

dr hab. inż. Roman Szymeczko,  
prof. uczelni  
ul. Gołębia 73/19  
85-309 Bydgoszcz

Bydgoszcz 04.10.2023

**OCENA**  
**pracy doktorskiej mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec**

wykonanej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w łodzi  
pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Śliżewskiej

pt.

**Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej (Wyciąg z protokołu nr 12/2019 posiedzenia RW z dnia 30 września 2019 r.), zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami)

Pani mgr inż. Paulina Markowiak-Kopec przedłożyła do oceny rozprawę doktorską pt. „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt”, opublikowaną w formie zwartej w 2023 roku. Praca została wykonana na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Katarzyny Śliżewskiej.

Antybiotyki będące substancjami naturalnymi, półsyntetycznymi lub syntetycznymi należą do substancji hamujących wzrost lub powodujących śmierć komórek bakterii chorobotwórczych. Są stosowane w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej w celu zapobiegania lub zwalczania zakażeń wywołanych bakteriami patogennymi. Zdolność ta, poprzez możliwość kontroli chorób zakaźnych, wpłynęła na obniżenie zachorowalności i śmiertelności wśród ludzi i zwierząt, przyczyniając się tym samym do wydłużenia średniej długości ich życia. W intensywnej produkcji zwierzęcej, w tym drobiarskiej, dostarczającej około 40% światowej produkcji mięsa drobiowego, antybiotyki są podawane w celu mikrobiologicznej kontroli procesu produkcyjnego, w postaci dawek terapeutycznych, metafilaktycznych, profilaktycznych lub w postaci antybiotykowych promotorów wzrostu, w celu zwiększenia końcowej wydajności zwierząt. Powszechne stosowanie, od początku lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku, antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW) w intensywnej produkcji zwierząt, w tym i drobiu, prowadzi do pojawienia się populacji bakterii patogennych, opornych na ASW. W jego wyniku dochodzi do rozwoju i rozprzestrzeniania się mikroorganizmów wielolekoopornych, bardzo niebezpiecznego zjawiska dla utrzymania globalnego stanu zdrowia ludzi i zwierząt a także optymalnego stanu środowiska naturalnego. Stan zagrożenia narastającą opornością na leki przeciwdrobnoustrojowe wymusił radykalną zmianę strategii, zarówno w celu utrzymania pełnej skuteczności dostępnych leków na rynku farmaceutycznym jak i zagwarantowania utrzymania stanu zdrowia publicznego. Globalna tendencja wzrostu wartości wskaźników oporności na antybiotyki, wymusiła konieczność poszukiwania i zastosowania w produkcji drobiu, innowacyjnych związków, jako środków alternatywnych w stosunku ASW. Zaliczamy do nich m.in.: probiotyki, prebiotyki, synbiotyki, inne substancje roślinne, metabolity bakteryjne, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, bakteriofagi, nanocząsteczki itp. Podjęte przez mgr inż. Paulinę Markowiak-Kopec badania

nad oceną skuteczności preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt wpisują się doskonale w globalną strategię badań. Zmierzają one poprzez modulację mikrobioty jelitowej, zapobieganiu chorobom zakaźnym i zatruciom toksynami grzybowymi organizmu ptaków, utrzymywanych na paszach bez udziału ASW. Ze względu na narastający problem lekooporności u ludzi i zwierząt, podjęte przez Doktorantkę badania w tym temacie uważam za w pełni uzasadnione, bardzo istotne ze względu na ich niepodważalny charakter poznawczy jak i nieograniczone możliwości praktycznego ich wykorzystania. Prezentowane w ocenianej pracy doktorskiej badania były dofinansowane 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 projektu 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”.

#### Formalna strona rozprawy doktorskiej

Od strony formalnej oceniana rozprawa jest pracą o charakterze eksperymentalnym, z typową kolejnością rozdziałów, charakterystyczną dla prac doświadczalnych. Jest rozprawą bardzo obszerną, obejmuje 238 stron maszynopisu. W tekście pracy umieszczonych jest 50 bardzo przejrzystych tabel i 52 rysunki, profesjonalnie przygotowane od strony graficznej. Przedstawiają one zarówno określone schematy ideowe jak i bardzo przejrzystą dokumentację wyników badań eksperymentalnych. Główne rozdziały ocenianej pracy poprzedza: Strona tytułowa (1), Podziękowania (1 strona), Spis treści (5 stron), Wykaz skrótów i symboli, (2 strony) oraz Streszczenia w języku polskim i angielskim (4 strony). Zasadnicza struktura rozprawy składa się z sześciu rozdziałów: 1. Przegląd literatury (25 stron), 2. Założenia badawcze z wytyczonym celem pracy i hipotezami badawczymi oraz zakresem pracy (4 strony), 3. Materiał i Metody (22 strony), 4. Wyniki (134 strony), 5. Dyskusja (21 stron), 6. Wnioski (1 strona) oraz spis Literatury (18 stron). Licząca 295 publikacji bibliografia obejmuje głównie literaturę obcojęzyczną i w ponad 30% składa się z prac opublikowanych w ostatnich 10 latach. Oceniana rozprawa doktorska jest napisana bardzo jasnym i poprawnym językiem polskim. Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Na wyróżnienie zasługuje edytorska strona pracy.

