

Recenzja

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

Wśród ssaków bardzo interesującą grupą są zwierzęta przeżuwające (poligastryczne), a to ze względu na odmienny, w porównaniu z ssakami monogastrycznymi, sposób trawienia przez nie pokarmu. Ich żołądek składa się bowiem z czterech części, z których żwacz jest największą, będącą w zasadzie komorą fermentacyjną, ze względu na fakt, że odbywające się tam przemiany składników pokarmowych zachodzą w warunkach beztlenowych. Zatem jego wnętrze jest doskonałym środowiskiem do rozwoju drobnoustrojów beztlenowych. Można go też uważać za swoisty ekosystem, którego biotopem jest treść pokarmowa, a biocenozą zasiedlające go mikroorganizmy.

Dotychczasowe badania wykazały, że mikroorganizmy zasiedlające żwacz (bakterie, grzyby, pierwotniaki) pełnią kluczową rolę w procesie trawienia i przyswajania składników pokarmowych u przeżuwaczy. Szczególnie bakterie były dotychczas obiektem licznych badań, natomiast stosunkowo niewiele prac poświęcono roli pierwotniaków żwaczowych, wśród których orzęski (*Ciliata*), będące obiektem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej, pod względem swojej biomasy mogą dorównywać bakteriom. W tym miejscu chciałbym z satysfakcją podkreślić osiągnięcia zespołu badawczego kierowanego przez Prof. Tadeusza Michałowskiego dotyczące procesów trawiennych przeżuwaczy z udziałem tej właśnie grupy pierwotniaków. Swego czasu miałem okazję recenzować rozprawę doktorską p. Krzysztofa Wereszki z tego Instytutu, dotyczącą aktywności celulitycznej i ksylanolitycznej orzęsków żwaczowych, obecna rozprawa dotyczy zdolności

chitynolitycznych, i jak wykażę w dalszej części tej recenzji, jej tematyka badawcza jest bardzo ważna, aktualna i ma duże znaczenie poznawcze, a także może mieć znaczenie praktyczne w hodowli zwierząt. Przecież ciągle jeszcze dodaje się do paszy mączkę z kryła, a na pewno w różnej postaci drożdże. Powstaje pytanie, czy jest sens by to czynić? Czy zawarta w nich chityna jest trawiona i wykorzystywana?

Źródłem chityny w żwaczu są głównie grzyby: ich grzybnia, która jest związana ściśle ze stałymi fragmentami treści pokarmowej, oraz ich zarodniki (zoospory) wolno pływające w żwaczu. Mogą one stanowić około 8 % biomasy wszystkich drobnoustrojów żwaczowych, co niewątpliwie stawia je w rzędzie ważnego źródła węgla, co niewątpliwie uzasadnia podjęcie wnikliwych badań związanych z ich udziałem w procesach trawiennych przeżuwaczy.

Zasadniczym celem recenzowanej rozprawy było zbadanie roli orzęsków z gatunku *Eudiplodinium maggii* w przemianach chityny w żwaczu owiec. Badania te polegały przede wszystkim na dokładnym określeniu ich aktywności chitynolitycznej, oraz identyfikacji głównych enzymów uczestniczących w trawieniu, zarówno czystej chityny (komercyjnej), jak i zoospor grzybów żwaczowych, w komórce tego pierwotniaka w warunkach *in vitro*. Doświadczenia przedstawione w tej części rozprawy zaliczyłbym do jej najważniejszych osiągnięć, zostały bowiem wykonane w ściśle określonych warunkach, z uwzględnieniem licznych i dobrze zaplanowanych eksperymentów kontrolnych, co nie zawsze można było wykonać w przypadku badań *in vivo*.

Do bardzo interesujących celów podjętych w tej rozprawie było też zbadanie zawartości i przemian chityny *in vivo*, a więc w samym żwaczu, w jego tak specyficznym dla mikroorganizmów ekosystemie i to pomimo, że jak zaznaczyłem powyżej, nie we wszystkich przypadkach można było zastosować odpowiednie kontrole. Chociaż i tutaj, nie widziałbym

przeciwwskazań, by zarówno w pierwszym (podczas defaunacji), jak i w drugim (refaunacji) etapach badań *in vivo*, podawać owcom antybiotyki, podobnie jak to czyniono w doświadczeniach *in vitro* w celu pozbycia się bakterii. Oczywiście zabieg taki nie wyeliminowałby całkowicie ewentualnych bakterii chitynolitycznych na długi czas (np. 30 dni trwania pierwszego etapu), ale przynajmniej w krótkim okresie, warunki doświadczenia byłyby porównywalne.

