

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Renaty Miltko pt. „Zdolności chitynolityczne orzęsków *Eudiplodinium maggii* i ich udział w przemianach chityny w żwaczu”

Żwacz można scharakteryzować używając w przenośni terminu „skomplikowanej fabryki”, w której odbywa się degradacja i przemiana cukrów o tak zmienionej strukturze, że stają się niedostępne przy normalnym sposobie trawienia przez enzymy zwierzęcia. Cukry te zostają w żwaczu degradowane aby w rezultacie dostarczyć zarówno energii jak i składników strukturalnych dla zwierzęcia, takich jak tłuszcze i niektóre aminokwasy. Jest to więc fabryka w której odbywają się procesy przy zastosowaniu „wyrafinowanej biotechnologii”. W ten sposób następuje przeniesienie energii w łańcuchu pokarmowym, w którym energia promieni słonecznych jest gromadzona w roślinach za pośrednictwem fotosyntezy, jest następnie przenoszona na herbivora (posiadającymi żwacz) następnie na carnivora aby w końcu służyć człowiekowi. Z tych powodów procesy zachodzące w żwaczu są bardzo ważne zarówno z punktu widzenia teoretycznego, stanowiąc wdzięczny temat do badania mechanizmów biologicznych oraz ze względu na aspekty praktyczne, aby wykorzystać badania w poprawieniu produktywności zwierząt.

W Instytucie w Jabłonie biologią mikroorganizmów żwacza zajmował się od początku istnienia Instytutu dr Aleksander Ziółcki. Obecnie Jego dzieło kontynuuje prof. dr hab. Tadeusz Michałowski z zespołem młody badaczy. Jego zespół wysunął się na czoło zespołów naukowych badających mikroorganizmy żwacza.

Obecna rozprawa jest kontynuacją bardzo ważnych badań dotyczących trawienia i przemian chityny w żwaczu przez jego mikroorganizmy szczególnie przez orzęska *Eudiplodinium maggii*. Orzęski izolowano z płynu żwacza owiec i hodowano w warunkach *in vitro* lub wszczepiano do żwacza zwierząt, którym usunięto poprzednio ich naturalną faunę orzęsków.

Autorka obrała jako przedmiot badań następujące zagadnienia i problemy:

- 1) wpływ dodatku chityny i zoospor grzybów żwaczowych do podłoża hodowlanego na przeżywalność i liczebność populacji orzęsków *Eudiplodinium maggii* w warunkach *in vitro*;
- 2) zdolność trawienia chityny i zarodników grzybów żwaczowych przez orzęski oraz wykorzystanie uzyskanych produktów jako źródła węgla w przemianach dostarczających im energii;
- 3) identyfikacja i charakterystyka enzymów katalizujących rozkład chityny w komórkach pierwotniaków;
- 4) wpływ badanych orzęsków na zawartość i produkcję chityny w żwaczu owiec;
- 5) udział pierwotniaków *Eudiplodinium maggii* w przemianach chityny w żwaczu owiec.

Rozprawa liczy 141 stron i składa się z 10 rozdziałów:

I. Wstęp; II. Materiał i metody; III. Wyniki; IV. Dyskusja; V. Wnioski; VI. Literatura; VII. Spis tabel; VIII. Spis rysunków; IX. Streszczenie; X. Abstract.

We wstępie Autorka omówiła teoretyczne przesłanki i aktualną wiedzę, dotyczące ssaków przeżuwających, mikroorganizmów żwacza i ich roli biologicznej oraz scharakteryzowała strukturę i mechanizmy przemiany chityny w żwaczu. Wstęp jest napisany

jasno z uwzględnieniem literatury naukowej, ale także cytuje publikacje starsze, co należy zauważyć z aprobatą, jak na przykład publikację prof. Zdzisława Raabego z 1964 r., który był pionierem protozoologii w Polsce. Dla jaśniejszego wykładu Autorka zamieściła w tym rozdziale 6 rysunków.

Rozdział II. Materiał i metody – zawiera omówienie metodyki badań zastosowanych w pracy. Należy podkreślić z uznaniem wprowadzenie bardzo nowoczesnej metodyki liczenia zarodników grzybów przy zastosowaniu techniki real time PCR. W tym rozdziale umieszczono 2 tabele i 7 rysunków. Zauważyłem błąd w tabeli 2.1.: druga pozycja od dołu jest $\text{NaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ a powinno być: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$.

Rozdział III. Wyniki – zawiera rezultaty przeprowadzonych badań. W tym rozdziale umieszczono 7 tabel i 19 rysunków.

Rozdział IV. Dyskusja – zawiera omówienie wyników na tle badań światowych w tej dziedzinie.

Rozdział VI. Literatura – zawiera 242 pozycje cytowane w związku z wykonanymi badaniami.

Badania Autorki przeprowadzone *in vitro* wykazały, że przeżywalność orzęsków *Eudiplodinium maggii* hodowanych na podłożu zawierającym roztwór soli o stałym składzie chemicznym i chitynę albo zarodniki grzybów nie przekraczała 4 dni. Dodanie do podłoża płynu żwacza i glutenu wydłużało przeżywalność tych orzęsków do kilku dalszych dni i dłużej. Podłoże zawierające ten sam roztwór i siano łąkowe oraz gluten pszeniczny pozwalało na przeżywalność orzęsków przez około 28 dni. Dodatek chityny do tego podłoża stymulował wzrost populacji tego orzęska w sposób istotny. Dalsze eksperymenty wykazały, że inkubacja *Eudiplodinium maggii* z chityną i zoosporami grzybów żwaczowych indukowała biosyntezę lotnych kwasów tłuszczowych: kwasu octowego, który stanowił 72,0 i 77,7% wszystkich

