

Dr hab. Dariusz Gączarzewicz
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
ul. Klemensa Janickiego 29
71-270 Szczecin

Szczecin, 20 lipca 2021 rok

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Joanny Porankiewicz** pt. **„Zastosowanie substytutów antybiotyków konwencjonalnych w konserwacji nasienia knura”** wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie, **pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Zdzisława Smorąga**.

W zakresie stosowania technik wspomaganego rozrodu u świń wciąż aktualnym problemem pozostaje efektywność metod przechowywania nasienia. Jest to problem złożony i wieloaspektowy, dlatego dążenie do doskonalenia metod konserwacji nasienia koncentruje się na różnych płaszczyznach. Obecnie coraz częściej przedmiotem zainteresowania środowiska naukowego jest utrzymanie wysokiej jakości przechowywanego nasienia także w aspekcie mikrobiologicznym. Podyktowane jest to obserwowanym i mocno sygnalizowanym w ostatnich latach wzrostem oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Wobec tego zjawiska znaczenie tzw. „zanieczyszczenia” mikrobiologicznego nasienia, zwłaszcza podczas konserwacji w stanie płynnym, staje się szczególnie istotne. U knurów jednak skuteczność działania przeciwbakteryjnego rozcieńczalników w czasie przechowywania nasienia w kontekście kontroli wzrostu drobnoustrojów jest słabo udokumentowana. Jest ona przy tym niejednoznaczna co do wpływu na płodność świń. Podkreślić należy również, że wymogi stawiane rozcieńczalnikom (tj. obligatoryjne stosowanie osłony antybiotykowej) oraz występowanie w ejakulatach knurów bakterii na ogół uważanych za niepatogenne, przyczyniają się do bagatelizowania znaczenia wysokiej jakości mikrobiologicznej dawki inseminacyjnej. Takie podejście jest niepokojące, ponieważ dane wskazują że z ejakulatów i przechowywanego nasienia knurów także izolowane są różne, często współwystępujące szczepy bakterii wykazujące całkowitą oporność na powszechnie stosowane antybiotyki. Fakt ten „narzuca” konieczność poszukiwania substancji działających bakteriobójczo i/lub bakteriostatycznie, które mogłyby zastąpić antybiotyki konwencjonalnie wykorzystywane w rozcieńczalnikach dla nasienia knura.

Biorąc powyższe pod uwagę, przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Porankiewicz jest opracowaniem interesującym, związanym z aktualną, trafnie dobraną tematyką, która wpisuje się w kierunki badań oraz problematykę współczesnej zootechniki.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest monografią, obejmuje 104 strony, zawiera 28 tabel oraz 13 rycin (przedstawionych w pracy jako zdjęcia 1-5 i wykresy 1-8). Napisana jest w układzie typowym i zgodnym z ogólnie przyjętymi wymogami formalnymi stawianymi strukturze rozprawy naukowej. Wyróżniono w niej 10 rozdziałów, w kolejności: „1. Przegląd literatury, 2. Cel pracy, 3. Materiały i metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Podsumowanie i wnioski, 7. Literatura, 8. Spis tabel, 9. Spis wykresów, 10. Spis zdjęć”. Na początku pracy zamieszczono streszczenie zredagowane w języku polskim i angielskim. Wykorzystane piśmiennictwo obejmuje 144 pozycje, są to pozycje merytorycznie związane z prezentowaną tematyką pracy, w większości obcojęzyczne.