Innym celem prezentowanych badań było określenie wpływu wybranego gatunku pierwotniaków na zawartość i produkcję chityny w żwaczu owiec (punkt 4, str. 21). Było to dużym zaskoczeniem dla mnie jako recenzenta, gdyż tego typu badań nie zapowiada tytuł rozprawy, dotyczący chitynolitycznych właściwości badanego gatunku pierwotniaków. Synteza chityny w żwaczu, to przede wszystkim domena żyjących w nim grzybów. Wyjaśnienie tej wątpliwości znalazłem dopiero na samym końcu rozdziału Wyniki. To nie badane pierwotniaki syntetyzowały chitynę, ale stymulowały one wzrost liczby zoospor grzybów, a tym samym pośrednio zwiększała się ilość chityny w żwaczu, po refaunacji owiec. Ewidentnie więc ten punkt w celach pracy został niewłaściwie sformułowany. A tak na marginesie, chciałbym prosić Autorkę podczas obrony rozprawy o szersze, niż jest to w części Dyskusja (str. 92), wyjaśnienie mechanizmu takiej stymulacji.

Przedstawiona praca zawiera bardzo obszerny materiał doświadczalny do zgromadzenia, którego niezbędne było dobre opanowanie przez Autorkę różnych metod badawczych, związanych z prowadzeniem hodowli pierwotniaków żwaczowych *in vitro*, a przede wszystkim konieczna była znajomość licznych technik biochemicznych, w tym również biologii molekularnej.

Obszerny Wstęp, liczący 20 stron, to bardzo dobre i kompetentne wprowadzenie do tematyki rozprawy. Zawarte w nim, bowiem informacje

nie tylko dotyczą charakterystyki badanych pierwotniaków, ich roli w procesach trawiennych u przeżuwaczy, ale zawiera także wszystkie istotne dane na temat mikroflory i mikrofauny tego tak bardzo specyficznego ekosystemu, jakim jest środowisko żwacza. W konsekwencji otrzymuje się przekonujące dowody z cytowanego piśmiennictwa, uzasadniające cele rozprawy, które w uproszczonej formie przedstawiłem powyżej.

Część dotycząca zastosowanych metod badawczych została w zasadzie dobrze i wyczerpująco przedstawiona. Właściwie nie mam żadnych bardzo istotnych uwag dotyczących części biochemicznej, w tym metod enzymatycznych. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowoczesnych technik biologii molekularnej (18S rRNA - PCR) w badaniach liczebności populacji zoospor grzybów w płynie żwacza, zarówno owiec defaunowanych jak i refaunowanych. Szkoda tylko, że dla weryfikacji poprawności tych oznaczeń nie przeprowadzono chociażby wstępnych badań z zastosowaniem zliczania zoospor pod mikroskopem. Metodę taką stosowano z powodzeniem w badaniach *in vitro*. Moim zdaniem, lepiej byłoby zdecydować się na jedną metodę (mikroskopową lub PCR) zarówno w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Byłaby to też dodatkowa, oprócz przedstawionych w pracy, kontrola właściwie wykonanych starterów. Z drugiej jednak strony, metoda q-PCR miała tę zaletę, że można ją było stosować do analizy materiału liofilizowanego i zamrażanego, a nawet utrwalanego formaliną, co było dużym ułatwieniem przy organizacji badań. Zwykle wykonuje się też reakcję PCR na samych tylko starterach, dla potwierdzenia prawidłowej ich syntezy, czego Autorka nie wykonywała, polegając na renomie firmy Genomed, która je zaprojektowała i wykonała.

Inne moje uwagi odnośnie stosowanych metod badawczych dotyczą kontroli związanych z ewentualną obecnością bakterii

chitynolitycznych w badanych próbach. Wprawdzie Autorka stosowała zestaw trzech antybiotyków (chloramfenikol, streptomycynę i ampicylinę) do ich wyeliminowania z zawiesiny pierwotniaków, ale po pierwsze, nie stosowano ich w badaniach *in vivo*, a po drugie, mogły one być odporne na te antybiotyki. Czy na wstępie nie należało wykonać tzw. antybiogramów?

Mniej istotne uwagi to: brak informacji o czystości stosowanej chityny z pancerzy krabów firmy Sigma (str. 24) i brak podanej firmy i stężeń użytych do badań enzymów chitynolitycznych (str. 34).

Mimo tych zastrzeżeń Autorka uzyskała bardzo interesujące i dość jednoznaczne wyniki. Najważniejszym, moim zdaniem, osiągnięciem recenzowanej rozprawy jest stwierdzenie, że badane orzęski z gatunku *Eudiplodinium maggii* biorą udział w trawieniu chityny, dzięki posiadaniu enzymów o właściwościach chitynolitycznych. W tym aspekcie wniosek 2 (str. 160), że orzęski te prawdopodobnie wykorzystują chitynę do „pokrycia kosztów zwiększonej syntezy materii komórkowej..” jest, moim zdaniem, zbyt ostrożny. Wydaje mi się (jestem tego pewien), że Autorka uzyskała przekonujące dowody pod tym względem.