kwasów, kwas masłowy – 21,1 i 12,2% i kwas propionowy 6,9 i 11,0%, odpowiednio. Ogólna aktywność chitynolityczna *Eudiplodinium maggii*, przy użyciu surowego preparatu enzymatycznego tych orzęsków, wynosiła około 0,035 μM uwolnionej N-acetyloglukozoaminy /mg białka/min. Preparat enzymatyczny powodował całkowity rozkład chityny a końcowymi produktami były N-acetyloglukozoamina, chitobioza i chitotrioza. Badania zymograficzne wykazały, że w preparacie orzęsków *Eudiplodinium maggii* były obecne następujące enzymy: endochitynaza, egzochitynaza i chitobiaza. Oczyszczanie białka pochodzącego od tych orzęsków na zsieciowanym dekstranie Seph. G-150 wykazało, że enzymy endochitynaza i chitobiaza wypływały z kolumny w tych samych frakcjach, natomiast enzymy o cechach egzochitynazy wypływały z kolumny nieco później, co sugerowało ich większą masę cząsteczkową. Autorka określiła masę cząsteczkową endochitynazy 62 kDa, chitobiazы – 51 kDa i egzochitynazy – 41 kDa. Badania *in vivo* wykonano używając trzy owce, którym założono trwałe przetoki żwacza. W okresie kontrolnym owce nie posiadały żadnych orzęsków w żwaczu, a w okresie doświadczalnym posiadały orzęski *Eudiplodinium maggii*. Stwierdzono, że chityna obecna w zarodnikach grzybów żwacza stanowiła 81-99% całkowitej zawartości chityny i odpowiadała liczbie zoospor. Całkowita zawartość chityny, z której mogły korzystać orzęski w ciągu 12 godzin wynosiła 6,2 g. Intensywność trawienia chityny wynosiła około 3%/godzinę.

Badania wykazały również, że orzęski *Eudiplodinium maggii* są zdolne do trawienia i wykorzystania chityny syntetyzowanej w żwaczu. Na podstawie przeprowadzonych badań, analizy wyników oraz po wykonaniu obliczeń statystycznych, przy użyciu programów Excel 2003 i Statistica 6.0 i analizy statystycznej wyników wykonanych metodą jedno- i dwuczynnikowej analizy wariancji: Autorka sformułowała następujące wnioski, mające pełne uzasadnienie w otrzymanych wynikach badań:

- 1) Siano łąkowe jest niezbędnym składnikiem podłoża hodowlanego w badaniach wpływu chityny i liofilizowanych zarodników grzybów żwaczowych na liczebność orzęsków *Eudiplodinium maggii* podczas długookresowej hodowli *in vitro*.
- 2) Stymulujący wpływ chityny i zarodników grzybów na rozwój populacji *Eudiplodinium maggii* był wynikiem wzbogacenia podłoża hodowlanego o te składniki odżywcze, które umożliwiają pokrycie kosztów zwiększonej syntezy komórek orzęsków.
- 3) Przyrost stężenia lotnych kwasów tłuszczowych w podłożu, obserwowany podczas wykonywania doświadczeń fermentacyjnych wskazuje, że chityna i węglowodany zawarte w zoosporach grzybów były trawione i wykorzystywane jako źródło węgla w procesach dostarczających pierwotnikom energii.
- 4) W trawieniu chityny w komórkach orzęsków *Eudiplodinium maggii* uczestniczą enzymy o właściwościach endochitynazy i chiobiazy. Endochitynaza może być uważana jako enzym wyznaczający szybkość trawienia chityny.
- 5) Głównym źródłem chityny w płynie żwacza są zarodniki grzybów. Pierwotniki *Eudiplodinium maggii*, stymulując rozwój grzybów w żwaczu sprzyjają tworzeniu się nowych zarodni i powstawaniu zwiększonej liczby zarodników. Wynikiem tych procesów jest przyrost zawartości chityny w płynie żwacza.
- 6) Orzęski *Eudiplodinium maggii* wykorzystują niewielką część chityny syntetyzowanej w żwaczu. Pełnią one drugorzędną rolę w przemianach tego węglowodanu w żwaczu. Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy wydaje się być bardzo mały wychwytywanie zarodników grzybów, które są głównym źródłem chityny dla pierwotników.

Nie analizuję dokładnie wszystkich drobnych błędów słownych (np. s. 136, wiersz 12 od góry: „egzochitynazyzy” czy użycie słowa „puryfikacja”), ponieważ nie umniejszają one nawet w najmniejszym stopniu, wartości rozprawy a będą usunięte przed oddaniem manuskryptu do druku.

Podsumowując moją ocenę rozprawy uważam, że rozprawa ta jest ważną i cenną pozycją naukową, jest wielkim osobistym osiągnięciem naukowym Autorki a pośrednio także zespołu badawczego i Instytutu.

Stwierdzam z głębokim przekonaniem, że Rozprawa Doktorska Mgr Renaty Miltko pt. „Zdolności chitynolityczne orzęsków *Eudiplodinium maggii* i ich udział w przemianach chityny w żwaczu” spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 z 16 kwietnia 2003 r., poz. 595) wraz ze zmianami wprowadzonymi Ustawą – Prawo o szkolnictwie wyższym z dnia 27 lipca 2005 r. (Dz.U. Nr 164 poz.1365).

Dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN o przyjęcie niniejszej rozprawy.

Wnoszę również o przyjęcie tej rozprawy z wyróżnieniem.



Prof. dr hab. Kazimierz Kochman