Tytuł pracy jest sformułowany poprawnie i uwzględnia w pełni zawarte w niej treści. W rozdziale „Przegląd literatury”, zawartym na 10 stronach i podzielonym na podrozdziały, Autorka przedstawia stan wiedzy dotyczący wybranych aspektów mikrobiologicznych związanych z przechowywaniem nasienia, przede wszystkim u gatunku będącego przedmiotem opracowania. Na początku rozdziału Doktorantka zwięźle wprowadza w problematykę przechowywania nasienia knura w stanie płynnym. Następnie w podrozdziale dotyczącym zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia wskazuje najczęściej izolowane w nim drobnoustroje oraz opisuje źródła ich pochodzenia. W tej części pracy Autorka przedstawia również ciekawe, szczegółowe opracowanie kilku wybranych szczepów bakterii występujących w nasieniu knura. Zestawia informacje między innymi na temat cech przystosowawczych tych drobnoustrojów, czynników wpływających na ich zjadliwość oraz potencjalną lekooporność. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje substancje działające antybakteryjnie. Charakteryzuje antybiotyki wskazując między innymi mechanizmy i zakres ich działania, zastosowanie i wymogi dotyczące wykorzystania antybiotyków w konserwacji nasienia, podkreśla także problem zjawiska lekooporności bakterii. Następnie opisuje substancje wykazujące właściwości przeciwbakteryjne, które mogą stanowić alternatywę dla konwencjonalnie stosowanych antybiotyków. Wskazuje na możliwość takiego wykorzystania grupy peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, tzw. antybiotyków peptydowych (AMP – antimicrobial peptides). Przytacza przykłady i dane empiryczne dotyczące zastosowania tego rodzaju substancji w konserwacji nasienia zwierząt gospodarskich oraz zwraca uwagę na specyfikę doboru preparatów przeciwdrobnoustrojowych. W dalszej części rozdziału, Autorka przedstawia informacje na temat poszczególnych peptydów które wytypowała do badań (Pexiganan, daptomycyna, polimiksyna b, Temporin A, Palm-KK-NH₂, Camel, Tymozyna β₄), opisuje ich budowę oraz właściwości wraz z mechanizmami i spektrum działania biobójczego. Rozdział „Przegląd literatury” zakończony jest akapitem, w którym zawarto najistotniejsze treści podsumowujące.

Cały rozdział uznać należy za dobre wprowadzenie do opisu przeprowadzonych badań. Zredagowany jest poprawnym i jasnym w odbiorze językiem naukowym, z logicznym i przemyślanym układem treści, które opracowano w oparciu o aktualne, dobrze dobrane materiały źródłowe. Zaprezentowane są w nim najważniejsze informacje stanowiące uzasadnienie znaczenia podjętej tematyki oraz sformułowanych przez Autorkę celów badawczych. Ze względu na szeroki zakres problematyki i wieloczynnikowe podłoże zjawisk wpływających na efektywność konserwacji nasienia knura, za zasadne uznaję sygnalizowanie lub esencjonalny opis niektórych zagadnień uwzględnionych w tym rozdziale. W mojej ocenie, przedstawione w nim treści świadczą o znajomości przedmiotowego piśmiennictwa oraz o tym, że do własnych badań Doktorantka była dobrze przygotowana.

W dysertacji cele badań zostały sformułowane ogólnie i dotyczyły „*wykazania aktywności antybakteryjnej substytutów antybiotyków wobec patogennej mikroflory bytującej w nasieniu knura podczas przechowywania, a także skomponowania składu nowego rozcieńczalnika, poprzez zastąpienie konwencjonalnych antybiotyków nowymi preparatami o działaniu antybakteryjnym.*”

Osiągnięcie założeń pracy obejmowało rozbudowany układ doświadczalny z kilkietapowym procesem realizacji przedstawionym w rozdziale „*Materiały i metody*” wraz z uzupełniającymi opisami w rozdziale „*Wyniki*”. Na początkowym etapie badań weryfikowano między innymi wpływ wybranych peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Pexiganan, Temporin A, Palm-KK-NH₂, Camel, a także osobny i jednoczesny – daptomycyny i polimiksyny b) na ruchliwość oraz przeżywalność plemników. Rozcieńczalniki zawierające wytypowane peptydy (z różnymi wariantami stężeń dla każdego z badanych peptydów) przygotowano na bazie rozcieńczalnika Biosolwens Plus bez gentamycyny. Wskaźniki jakości nasienia przechowywanego w tych rozcieńczalnikach odnoszono do jakości nasienia konserwowanego w rozcieńczalnikach BTS oraz Biosolwens Plus z i bez

