rate, NRR) oraz aktywność procesu anammoks (ang. specific anammox activity, SAA). Wydzielanie przez komórki bakterii do podłoża substancji pozakomórkowych EPSs określał metodami biochemicznymi poprzez pomiar białka (PN) i polisacharydu (PS) metodą Flint-fenol i metodą Anthrone. W trakcie przeprowadzanych eksperymentów Doktorant pobierał próbki biomasy z reaktorów w celu analizy obecności genów związanych z przemianami azotu w reaktorach,

takich jak: gen *hzo*- gen uczestniczący w procesie anammox kodujący oksydoreduktazę hydrazyny, geny kodujące reduktazę azotynową *nirS* i *nirK* uczestniczące w procesie denitryfikacji (ang. heterotrophic bacteria, HET), gen *amoA* kodujący monooksygenazę amoniową uczestniczącą w procesie utleniania amoniaku do hydroksyloaminy (bakterie nitryfikacyjne I fazy, ang. ammonia-oxidizing bacteria, AOB) oraz gen *nxrA* kodujący oksydoreduktazę azotynową uczestniczącą w procesie utleniania azotynów do azotanów (bakterie nitryfikacyjne II fazy, ang. nitrite oxidizing bacteria, NOB). Do analizy genów antybiotykoodporności obecnych w biomase anammox wybrano gen kodujący oporność na CLA (*mhpA*), trzy geny kodujące oporność na CIP (*qnrB*, *qnrB4*, *qnrS*) oraz trzy geny kodujące oporność na OTC (*tetX*, *tetC*, *tetW*). Wpływ antybiotyków na obecność wyżej wymienionych genów badano przy pomocy metody qPCR. Strukturę genotypową biomasy analizowano z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (ang. next generation sequencing, NGS) w oparciu o region V3-V4 genu kodującego 16S rRNA. Wizualizację zmian w ultrastrukturze bakterii anammox Doktorant przeprowadzał z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. transmission electron microscopy, TEM). Aby zrozumieć związek między gatunkami dominującymi, genami funkcjonalnymi przemian związków azotu i genami oporności na wybrane antybiotyki wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana, wizualizację danych i analizę sieci przeprowadzano za pomocą oprogramowania Gephi (V 0.9.1), a analizę głównych składowych (PCA) wykorzystano w celu wizualizacji oraz wyjaśnienia wpływu czynników środowiskowych na zmiany dominujących rodzajów w biomase.

3. Ocena rozprawy

Tak jak wspomniano na początku, podjęta przez Pana mgr inż. Filipa Gamonia tematyka naukowa rozprawy jest bardzo ważna i aktualna.

Pierwszy etap badań Doktoranta dotyczył zebrania informacji literaturowych na temat zagrożeń wynikających z występowania antybiotyków w środowisku naturalnym oraz występowania tych związków w ściekach i ich wpływu na proces biologicznego oczyszczania z uwzględnieniem procesu anammox.

Przegląd literaturowy pozwolił Doktorantowi na dostrzeżenie brakującej wiedzy związanej z trzema antybiotykami szeroko stosowanymi w medycynie i hodowli zwierząt, a wpływ dwóch z nich, cyprofloksacyny i klarytromycyny, na proces anammox został oceniony w ramach rozprawy po raz pierwszy. Z kolei wiedza na temat działania oksytetracykliny została rozszerzona. Obecność w ściekach CIP i CLA jest szczególnie niebezpieczna. Antybiotyki te zostały bowiem umieszczone na europejskiej liście obserwacyjnej dla substancji, które muszą być monitorowane w środowisku (UE Decyzja 2018/840 z dnia 5 czerwca 2018 r.).

Również badania wybranych antybiotyków w stężeniach poniżej 1 mg/L prowadzono po raz pierwszy, bowiem większość badaczy analizuje zwykle w swoich pracach wpływ wyższych stężeń, które praktycznie nie występują w ściekach.

Ponadto okazuje się, że krótki czas ekspozycji bakterii anammox na antybiotyki jest niewystarczający do obserwacji wpływu tych substancji na społeczności bakterii usuwających azot z hodowli oraz obserwacji produkcji przez nie substancji EPSs tworzących swoistą barierę ochronną komórek przed antybiotykami. Związane to jest przede wszystkim z ich wolnym tempem wzrostu. Tak więc, aby właściwie zrozumieć wpływ OTC, CIP i CLA na proces

anammox, Doktorant przeprowadził także długotrwały eksperyment trwający 340 dni, tworząc jednocześnie warunki do aklimatyzacji bakterii do coraz wyższych stężeń antybiotyków.

Wszystkie powyższe spostrzeżenia wynikające ze studiów literaturowych pozwoliły Doktorantowi skupić się na opisie roli i zależności pomiędzy bakteriami anammoks oraz bakteriami z nimi współistniejącymi w biomasie i też uczestniczącymi w przemianach związków azotowych w odpowiednich warunkach hodowlanych. Badania te miały na celu potwierdzenie sformułowanej przez Doktoranta tezy pracy, *iz badane antybiotyki oddziałują z bakteriami anammox inaczej niż z pozostałymi bakteriami usuwającymi azot ze względu na ich specyficzną strukturę komórkową prowadzącą do obniżenia efektywności usuwania azotu ze ścieków i zmiany w ich metabolizmie.*

