

Dr hab. Dominika Drzewiecka

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. **Agnieszki Chlebicz-Wójcik**, pt. **„Opracowanie preparatów synbiotycznych do profilaktyki zdrowotnej trzody chlewnej”**

Praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Chlebicz-Wójcik została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Katarzyny Śliżewskiej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Badania były częściowo realizowane w ramach projektu Programu Badań Stosowanych z 2015 r. (PBS3/A8/32/2015, pt. „Preparat synbiotyczny do profilaktyki zdrowotnej zwierząt monogastrycznych i zapobiegania wystąpienia chorób bakteryjnych i zatruc wywołanych toksynami oraz poprawiającego bezpieczeństwo żywienia i wydajność chowu zwierząt”), współfinansowanego przez NCBiR. Pięć wyselekcjonowanych szczepów probiotycznych objęto prawami patentowymi. Wyniki badań zostały częściowo opublikowane w postaci dziewięciu artykułów naukowych i rozdziałów w monografiach naukowych. Nie podano informacji o innych dokonaniach i aktywnościach Doktorantki, niezwiązanych bezpośrednio z pracą doktorską. Autorka opisała osiągnięcia tej pracy w postaci obszernej rozprawy, zbudowanej w sposób typowy dla naukowych prac doświadczalnych. Praca obejmuje podstawy teoretyczne wykonywanych badań wraz z hipotezami badawczymi i celami pracy, a także opis części eksperymentalnej i omówienie uzyskanych wyników. Znalazły się w niej liczne odwołania do niemal 600 aktualnych publikacji naukowych i dokumentów.

Ciekawy i dobrze napisany „Wstęp” wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematem pracy. Autorka omawia budowę i funkcjonowanie układu pokarmowego świni wraz z ważnym jego elementem – mikrobiotą, zwracając uwagę na zmiany rozwojowe związane

z wiekiem, kształtowanie się zespołu drobnoustrojów jelitowych i ich rolę w utrzymaniu zdrowia gospodarza, zwłaszcza poprzez wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a także w kontekście zagrażających zwierzęciu mikroorganizmów patogennych i powodowanych przez nie chorób. Ważną częścią Wstępu są podrozdziały poświęcone dodatkom paszowym, stosowanym w celu polepszenia kondycji trzody chlewnej, które powinny zająć miejsce słusznie zakazanych w tym celu antybiotyków. Problemy i wyzwania związane z tym zagadnieniem stały się podstawą prezentowanej pracy doktorskiej, której Autorka postawiła sobie za cel opracowanie takich preparatów synbiotycznych, które jak najdoskonalej odpowiadałyby na ważne potrzeby w tym zakresie. Chociaż bowiem Doktorantka wymienia 25 preparatów probiotycznych zatwierdzonych w Europie dla trzody chlewnej, brak było na rynku polskim odpowiedniego preparatu synbiotycznego. Wstęp jest dobrze skonstruowany i zawiera dużo istotnych informacji, jest też, co ważne, wzbogacony wieloma tabelami i rycinami, w dużym stopniu opracowanymi przez Autorkę pracy, która jednak nie ustrzegła się pewnych drobnych błędów merytorycznych. Myli Ona niektóre jednostki taksonomiczne i pojęcia ekologiczne, o czym piszę także w dalszej części recenzji. Zamiennie używa pojęć „układ” i „narząd” / „organ” (str. 6-7), choć układ łączy narządy. Opis budowy jelita cienkiego na str. 7 nie jest do końca zgodny ze schematem na ryc. 2. W układzie trawiennym świni bytuje nie bilion drobnoustrojów (str. 12), ale bilion na gram kału, o czym jest mowa na str. 11 i podobnie - nie tylko 800 drobnoustrojów chorobotwórczych (str. 15). Mimo niewielkich uchybień „Wstęp” stanowi odpowiednią i szeroką podbudowę teoretyczną prezentowanej pracy doktorskiej i nakreślonych w następnym rozdziale celów pracy, opartych na konkretnie i jasno sformułowanych hipotezach badawczych.