gentamycyny. Na tym etapie badań przeprowadzono również ocenę mikrobiologiczną nasienia. Obecność bakterii identyfikowano w nasieniu natywnym oraz przechowywanym w rozcieńczalnikach referencyjnych a także zawierających analizowane peptydy. Zastosowano metodykę ukierunkowaną na określenie obecności bakterii najczęściej izolowanych z ejakulatów knurów, między innymi należących do rodziny *Enterobacteriaceae* i innych pałeczek Gram-ujemnych, a także *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Niejednoznaczne wyniki uzyskane na tym etapie prac eksperymentalnych przyczyniły się do konieczności zweryfikowania wpływu badanych peptydów na mikroorganizmy testowe. W tym celu wykorzystano osiem szczepów bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica subsp. enterica ser. enteritidis*, *Streptococcus suis* I i II) pozyskanych z zasobów ośrodków krajowych (Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu oraz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego PIB w Puławach). W pierwszej kolejności wrażliwość szczepów testowych bakterii oceniono dla poszczególnych substancji przeciwdrobnoustrojowych, przy czym do badań dołączono kolejny peptyd – Tymozynę β_4 . Następnie, uwzględniając uzyskane wyniki, wytypowano peptydy których wspólne działanie powinno potencjalnie hamować jednoczesny wzrost wszystkich bakterii testowych. Zestawiono peptydy Pexiganan z daptomycyną oraz Camel z daptomycyną, których aktywność bakteriobójczą ponownie określono wobec szczepów testowych. Na podstawie tych oraz wcześniej otrzymanych wyników, w ostatnim etapie badań przeprowadzono ocenę jakości nasienia przechowywanego przez 13 dni w rozcieńczalniku Biosolwens Plus zawierającym Pexiganan i daptomycynę, w stężeniach odpowiednio 16 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$. W nasieniu oceniono wskaźniki obejmujące zmiany ruchliwości, integralności błony komórkowej i aktywności mitochondriów plemników, które odnoszono do zmian w nasieniu przechowywanym w rozcieńczalnikach Biosolwens Plus zawierającym i niezawierającym gentamycyny oraz w rozcieńczalniku BTS-PLUS.

Badania przeprowadzono łącznie na 33 ejakulatach 29 użytkowanych rozplodowo knurów różnych ras (polska biała zwisłoucha, wielka biała polska, pietrain, landras austriacki, duroc) i mieszańców (duroc x pietrain, Hypor linia S, G oraz Maxter H16) w wieku od 14 miesięcy do 6 lat. Wpływ każdego z badanych peptydów na jakość nasienia określano na podstawie analizy nasienia 4 knurów, natomiast jednoczesnego działania peptydów Pexiganan i daptomycyny (przeprowadzonego w ostatnim etapie badań) – na nasieniu 5 knurów. Nasienie po pobraniu i wstępnej ocenie kwalifikacyjnej (objętości, koncentracji i ruchliwości plemników, a także osmolalności i pH) rozrzedzano rozcieńczalnikami doświadczalnymi i referencyjnymi, transportowano do laboratorium, a następnie stosując kilkudniowe odstępy poddawano ocenie. Ruchliwość plemników określano metodą subiektywną. Ponadto, w 1. dniu przechowywania nasienia przeprowadzano analizę wspomaganą komputerowo (CASA) za pomocą systemu SCA z uwzględnieniem wielkości najważniejszych subpopulacji plemników, tj. z ruchem postępowym, szybkim oraz postępowym szybkim. W zakresie szczegółowej oceny strukturalno-funkcjonalnej plemników przeprowadzonej w mikroskopie fluorescencyjnym zastosowano barwienie YO-PRO-1, PI oraz JC-1. Identyfikację bakterii obecnych w nasieniu przeprowadzono w oparciu o procedury rutynowo stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej, z kolei wrażliwość szczepów testowych bakterii na badane peptydy określano metodą mikrorozcieńczeń zgodnie z aktualnymi rekomendacjami Instytutu Norm Klinikalnych i Laboratoryjnych (CLSI).

