

Dr hab. Dorota Zielińska, prof. SGGW  
Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności  
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopeć**  
**pt.: „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt”**  
wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej,  
**pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Katarzyny Śliżewskiej**

**1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji**

Podstawą wykonania recenzji jest decyzja Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ z dnia 30.09.2019r., o powierzeniu mi recenzji pracy doktorskiej, przekazana przez Prodziekana ds. kształcenia dr hab. inż. Edytę Kordialik-Bogucką, prof. uczelni w piśmie z dnia 10.07.2023r.

Przedmiotem recenzji jest ocena czy rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopeć spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.).

**2. Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej**

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jest wartościowa pod względem naukowym i jednocześnie ważna z praktycznego punktu widzenia. Od 1 stycznia 2006 r. (Rozporządzenie WE Nr 1831/2003) w Unii Europejskiej wprowadzono całkowity zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu, przy czym dopuszcza się stosowanie antybiotyków jako leki, tylko w paszach leczniczych lub dodatkach profilaktycznych. Istotnym skutkiem wprowadzonego zakazu stało się poszukiwanie alternatywnych dla antybiotyków substancji pochodzenia naturalnego. Wśród naturalnych dodatków wskazuje się możliwości zastosowania probiotyków i prebiotyków. W literaturze opisane są różne rozwiązania z tego zakresu, jednak wciąż na rynku brakuje skutecznych preparatów. Ważnym problemem w hodowli drobiu są zakażenia bakteryjne (salmonellozy i kampylobakteriozy), a także zatrucia wywołane mykotoksynami obecnymi w paszach. Poszukiwanie skutecznych preparatów pozwalających jednocześnie na działanie profilaktyczne i wpływające prozdrowotnie na zwierzęta jest ważne i niezwykle potrzebne.

Przesłanki te uzasadniają podjęcie przez mgr inż. Paulinę Markowiak-Kopeć badań, zmierzających do oceny skuteczności zaprojektowanych preparatów synbiotycznych w profilaktyce i utrzymaniu zdrowia drobiu.

**3. Ocena formalna rozprawy doktorskiej**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter pracy eksperymentalnej i ma typowy układ dla pracy badawczej. Praca jest obszerna, liczy 238 stron, na które składają się: spis treści, wykaz skrótów i symboli, streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, założenia badawcze, w tym cel, hipotezy i zakres pracy, materiały i metody badań, wyniki oraz ich dyskusja, wnioski i literatura. Proporcje poszczególnych części są prawidłowe. Praca jest spójna tematycznie, a poszczególne rozdziały stanowią logiczną kontynuację założeń badawczych. Najbardziej obszernym rozdziałem jest omówienie wyników badań, który liczy 134 strony, a wyniki zaprezentowane są na 43 rysunkach i 35 tabelach. Pozostałe 9 rysunków i 15 tabel uzupełniają informacje znajdujące się w

rozdziałach: przegląd literatury oraz materiały i metody badań. Wykaz literatury obejmuje 295 pozycji, z czego 261 (88,5%) obcojęzycznych, a 102 (34,6%) z ostatnich 10 lat, co świadczy o rzetelnym przeglądzie najnowszej literatury światowej i potwierdza dbałość Doktorantki o nowatorski charakter pracy.

W pracy wskazano źródło finansowania, jakim jest projekt z Programu Badań Stosowanych NCBiR, nr 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” oraz projekt z Funduszu Młodych Liderów Nauki na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności: „Przeżywalność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* obecnych w opracowanych preparatach synbiotycznych w symulowanym układzie pokarmowym drobiu”.

Pod względem edytorskim praca jest bardzo dobrze przygotowana, a poprawność językowa i stylistyczna ułatwia odbiór treści rozprawy. Nieliczne błędy literowe i edytorskie nie umniejszają wartości pracy. Podsumowując, pod względem formalnym przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom dysercyjnym na stopień doktora.