Kolejna część rozprawy doktorskiej dotyczy wykonania i analizy eksperymentalnej części pracy. Rozdział „Materiały i metody” jest bardzo szczegółowo i obszernie napisany. Bardzo dobrym rozwiązaniem jest przedstawienie użycia licznych materiałów w uporządkowanej formie tabelarycznej. Nie zastosowano jednak klucza, np. alfabetycznego, który ułatwiałby odnalezienie poszczególnych pozycji. Może niekonieczne było przedstawienie użycia nawet tak powszechnie stosowanych materiałów, jak np. próbówki, ezy, płytki Petriego, olejki immersyjny, PBS itp., których wykorzystanie nie odbiegało od powszechnie przyjętych zastosowań. Poza tym niektóre używane materiały, jak antybiotyki,

mykotoksyny, składniki pasz czy testów API, wymieniono dopiero w podrozdziale „Metody badawcze”. W podpunkcie tym opisano bardzo dokładnie metodykę, w tym nawet testy powszechnie stosowane (jak np. barwienie metodą Grama) czy komercyjne (wykonywane wg instrukcji producenta), co w konsekwencji bardzo zwiększa objętość tego rozdziału. Niespójne są informacje nt. okresu suplementowania prosiąt badanymi preparatami synbiotycznymi – inne w tekście (29 dzień życia), inne na ryc. 8. Omyłkowo chyba napisano w p. 4.3.1.13.4., że „Widoczny wzrost bakterii wzdłuż linii wkłucia świadczył o ruchu własnym (...)”, gdyż w „Wynikach” interpretacja takiego wzrostu prawidłowo stwierdza brak ruchu. Chciałabym zapytać Doktorantkę o pochodzenie badanych zwierząt i liczebność poszczególnych grup badawczych i kontrolnej (zwierzęta niesuplementowane) oraz w jaki sposób zawieszano próbki kału do oznaczania ilościowego poszczególnych składowych mikrobioty jelitowej, aby wystandaryzować ten proces (punkt 4.3.4.2). Nie znalazłam też informacji o standaryzacji (np. densytometrycznie lub spektrofotometrycznie, ilościowo) inokulum badanych szczepów potencjalnie probiotycznych, do wykonywanych testów, np. wrażliwości na antybiotyki, przeżywalności w niskim pH lub w obecności soli żółci, detoksyfikacji mykotoksyn, cytotoksyczności czy tworzenia biofilmu – czy takie przygotowanie zawiesin było stosowane? Czy przy badaniach wpływu pH hodowli na wybrane szczepy mierzono pH w czasie trwania hodowli lub stosowano podłoże buforowane, przeciwdziałające zmianom pH?

Rozdział „Wyniki” w sposób szczegółowy, klarowny i logiczny zapoznaje czytelnika z poszczególnymi etapami pracy i uzyskanymi w nich wynikami. Dobra dokumentacja i analiza wyników, czytelne wykresy, mapowanie i forma tabelaryczna ułatwiają zrozumienie toku postępowania badawczego, interpretacja Autorki jest przekonująca. Może tylko wykresy 9-22 byłyby łatwiejsze do odczytu, gdyby były przedstawione w odwrotnej pozycji. Pożądanymi byłyby także pełniejszy opis rycin, zwłaszcza prezentujących zdjęcia (np. fot. 1 i 2, ryc. 27, 29, 31), aby nie było konieczne poszukiwanie metodyki w tekście pracy. Doktorantce udało się wytypować i wyselekcjonować spośród badanej grupy szczepów potencjalnie probiotycznych, zarówno pałeczek kwasu mlekowego, jak i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, grupę sześciu izolatów, które wykazywały najlepsze właściwości biochemiczne, fizjologiczne, a także antagonistyczne względem analizowanych patogenów jelitowych. Cechy te predestynowały je do wykorzystania prozdrowotnego w hodowli trzody chlewnej, co Doktorantka przekonująco

