



Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych
Instytut Nauk Medycznych

Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR

Rzeszów, 26.07.2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Skotniczny pt. „Bioróżnorodność bakterii kwasu mlekowego izolowanych z tradycyjnych produktów fermentowanych oraz ocena ich wybranych cech technologicznych”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Magdaleny Skotniczny, wykonana w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Pawła Satory, ma postać monografii obejmującej łącznie 157 stron, opracowanej bardzo starannie i zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Bakterie kwasu mlekowego (ang. Lactic Acid Bacteria, LAB) stanowią niejednorodną filogenetycznie grupę bakterii Gram-dodatnich, wyodrębnioną ze względu na ich zdolność do syntezy kwasu mlekowego podczas homo- lub hetero-fermentacji. Bakterie te są zróżnicowane ze względu na cechy morfologiczne, fizjologiczne, genetyczne. Ponadto, charakteryzuje je różnorodność zasiedlanych środowisk, co znajduje odzwierciedlenie w różnorodnych zdolnościach metabolicznych tych bakterii. Z tego powodu bakterie LAB są szeroko wykorzystywane w wielu dziedzinach, w tym w przemyśle spożywczym, medycynie, rolnictwie i środowisku. Nie dziwi więc, że badania nad bakteriami LAB są intensywnie prowadzone, skoro coraz dokładniejsze ich poznanie znajduje tak szerokie praktyczne i naukowe implikacje. Niektóre szczepy bakterii LAB stanowią bardzo ważny element naturalnej mikrobioty ludzi i zwierząt, a z uwagi na ich profilaktyczne i terapeutyczne działanie znalazły zastosowanie także jako probiotyki. Prowadzone badania pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy działania probiotyków, ich wpływ na odporność, prowadzą do wyjaśnienia podłoża różnych chorób przewlekłych. Niektóre bakterie LAB mają zdolność do wytwarzania substancji przeciwdrobnoustrojowych i stymulowania wzrostu roślin, co może

być wykorzystane w ochronie roślin przed szkodnikami i chorobami oraz przyczynić się do rozwijania ekologicznych metod ochrony roślin. Bakterie LAB mogą odgrywać rolę w przenoszeniu genów oporności na inne mikroorganizmy przyczyniając się do rozprzestrzeniania lekooporności wśród bakterii. Zjawisko oporności bakterii patogennych na antybiotyki jest coraz bardziej problematyczne dlatego badania te mogą pozwolić na głębsze rozumienie zjawiska i wspomóc walkę z problemem narastającej lekooporności. Szczególne zastosowanie bakterii LAB opiera się na ich zdolności do fermentacji. Wykorzystanie bakterii LAB może przyczynić się m. in. do rozwoju zrównoważonych i ekologicznych metod produkcji biopaliw. Szczególne zastosowanie bakterie fermentacji mlekowej znajdują w przemyśle spożywczym. Bakterie LAB są kluczowe jako kultury starterowe do produkcji pasz zwierzęcych i żywności fermentowanej. Badania nad tymi drobnoustrojami pozwalają doskonalić procesy fermentacji, kontrolować jakość i bezpieczeństwo żywności, a także rozwijać nowe i innowacyjne produkty. Pożądane właściwości bakterii LAB często są cechami szczepozależnymi. Rozwój właściwych mikroorganizmów jest niezbędny do uzyskania smaku i aromatu charakterystycznego dla fermentowanego produktu. Z tego powodu dużą wagę przywiązuje się do łączenia istotnych technologicznie właściwości z konkretnym szczepem. To właśnie w ten kierunek badań nad bakteriami LAB, wpisują się badania bioróżnorodności bakterii kwasu mlekowego izolowanych z tradycyjnych produktów fermentowanych przedstawione w przedłożonej do recenzji rozprawie doktorskiej. Podjętą w pracy tematykę uważam za w pełni uzasadnioną i ważną.