#### Merytoryczna strona pracy

Treść pracy jest zgodna z tematem rozprawy doktorskiej i założonym celem pracy. Temat pracy, logiczna i spójna koncepcja naukowa badań, zaproponowany układ doświadczalny pracy i bardzo szeroki zakres przeprowadzonych doświadczeń wskazują na poznawczy charakter pracy z wyraźnie zaznaczonym aspektem aplikacyjnym. Podjęty bowiem przez Autorkę temat charakteryzuje wyjątkowa aktualność w badaniach prowadzonych na świecie w świetle narastającego stanu lekooporności w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej. Jasno określa cel i zakres podjętych przez Autorkę badań i z tego względu zasługuje na szczególne wyróżnienie. Jest bezpośrednią odpowiedzią aktywności naukowej Doktorantki na niepokojące sygnały płynące również bezpośrednio z krajowej praktyki hodowlanej drobiu. Informują one o rozwoju i rozprzestrzenianiu antybiotykooporności bakterii, powodującej groźne infekcje bakteryjne w stadach produkcyjnych drobiu.

Zamieszczone na początku pracy „Streszczenie” umożliwia czytelnikowi na szybkie zapoznanie się z zawartością ocenianej rozprawy doktorskiej. W jasny i przejrzysty sposób przedstawia istotę podjętego problemu badawczego, ściśle powiązanego z jasno

sprecyzowanym celem naukowym pracy. Prezentuje bardzo szeroki zakres badań, wykonanych z wykorzystaniem nowoczesnej metodyki badawczej, właściwej do realizacji zaplanowanego celu badań. Zawiera krótki opis uzyskanych wyników oraz stwierdzenie o skuteczności zastosowanych preparatów synbiotycznych, jako alternatywnej strategii dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu.

W pierwszym, składającym się z 12 podrozdziałów, rozdziale „Przegląd literatury” Autorka dokonała szerokiej, przedstawionej w bardzo interesujący sposób, analizy piśmiennictwa związanego z tematem rozprawy. Na podstawie krótkiego rysu historycznego i prawodawstwa unijnego (EU) oraz unijnych i światowych organizacji i stowarzyszeń do spraw wyżywienia, bezpieczeństwa żywności, leków i zdrowia charakteryzuje w oddzielnych podrozdziałach poszczególne rodzaje, definicje, kryteria selekcji i funkcje dodatków paszowych. Dotyczy to antybiotyków, prebiotyków, probiotyków i synbiotyków, dodatków objętych badaniami w pracy. Poddaje wnikliwej ocenie korzyści płynące ze stosowania antybiotyków w celu terapeutycznym, metafilaktycznym i profilaktycznym oraz w postaci ASW. Zwiększają one wartość wskaźników użytkowych w intensywnej produkcji zwierząt i drobiu. Identyfikuje również zagrożenia w postaci narastającej oporności bakterii na ASW, niebezpiecznego zjawiska dla środowiska, zdrowia ludzi i zwierząt, wynikającego z nadmiernego stosowania ASW w paszach od początku lat pięćdziesiątych ubiegłego wieku. W wyniku rozwoju i rozprzestrzeniania się antybiotykoodporności bakterii Komisja Europejska wprowadziła zakaz stosowania ASW w paszach dla zwierząt, obowiązujący w Unii Europejskiej od 1 stycznia 2006 roku. Autorka informując, że, cyt. „Istotnym skutkiem wprowadzonego zakazu stało się poszukiwanie alternatywnych dla antybiotyków substancji pochodzenia naturalnego” przechodzi płynnie do ich prezentacji w kolejnych podrozdziałach pracy. Skupia się na probiotykach, prebiotykach, składowych komponentach ocenianych w pracy synbiotyków, pod kątem ich skuteczności w hodowli kurcząt i indyków. Na podstawie uwarunkowań historycznych, w logiczny i spójny sposób szeroko omawia rygorystyczne, określone na podstawie bardzo specjalistycznych i szczegółowych badań, kryteria kompleksowej oceny, jasno zdefiniowanych szczepów bakterii probiotycznych, substancji prebiotycznych i preparatów synbiotycznych. Poddaje wnikliwej ocenie korzyści ze stosowania tych dodatków w żywieniu drobiu i innych gatunków zwierząt. Na podstawie systemowego ich oddziaływania na organizm określa korzystny wpływ tych preparatów na stan zdrowia i poprawę efektów produkcyjnych kurcząt i indyków mięsnych. Dalszą część „Przeglądu literatury” Autorka poświęciła na omówienie budowy anatomicznej układu pokarmowego ptaków w nawiązaniu do funkcji fizjologicznych w zakresie procesów trawienia i wchłaniania w poszczególnych jego odcinkach. Przedstawiono także proces rozwoju mikrobioty jelitowej i jej jakościowy skład w przewodzie pokarmowym dorosłych ptaków. Końcowa część tego rozdziału zawiera informacje na temat zakażeń, zarówno bakteriami patogennymi jak i toksykoz powodowanych przez mykotoksyny. Ze względu na dużą skalę zagrożenia dla zdrowia publicznego oraz zdrowia i wydajności zwierząt, najwięcej uwagi poświęciła salmonellozie, wywoływanej przez serowary *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium oraz mykotoksykozie, wywoływanej skażeniem pasz i żywności ochratoksyną A.

Rozdział 1 „Przegląd literatury” został opracowany przez Autorkę na podstawie analizy 295 publikacji zamieszczonych w zdecydowanej większości w czasopiśmie naukowych z obiegu międzynarodowego. Na wyróżnienie zasługuje wykorzystanie szeregu pionierskich publikacji naukowych w danym obszarze tematycznym rozprawy. Na uznanie zasługuje również duża znajomość Autorki w zakresie prawa unijnego i międzynarodowego związanego z tematem rozprawy. W sposób syntetyczny i logiczny przedstawiono w nim bardzo obszerny zakres wiedzy interdyscyplinarnej bezpośrednio związanej z szerokim profilem tematycznym badań w pracy. Przejrzystość i łatwiejsze zrozumienie zawartych

w nim treści jest zwiększona przez umieszczenie dobrze przygotowanych od strony graficznej i merytorycznej 6 rysunków i 4 tabel. Godnym podkreślenia jest fakt, że wymienione elementy graficzne zostały opracowane przez Autorkę na podstawie wskazanych prac źródłowych. Sposób przedstawienia przeglądu piśmiennictwa, wykorzystanie w nim 3 prac własnych (pierwszy autor), opublikowanych w czasopismach z bazy JCR (2 prace w „Nutrients”, IF 6,607; 1 praca w „Gut Pathogens”, IF 4,6) świadczą o dojrzałości naukowej i dużym zaangażowaniu Autorki w podjętą problematykę badawczą. W mojej ocenie rozdział ten opracowano w sposób interesujący. Przedstawione w nim treści świadczą o bardzo dobrej znajomości literatury związanej z tematem pracy doktorskiej oraz o dobrym przygotowaniu Doktorantki do doświadczalnej części pracy.