Dobór wykorzystanych metod badawczych uznać należy za zasadny, także w aspekcie dostosowywania metodyki i uwzględniania wyników z poszczególnych etapów badań. Zastosowane procedury Doktorantka w sposób prawidłowy i szczegółowy przedstawia w rozdziale „*Materiały i metody*”. Dotyczy to zwłaszcza opisu syntezy peptydów i przygotowania zawierających je rozcieńczalników oraz wskazania materiału źródłowego, na podstawie którego Autorka dokonała

wstępnego wyboru stężeń badanych peptydów. Nie mam również zastrzeżeń do wyczerpującego przedstawienia metodyki i materiałów odnoszących się do mikrobiologicznego zakresu pracy. Mam jednak kilka sugestii i uwag dotyczących tej części dysertacji. Sugeruję zredagowanie w rozdziale ogólnego opisu zasadniczych etapów badań. W pracy informacje na ten temat Doktorantka przedstawia sukcesywnie, w różnych podrozdziałach, a niektóre wyjaśnienia zamieszcza dopiero przy zapoznawaniu czytelnika z wynikami badań. Uważam, że wyodrębnienie oraz zestawienie informacji o przebiegu postępowania i istocie układu doświadczalnego w konkretnej części pracy ułatwiłoby zrozumienie sposobu realizacji założeń dysertacji. Niedopatrzeniem w pracy jest brak opisu zastosowanych metod statystycznych. Uniemożliwia to odniesienie się do poprawności zastosowanych testów statystycznych i zasadności opracowania pod tym względem. Ponadto, uszczegółowienia lub uzupełnienia wymagają informacje dotyczące między innymi: rozcieńczalnika BTS i BTS-PLUS (tj. wskazania producenta, rodzaju i ewentualnie stężenia substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej); stężenia gentamycyny w referencyjnym rozcieńczalniku Biosolwens Plus (lub wyjaśnienie braku tej informacji); przygotowania nasienia i jego zamrażania przed wykonaniem badań mikrobiologicznych; oceny koncentracji plemników oraz osmolalności i pH nasienia; oceny ruchliwości plemników za pomocą systemu SCA (tj. wskazania kryteriów identyfikacji plemników z ruchem postępowym, szybkim i postępowym szybkim); stężenia barwników fluorescencyjnych (YO-PRO-1, PI, JC-1) oraz parametrów filtrów fluorescencyjnych. Sugeruję również skorygowanie informacji dotyczącej identyfikacji plemników niewykazujących cech apoptotycznych oraz niestosowanie określenia „pomiar” (*„pomiar mitochondrialnego potencjału transbłonowego plemników”*) w aspekcie *de facto* przeprowadzonej oceny liczby plemników o określonej aktywności mitochondriów. W mojej opinii niewłaściwe w pracy jest również odnoszenie oceny aktywności mitochondriów plemników do *„oceny zmian apoptotycznych”*. Uważam, że w przeprowadzonych badaniach ze względu na charakter analizy dotyczącej mitochondriów nie można łączyć zmian w obrębie tych struktur ze zjawiskiem apoptozy w plemnikach.

W pracy zauważyć można również kilka kwestii o charakterze dyskusyjnym, które związane są z metodyką badań. Wskazaną powyżej liczebność grup, w których weryfikowano działanie poszczególnych peptydów na przechowywane nasienie, uznać należy za względnie niską. Wydaje się, że mogło to wpłynąć także na merytoryczność niektórych otrzymanych wyników, zwłaszcza gdy uwzględnimy przy tym znaną zmienność cech nasienia knurów wynikającą z różnic międzyrasowych oraz z relatywnie wysokiej zmienności wewnątrz rasy. Ponadto, nie znajduję uzasadnienia dla przeprowadzenia oceny ruchliwości plemników za pomocą systemu SCA tylko w 1. dniu przechowywania nasienia. Uważam, że wykorzystanie tej metody w całym przedziale czasowym konserwacji nasienia podniosłoby dodatkowo wartość pracy. Zwracam przy tym uwagę Doktorantki na celowość wykonywania analiz nasienia znacznie poza rekomendowanym dla danego rozcieńczalnika okresem przechowywania (rozcieńczalniki BTS i BTS-PLUS są rozcieńczalnikami mającymi utrzymywać zdolność zapładniającą plemników przez okres odpowiednio do 3 i 5 dni, natomiast rozcieńczalnik Biosolwens Plus jest rozcieńczalnikiem 7–10-dniowym; jaka jest zatem zasadność przeprowadzania oceny mikrobiologicznej nasienia w 18. czy 21. dniu przechowywania?).