Celem pracy była charakterystyka mikrobioty dwóch tradycyjnych produktów fermentowanych oraz izolacja, identyfikacja i charakterystyka dominujących w nich szczepów LAB pod względem wybranych cech technologicznych. Doktorantka precyzując cel pracy wymieniła cele szczegółowe, które dobrze odzwierciedlają porządek przeprowadzonych badań: 1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z materiału poddanego spontanicznej fermentacji, 2. Ocena bioróżnorodności izolatów LAB, 3. Identyfikacja szczepów LAB, 4. Identyfikacja mikrobioty bakteryjnej badanych produktów fermentowanych za pomocą metod niehodowlanych (16S rRNA NGS), 5. Charakterystyka szczepów pod względem wybranych cech technologicznych. Do czwartego celu mam małą uwagę - chodzi raczej o jedną metodę więc zastosowanie liczby mnogiej nie jest właściwe. Doktorantka postawiła również trzy tezy badawcze. Moje zastrzeżenie budzi niewystarczająco precyzyjnie sformułowana pierwsza teza: „Identyfikacja bakterii kwasu mlekowego wyizolowanych z różnych produktów fermentowanych oparta m. in. o sekwencjonowanie DNA dostarczy informacji o dominujących gatunkach”. Nie wiadomo o jakie sekwencjonowanie DNA chodzi. Co prawda, zastosowane w pracy sekwencjonowanie NGS, oparte o fragment V3-V4 genu 16S rRNA, pozwala na uzyskanie informacji na temat składu ilościowego bakterii, w tym bakterii

dominujących, ale nie na poziomie gatunku. Natomiast nie wszystkie gatunki wchodzące w skład mikrobioty można wyhodować w laboratorium więc założenie, że te, które uda się otrzymać w hodowli dadzą obraz gatunków dominujących nie jest poprawne. Doktorantka postawiła jeszcze dwie tezy: „Bakterie kwasu mlekowego wyizolowane z tradycyjnych produktów fermentowanych, w zależności od pochodzenia, wykazują odmienne cechy technologiczne” oraz „Zdolność do produkcji różnych metabolitów przez bakterie kwasu mlekowego izolowane z tradycyjnych produktów fermentowanych są cechami szczepozależnymi”. Obie tezy nie budzą moich zastrzeżeń.

Do eksperymentów Doktorantka wybrała dwa polskie tradycyjne produkty fermentowane – kapustę kiszoną i Bryndzę Podhalańską. W przypadku kapusty badania dotyczyły czterech odmian z różnych dni fermentacji (zmiennie), natomiast badane bryndze były gotowym produktem i różniły się producentem oraz datą produkcji. Doktorantka wykazała, że jeden biotyp bakterii LAB (biotyp 5) występował u dwóch różnych odmian kapusty, co wskazywać może na ich powiązania poprzez podobny obszar uprawy. Uważam, że użyteczna byłaby większa wiedza na temat miejsca uprawy kapust czy ewentualnych zabiegów u zwierząt, od których pochodziło mleko do produkcji badanych serów, skoro ich początkowe obciążenie mikrobiologiczne może mieć wpływ na skład mikrobioty badanych produktów.

Metody badawcze wykorzystane w pracy zostały właściwie dobrane i prawidłowo zastosowane dla weryfikacji postawionych tez. Doktorantka zastosowała metody klasyczne (posiewy mikrobiologiczne na odpowiednie podłoża oraz testy fermentacyjne) oraz metody biologii molekularnej tj. PCR-RAPD dla typowania genetycznego, sekwencjonowanie genu 16S rRNA w celu identyfikacji gatunkowej uzyskanych izolatów oraz sekwencjonowanie nowej generacji zmiennych regionów V3-V4 genu 16S rRNA w celu analizy mikrobioty badanych produktów. Dla oznaczenia wybranych cech technologicznych Doktorantka zastosowała metody chromatografii: HPLC RID dla oznaczenia zawartości cukrów, HPLC dla oznaczenia kwasów organicznych oraz HS-SPME-GS-MS dla oznaczenia związków lotnych. Dla analiz wyników zastosowała prawidłowo dobrane programy i metody statystyczne.