W rozdziale 2 „Założenia badawcze”, po krótkim opisie założeń pracy przedstawiono cel pracy i jasno sformułowane hipotezy badawcze oraz zakres i metodykę realizacji badań. Należy stwierdzić, że cel pracy jest czytelny i dobrze skorelowany z dalszymi częściami pracy, wskazującymi na zgodność z tytułem rozprawy doktorskiej i jej tematem.

W rozdziale 3 „Materiały i Metody” scharakteryzowano w pierwszej kolejności materiał badawczy użyty w badaniach. Przedstawiono oceniane w pracy pod względem skuteczności ich działania w hodowli drobiu innowacyjne, krajowe preparaty synbiotyczne oraz zagraniczne, komercyjne preparaty probiotyczne. Godnym podkreślenia jest fakt, że preparaty synbiotyczne i znajdujące się w ich składzie szczepy bakterii i drożdży probiotycznych zostały opracowane pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Katarzyny Ślizewskiej w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Należy także podkreślić, że wymienione wcześniej preparaty probiotyczne zdeponowano w Łódzkiej Kolekcji Czystych Kultur (ŁOCK 105) oraz Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM). Mikroorganizmy probiotyczne znajdujące się w składzie ocenianych synbiotyków zostały objęte ochroną patentową. Następnie scharakteryzowano materiał zwierzęcy w postaci treści jelitowej pobieranej z jelita czczego i jelita ślepego oraz kałomoczu z kolaki ptaków doświadczalnych. Eksperymenty na kurczętach przeprowadzono we współpracy z SGGW w Warszawie natomiast badania na indykach wykonano przy udziale UWM w Olsztynie za zgodą Lokalnych Komisji Etycznych ds. Doświadczeń/Badań na Zwierzętach. W sposób bardzo czytelny przedstawiono zestawy i pochodzenie selektywnych podłoży hodowlanych, zastosowanych w badaniach mikrobiologicznych oraz podłoża wykorzystanego w hodowli linii kurzych komórek raka wątroby do oceny stopnia genotoksyczności kałomoczu. W następnej kolejności podano składy i pochodzenie pełnoskładnikowych mieszanek paszowych, zastosowanych w żywieniu ptaków doświadczalnych oraz zestawienie odczynników stosowanych w badaniach mikrobiologicznych, toksykologicznych i biochemicznych. Kolejną część tego rozdziału zawiera szczegółowy opis badań *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vitro* poświęcono ocenie przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych w preparatach synbiotycznych w warunkach trawienia pozaustrojowego. Przeprowadzono je w laboratoryjnym modelu układu pokarmowego drobiu, opisanego przez trzech autorów Versantvoort’a i wsp. (2015), Latorrea i wsp. (2015) i Menezes-Blackburn’a (2015) w modyfikacji własnej Autorki pracy doktorskiej. Badania *in vivo* obejmowały ocenę skuteczności synbiotyków i probiotyków w modulacji mikrobioty jelitowej u kurcząt SPF oraz kurcząt i indyków rzeźnych, kurcząt SPF żywionych paszą skażoną ochratoksyną A lub zakażonych *Salmonella* Typhimurium i indyków rzeźnych utrzymywanych na paszy skażonej ochratoksyną A. Niezmiernie szeroki zakres wykonanych badań na kurczętach i indykach uwidaczniają bardzo dobrze przygotowane od strony graficznej, czytelne schematy blokowe, przedstawione na rysunkach 7 i 8. Dalsza część rozdziału zawiera szczegółowy, przedstawiony w klarowny sposób, opis badań mikrobioty jelitowej w treści jelit i kałomoczu ptaków doświadczalnych. W badaniach metodą hodowlaną płytkową oznaczono ogólną liczbę bakterii beztlenowych