#### **4. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

W przeglądzie literatury Autorka przedstawia charakterystykę dodatków paszowych, skupiając się jednocześnie na antybiotykowych stymulatorach wzrostu. Ich nadużycie wg. Doktorantki doprowadziło do rozprzestrzenienia antybiotykoodporności w środowisku, dlatego Autorka wskazuje alternatywy w postaci naturalnych dodatków paszowych, którymi są m.in. probiotyki, prebiotyki i synbiotyki. Doktorantka w wyczerpujący i zwarty sposób krótko scharakteryzowała wspomniane -biotyki, w kolejnych trzech podrozdziałach. Zaprezentowała historię i aktualną definicję oraz wymagania stawiane -biotekom, a także wskazała probiotyki, prebiotyki i synbiotyki stosowane w żywieniu zwierząt. Wartościowym podsumowaniem tej części przeglądu literatury jest Tabela 4, prezentująca przykłady badań dotyczących wpływu probiotyków, prebiotyków i synbiotyków na zdrowie drobiu. W kolejnym podrozdziale Autorka skupiła się na omówieniu budowy układu pokarmowego drobiu oraz składu mikrobioty jelitowej. W ostatnim podrozdziale przeglądu literatury Autorka rozważa główne źródła zakażeń drobiu, które wpływają zarówno na dobrostan zwierząt, jak i na jakość i bezpieczeństwo żywności. Doktorantka słusznie zauważa, że obecnie kamylobakteriozy są główną przyczyną infekcji układu pokarmowego człowieka przenoszonych przez żywność (głównie drób), a salmonellozy zajmują drugie miejsce. W tym miejscu chciałabym zapytać Panią Doktorantkę, z czego według niej wynika tak duża zjadliwość i możliwość rozprzestrzeniania się *Campylobacter*, w porównaniu do *Salmonella*. Dlaczego jest to obecnie najczęstsze źródło zatruc pokarmowych człowieka? Czy Autorka rozważała zastosowanie tego organizmu w badaniach modelowych?

Kolejnym ważnym zagrożeniem, na które zwraca uwagę Autorka dysertacji są mykotoksyny, które obecne w paszy mogą zagrażać zdrowiu zwierząt, a także ludzi. Autorka słusznie zauważa, że niektóre mikroorganizmy, w tym probiotyczne, mają zdolność detoksykacji mykotoksyn ze środowiska poprzez różne mechanizmy, co stanowi ważny argument do ich stosowania w żywieniu zwierząt.

W opinii Recenzenta ten rozdział stanowi dużą wartość, gdyż jasno nakreśla problem badawczy jakim jest nadużywanie antybiotyków w hodowli drobiu, zbiera krytyczną ocenę możliwości przeciwdziałania temu zjawisku, przy jednoczesnym zapewnieniu prozdrowotnych właściwości paszy, a co za tym idzie wysokiej jakości żywności. Rozdział 1 Przegląd literatury napisany jest bardzo starannie i w pełni uzasadnia wybór tematu badań oraz jego celowość, a treści w nim zawarte potwierdzają specyficzną wiedzę Doktorantki w tematyce rozprawy.

W rozdziale 2. pt.: „Założenia badawcze” Autorka wskazała, że głównym celem pracy było określenie skuteczności trzech innowacyjnych preparatów w zapobieganiu chorobom bakteryjnym i zatruciom wywołanym toksynami oraz poprawiających bezpieczeństwo żywienia indyków i kurcząt. Autorka sformułowała także cztery hipotezy badawcze, zakładając, że (1) przeżywalność grupy mikroorganizmów probiotycznych obecnych w składzie badanych preparatów synbiotycznych w symulowanym układzie pokarmowym drobiu pozwala na zastosowanie synbiotyków w żywieniu kurcząt i indyków; (2) badane preparaty synbiotyczne wykazują korzystny wpływ na mikrobiotę jelitową zwierząt oraz jej metabolizm; (3) podawanie badanych preparatów zwierzętom zakażonym zawiesiną bakterii *Salmonella* Typhimurium lub karmionych paszą skażoną Ochratoksyną A jest pomocne w zapobieganiu chorobom bakteryjnym i zatruciom wywołanym toksynami; (4) innowacyjne preparaty synbiotyczne mogą być stosowane w żywieniu indyków i kurcząt oraz charakteryzują się wyższą skutecznością niż komercyjnie dostępne preparaty probiotyczne dla drobiu.