Ciekawi mnie wykorzystanie automatycznego systemu do izolacji kwasów nukleinowych z serów pozyskanych w 2016 roku. Czy ilość izolatów bakteryjnych uzasadniała zastosowanie tej metody? Ponadto, moje zastrzeżenia budzi niewystarczająca dokumentacja identyfikacji gatunkowej bakterii. Choć użyto powszechnie stosowaną metodę identyfikacji z użyciem uniwersalnych starterów, a wielkości produktów amplifikacji umieszczono w Tabeli 12, to jednak warto byłoby dołączyć zdjęcie żelu elektroforetycznego z produktami amplifikacji. Dziwi mnie wysyłanie do firmy, która przeprowadzała identyfikację gatunkową, próbek zawierających końcowe stężenie matrycy wraz ze starterami (domyślam

się, że chodzi o startery do sekwencjonowania). Im mniejsze stężenie wyizolowanego DNA tym mniejsza jego stabilność, natomiast startery dodaje się bezpośrednio przed reakcją. Proszę o wyjaśnienie. Brak również dokumentacji analizy sekwencji otrzymanych w wyniku sekwencjonowania metodą Sangera z wykorzystaniem programu BLAST. Ciekawi mnie też dlaczego gatunkowo-specyficzną amplifikację genu *mutL* wykonano dla wszystkich izolatów, a nie tylko dla szczepów potwierdzonych sekwencjonowaniem jako *L. plantarum*. Ponadto, na zdjęciach żeli elektroforetycznych (Rysunek A1 i A2 Aneksu) brakuje markera mas DNA, względem którego powinna być oceniana wielkość otrzymanego produktu. Również w tekście nie znajduję danych na temat wielkości tego ampliconu, a jedynie w cytowanej publikacji.

W rozdziałach 5.1.2 (Analiza ilościowa LAB), 5.2 (Analiza mikrobiologiczna Bryndzy Podhalańskiej) oraz w rozdziale 6 (Metodyka) brak jest wyczerpujących informacji na temat posiewów mikrobiologicznych w celu określenia ilości bakterii LAB w badanych próbach – z jakich rozcieńczeń je wykonywano, w ilu powtórzeniach oraz z ilu i jakich płytek liczono wyrosłe kolonie. Zakładam, że moje zastrzeżenie wynikają jedynie z niezbyt jasnego opisu metodyki, a nie z niepoprawnego zastosowania metody. Doceniam jasno przedstawione dokładne liczebności LAB wraz z wynikami analizy statystycznej załączone w Aneksie (Tabele A1 i A2 dla kapusty kiszzonej i Tabele A3-A11 dla Bryndzy Podhalańskiej).

Aby zapobiec wzrostowi drożdży, do pożywek na płytkach, na których wysiewano badane próby, słusznie dodawany był cykloheksymid. Ciekawi mnie dlaczego w eksperymentach kiszenia kapust nie dodawano czosnku lub chrzanu, jak zwykle się tradycyjnie robić aby zahamować wzrost drobnoustrojów patogennych.

Na szczególne uznanie zasługuje wybór metody sekwencjonowania zmiennych regionów V3-V4 genów 16S rRNA (NGS) dla analizy mikrobioty zarówno kapusty kiszzonej jak i Bryndzy Podhalańskiej. Badania mikrobiomów niezależne od hodowli zyskują na popularności dzięki coraz bardziej dostępnej technice sekwencjonowania NGS. Choć w przedstawionej pracy nie wszystkie etapy metody NGS zostały przeprowadzone przez Doktorantkę osobiście, to jednak wybór tej metody dla zweryfikowania postawionych w rozprawie tez świadczy o znajomości współczesnych metod badawczych i możliwościach ich wykorzystania. Doceniam bardzo przejrzyste przedstawienie wyników w Tabelach 14-17, których jednak nie sposób bezpośrednio porównać z wynikami otrzymanymi metodami opartymi o hodowle (Tab. 13). Trudno więc zgodzić się ze zdaniem: „Obecność wszystkich tych rodzajów bakterii w Bryndzy Podhalańskiej są zgodne z wynikami analizy mikrobiologicznej przeprowadzonej metodami hodowlanymi” (str. 87). We Wstępie, zamiast opisu metodyki sekwencjonowania NGS (rozdział 2.4.2) cenniejszym byłby przegląd literaturowy na temat stosowania tej metody w badaniach mikrobioty produktów