z uwzględnieniem *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. i *Bacteroides* spp., liczbę bakterii tlenowych lactobacilli i *Enterococcus* spp., liczbę bakterii względnie beztlenowych *Enterobacteriaceae* z *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. (u kurcząt zakażonych *Salmonella* Typhimurium) i ogólną liczbę drożdży. Metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) określono natomiast ogólną liczbę bakterii, liczbę bakterii tlenowych *Enterococcus* spp. + lactobacilli, liczbę bakterii beztlenowych *Bifidobacterium* spp., *Clostridium coccoides* i *Bacteroides* spp. + *Prevotella* spp. w kałomoczu kurcząt i indyków na początku i końcu odchovu. Chciałbym podkreślić, że mocną stroną wykonanej analizy mikrobiologicznej z zastosowaniem selektywnych pożywek, zwiększającą wiarygodność uzyskanych wyników badań, jest jej zgodność z obowiązującą normą europejską PN-EN ISO. Badania nad określeniem genotoksyczności, stężenia kwasu mlekowego, profilu krótkołańcuchowych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych oraz aktywności enzymatycznej w kałomoczu ptaków przeprowadzono przy użyciu nowoczesnych metod (SCGE, HPLC, Spektrofotometryczna) z wykorzystaniem specjalistycznej aparatury naukowej. Ogromna ilość uzyskanych wyników badań poddana została opisanej w jasny sposób, rozbudowanej analizie statystycznej z zastosowaniem właściwych testów i narzędzi statystycznych. Na szczególne wyróżnienie zasługuje interesujący sposób graficznej prezentacji opracowanych wyników badań w postaci mapy cieplnej, wizualizacji korelacji na bazie PCA i dendrogramów na podstawie (AHC). Ogólna ocena opisu materiału badawczego, wzbogaconego 6 czytelnymi tabelami, dokonania właściwego wyboru dobrze zaplanowanych i klarownie przedstawionych na 2 kolorowych schematach blokowych, nowoczesnych i wiarygodnych metod badawczych i analitycznych jest bardzo wysoka. Potwierdza bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i analityczne Autorki przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Rozdział 4 „Wyniki” liczy 134 strony. W treści tego rozdziału umieszczono 36 w pełni informatywnych tabel i 44 bardzo czytelne rysunki. Chciałbym podkreślić, że taka forma przedstawienia wyników jest z jednej strony dużym ułatwieniem dla czytającego pracę, z drugiej natomiast strony stanowi duże utrudnienie dla przygotowującego pracę doktorską. Doktorantka przedstawiła wyniki prac eksperymentalnych, uzyskane w realizacji dwóch głównych kierunków badań, obejmujących badania *in vitro* i badania *in vivo*. W ramach badań *in vitro* przedstawione są wyniki poświęcone ocenie przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych znajdujących się w składzie badanych synbiotyków w symulowanym modelu układu pokarmowego drobiu. Należy zaznaczyć, że dokonana na tym etapie pracy ocena stopnia przeżywalności mikroorganizmów w preparatach synbiotycznych była niezwykle istotna dla ich zastosowania w doświadczeniach na drobiu. W szerokim zakresie badań *in vivo* Doktorantka przedstawiła obszerną dokumentację wyników z 36! wykonanych doświadczeń. Na szczególne wyróżnienie zasługuje przejrzysty i logiczny sposób przedstawienia ogromnej ilości danych eksperymentalnych i ich rozbudowanej analizy statystycznej z graficzną wizualizacją korelacji pomiędzy grupą ptaków a badanymi parametrami w ocenianej pracy doktorskiej. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania *in vitro* wykazały wysoki poziom przeżywalności probiotycznych szczepów bakterii lactobacilli i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w Synbiotykach A, B i C w procesie trawienia w symulowanych warunkach wola, żołądka gruczołowego i jelita cienkiego, laboratoryjnego modelu układu pokarmowego drobiu. Po 135' minutowym pasażu mieszanek probiotycznych w symulowanym układzie pokarmowym wykazano najwyższą przeżywalność bakterii probiotycznych Synbiotyku C oraz drożdży Synbiotyku A. W warunkach trawienia *in vitro* stwierdzono wzrost przeżywalności wszystkich mieszanin probiotycznych w obecności dodanej paszy. Analiza PCA potwierdziła dodatnią korelację pomiędzy mieszaniną paszy i synbiotyków a wzrostem przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych w ocenianych synbiotykach.

Wysoką wartość naukową i aplikacyjną wyników badań *in vitro* potwierdzają zarówno wyniki badań *in vivo* na wolnych od patogenów kurczętach (SPF) jak i doświadczenia na kurczętach i indykach rzeźnych. Wykazano w nich zarówno wpływ wieku jak i dodatku Synbiotyków A, B i C w paszy na kształtowanie się populacji mikrobiologicznej, oznaczonej metodą hodowlaną w treści jelita czczego, jelit ślepych i kałomoczu badanych ptaków.

W porównaniu do ptaków kontrolnych, suplementacja paszy synbiotykami spowodowała istotny, potwierdzony dodatnią korelacją, wzrost liczby bakterii *Bifidobacterium* spp.

i *Lactobacilli* oraz drożdży. Zaobserwowano również istotny, ujemnie skorelowany spadek liczby bakterii potencjalnie chorobotwórczych *Clostridium* spp. i *Escherichia coli* w okresie odchowu ptaków doświadczalnych. Z badanych w pracy synbiotyków, najskuteczniejszym modulatorem mikrobioty jelitowej w większości badanych przypadków, był Synbiotytek C. Odnotowano mniejszą skuteczność zagranicznych preparatów probiotycznych od krajowych synbiotyków w kształtowaniu liczebności tych grup bakterii u kurcząt i indyków rzeźnych. Po zakończeniu odchowu stwierdzono zbliżone liczebności bakterii beztlenowych, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. i *Bacteroides* spp. w grupach ptaków kontrolnych i utrzymywanych na paszach suplementowanych synbiotykami i probiotykami. Stwierdzono większą liczbę mikroorganizmów oznaczonych w kałomoczu metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* niż metodą hodowlaną płytkową. W porównaniu do grupy kontrolnej, zauważono większą skuteczność testowanych preparatów synbiotycznych, w szczególności Synbiotyku C, w promowaniu wzrostu liczby bakterii *Bifidobacterium* spp.

i *Lactobacilli* oraz hamowaniu wzrostu liczby *Clostridium* spp. Po zakończeniu odchowu ogólna liczba bakterii oraz liczba bakterii *Bacteroides* spp. i *Prevotella* spp. była porównywalna we wszystkich badanych grupach ptaków.

