



UNIwersytet Warszawski  
Instytut Mikrobiologii

Miecznikowa 1, Warszawa  
e-mail jbielecki@biol.edu.uw.pl, tel.(22) 5541304



Prof. dr hab. Jacek Bielecki,

Warszawa, 10. 07. 2013.

Zakład Mikrobiologii Stosowanej

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Stan - Głasek**  
**„Zdolność wykorzystania sacharozy i polimerów fruktozy przez bakterie żwaczowe**  
**szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis*”**

Pracą doktorską Pani mgr Katarzyny Stan - Głasek została wykonana w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tadeusza Michałowskiego, który od wielu lat zajmuje się badaniami dotyczącymi biologii flory i fauny przewodu pokarmowego ssaków przeżuwających. Nic więc dziwnego, że pod jego opieką powstała rozprawa doktorska Pani magister Stan - Głasek, ściśle związana z tą tematyką. Dysertacja z definicji powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a także wykazać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej. Tak też dzieje się w przypadku rozprawy doktorskiej Pani Stan - Głasek, której rozprawa doktorska jest ściśle związana z problemami identyfikacji i charakterystyki szczepu bakteryjnego wyizolowanego ze żwacza owcy, zdolnego do wzrostu na podłożu zawierającym jako źródło węgla fruktan z tymotki. Założeniem wstępnym pracy było to, że szczep ten najprawdopodobniej ma zdolność do trawienia sacharozy i węglowodanów złożonych z fruktozy. Ocena wykorzystania szczepu zwanego roboczo k3 do trawienia polisacharydów, to główny cel pracy. Jednocześnie praca ma charakter metodyczny, bowiem doktorantka ocenia przy okazji szereg metod biochemicznych jako narzędzi przydatnych do charakterystyki białek biorących udział w trawieniu polisacharydów.

Rozprawa doktorska zatytułowana „Zdolność wykorzystania sacharozy i polimerów fruktozy przez bakterie żwaczowe szczepu k3 *Pseudobutyrvibrio ruminis*” obejmująca zagadnienia związane z charakterystyką bakterii realizujących proces wykorzystania sacharozy i polimerów fruktozy u przeżuwaczy jest aktualna i potrzebna. Tego typu badania są obecnie prowadzone w wielu znaczących ośrodkach naukowych na świecie. Charakterystyka tego typu bakterii może mieć duże znaczenie aplikacyjne, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że drobnoustroje rozkładające polisacharydy są wciąż poszukiwane i wykorzystywane do

bioremediacji środowiska naturalnego człowieka. Układ rozprawy jest klasyczny i typowy dla pracy oryginalnej, tzn. składa się ze wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników oraz dyskusji. Praca zawiera również wnioski końcowe oraz spis literatury. Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona dość obszernym wstępem, który został opracowany na podstawie bogatego piśmiennictwa, co wskazuje na dobrą znajomość obszaru tematycznego prowadzonej przez autorkę pracy i odpowiednie przygotowanie do pracy eksperymentalnej. Dość obszerna jest też część wynikowa, co wynika między innymi z faktu, że doktorantka dla rozwiązania problemów z konieczności pracowała nad różnymi układami eksperymentalnymi prowadzącymi do rozkładu sacharydów w wielu różniących się warunkach hodowlanych. Dane eksperymentalne udokumentowane są 41 rycinami i 5 tabelami. Otrzymane wyniki wnikliwie omówiono w dyskusji. Spis literatury (230 pozycji) obejmuje w dużym stopniu publikacje wydane w ostatnim trzydziestoleciu, ale są wśród nich także pozycje z ostatnich pięciu lat.

Realizacja rozprawy była możliwa między innymi dzięki realizacji projektu promotorskiego. Doktorantka była dobrze przygotowana do rozprawy doktorskiej, ponieważ już wcześniej brała udział w pracach zespołowych związanych z charakterystyką enzymów fruktanolitycznych i sacharolitycznych, a wyniki tych prac były opublikowane w co najmniej 4 czasopismach z listy filadelfijskiej, takich jak *J. Appl. Microb.*, *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, *Folia Microbiol.*, w których doktorantka jest współautorem publikacji, a w jednej pierwszym autorem. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pod względem merytorycznym nie zawiera błędów, chociaż Autorka nie ustrzegła się wielu drobnych błędów, głównie natury językowej i redakcyjnej. Spolszczone nazwy rodzajowe bakterii (np. koki, treponemy) używane przez doktorantkę nie powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej. Często nazwy polskie należą też do żargonu laboratoryjnego (bakterie pałeczkowate to pałki), albo stwierdzenie, iż bakterie barwią się gramujemnie. Nazwę szczepu K3 używałbym po nazwie rodzajowej i gatunkowej, tak jak ma to miejsce w przypadku nazwy klasycznego już w mikrobiologii szczepu laboratoryjnego *Escherichia coli* K12. Jakże karkołomnym sformułowaniem pod względem językowym jest zapis „szczep k3 bakterii *Pseudobutyrvibrio ruminis*”. Oznaczenie szczepu gatunku k3 powinno pozostawać względem ważności na końcu nazwy. Ale, mimo niektórych niedoskonałości oraz trudnych zagadnień i wielkiej ilości informacji w postaci tabel i wykresów czytanie pracy jest stosunkowo łatwe. Z punktu widzenia biologa do najważniejszych osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej należy wykazanie, że konkretne bakterie żwaczowe były zdolne przy pomocy własnego systemu enzymatycznego do trawienia sacharozy oraz niektórych polimerów fruktozy. Jak wspomina doktorantka, wykorzystanie sacharozy oraz specyficzne wykorzystywanie fruktanu z tymotki jest niezwykle