Weryfikację hipotez zaplanowano w oparciu o szeroki zakres prac *in vitro* i *in vivo* z udziałem kurcząt i indyków rzeźnych, które Autorka zebrała w Tabeli nr 5. W ocenie Recenzenta cel pracy sformułowany jasno i jednoznacznie, a postawione hipotezy są możliwe do weryfikacji uwzględniając zaproponowany wieloetapowy zakres badań. Świadczy to o dojrzałym i szerokim warsztacie pracy Zespołu oraz samej Doktorantki.

Rozdział 3. Zatytułowany: „Materiały i metody badań” zawiera wskazany materiał badawczy w postaci 6. szczepów bakterii probiotycznych zdeponowanych w Łódzkiej Kolekcji Czystych Kultur (ŁOCK 105), inuliny oraz dwóch preparatów komercyjnych użytych w celach porównawczych. Na stronie 43 znajduje się stwierdzenie: „Poszczególne szczepy bakterii w preparatach A, B i C znajdowały się w równych proporcjach.” oraz tabela 6, prezentująca jedynie skład jakościowy zaprojektowanych preparatów. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie w jakich proporcjach/ilościach dodawano poszczególne mikroorganizmy w kompozycji preparatu? W jakiej postaci zastosowane były preparaty: płynnej, czy suszonej? W kolejnych podrozdziałach Doktorantka wyjaśnia, że materiał biologiczny w postaci treści jelitowej i kałomoczu zwierząt pozyskano za zgodą Komisji Etycznej. W tabelach 7-11 zebrano wszystkie odczynniki, podłoża hodowlane oraz składniki mieszanek paszowych zastosowanych w żywieniu zwierząt. Uważam, że taki zabieg sprawił, że przy tak złożonych i obszernych badaniach odbiór pracy jest niezwykle czytelny i jasny.

W kolejnym podrozdziale Autorka w sposób klarowny prezentuje metody badań. Należy docenić liczne grupy badawcze, na które składały się 364 kurczęta SPF, 504 kurczęta rzeźne oraz 720 indyki rzeźne. Badania podzielono na szereg eksperymentów, które są zilustrowane na rysunkach 7 i 8. Warto podkreślić, że badania z udziałem zwierząt zrealizowano w dwóch niezależnych ośrodkach badawczych (SGGW w Warszawie oraz w UWM w Olsztynie), co zwiększa rangę badań. Niezwykle ważnym doświadczeniem było zastosowanie paszy skażonej Ochratoksyną A, w celu oceny wpływu suplementacji preparatami synbiotycznymi na markery zdrowia u drobiu. Zastanawia jednak w jaki sposób skażono paszę. Czy mykotoksynę dodawano celowo? Proszę o doprecyzowanie jakie kryteria doboru dawki toksyny do paszy zastosowano w badaniu? Z kolei w badaniach modelowych z udziałem zwierząt zakażonych pałeczkami *Salmonella* badano skuteczność preparatów w poprawie stanu zdrowia. Szkoda, że nie zaplanowano próby kontrolnej, w przypadku której podawano by antybiotyk chorym zwierzętom w celu porównania tempa zmian wybranych markerów zdrowia. Pozwoliłoby to na jednoznaczne określenie skuteczności preparatów synbiotyków w odniesieniu do stosowanych antybiotyków.

Pozyskany materiał biologiczny analizowano pod kątem kluczowych grup mikroorganizmów w mikrobiocie, określano genotoksyczność oraz aktywność metaboliczną wybranych grup enzymów i profil kwasów tłuszczowych. Badanie składu mikrobioty wykonano dwoma metodami: klasyczną

metodą hodowlaną oraz metodą FISH. Proszę Doktorantkę o odpowiedź, dlaczego wybrano te dwie metody badań oceny składu mikrobioty? Jakie inne metody określania składu mikrobioty jelitowej są obecnie stosowane? Jakie są zalety i wady tych metod?