W kolejnej części pracy Doktorantka przedstawiła wyniki badań nad oceną stopnia wrażliwości mikrobioty jelitowej układu pokarmowego ptaków żywionych w czasie odchowu mieszankami paszowymi z udziałem pszenicy skażonej OTA oraz preparatów synbiotycznych i probiotycznych. Pasze dla kurcząt SPF zawierały dodatek Synbiotyków A, B i C, a mieszanki paszowe dla indyków przygotowano zarówno z udziałem Synbiotyków A, B i C jak i zagranicznych preparatów probiotycznych BioPlus 2B® i Cylactin®. Stwierdzono negatywny wpływ paszy skażonej OTA na obraz ilościowy populacji mikrobiologicznej przewodu pokarmowego ptaków, przedstawiający istotnie niższą liczebność bakterii *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacilli* oraz potwierdzony statystycznie wzrost liczby bakterii *Clostridium* spp. i *Escherichia coli*. Suplementacja skażonej paszy OTA preparatami synbiotycznymi i probiotycznymi obniżała toksyczność mykotoksyny, wyrażonej wzrostem liczby bakterii *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacilli* oraz istotnym obniżeniem liczebności bakterii *Clostridium* spp. i *Escherichia coli*. Spośród ocenianych synbiotyków najskuteczniejszym w niwelowaniu skutków skażenia OTA okazał się Synbiotytek C. Jego dodatek powodował statystycznie istotny wzrost liczby bakterii *Bifidobacterium* spp.

i *Lactobacilli* (o 2 - 3 rzędy wielkości) oraz istotny spadek liczby *Clostridium* spp.

i *Escherichia coli* (o 3 - 1 rząd wielkości). Stwierdzono również korzystny wpływ dodawanych preparatów synbiotycznych (szczególnie Synbiotyku C) do paszy skażonej OTA na liczbę drożdży w treści jelitowej ptaków doświadczalnych. Probiotyki dodane do skażonej paszy okazały się mniej skuteczne od synbiotyków w łagodzeniu niekorzystnych dla mikrobioty jelit skutków paszy skażonej OTA. Wysoką skuteczność synbiotyków oraz niższą efektywność probiotyków w łagodzenia skutków oddziaływania paszy skażonej OTA na mikrobiom jelitowy ptaków potwierdzają wyniki badań uzyskane przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Stwierdzono także, że po zakończonym odchowu kurcząt i indyków liczba bakterii beztlenowych, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp.

i *Bacteroides* spp. w treści jelitowej badanych segmentów układu pokarmowego ptaków doświadczalnych pozostawała na zbliżonym poziomie.

Następnie określono skuteczność synbiotyków w łagodzeniu skutków zakażenia kurcząt SPF bakteriami *Salmonella* Typhimurium (ST), naruszającego stan eubiozy jelitowej u badanych ptaków. Stwierdzono, w porównaniu do grupy kontrolnej (negatywnej) kurcząt, naruszenie równowagi mikrobiomu jelitowego w grupie pozytywnej ptaków zakażonych patogenem i utrzymywanych na paszy bez udziału Synbiotyków A, B i C. Jej wynikiem było zmniejszenie liczebności bakterii *Bifidobacterium* spp. i lactobacilii, drożdży oraz istotny wzrost liczby bakterii *Salmonella* Typhimurium, w porównaniu do grup kurcząt zakażonych ST żywionych paszami z dodatkiem synbiotyków. Potwierdzono wysoką skuteczność ocenianych preparatów synbiotycznych (w szczególności Synbiotyku C) w niwelowaniu skutków zakażenia ST. W treści jelitowej i kałomoczu ptaków zakażonych ST, utrzymywanych na paszach z synbiotykami. Wzrostowi ilości korzystnych bakterii *Bifidobacterium* spp. i lactobacilii oraz drożdży towarzyszył spadek liczebności bakterii potencjalnie patogennych *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*. Ogólne liczby bakterii beztlenowych, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. i *Bacteroides* spp. pozostawały natomiast na zbliżonym poziomie w badanych grupach ptaków. Badania populacji mikrobiologicznej w kałomoczu za pomocą metody FISH wykazały, w porównaniu do wyników uzyskanych metodą hodowlaną, większe wartości liczbowe dla oznaczonych grup bakterii. Uzyskane dane potwierdziły dużą efektywność stosowanych preparatów synbiotycznych w promowaniu wzrostu korzystnej mikroflory dla zdrowia ptaków zakażonych ST i hamowaniu rozwoju bakterii potencjalnie chorobotwórczych. W kolejnej części rozdziału Doktorantka prezentuje wyniki badań *in vivo* nad określeniem genotoksyczności kałomoczu kurcząt i indyków, karmionych paszami z dodatkiem synbiotyków lub probiotyków, skażonymi OTA a także u kurcząt zakażonych bakteriami *Salmonella* Typhimurium. Genotoksyczność wody kałowej określono na podstawie stopnia uszkodzeń DNA z komórek LMH, rozdzielonego metodą elektroforezy SCGE w żelu agarozowym z wykorzystaniem techniki „Testu kometowego”. Stwierdzono, że poziom genotoksyczności kałomoczu ptaków kontrolnych, otrzymujących pasze bez dodatków, utrzymywał się średnio na poziomie od 15 do 22%. W porównaniu do grupy kontrolnej, suplementacja paszy synbiotykami i probiotykami spowodowała obniżenie poziomu uszkodzeń DNA kałomoczu kurcząt i indyków rzeźnych, przy czym różnice nie okazały się istotne statystycznie. Zauważono, w porównaniu do grupy ptaków kontrolnych SPF istotny wzrost (średnio 50%) poziomu genotoksyczności kałomoczu kurcząt SPF otrzymujących paszę skażoną OTA bez dodatków. Uzyskane wyniki badań potwierdzają wysoką skuteczność Synbiotyków B i C w obniżaniu poziomu genotoksyczności kałomoczu kurcząt żywionych paszami skażonymi OTA. Wyniki badań na indykach rzeźnych nie potwierdziły natomiast istotnej statystycznie skuteczności synbiotyków i probiotyków dodanych do paszy skażonej OTA w obniżeniu stopnia uszkodzeń DNA pod wpływem kałomoczu pozyskanego od tych zwierząt doświadczalnych. W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka zamieściła wyniki badań nad oceną wpływu pasz z udziałem synbiotyków i probiotyków na stężenie kwasu mlekowego, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA) oznaczone metodą HPLC w kałomoczu kurcząt i indyków. Na podstawie uzyskanych danych stwierdziła, że suplementacja pasz rodzimymi synbiotykami spowodowała istotny wzrost stężenia kwasu mlekowego i SCFA oraz obniżenie zawartości BCFA w kałomoczu ptaków doświadczalnych, w porównaniu do stężenia tych kwasów w kałomoczu kurcząt i indyków kontrolnych. Spośród ocenianych synbiotyków najbardziej skutecznym w kształtowaniu profilu kwasów tłuszczowych okazał się Synbiotyku C. Zagraniczne preparaty probiotyczne powodowały podobny do synbiotyków trend zmian stężenia badanych kwasów, obrazowany zarówno wzrostem koncentracji kwasu mlekowego i SCFA oraz obniżeniem poziomu BCFA. Stężenia tych kwasów oznaczone w kałomoczu badanych ptaków były jednak niższe od zawartości notowanych w wyniku aktywności