Osiągnięcie głównego celu pracy i celów szczegółowych wymagało od Doktoranta realizacji dużego zakresu pracy, co wiązało się z przeprowadzeniem pracochłonnych prac doświadczalnych. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze opanowany przez Doktoranta warsztat badawczy obejmujący techniki badań fizykochemicznych, biochemicznych, molekularnych oraz analizy bioinformatycznej. 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. Zbiór tych prac został poprzedzony opracowaniem mającym charakter dysertacji doktorskiej. Lektura jego treści pokazuje iż zbiór 3 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. Ponadto dostrzega również na podstawie uzyskanych wyników możliwe dalsze kierunki badań które zamieścił na końcu swojego autoreferatu.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych Doktoranta, poza potwierdzeniem tezy pracy, zaliczyłabym:

- Podjęcie po raz pierwszy badań krótko- i długoterminowych nad wpływem cyprofloksacyny i klarytromycyny na proces anammoks;
- Stwierdzenie znikomego wpływu niskich stężeń badanych antybiotyków (OTC, CIP i CLA), zbliżonych do tych występujących w ściekach (0,001 mg/L), na przebieg procesu anammox, przy jednoczesnym niekorzystnym ich wpływie na strukturę społeczności bakteryjnej oraz uruchomieniu mechanizmów obronnych komórek bakterii anammoks wyrażających się poprzez produkcję EPSs oraz wzrostem liczebności w reaktorach genów (ARGs) odpornych na badane antybiotyki;
- Wykazanie, że tylko stężenia powyżej 10 mg/L badanych antybiotyków prowadzą do obniżenia efektywności usuwania związków azotowych, co może stanowić poważny problem dla jakości oczyszczanych ścieków;
 - gdy stężenie antybiotyków OTC, CIP i CLA wzrosło do 10 mg/L zaobserwowano spadek wydajność usuwania azotu (NRE) odpowiednio o 19,9%, 26,57% i 29,9%. Dalsze zmniejszenie wydajności procesu anammox zaobserwowano gdy stężenie antybiotyków wynosiło 100 mg/L (odpowiednio o 27%, 30% i 56%);
 - stwierdzenie, iż klarytromycyna wykazywała największy negatywny wpływ na proces anammox ze wszystkich przebadanych antybiotyków;

- Potwierdzenie współistnienia w biomase innych bakterii przeprowadzających przemiany związków azotowych, takich jak bakterie denitryfikacyjne (HET) i nitryfikacyjne I i II fazy (AOB i NOB);
 - zauważono istotnie statystycznie zmniejszanie się ilości genów *nirS/nirK*, *amoA*, *nrrA* oraz genu *hzo* wraz z wrastającym stężeniem antybiotyków jednak ilość genów związanych z heterotroficznym i autotroficznym usuwaniem związków azotu była cały czas większa niż genu *hzo* związanego z procesem anammox już przy śladowych stężeniach antybiotyków. W tym samym czasie w reaktorze kontrolnym liczebność genu *hzo* rosła;
 - wykazanie w badaniach struktury genotypowej społeczności biomasy znaczącego udziału bakterii z rodzaju *Nitrospira* należących do bakterii NOB i zawierających pełen zestaw genów potrzebnych do przeprowadzenia pełnego procesu nitryfikacji w warunkach beztlenowych w jednym kroku (proces comammox, ang. complete ammonia oxidation). Dzięki temu w obecności antybiotyków wrażliwe bakterie anammox mogą być „wspierane” przez bardziej odporne bakterie NOB *Nitrospira* w procesie stabilnego usuwania związków azotu;
- Stwierdzenie rozwoju w reaktorach bakterii należących do typu *Planctomycetes* oraz dominację wśród nich rodzajów przeprowadzających proces anammox takich jak: *Candidatus Brocadia* i *Candidatus Jettenia* przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości genów *hzo* świadczącym o tym, iż większość tych bakterii nie była zdolna do prowadzenia procesu anammox;
- Potwierdzenie, że bakterie żyjące w zbiorowisku osadu anammox są w stanie ochronić się przed działaniem antybiotyków poprzez produkcję zewnątrzkomórkowych polimerów EPSs oraz wymianę ARGs;
 - udowodnienie, że *Candidatus Jettenia* uczestniczy w transferze ARGs determinujących oporność na CLA;
 - wykazanie, iż bakterie z rodzaju *Nitrospira* odgrywają ważną rolę w przekazywaniu genów oporności na antybiotyki;
- Zaobserwowanie w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej zmian w kształcie komórek bakterii oraz lizę komórek bakterii anammox w obecności CIP i CLA w stężeniach powyżej 10 mg/L.

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. Do jakiej grupy związków chemicznych należą badane w pracy antybiotyki? Czy znane są inne niż przebadane w pracy molekularne mechanizmy obrony komórek bakteryjnych przed tymi związkami?
2. W związku z rosnącym zainteresowaniem usuwania jak największej ilości azotu ze ścieków istnieje potrzeba opracowywania nowych procesów technologicznych, w związku z tym jaka jest możliwość zastosowania w praktyce uzyskanych wyników badań?
3. Na jakie parametry procesu należy zwrócić uwagę próbując wdrożyć proces anammox w skali technicznej?

4. Jakimi układami technologicznymi powinny charakteryzować się oczyszczalnie ścieków wykorzystujące proces anammox do usuwania związków azotu?
5. Jak zmieniałby się wpływ antybiotyków na proces anammox przy zmieniającym się stężeniu biomasy oraz obecności w układzie rzeczywistych ścieków komunalnych?

4. Wniosek końcowy

Podsumowując moją opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr inż. Filipa Gamonia pt.: „*The influence of chosen antibiotics on the anammox process*” przedstawiona w postaci jednotematycznego cyklu trzech publikacji stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w dyscyplinie naukowej *inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka* i wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktoranta. 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* Politechniki Śląskiej wniosek o przyjęcie opiniowanej rozprawy i dopuszczenie Pana mgr inż. Filipa Gamonia do publicznej obrony pracy doktorskiej.

Podpisała Katarzyna Piekarska