ciekawym zjawiskiem sugerującym mocne przystosowanie badanych drobnoustrojów żwaczowych do użytkowania węglowodanów występujących głównie w trawach zjadanych przez przeżuwacze. Charakterystyka enzymów z tzw. SPE biorących udział w rozkładzie cukrów została wykonana poprawnie i daje przekonujące wyniki. Opis swoistej endolewanazy oraz fosforylasy sacharozy, a także nieswoistej  $\beta$ -fruktofurynazy to bardzo mocne punkty przedstawionej rozprawy doktorskiej. Z punktu widzenia biotechnologii w ochronie środowiska do najważniejszych osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej należy wykazanie, że opisywany szczep K3 nadaje się do intensyfikacji fazy hydrolizy w ramach bioaugmentacji, a przebieg procesu można oceniać stosunkowo prostą metodą przy użyciu technik biochemicznych. Niestety nie udało się doktorantce z całą pewnością wykazać, w jaki sposób dochodzi do indukcji konkretnych białek enzymatycznych, nie opisano także miejsca działania endolewanazy, która jak przypuszcza jedynie doktorantka, może być związana z błoną zewnętrzną bakterii. Jeśli tak, to wystarczyło zrealizować jeden prosty eksperyment wskazujący na powinowactwo białka enzymatycznego z błoną zewnętrzną bakterii. Bardzo ciekawą byłaby też analiza genomiczna badanego zjawiska, tak ważna w przypadku badania zależności regulacyjnych. Przedstawiona w pracy dyskusja tego wyniku w pracy nie jest w pełni przekonująca. W związku z tym wniosek 3 nie jest uprawniony i w zasadzie nie jest to wniosek tylko potwierdzenie uzyskanego wyniku. Na pewno dobrym argumentem w tej sytuacji jest fakt, że prace molekularne w tym zakresie są realizowane zwykle przez duże zespoły naukowe, za wielkie pieniądze i często w dużo dłuższym czasie niż ten przeznaczony do wykonywanej pracy doktorskiej.

Nic nie wiemy także o układzie genetycznym badanego drobnoustroju, a tym samym o możliwościach regulacji produkcji badanych enzymów przy udziale szczepów zmodyfikowanych genetycznie. Zabrakło też tego elementu pracy w dyskusji. Przez to dyskusję należy uznać za nieco niedopracowaną, a to przede wszystkim ze względu na fakt, że coraz więcej laboratoriów, także krajowych, realizuje obecnie projekty badawcze, których celem jest właśnie konstrukcja nowych szczepów mających znaczenie w wielu procesach rozkładu związków organicznych z zastosowaniem bioaugmentacji. Zresztą znaczenia opisywanego szczepu i przeprowadzanych procesów w zakresie bioremediacji również nie dyskutowano. Wykazanie, że uzupełnienie szczepami konstrukcyjnymi środowiska może znacznie wspomagać procesy kierunkowego rozkładu substancji organicznych jest dużym wyzwaniem dla współczesnej biotechnologii i mogłoby znacznie poszerzyć wąskie sprecyzowanie badań w przedstawionej rozprawie. Badane obecnie w wielu innych laboratoriach szczepy konstrukcyjne najczęściej zawierają plazmidy zawierające geny

odpowiedzialne za realizację procesu hydrolizy. Tego typu szczepy bakteryjne mogą być podstawą do wykorzystania obecnie w projektowaniu nowych rozwiązań aplikacyjnych. Być może tego typu badania będą przez doktorantkę kontynuowane.

W podsumowaniu należy uznać, iż postawione cele pracy zostały przez Autorkę osiągnięte, a praca wnosi wiele nowych i cennych informacji w zakresie charakterystyki białek enzymatycznych mających udział w procesach hydrolizy związków organicznych. Pod tym względem praca potencjalnie ma duże znaczenie aplikacyjne, a wyniki uzyskane powinny w przyszłości znaleźć zastosowanie w publikacji albo w opracowanym patencie (brak danych na ten temat).

Biorąc powyższe rozważania nad rozprawą pod uwagę, uważam że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Stan - Głasek spełnia wszystkie podstawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii I Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK**  
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego

*[Podpis]*  
**prof. dr hab. Jacek Bielecki**