preparatów synbiotycznych. Potwierdzona została również wysoka skuteczność Synbiotyków A, B i C oraz probiotyków BioPlus 2B® i Cylactin® w niwelowaniu skutków skażenia pasz OTA i zakażenia zawiesiną bakterii *Salmonella* Typhimurium (ST) badanych ptaków. Pasza skażona OTA oraz zakażenie ST (kurczęta), poprzez naruszenie równowagi mikrobioty jelita oraz zmianę tempa i kierunku jej aktywności fermentacyjnej, powodowały istotne zmniejszenie kwasu mlekowego i SCFA oraz zwiększenie BCFA w kałomoczu kurcząt i indyków grup pozytywnych (skażonych OTA) w porównaniu do grup negatywnych (kontrolnych) ptaków. Suplementacja pasz skażonych OTA synbiotykami (kurczęta), synbiotykami i probiotykami (indyki) oraz dodatek synbiotyków do pasz dla kurcząt zakażonych ST, powoduje istotny wzrost stężenia kwasu mlekowego i SCFA oraz obniżenie zawartości BCFA w kałomoczu badanych ptaków. Synbiotyki C okazały się ponownie najskuteczniejszym preparatem w łagodzeniu skutków zakażenia kurcząt ST oraz skażenia pasz OTA u kurcząt i indyków. Stwierdzono, że zagraniczne preparaty probiotyczne BioPlus 2B® i Cylactin® okazały się mniej skuteczne od krajowych preparatów Synbiotycznych A, B i C w niwelowaniu wyników skażenia pasz OTA u indyków. W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła wyniki badań nad oceną wpływu dodatku do paszy własnych Synbiotyków A, B i C oraz komercyjnych probiotyków BioPlus 2B® i Cylactin® na aktywność fekalnych enzymów bakteryjnych dwóch  $\alpha$ -glikozydaz:  $\alpha$ -glukozydazy i  $\alpha$ -galaktozydazy i trzech  $\beta$ -glikozydaz:  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -galaktozydazy i  $\beta$ -glukuronidazy. Oznaczenie aktywności wymienionych wyżej enzymów przeprowadzono za pomocą metody spektrofotometrycznej w kałomoczu pozyskanym od ptaków. Stwierdzono istotny wzrost aktywności  $\alpha$ -glikozydaz oraz zmniejszenie aktywności  $\beta$ -glikozydaz w kałomoczu kurcząt i indyków żywionych paszami suplementowanymi synbiotykami i probiotykami w porównaniu do aktywności tych enzymów oznaczonej w kałomoczu ptaków kontrolnych. W przypadku probiotyków różnice w aktywności tych enzymów okazały się mniej wyraźne niż w przypadku synbiotyków. W porównaniu do grup kontrolnych, w grupach kurcząt i indyków żywionych paszą skażoną OTA oraz u kurcząt zakażonych ST, utrzymywanych na paszy bez dodatków, spadkowi aktywności  $\alpha$ -glikozydaz towarzyszył wzrost aktywności  $\beta$ -glikozydaz w kałomoczu badanych ptaków. Doktorantka stwierdziła, że suplementacja paszy synbiotykami (kurczęta) oraz synbiotyki i probiotykami (indyki) znosi niekorzystne skutki dotyczące zarówno skażenia pasz OTA u kurcząt i indyków jak i zakażenia bakteriami *Salmonella* Typhimurium u kurcząt. Wymiernym efektem takiego działania preparatów synbiotycznych i probiotycznych jest wzrost aktywności  $\alpha$ -glikozydaz oraz obniżenie aktywności  $\beta$ -glikozydaz w kałomoczu badanych ptaków. Stwierdzono, że spośród ocenianych preparatów synbiotycznych, Synbiotyki C okazały się najskuteczniejszym preparatem w utrzymaniu korzystnego profilu aktywności badanych enzymów fekalnych. Bardzo szeroki zakres niezmiernie pracochłonnych i czasochłonnych badań mikrobiologicznych, genotoksycznych i biochemicznych wymagał od Doktorantki bardzo dużej wiedzy teoretycznej, bardzo dobrego przygotowania analitycznego oraz dużego zaangażowania w realizacji ocenianej rozprawy. Wykorzystane w tych badaniach uznane i nowoczesne metody analityczne potwierdzają dużą dokładność i wiarygodność uzyskanych wyników oraz ich nowatorski charakter.