Ogólnie ujmując, praca pod względem metodycznym z wyjątkiem powyżej wymienionych uwag nie budzi zastrzeżeń. Znając specyfikę i trudności w przeprowadzaniu tego typu badań stwierdzić można, że Doktorantka podjęła ambitnie zaplanowane zadania, które zorganizowała i w sposób konsekwentny przeprowadziła. Podkreślić należy, że świadczy to również o dużym potencjale warsztatu badawczego Doktorantki i Jej pracowitości.

Rozdział *„Wyniki”* stanowi najobszerniejszą część pracy (str. 30–81). Został opracowany adekwatnie do przyjętego układu doświadczalnego, wyróżniono w nim pięć głównych podrozdziałów korespondujących z treściami opisującymi metodykę badań. W rozdziale tym uzyskane wyniki

Autorka szczegółowo opisuje, a także przedstawia w formie czytelnych, w większości poprawnie opracowanych i informacyjnych tabel (Tabela 1-28) oraz wykresów (Wykres 1-8). Zamieszcza również fotografie (Zdjęcie 1-5) stanowiące dokumentację badań z zakresu oceny mikrobiologicznej. Na początku rozdziału Doktorantka zestawia i opisuje wskaźniki wstępnej oceny nasienia wszystkich knurów objętych badaniami. Następnie przedstawia rezultaty oceny wpływu każdego z badanych peptydów i kompozycji niektórych z nich na ruchliwość oraz określaną na jej podstawie przeżywalność plemników podczas przechowywania nasienia. Ze względu na bardzo szczegółową charakterystykę i zastosowaną przez Autorkę kolejność opisu tych wyników sugeruję rozważenie zmian w ich zaprezentowaniu. Uważam, że przejrzystość oraz ułatwienie analizy wyników zwiększyć można poprzez przedstawienie rezultatów oceny ruchliwości poszczególnych knurów bezpośrednio po wynikach opisujących ich ogólne zestawienie (dla każdego z badanych peptydów). Wyniki uzyskane na tym etapie badań były niejednoznaczne, pozwoliły jednak Autorce na stwierdzenie, że najwyższe analizowane stężenia peptydów Camel i Temporin A (odpowiednio 32 $\mu\text{g/mL}$ i 8 $\mu\text{g/mL}$) negatywnie wpływają na ruchliwość i przeżywalność plemników.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawia wyniki dotyczące izolacji bakterii z nasienia świeżego i przechowywanego. Podaje skład jakościowy mikrobiomu ejakulatów, a następnie charakteryzuje szczepy bakterii których obecność wykazała w przechowywanym nasieniu. Wnikliwe podejście Autorki do uzyskanych wyników przyczyniło się również do bardzo szczegółowego opisu występowania bakterii w nasieniu poszczególnych knurów, które przechowywano w rozcieńczalnikach referencyjnych oraz rozcieńczalnikach zawierających badane peptydy (w przypadku Pexiganan i Temporin A przez cały okres konserwacji – do 18. dnia, natomiast pozostałych peptydów w 10. lub 11. dniu przechowywania). W końcowej części podrozdziału Doktorantka odnosi wyniki oceny ruchliwości plemników do oceny mikrobiologicznej nasienia. Całość słusznie podsumowuje stwierdzeniem, że ze względu na dużą zmienność występowania bakterii w przechowywanym nasieniu, nie można w sposób jednoznaczny określić efektu działania badanych peptydów na bakterie podczas konserwacji nasienia (zwracam uwagę, że przy planowaniu badań w przyszłości warto rozważyć również ocenę liczby bakterii obecnych w nasieniu).

