



Wrocław, 26.08. 2021 r.

prof. dr hab. Anna Rząsa

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Łupkowskiej-Grygorcewicz pt.:

„Wpływ mikroorganizmów probiotycznych wytworzonych w technologii EM[®] na jakość mięsa i wybrane wyniki produkcyjne tuczników”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Artura Rybarczyka, prof. Uczelni w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii, na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Ciągłe doskonalenie wartości użytkowej trzody chlewnej, jest priorytetem różnych programów hodowlanych, systemów utrzymania i żywienia. Jak już na wstępie zaznacza doktorantka, żywność, w tym mięso i jego przetwory, są dobrem podstawowym i stanowią ważny komponent zróżnicowanej diety człowieka. W krajach wysokorozwiniętych ciągle wzrasta spożycie mięsa, choć zmieniają się preferencje i oczekiwania konsumentów. Poszukują oni nie tylko produktów względnie tanich i o wysokiej jakości, za którą kryje się bezpieczeństwo zdrowotne (w tym brak pozostałości wszelkich chemioterapeutyków). Chcieliby również by te produkty pochodziły od "zdrowych i szczęśliwych zwierząt", a ostatnio coraz większą wagę przykładają do właściwości prozdrowotnych oferowanej na rynku żywności. Te przeciwstawne często oczekiwania - wysoka jakość i niska cena, stanowią wyzwanie dla hodowców i producentów trzody chlewnej, przemysłu mięsnego oraz naukowców zajmujących się tym gatunkiem.

Do tej pory w pracach hodowlanych skupialiśmy się nad poprawą założeń genetycznych utrzymywanych świń i udało się znacznie zwiększyć mięsność tuczników w chowie masowym. Obecnie prowadzone są intensywne prace nad szeroko pojętą poprawą jakości surowca rzeźnego. Od 28 stycznia 2022 roku obowiązywać będzie w Unii Europejskiej nowe rozporządzenie, które poszerza wprowadzony w 2006 roku zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu u zwierząt rzeźnych, poprzez zaostrzenie walki z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe.



W obszarze utrzymania jak i poprawy wydajności, jakości surowca rzeźnego oraz przede wszystkim ochrony zdrowia zwierząt, dużo uwagi skupia się na różnych dodatkach paszowych, które mają zastąpić antybiotyki. Jest to niezwykle aktualne również w odniesieniu do koncepcji „jedno zdrowie” (One Health), która odnosi się do ochrony zdrowia człowieka, przy współdziałaniu ochrony zdrowia zwierząt. W tym zakresie ocena mikrobiomu jelitowego świń zyskała w ostatnich latach na znaczeniu. Wykazano, iż podaż różnych dodatków paszowych może modulować skład taksonomiczny mikrobiomu jelitowego, co z kolei może wpływać, między innymi, na zwiększoną odpowiedź immunologiczną oraz efekty produkcyjne. Ciągle jeszcze wiedza w tym zakresie jest niepełna. Dzięki rozwojowi technologii możemy identyfikować materiał genetyczny ogółu drobnoustrojów, w tym bakterii (mikrobiota), które stanowią zróżnicowaną społeczność mikroorganizmów komensalnych, symbiotycznych i patogennych, bytujących w przewodzie pokarmowym. Pod tym względem podjęte przez Doktorantkę badania należą do niezwykle istotnych i poszerzających naszą wiedzę w tym zakresie.

Przedłożona do recenzji praca przygotowana jest w klasycznym układzie i składa się z 119 stron maszynopisu. Po stronie tytułowej, umieszczony jest Spis treści (2 strony), Wykaz skrótów i akronimów (3 strony), Wstęp (3 strony), Przegląd piśmiennictwa (32 strony), Cel pracy (1 strona), Hipoteza badawcza (1 strona), Materiał, organizacja i metody badań (11 stron), Wyniki i ich omówienie (14 stron), Dyskusja (9 stron), Stwierdzenia i wnioski (3 strony), Streszczenie w języku polskim i angielskim (4 strony), Spis tabel (2 strony), Spis rycin (1 strona), Literatura (31 stron).