W rozdziale „Dyskusja” podzielonym na siedem porządkujących podrozdziałów Pani mgr inż. Paulina Markowiak-Kopeć przedyskutowała uzyskane wyniki badań w świetle wyników badań innych autorów. W dyskusji wykorzystwała również wyniki opublikowanych badań własnych i autorów z macierzystej jednostki. W pierwszej części tego rozdziału, omówiła zdolności: silnej antagonistycznej aktywności probiotycznych szczepów bakterii *Lactobacilli* w stosunku do szeregu grup bakterii chorobotwórczych i detoksyfikacji mykotoksyn, probiotycznych drożdży do stymulacji wzrostu bakterii kwasu mlekowego



i detoksyfikacji toksyn. Przedstawione zdolności mikroorganizmów probiotycznych oraz prebiotyku inuliny Autorka wykorzystała w omówieniu korzyści wynikających z ich stosowania w żywieniu kurcząt i indyków. Odniosła je również do pełnej charakterystyki opracowanych preparatów synbiotycznych w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Na podstawie wyników cytowanych prac omówiła zalety rodzimych, preparatów synbiotycznych z uzasadnieniem przeprowadzonych z ich udziałem badań. W kolejnej części przedyskutowała wyniki badań dotyczące przeżywalności mikroorganizmów probiotycznych w symulowanym układzie pokarmowy drobiu, w odniesieniu do ścisłych kryteriów, które muszą spełnić szczepy probiotyczne w procesie ich selekcji. Wyniki badań wykazały wysoką przeżywalność badanych mikroorganizmów, wyższą w obecności paszy, w symulowanych warunkach trawienia *in vitro*. Zostały potwierdzone wynikami badań innych autorów.

W następnej części tego rozdziału Autorka skonfrontowała wyniki badań własnych, dotyczące oceny wpływu synbiotyków oraz porównawczo probiotyków na liczebność mikrobioty jelitowej, zaburzeń równowagi mikrobioty jelitowej w wyniku skażenia pasz OTA oraz zakażenia bakteriami *Salmonella Typhimurium* u kurcząt i indyków z danymi literaturowymi. Uzyskane dane potwierdziły korzystny wpływ dodatku synbiotyków w paszy na skład ilościowy mikrobioty jelitowej oraz niwelowanie skutków skażenia OTA i zakażenia *Salmonella Typhimurium*. W kolejnej części Doktorantka omówiła, wyniki badań własnych dotyczące redukcji genotoksyczności kałomoczu u ptaków żywionych paszą suplementowaną synbiotykami lub probiotykami oraz u kurcząt i indyków narażonych na działanie OTA w paszy a także kurcząt zakażonych patogennymi bakteriami *Salmonella Typhimurium*. Porównała je z wynikami badań innych autorów, które potwierdziły skuteczność probiotyków w zapobieganiu salmonellozie u kurcząt. Na początku następnego etapu Autorka, wykorzystując dane literaturowe, w tym wyniki własnej opublikowanej pracy, przedstawiła udział mikroorganizmów jelitowych w powstawaniu SCFA i ich znaczeniu dla organizmu gospodarza. W świetle tych informacji omówiła uzyskane wyniki korzystnego wpływu ocenianych synbiotyków (w szczególności Synbiotyku C) i probiotyków na wzrost stężenia kwasu mlekowego i SCFA z równoczesnym obniżeniem koncentracji BCFA w kałomoczu badanych ptaków, kurcząt i indyków żywionych paszami skażonymi OTA i kurcząt zakażonych bakteriami *Salmonella Typhimurium*. Wyniki badań własnych znalazły potwierdzenie w wynikach badań zamieszczonych w cytowanych pozycjach piśmiennictwa. W dyskusji ostatniej części wynikowej rozprawy, w oparciu o prace innych autorów, w tym autorów z macierzystej jednostki, Doktorantka omówiła wpływ diety i metabolizmu bakteryjnego na aktywność i charakterystykę enzymów fekalnych, warunkującą powstawanie toksycznych a także i korzystnych dla organizmu związków. Po tym wprowadzeniu Autorka porównała wyniki badań własnych dotyczące korzystnego wpływu synbiotyków lub probiotyków w paszy na aktywność enzymów fekalnych  $\alpha$ -glikozydaz ( $\alpha$ -galaktozydaza i  $\alpha$ -glukozydaza) oraz  $\beta$ -glikozydaz ( $\beta$ -glukozydaza,  $\beta$ -galaktozydaza i  $\beta$ -glukuronidaza) w kałomoczu ptaków doświadczalnych, łagodzenie niekorzystnej aktywności  $\alpha$ -glikozydaz do  $\beta$ -glikozydaz u kurcząt i indyków otrzymujących paszę skażoną OTA oraz u kurcząt zakażonych patogennymi bakteriami *Salmonella Typhimurium*. Dane literaturowe potwierdziły wyniki badań przedstawione w ocenianej pracy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje dyskusja wyników oparta na rzeczowej analizie trafnie dobranych publikacji z zakresu przeprowadzonych badań. Autorka krytycznie podeszła do własnych wyników badań, choć ich dyskusja z przyczyn obiektywnych była niekiedy utrudniona. Rozdział ten świadczy o dużym zaangażowaniu oraz wiedzy Autorki związanej z tematem rozprawy doktorskiej. Dojrzałość naukową i bardzo duże zaangażowanie w podjętą problematykę badawczą Doktorantki potwierdza bardzo bogaty spis opublikowanych prac własnych. Jest Współautorką 17 publikacji naukowych, z których 9 zostało opublikowanych w czasopiśmie

z bazy JCR: 2 prace w „Nutrients” IF 5,9, 2 prace w Journal of the Science of Food and Agriculture IF 4,1, Cancers IF 5,2, Gut Pathogens IF 4,2, Scientific reports IF 5,0, Toxins IF 4,2, FEMS Microbiology Letters IF 2,8, ośmiu monografii i dwóch grantów naukowych oraz Uczestniczką 25 krajowych i zagranicznych konferencji naukowych. Za szczególną aktywność naukową Doktorantka została nagrodzona 8 nagrodami naukowymi.