Drugim, bardzo ważnym osiągnięciem tej pracy jest stwierdzenie, że zarówno chityna komercyjna jak i znajdująca się w zoosporach grzybów, były trawione przez badane pierwotniaki i wykorzystywane jako źródło węgla w ich przemianach energetycznych, co ustalano na podstawie badania stężeń uwalnianych w tym procesie lotnych kwasów tłuszczowych (LKT). Tu uwaga do punktu 3 Wniosków, w którym Autorka, zamiast stwierdzenia wprost, że chityna znajdująca się w zoosporach była trawiona, używa terminu „węglowodany zawarte w zoosporach grzybów były trawione..” Czy oprócz chityny, chodziło jeszcze o jakieś inne węglowodany? W tym miejscu, chciałbym też prosić o wyjaśnienie kwestii składu uwalnianych podczas procesu

fermentacji chityny. Autorka pisze, że w uwalnianych LKT, w zdecydowanej przewadze był kwas octowy, co jak wiemy, charakteryzuje głównie fermentację chityny przez bakterie chitynolityczne. Natomiast w czasie rozkładu chityny przez pierwotniaki uwalniany jest raczej kwas masłowy, który występował w najniższym stężeniu. Czy przypadkiem nie potwierdzałoby to mojego poprzedniego przypuszczenia, że stosowane antybiotyki nie eliminowały całkowicie bakterii z badanych próbek?

Wreszcie trzecim, bardzo ważnym osiągnięciem rozprawy, jest zidentyfikowanie trzech enzymów chitynolitycznych badanego gatunku pierwotniaka. Badania te przeprowadzono z godną podziwu precyzją i starannością. Wykorzystano w nich nowoczesne metody sączenia molekularnego, a przede wszystkim trudną metodę zymografii, po uprzednim, elektroforetycznym rozdziale białka na żelu poliakrylamidowym. Zaś końcowe produkty hydrolizy chityny zidentyfikowano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

Bardzo dobrze opracowaną częścią pracy jest jej dyskusja, w której Autorka wykazała się sporym ładunkiem krytycyzmu, co bardzo podwyższa wartość recenzowanej pracy. Wynikają z niej również propozycje badań na przyszłość, jak chociażby interesująca obserwacja dotycząca wykorzystania zoospor grzybów przez badane pierwotniaki. Istotnie, zastanawiającym jest, dlaczego dopiero po 20-28 dniach od dodania liofilizowanych zarodników grzybów następował wyraźny wzrost liczby pierwotniaków? Autorka tłumaczy, że w tym przypadku, badane „orzęski wymagały stosunkowo długiego okresu adaptacji do zarodników jako źródła składników odżywczych. Co w tym przypadku kryje się pod terminem „adaptacja” i jakie towarzyszą jej procesy? To z pewnością może być bardzo ciekawe i ważne zagadnienie dla przyszłych badań.

Praca została napisana dobrym językiem polskim i czyta się ją z dużą przyjemnością. Oczywiście wolałbym by zamiast „Izolacja i

puryfikacja DNA” (str. 45) użyto terminu „oczyszczanie DNA”, czy zamiast wyrażenia „...spowodowała numeryczny przyrost liczby zoospor...” (str. 71), napisać, „spowodowała wzrost liczby zoospor”. Jednakże podobne „uchybień” są stosunkowo nieliczne, jak na ok. 140 stronicowy tekst. Oprócz tego, do słownictwa naukowego wchodzi nowe, obcojęzyczne, wyrażenia i należy je przyjmować jako *signum temporis!*

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Renaty Miltko pt. „*Zdolności chitynolityczne orzęsków Eudiplodinium magii i ich udział w przemianach chityny w żwaczu*” jest poważnym wkładem do naszej wiedzy o udziale pierwotniaków w procesach trawiennych zachodzących w żołądku zwierząt przeżuwających. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie przez Autorkę nowoczesnych metod biochemicznych i biologii molekularnej. Szczególnie godne uwagi jest zastosowanie elektroforezy białek do przeprowadzenia trudnych technik zymograficznych.

Stosując te metody, Autorka była w stanie scharakteryzować skład enzymów chitynolitycznych występujących u *Eudiplodinium magii*, co jest bardzo dużym osiągnięciem.

Przedstawioną mi do recenzji rozprawę oceniam wysoko i proponuję Radzie Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego* PAN w Jabłonie jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Renatę Miltko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Proponuję też wyróżnienie tej rozprawy odpowiednią nagrodą.

Warszawa, dnia 12.05.2011


Prof. dr hab. Bronisław Cymborowski