Temat i zakres podjętych przez doktorantkę prac wpisują się w najnowsze trendy badawcze oraz, co istotne, w oczekiwania producentów i konsumentów żywności wieprzowej. Maszynopis pracy przygotowany jest bardzo starannie, niewiele jest tam uchybień edytorskich, które z racji obowiązku recenzenta wymienię na końcu.

Pierwsza refleksja, która nasunęła mi się przy czytaniu pracy, związana jest z wielkością spisu literatury - 306 pozycji to moim zdaniem stanowczo za dużo. Wpłynęło to na układ całego maszynopisu, w którym najdłuższym rozdziałem jest Przegląd literatury, a tylko jedną stroną mniej zajmuje spis tejże literatury. Nagromadzenie tak dużego zbioru publikacji zaowocowało nadgorliwością w przybliżeniu czytającym pracę wszystkiego co Autorka zebrała, przez to w Przeglądzie literatury przedstawionych jest zbyt dużo różnych wątków i zbyt szczegółowo. Mam



nadzieję, że ten swój duży nakład pracy w tym obszarze później wykorzysta Autorka do przygotowania kilku prac przeglądowych. Bardzo ważny rozdział Materiał i Metody jest trochę chaotyczny i nie jest w nim przestrzegana chronologia postępowania eksperymentalnego. Początek dyskusji wygląda jak kontynuacja przeglądu literatury, w całej dyskusji brakuje mi własnych komentarzy Autorki. Pod koniec mam niedosyt jednoznacznych zaleceń dla praktyki. Najlepiej napisanym rozdziałem jest ten, gdzie przedstawiono wyniki badań.

Teraz przedstawię chronologicznie spostrzeżenia, jakie nasunęły mi się w trakcie lektury maszynopisu. Mam nadzieję, że zwrócenie uwagi na pewne kwestie bądź niedociągnięcia pozwoli lepiej zredagować pracę przy przygotowywaniu publikacji oraz pozwoli na ustosunkowanie się do przedstawionej recenzji w trakcie publicznej obrony.

1. **Wykaz skrótów i akronimów**, konsekwentnie nie wprowadzono wszędzie tłumaczeń z języka angielskiego lub pełnego rozwinięcia skrótu np.:

a) EMA - jest wszystko i pełne rozwinięcie nazwy i przetłumaczenie (Europejska Agencja Leków/European Medicine Agency a przy WHO jest tylko polskie tłumaczenie - Światowa Organizacja Zdrowia,

b) BW1 - jeśli używamy skrótów od słów angielskich to należy tak jak wcześniej dodać też te słowa body weight/masa ciała.

2. **Wstęp** jest bardzo dobrym wprowadzeniem do zagadnień poruszanych w pracy. Mam tylko drobne uwagi, wynikające z moich odczuć a nie zastrzeżeń merytorycznych.

- uważam, że obecnie dążymy nie do poprawy zdrowotności zwierząt a raczej do utrzymania ich wysokiego statusu zdrowotnego bądź stanu zdrowia;

- zamiast sformułowania "wyników produkcyjnych ich tuczu" użyłabym "użytkowości tucznej";

- zamiast "w okresie odsadzenia i po odsadzeniu" użyłabym "w okresie okołoodsadzeniowym";

- na str.9 mamy średnie dzienne przyrosty masy ciała a powinno być dobowe, prawidłowo jest to przedstawione w skrótach;

- niezręcznie sformułowano "mikrobiota jelitowa jest celem wielu prac badawczych", może inaczej?

- i najważniejsza dla mnie uwaga: błędnie w wielu miejscach, i w innych rozdziałach pracy, używane jest określenie "hodowla" podczas gdy najczęściej Autorka ma na myśli "chów". Hodowla



to działania mające na celu zmianę założeń dziedzicznych (genotypu) w zakres których wchodzi ocena wartości użytkowej i hodowlanej, selekcja i dobór osobników do kojarzenia. Chów zwierząt polega na zapewnieniu im prawidłowych warunków bytowania i rozwoju, dzięki którym możliwy jest pełny rozwój pożądanых cech.