W ostatnim podrozdziale Autorka podsumowała efekty szerokiego zakresu badań *in vitro* a także *in vivo*, które jednoznacznie wykazały wysoką ocenę skuteczności preparatów synbiotycznych (głównie Synbiotyku C) w żywieniu kurcząt i indyków, w zapobieganiu infekcjom bakteryjnym i mykotoksykozom. Zgadzam się w pełni z Autorką, która w zakończeniu tego rozdziału stwierdza cyt. „Badane preparaty synbiotyczne mogą być stosowane w żywieniu drobiu, stanowiąc alternatywę dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu”.

Rozdział 6 „Wnioski”. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań i ich analizie Autorka sformułowała w sposób jasny i zrozumiały osiem odpowiednich, interesujących wniosków i stwierdzeń, potwierdzających zrealizowanie celu pracy. Mają dużą wartość poznawczą i aplikacyjną.

Chciałbym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie i ustosunkowanie się do następujących uwag i pytań, które nasunęły mi się w trakcie czytania pracy:

W „Spisie treści” 1. Nie ma numeracji następujących podrozdziałów i ich tytułów dotyczących: metod hodowlanej płytkowej oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* : 4.2.1.1.1.1.; 4.2.1.1.1.2.; 4.2.1.1.2.1.; 4.2.1.1.2.2.; 4.2.1.1.3.1.;4.2.1.1.3.2.; 4.2.1.1.4.1.; 4.2.1.1.4.2.; 4.2.1.2.1.1.; 4.2.1.2.1.2.; 4.2.1.2.2.1.; 4.2.1.2.2.2. Wymienione podrozdziały znajdują się natomiast w tekście pracy.

Rozdział 1 „Przegląd literatury”

1. Czy podany rok 1929 jest właściwą datą odkrycia penicyliny przez Aleksandra Fleminga? Ze względu na znaczenie tego odkrycia proszę Doktorantkę o przedstawienie krótkiej jego historii z uwzględnieniem tzw. raportu Swanna z 1969 roku.

2. Przewód pokarmowy drobiu i wypełniająca go treść jelitowa jest głównym obszarem prowadzonych prac badawczych Doktorantki. Z tego względu proszę o uzupełnienie informacji dotyczących jego aktywności skurczowej i przebiegu w nim procesów trawienia.

Rozdział 3 „Materiały i metody”. Brak numeru strony „63”

1. Jaką procedurę postępowania przyjęto przy wyodrębnianiu jelita czczego z jelita cienkiego ptaków doświadczalnych i kolekcji treści u najmłodszych kurcząt i indyków doświadczalnych?

2. Czy pobierana do badań treść z jelita czczego starszych ptaków stanowiła całą jego objętość, czy była próbką treści pobraną z określonego jego odcinka?

3. Czy pobierano treść z jednego, czy z dwóch jelit ślepych i czy była to cała zawartość jelita/jelit, czy też była to próbka treści?

4. Jaka była procedura postępowania z pobranym materiałem biologicznym po jego kolekcji do chwili wykonania badań?

5. Na czym polegała modyfikacja własna zastosowana w laboratoryjnym modelu trawienia *in vitro* układu pokarmowego drobiu?

6. Czym należy tłumaczyć różnice temperatury ciała ptaków i aktywności skurczowej odcinków przewodu pokarmowego drobiu *in vivo* w stosunku do temperatury trawienia *in vitro* i intensywności mieszania w symulowanym układzie pokarmowym drobiu?

Rozdział 4 „Wyniki”

1. Uzupełnienie w tytułach tabel nazwy kurcząt „SPF” lub „różnych” umożliwi szybsze czytanie tekstu pracy.

2. Według mnie słowo „Nawet” jest zbyt często używane w tekście opisującym wyniki doświadczeń.

Przedstawione uwagi i pytania o charakterze porządkowym i dyskusyjnym nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę wartości merytorycznej pracy. Zaznaczone w tekście rozprawy nieliczne uchybienia stylistyczne i redakcyjne zaznaczyłem w tekście rozprawy.

### **Podsumowanie**

Pracę doktorską Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec pt. „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt” oceniam bardzo wysoko. Podjęty w pracy temat jest aktualny, bardzo ważny zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wykorzystanie przez Doktorantkę uznanych, nowoczesnych technik i metod analitycznych umożliwiło uzyskanie bardzo dokładnych, wiarygodnych, i nowatorskich wyników. Zostały one przedstawione prawidłowo i szeroko przedyskutowane w oparciu, o zgodne z tematem pracy, aktualne piśmiennictwo. Cel pracy został zrealizowany. Dojrzałość naukową i bardzo duże zaangażowanie Doktorantki potwierdza Jej okazały dorobek naukowy, przedstawiony w rozdziale 5 recenzji. Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska zasługuje na uznanie, zarówno ze względu na bardzo wysoką ocenę merytoryczną pracy jak i nowatorskie rozwiązanie problemu badawczego, potwierdzające wszechstronne przedmiotowe przygotowanie merytoryczne jak i analityczne Doktorantki do pracy naukowej.

### **Wnioski Końcowe**

W posumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec pt. „Skuteczność preparatów synbiotycznych w chowie indyków i kurcząt” spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (DZ.U. 2003 r. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o przyjęcie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Markowiak-Kopec i dopuszczenie pracy do publicznej obrony.

Bydgoszcz, dnia 04 października 2023 roku

dr hab. inż. Roman Szymeczko,  
prof. uczelni