Analizując tę część pracy stwierdzam, że badania zostały bardzo dobrze zaplanowane pod względem warsztatowym i metodycznym. W pracy zastosowano nowoczesne metody badań, tj. chromatografię cieczową HPLC, a także metody biologii molekularnej – metodę FISH. Ocenę genotoksyczności kałomoczu drobiu badano z wykorzystaniem linii komórkowej kurzych komórek raka wątroby LMH. Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki zakres prac badawczych, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki. Analizę statystyczną danych przeprowadzono poprawnie z zastosowaniem, poza prostymi metodami statystycznymi, analizy składowych głównych PCA i aglomeracyjnego grupowania hierarchicznego AHC, co znacznie ułatwia prezentację i interpretację wyników badań.

W rozdziale 4 zaprezentowano wyniki badań, rozdzielając je na dwa podrozdziały: (1) badania *in vitro* i (2) badania *in vivo*. Wyniki badań pierwszego etapu potwierdzają, że bakterie probiotyczne zawarte w badanych preparatach synbiotycznych wykazują wysoką tolerancję na modelowe warunki przewodu pokarmowego drobiu, tym samym pozytywnie weryfikują hipotezę nr 1. Najbardziej korzystne wyniki przeżywalności zaobserwowano w przypadku preparatu sześćoszczepowego C. Na stronie 204 w dyskusji wyników Autorka sugeruje, że może mieć to związek z efektem synergistycznym. W tym miejscu prosilibym Doktorantkę o rozwinięcie tego wątku. Na czym polega efekt synergistyczny i czy zawsze więcej szczepów w preparacie, oznacza lepszą przeżywalność? Jakie inne czynniki mogą mieć wpływ na przeżywalność mikroorganizmów w przewodzie pokarmowym?

W przypadku badań *in vivo* Autorka podzieliła omówienie wyników na cztery podrozdziały (1) wpływ preparatów synbiotycznych na liczebność dominującej mikrobioty jelitowej drobiu; (2) wpływ preparatów synbiotycznych na genotoksyczność kałomoczu drobiu; (3) wpływ preparatów synbiotycznych na profil kwasów tłuszczowych; (4) wpływ preparatów synbiotycznych na aktywność enzymów w kałomoczu drobiu. Zaprezentowane wyniki badań pozwalają na pozytywną weryfikację hipotez badawczych nr. 2, 3 i 4. Autorka wykazała, że badane preparaty synbiotyczne wpływały pozytywnie na równowagę mikrobioty jelitowej badanych zwierząt, stymulując wzrost liczby bakterii lactobacilli, bifidobakterii oraz drożdży, przy jednoczesnym obniżeniu liczebności *Clostridium* i *E.coli* zarówno w badaniach z udziałem zdrowych zwierząt, jak i zakażonych *Salmonella* i narażonych na działanie mykotoksyny. Ponadto, podawanie synbiotyków w paszy obniżyło genotoksyczność kałomoczu drobiu, szczególnie w odniesieniu do grup zwierząt narażonych na działanie czynników szkodliwych. Profil kwasów tłuszczowych oraz aktywność enzymatyczna w kałomoczu drobiu również uległy poprawie w przypadku suplementacji preparatów synbiotycznych. Niezwykle ważną obserwacją jest wyższa skuteczność nowo zaprojektowanych preparatów synbiotycznych w porównaniu do komercyjnych odpowiedników, które są obecne na rynku. Prezentacja wyników oraz ich omówienie nie budzi zastrzeżeń Recenzenta. Sposób prezentacji wyników jest spójny dla wszystkich eksperymentów. Na uwagę zasługuje fakt, że część wyników badań zostało już opublikowanych w recenzowanych artykułach naukowych (6 prac) i rozdziałach monografii (4 prace). Świadczy to o dużej wartości uzyskanych wyników, a także o umiejętnościach Doktorantki w przygotowaniu pracy do publikacji.