potwierdziła w badaniach *in vivo*, wyraźnie wykazując korzystny wpływ opracowanych preparatów synbiotycznych z inuliną na skład mikrobioty jelitowej trzody chlewnej na różnych etapach rozwoju oraz na ilość powstających kwasów karboksylowych. Mam tu następującą wątpliwość – Autorka, jak pisze, dokonuje oceny przynależności gatunkowej wytypowanych sześciu izolatów badanych pałeczek na podstawie testów API 50 CHL lub API 20C AUX w ostatnim etapie ich charakterystyki (p. 5.1.12.6. i 5.1.13.7.). Czy badane szczepy nie powinny być poddane tak oczywistym testom diagnostycznym, jak analiza morfologii mikroskopowej, zdolności do ruchu / zarodnikowania czy podstawowych cech metabolicznych i fizjologicznych, już w momencie izolacji, a nie dopiero po wykonaniu wszystkich innych badań, tym bardziej, że niektóre szczepy nie były zidentyfikowane genetycznie? Mam także pytanie o przygotowanie opracowanych w niniejszej pracy preparatów synbiotycznych. W jakim stosunku zmieszano poszczególne szczepy z dodatkiem 2% inuliny, czy podawane były w formie liofilizatu? I jeszcze mała uwaga: u prosiąt istotna statystycznie różnica w liczbie *Escherichia coli* widoczna jest w tabeli 44 dla synbiotyku B, nie C, jak podano w tekście.

„Dyskusja” to ostatni rozdział rozprawy doktorskiej, zakończony podsumowaniem zawierającym wnioski płynące z prezentowanej pracy. W rozdziale tym Doktorantka w uporządkowany sposób i systematycznie omawia uzyskane wyniki, szeroko konfrontując je z rezultatami badań, publikowanych przez innych autorów badań. Na tym tle uzyskane preparaty synbiotyczne prezentują dobre właściwości (z wyjątkiem niejednoznacznych wyników genotoksyczności) i mogą być obiecującym dodatkiem paszowym, podnoszącym zdrowotność trzody chlewnej, łagodzącym także stres odstawienia prosiąt od piersi. Autorka nie wskazuje jednak, który z opracowanych preparatów uważa za najkorzystniejszy. Czy ze względów prozdrowotnych i ekonomicznych wszystkie trzy specyfiki mają jednakowy potencjał, czy też tylko jeden powinien być wytypowany do wdrożenia bądź może powinny one mieć różne przeznaczenie? Czy analizowano wpływ nowo opracowanych preparatów synbiotycznych na przyrost masy zwierząt tucznych? Kolejne pytanie dotyczy zmian ilości poszczególnych badanych składników mikrobioty jelitowej. Jak można wytłumaczyć wyraźnie, istotnie statystycznie większą ogólną liczbę bakterii beztlenowych, w tym laseczek *Clostridium* spp., a jednocześnie mniejszą liczbę *Bifidobacterium* spp. w kale loch w 17 dniu

suplementacji nowo opracowanymi preparatami synbiotycznymi w porównaniu do kału loch niesuplementowanych (tabela 43)?