W następnych dwóch podrozdziałach Autorka opisuje wyniki oceny wrażliwości szczepów testowych bakterii wobec badanych peptydów. Umożliwiły one ustalenie najbardziej optymalnego składu rozcieńczalnika, który zawierał Pexiganan oraz daptomycynę i został oceniony przez Doktorantkę w ostatniej fazie badań. Do wyboru takiego składu rozcieńczalnika przyczynił się między innymi wykazany brak skutecznego efektu ograniczającego wzrost wszystkich szczepów testowych bakterii przy zastosowaniu różnych wariantów stężeń każdego z badanych peptydów oraz taki sam efekt w przypadku jednoczesnego zastosowania polimksyny b z daptomycyną. Ponadto Autorka stwierdziła, że odpowiednie stężenia peptydów Pexiganan wraz z daptomycyną (odpowiednio 8 $\mu\text{g/mL}$ i 1 $\mu\text{g/mL}$) oraz Camel wraz z daptomycyną (odpowiednio 8 $\mu\text{g/mL}$ i 1 $\mu\text{g/mL}$) mogą najskuteczniej hamować wzrost wszystkich szczepów testowych bakterii. Weryfikując to stwierdzenie z uwzględnieniem różnych wariantów stężeń peptydów wykazała, że pożądaný efekt hamowania wzrostu wszystkich szczepów testowych bakterii występuje przy zastosowaniu dwukrotnie większego stężenia obu zestawień badanych peptydów (tj. peptydów Pexiganan z daptomycyną oraz Camel z daptomycyną). Pani magister mając jednak na uwadze uzyskane wyniki dotyczące peptydu Camel (negatywny wpływ na ruchliwość plemników oraz skuteczne hamowanie wzrostu bakterii tylko przy wysokich stężeniach) w dalszych badaniach skupiła się wyłącznie na ocenie jakości nasienia przechowywanego w rozcieńczalniku zawierającym Pexiganan oraz daptomycynę (w stężeniach odpowiednio 16 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$). Wyniki te opisała w ostatnim podrozdziale. W ciągu całego okresu konserwacji (13 dni) w nasieniu przechowywanym w rozcieńczalniku z peptydami Pexiganan i daptomycyną, Autorka stwierdziła krótszą przeżywalność plemników oraz mniejszy średni udział

plemników z ruchem postępowym niż w nasieniu przechowywanym w rozcieńczalnikach referencyjnych. Różnice te zwiększały się wraz upływem czasu przechowywania nasienia, niemniej Doktorantka nie stwierdziła ich istotności statystycznej. Słusznie zauważyła natomiast, że uzyskane wyniki ruchliwości plemników mogły być związane ze zmiennością osobniczą knurów (wskazują na to dane poszczególnych knurów). Ponadto w nasieniu przechowywanym w rozcieńczalniku z badanymi peptydami, w odniesieniu do nasienia konserwowanego w rozcieńczalnikach referencyjnych, Autorka zaobserwowała niższy odsetek plemników z aktywnymi mitochondriami (z wysokim $\Delta\Psi_m$) oraz wyższy odsetek plemników ze zmianami błony komórkowej o charakterze nekrotycznym i apoptotycznym. Stwierdziła, że różnice udziału plemników z aktywnymi mitochondriami były istotne ($p < 0,05$) w 6. dniu przechowywania nasienia (rozcienceczalnik z badanymi peptydami vs Biosolwens Plus bez gentamycyny i BTS-PLUS), natomiast w przypadku udziału plemników apoptotycznych w 4. dniu konserwacji nasienia (rozcienceczalnik z badanymi peptydami vs Biosolwens Plus z i bez gentamycyny).

Rozdział „Dyskusja” zawarty na 8 stronach napisany jest poprawnym i zrozumiałym językiem naukowym. W rozdziale tym Doktorantka omawia i tłumaczy wyniki badań własnych, formułuje treści podsumowujące opis otrzymanych wyników i konfrontuje je z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Uważam, że omówienie wyników zostało przeprowadzone rzeczowo, z wykorzystaniem poprawnie dobranego piśmiennictwa. Podkreślić należy również, że Autorka do wyników i interpretacji własnych badań odnosi się racjonalnie i roztropnie. Zwraca między innymi uwagę na przeprowadzenie analiz na nielicznym materiale doświadczalnym oraz wskazuje potrzebę przeprowadzenia dalszych badań. Sugeruje to, że będą one kontynuowane przez Panią magister, co odbieram z zadowoleniem.