W rozdziale 5 Doktorantka zaprezentowała dyskusję wyników, która obejmuje kompleksowo analizę uzyskanych danych w odniesieniu do istniejącej wiedzy i doświadczeń innych autorów. Rozdział ten jest dość zwarty, jednak napisany w sposób dojrzały. Autorka krytycznie analizuje kluczowe wyniki i wyjaśnia obserwowane zjawiska, co świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej. Ostatni rozdział nr. 7 zawiera sformułowane trafne i zwięzłe stwierdzenia i wnioski

wynikające z realizacji pracy, prezentując jednocześnie najważniejsze osiągnięcia tej pracy. Cennym zakończeniem rozprawy jest wniosek końcowy prezentujący propozycję składu i dawki preparatu oraz jego możliwe zastosowanie w żywieniu drobiu.

## **5. Podsumowanie i wniosek końcowy**

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec stanowi oryginalne i nowatorskie rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego opracowania skutecznego preparatu do żywienia zwierząt o działaniu profilaktycznym i prozdrowotnym. Problematyka badawcza jest aktualna i niezwykle ważna z punktu widzenia mikrobiologii żywności i mieści się w dyscyplinie naukowej technologii żywności i żywienia. Sposób przygotowania rozprawy, a także opublikowane już artykuły naukowe z wybranych wyników badań świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowo-badawczej, dobrej znajomości warsztatu badawczego oraz umiejętności analizy wyników i wyciągania wniosków z przeprowadzanych badań. Uważam, że cel pracy został w pełni zrealizowany, hipotezy badawcze zweryfikowane, a uzyskane wyniki i ich dyskusję oceniam pozytywnie. Ponadto, rezultaty badań i sformułowane wnioski mają duży potencjał aplikacyjny. Wskazane w recenzji uwagi i komentarze mają jedynie charakter porządkujący i pobudzający do dyskusji, jednak nie wpływają na ogólną wartość merytoryczną i aplikacyjną pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec pt.: „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z póź. zm), Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora oraz Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 261) oraz Przepisami wprowadzającymi ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z póź. zm.). Stawiam zatem wniosek do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie załączam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec.



Warszawa, dn. 03.10.2023

Dr hab. Dorota Zielińska, prof. SGGW  
Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności  
Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopeć  
pt.: „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt”  
wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechniki Łódzkiej,  
pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Katarzyny Śliżewskiej**

Niniejszym wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopeć pt.: „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt”, ze względu na wysoki poziom naukowy i silny aspekt aplikacyjny pracy, co podnosi jej wartość ponad przeciętną.

Praca prezentuje niezwykle istotne i nowatorskie rozwiązanie, w postaci zaprojektowanego preparatu synbiotycznego (zawierającego mieszkankę szczepów probiotycznych pochodzących z Łódzkiej Kolekcji Czystych Kultur i prebiotyku) o właściwościach modulujących skład mikrobioty jelitowej i jej metabolizmu u drobiu. Rozprawa zawiera zarówno wyniki badań *in vitro* jak i *in vivo*, które zostały wykonane na licznej grupie zwierząt (868 kurcząt oraz 720 indyków) w dwóch różnych ośrodkach badawczych, co sprawia, że uzyskane wyniki badań mają wysoką rangę naukową. Pracę wyróżnia niezwykle szeroki zakres badań eksperymentalnych i metod badawczych oraz ich umiejętne zastosowanie do realizacji zamierzonych celów. Ponadto, praca jest napisana bardzo starannie. Na podkreślenie zasługuje duża rzetelność w interpretacji wyników, doskonała redakcja pracy, wyjątkowa znajomość problemu badawczego i literatury przedmiotu.

Najważniejszym osiągnięciem badawczym jest wykazanie, że zaprojektowane preparaty charakteryzują się wyższą skutecznością w ograniczaniu skutków zakażenia bakteryjnego i zatrucia mykotoksynami u drobiu niż wybrane preparaty dostępne komercyjnie i tym samym mogą być z powodzeniem stosowane jako alternatywa dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu w żywieniu drobiu. Wyniki niniejszej pracy stanowią cenne rozwiązanie dla szerokiej grupy odbiorców: producentów dodatków paszowych, czy hodowców drobiu, co może przyczynić się do zwiększenia jakości i bezpieczeństwa żywności.