fermentowanych. Proszę więc o krótkie przedstawienie wykorzystania metody NGS w badaniach mikrobioty, szczególnie polskich produktów fermentowanych, podczas publicznej obrony.

Rozumiem, że metoda PCR-RAPD była wystarczająca dla osiągnięcia zamierzonego celu tj. ograniczenia izolatów przeznaczonych do dalszych badań, a jej użycie poparte jest stosowaniem tej metody przez innych badaczy. Ciekawi mnie jednak czy istnieją inne, alternatywne metody, np. o większej powtarzalności, które można byłoby zastosować dla osiągnięcia tego samego celu.

Generalnie, stosowane w pracy metody opisane są w jasny, przejrzysty sposób w większości pozwalający na ich odtworzenie. Nie mam zastrzeżeń dotyczących wyboru zastosowanych metod i technik badawczych oraz programów do opracowań statystycznych. Ich wykorzystanie świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę bogatego warsztatu metodycznego niezbędnego w prowadzeniu badań nad bakteriami LAB.

Nieco razi używanie w pracy zarówno nowej jak i starej klasyfikacji bakterii LAB. Prawdopodobnie podyktowane jest to wciąż niezaktualizowanymi bazami danych, z których korzystano na etapie opracowywania wyników. Warto jednak mieć na uwadze zaktualizowanie nazewnictwa jeśli będzie taka możliwość przed przygotowywaniem materiałów do publikacji.

Niewątpliwie uzyskane wyniki stanowią wymierną wartość pracy. Doktorantka sformułowała 6 wniosków, które przedstawiają rezultaty przeprowadzonych badań w odniesieniu do postawionych celów. Doktorantka stwierdziła m. in., że odmiana kapusty ma wpływ na przebieg fermentacji, a tym samym na skład ilościowy i jakościowy mikrobioty. Stawia jednak podejrzenie, że równie ważne są mikroorganizmy zasiedlające warzywa. Doktorantka wykazała, które rodzaje bakterii dominują w poszczególnych odmianach kapusty (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) oraz badanych serach (*Lactococcus*, *Streptococcus*). Wskazała również na konkretne gatunki bakterii w obrębie dominujących rodzajów, co uważam za nieuzasadnione ponieważ dane dotyczące identyfikacji gatunkowej pochodzą z metod hodowlanych i wskazane gatunki nie muszą być ani dominujące ani najważniejsze dla procesu fermentacji badanego produktu. Doktorantka potwierdziła tezę, że badane właściwości technologiczne bakterii są szczepozależne. Ponadto, wykazała, że spośród badanych w pracy izolatów, szczep *L. plantarum* k7, wyizolowany z kapusty kiszzonej wykazuje najwyższy potencjał do wykorzystania jako kultura starterowa w roślinnym przemyśle fermentacyjnym.

Doktorantka zauważa potrzebę dalszych badań. Czy rozważa się w nich dalsze wykorzystanie metody sekwencjonowania NGS do badań mikrobioty w trakcie procesu

fermentacji (kiszenia kapusty, dojrzewania serów), analogicznie do wykonywanych w pracy posiewów bakterii z różnych dni fermentacji kapusty? A może nie jest to szczególnie wartościowa metoda w badaniach mających na celu poszukiwanie szczepów o cennych właściwościach technologicznych, jeśli przejąć założenie, że szczep taki powinien być hodowlany?

Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Wstęp, liczący 30 stron, obejmuje charakterystykę, klasyfikację oraz wybrane właściwości metaboliczne i technologiczne bakterii LAB. Scharakteryzowane są tu też dwa produkty będące przedmiotem badań – kapusta kiszona i Bryndza Podhalańska. Świadczy o doskonałej znajomości literatury przedmiotu, napisany jest w oparciu o właściwie dobrane i poprawnie cytowane piśmiennictwo. Uważam jednak, że dwa podrozdziały Wstępu, rozdział 2.4.1 (PCR RAPD) oraz 2.4.2 (Sekwencjonowanie genu 16S rRNA) należałoby połączyć z rozdziałem 6 (Metodyka), w którym ponownie te dwie metody opisane są w podrozdziałach 6.3 i 6.4. Co innego gdyby był to literaturowy przegląd różnych metod stosowanych w badaniach LAB, a nie tylko opis tych stosowanych w pracy.

Praca doktorska napisana jest ładnym językiem używanym w tekstach o charakterze naukowym. Tytuł rozprawy, choć oddaje jej treść, uwzględnia tylko analizy wykonane metodami opartymi o hodowlę bakterii. Bogate piśmiennictwo (188 pozycji) jest cytowane poprawnie i w większości (ponad 65%) obejmuje prace z ostatnich 10 lat. Rozprawa zawiera wykaz 33 skrótów stosowanych w pracy oraz starannie wykonane ryciny (zwane rysunkami) i tabele (odpowiednio 35 i 29), Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Aneks. Rozdział Wyniki i dyskusja napisany jest w sposób świadczący o wyczerpującym zgłębieniu tematu, dużej wiedzy Doktorantki oraz Jej umiejętnościach w zakresie krytycznej interpretacji wyników. Doktorantka połączyła przedstawienie wyników z obszerną dyskusją, w której wnikliwej analizie poddała własne rezultaty oraz odniosła je do wyników badań innych autorów. Z jednej strony obawiam się, że właśnie to połączenie mogło skutkować niedostateczną dokumentacją wyników. Z drugiej strony, umiejętność konfrontacji wyników z danymi literaturowymi przy równoczesnej prezentacji poszczególnych analiz świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów językowych, które z obowiązku recenzenta wymienię:

- zdanie: „Gen 16S rRNA jest częścią podjednostki 30S małego rybosomu” (str. 23) warto zamienić na: „Gen 16S rRNA jest częścią mniejszej podjednostki rybosomu”,
- w odniesieniu do kwasu nukleinowego poprawnym jest używanie przymiotników w formie męskiej: rybosomalny RNA (str. 24), wyizolowany, metagenomowy DNA (str. 39), oczyszczony DNA (str. 43),

- modyfikacja rysunku na str. 24 powinna również objąć przetłumaczenie słowa „base”,
- dla wyrażen *ex novo* czy *in vitro* (str. 113, 116) używa się italiki, a wyrazy Gram-ujemne i katalazo-dodatnie (str. 51, 71) powinny być napisane z łącznikiem,
- drobne błędy literowe czy interpunkcyjne znaleźć można na stronach 37, 48, 60, 64, 71, a niewłaściwą numerację stron na niektórych stronach z tabelami,
- pierwsze zdanie rozdziału 6.6 (str. 43) napisane jest jako kontynuacja tytułu rozdziału, a sformułowanie trzeciej tezy badawczej na str. 31 jest niepoprawne gramatycznie,
- wyniki PCR RAPD przedstawiono na Rysunkach 6-13, a nie 6-12 (str. 51).

Powyższe niedociągnięcia są nieliczne, szczególnie przy tak obszernej rozprawie i nie umniejszają wartości przedłożonej pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Uzyskane rezultaty badań są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi o charakterze twórczym. Wyrazy uznania kieruję nie tylko do Doktorantki ale i Promotora, prof. Pawła Satory.

Niniejszym stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 z późn. zm.) oraz ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Dyscypliny technologii żywności i żywienia Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie pani mgr inż. Magdaleny Skotniczny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. med. inż. Anna Żaczek, prof. UR