Przygotowując pracę do opublikowania sugeruję wnikliwe jej przejście i poprawę błędów edytorskich oraz stylistycznych. Pewne niedociągnięcia i nieścisłości, na ogół drobne, których często trudno uniknąć, dostrzegłem przede wszystkim w rozdziałach „Wyniki” i „Dyskusja”. Dotyczą one między innymi: użycia niewłaściwych lub nieprecyzyjnych sformułowań, konieczności wprowadzenia do treści odsyłaczy do graficznych form prezentacji wyników, nieścisłości (w tym braku) związanych z cytowaniem piśmiennictwa.

Rozdział „Podsumowanie i wnioski” został zredagowany w formie 7 punktów, których treść koresponduje z założonymi celami i jest logiczną konsekwencją analiz danych uzyskanych w badaniach. Pierwszych sześć punktów to stwierdzenia, których treść nawiązuje do otrzymanych rezultatów badań. Zasadniczy wniosek (punkt 7.) płynący z wykonanych badań to wykazanie możliwości wykorzystania w konserwacji nasienia knura niektórych peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej z koniecznością potwierdzenia skuteczności ich działania i określenia szczegółowych warunków zastosowania. Mam jednak kilka uwag i sugestii dotyczących użycia niewłaściwych, bądź błędnych sformułowań. W punkcie 1. należy rozważyć użycie określenia „stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego”, które raczej odnosiłbym do liczby drobnoustrojów, poza tym może ono błędnie sugerować że w pracy została przeprowadzona ocena liczby drobnoustrojów. W punkcie 3. określenie „daptomycynę i polimiksynę b” należy zastąpić „daptomycynę wraz z polimiksyną b” lub w podobny sposób zredagować treść. Uważam, że treść punktu 6. należy przeredagować w całości – przede wszystkim nieodpowiednie jest stosowanie określenia „nieco” („nieco niższa” czy „nieco mniejszym”) do kilkunasto-kilkudziesięcioprocentowych różnic pomiędzy wartościami (np. Tabela 25.–28.).

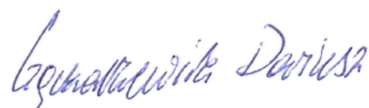
Podsumowując, wyrażone powyżej uwagi oraz sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji doktorskiej, którą w całości oceniam pozytywnie. Praca stanowi wartościowe opracowanie naukowe o dużych walorach poznawczych. Oprócz samej tematyki uzasadnionej

rozwiązywaniem aktualnych problemów, za istotne zalety pracy uważam dobór metod badawczych adekwatnych do założonego celu oraz konsekwentne i logiczne przeprowadzenie badań. Z kolei za najważniejsze merytoryczne aspekty pracy uznaję: (1) wykazanie negatywnego wpływu niektórych badanych peptydów (Camel i Temporin A) na ruchliwość plemników podczas przechowywania nasienia knura, (2) wykazanie potencjalnej możliwości wykorzystania peptydów Pexiganan i daptomycyny do konserwacji nasienia knura i wskazanie optymalnych stężeń obu tych substancji osłaniających w rozcieńczalniku, a także (3) uaktualnienie danych o jakości zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia knura.

Oceniana dysertacja jest efektem przemyślanego projektu, z szerokim zakresem badań, i co jeszcze raz podkreślę bez wątpienia jest dowodem na konsekwentny sposób dążenia do ambitnie wyznaczonych zadań. Świadczy nie tylko o dobrym przygotowaniu praktycznym i naukowym Autorki, Jej rzetelności badawczej, ale także o opanowaniu umiejętności opracowania i redagowania pracy naukowej.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Porankiewicz pt. „Zastosowanie substytutów antybiotyków konwencjonalnych w konserwacji nasienia knura” odpowiada wymaganiom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami), a Autorka wykazała wszystkie umiejętności potrzebne do otrzymania stopnia doktora nauki. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Porankiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Dariusz Gączarzewicz