Moje ogólne uwagi dotyczą licznych błędów literowych (także w nazwach drobnoustrojów) i edytorskich, a także interpunkcyjnych (zwłaszcza kalki z j. angielskiego, np. przecinki po: ponadto, aczkolwiek, jednakże, dlatego też), widocznych w całej pracy. W pracy wielokrotnie pojawiają się, pisane łącznie, wyrażenia typu „nowoopracowane” czy „nowonarodzone”, podczas gdy zestawienia przysłówka i imiesłowu pisze się rozdzielnie. Podobnie często Autorka niepoprawnie pisze rozdzielnie „nie mniej” w znaczeniu „jednak, ale”, „odporność” drobnoustrojów zamiast oporność. Pojawia się też określenie „inhibują” zamiast inhibują czy po prostu – hamują, a także uproszczenia i skróty myślowe. Wielokrotnie pomyłono lub pominięto numery cytowanych podrozdziałów, niektórych tabel lub wzorów. W pracy nie zamieszczono listy stosowanych skrótów i streszczenia w języku angielskim. Chcę też zwrócić uwagę Doktorantki na czasem nieprawidłowe używanie przez Nią pojęć, zwłaszcza taksonomicznych i ekologicznych we „Wstępie” i „Dyskusji” np. „rodzina *Firmicutes / Bacteroidetes*”, „rodzaj *Veillonellaceae*”, „z gatunku *Escherichia*”, „populacja” nie w odniesieniu do osobników jednego gatunku w danym środowisku, ale do jakiejś grupy drobnoustrojów, „ekosystem” zamiast biocenoza czy mikrobiota. Należy też odnotować, że w roku 2016 z rodziny *Enterobacteriaceae* wydzielono wiele rodzajów i powstały nowe rodziny, dlatego dziś rodzaje *Proteus* i *Providencia* nie należą już do tej rodziny, jak błędnie podano w „Dyskusji”, ale do nowej rodziny *Morganellaceae*, choć wspólnie reprezentują rząd *Enterobacterales*. Rozprawa napisana jest jednak czytelnym, ładnym i w większości poprawnym językiem. Stanowi ona spójną i pełną całość. Jest dobrze przemyślana i zaplanowana, badania obejmują ważne aspekty, niezbędne do wykorzystania wyizolowanych szczepów drobnoustrojów probiotycznych oraz otrzymania gotowych do zastosowania preparatów synbiotycznych. Ma wartościowy walor praktyczny, oferujący rozwiązanie korzystne dla hodowcy, hodowanych zwierząt i środowiska. Trzeba też podkreślić, że w części teoretycznej, metodycznej i dyskusyjnej Autorka oparła się na bardzo obszernym wachlarzu prawie 600 aktualnych publikacji naukowych i dokumentów.

Pytania i uwagi zawarte w recenzji nie poddają w wątpliwość jakości rozprawy, ale mają charakter dyskusyjny i wynikają z mojego zainteresowania tą bardzo bogatą, ciekawą i wartościową pracą.

Biorąc pod uwagę powyższą charakterystykę ocenianej rozprawy doktorskiej i jej jakość naukową uważam, że oceniana praca Pani mgr inż. Agnieszki Chlebicz-Wójcik, pt. „Opracowanie preparatów synbiotycznych do profilaktyki zdrowotnej trzody chlewnej”, spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora (dyscypliny nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia). Wnoszę zatem do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dominika Drzewiecka

Łódź, dnia 1 grudnia 2022 r.

Dr hab. Dominika Drzewiecka

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

WNIOSEK

o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. **Agnieszki Chlebicz-Wójcik**, pt.
„Opracowanie preparatów synbiotycznych do profilaktyki zdrowotnej trzody chlewnej”

wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Katarzyny Ślizewskiej na Wydziale
Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej

Praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Chlebicz-Wójcik wyróżnia się bardzo szeroko zakrojonymi badaniami, opartymi na dobrym planie badawczym. Logiczny, kompletny i konsekwentnie realizowany tok analiz oraz krytyczna i rozważna interpretacja uzyskiwanych wyników pozwoliły na uzyskanie produktu o udowodnionym przez Doktorantkę działaniu probiotycznym, praca ma więc także ważny aspekt praktyczny, a wiele wyników zostało opublikowanych w postaci artykułów naukowych. Rozprawa, choć bardzo obszerna, jest dobrze i czytelnie napisana, w odniesieniu do wyjątkowo szerokiej gamy prawie sześciuset publikacji naukowych, a Doktorantka w sposób syntetyczny i przekonujący przedstawiła poszczególne etapy i aspekty badań.

Powyższe przesłanki skłaniają mnie do wystąpienia do wysokiej Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Dominika Drzewiecka