3. **Przegląd piśmiennictwa**, wcześniej już wspomniałam, że to bardzo obszerny rozdział pracy, zacytowano w nim ponad 76% zgromadzonej literatury. Niepotrzebnie wprowadzone są tam aspekty nie poruszane w badaniach własnych. Podobnie jak wcześniej nie mam zastrzeżeń merytorycznych, tylko parę drobnych uwag dotyczących niefortunných, zbyt potocznych według mnie sformułowań, jak przytoczona wcześniej "hodowla";

- "zdrowotność żywności" - a słyszał ktoś o "chorej żywności";

- "biegunki zakaźne" - raczej na tle zakaźnym czy o zakaźnej etiologii;

- "jakość mięsa kształtowana jest .m.in. .. przez rasę, genotyp" - czy to nietożsame?;

- na stronie 12 jest podane, że roczne zużycie antybiotyków w naszym kraju wynosi ponad 800 ton, to są dane z 2014 roku i należało to dodać, gdyż nieuważny czytelnik może błędnie to zinterpretować;

- cytując pozycję literatury Doktorantka napisała: "wzrost zawartości IgG i IgA poprawia istotnie zdrowie prosiąt" - to zbyt dosłowny cytat, sama koncentracja immunoglobulin może być różnie interpretowana, wysoka nie zawsze świadczy o dobrym stanie zdrowia.

4. **Cel pracy**, jakkolwiek jest dobrze założony to trochę niezręcznie sformułowany: "założenia zasadniczego celu dysertacji postanowiono osiągnąć" raczej cel ten zrealizowano poprzez.... i tu wymieniamy cele szczegółowe, w 4 celu szczegółowym brakło na początku słowa "określenie" bądź "ocena" ... kształtowania się wyróżników.

5. **Materiał, organizacja i metody badań**, do tego rozdziału mam najwięcej zastrzeżeń merytorycznych.

- zaczynając od opisu materiału badawczego: powinno być, że tuczники były utrzymywane w systemie głębokiej ściółki i żywione do woli paszą sypką. Brakuje informacji o wielkości kojców, w których były utrzymywane tuczники, w jakim okresie (pora roku) przeprowadzono badania, czy grupa, w której stosowano zamgławianie była w oddzielnym budynku, może były



jakieś ściany/kurtyny między kojcami? czy ferma towarowa, w której przeprowadzono doświadczenie pracuje w cyklu zamkniętym?

- przedstawiony układ doświadczenia jest też mało precyzyjny, ogółem wybrano do tuczu 120 prosiąt, które przydzielono do 4 grup i taką mamy liczbę w Tab.6. Tam też jest podane, że liczba tuczników wybranych do badań to 96 (dokładnie tą liczbę mamy podaną w streszczeniu pracy). Należałoby wyjaśnić z czego wynika ta rozbieżność, czy te 24 sztuki w każdej grupie to np. osobniki indywidualnie przeważane?, pobrano od nich później próby do oznaczeń laboratoryjnych?, na str. 48 mamy podane, że do analiz mikrobiologicznych w treści i śluzówce okrężnicy pobrano odcinki okrężnicy od 10 tuczników z każdej grupy a nie od 24.

- czy czterogodzinne zraszanie półtuszy nie miało na celu po prostu szybszego ich schłodzenia?, po 18 godzinach pobytu w chłodni na pewno wszystkie były dobrze schłodzone.

- na str.47 jest napisane, że analizę mikrobiologiczną pasz zadawanych w trakcie badań dla 3 grup przedstawiono w publikacji ..., z tego co jest przedstawione w pracy można błędnie pomyśleć, że nie oceniono paszy z Grupy EM-3Z. Oczywiście wiem, że jest to oceniona mieszanka EM-3, to tylko małe niedopatrzenie ;)

- na str. 48 jest napisane, że pomiar pH przeprowadzono 5 razy, w tym w 3. i 4. dobie po uboju na wiszących półtuszach, a z informacji ze str. 44 wynika, że rozbiór półtuszy na elementy nastąpił po 18 godz. schładzania ;)

- czy jeśli mamy wagę bitą ciepłą i końcową masę ciała (w dniu sprzedaży na ubój) to nie można było wyliczyć wydajności rzeźnej?

- trochę niejasno przedstawiono jak przeprowadzano ocenę fizykochemiczną, rozumiem, że część pomiarów przeprowadzono w ubojni a część w laboratorium na pobranych próbach - czy tak?, godzina pobrania prób mięśnia podana jest dopiero przy opisie oznaczania wycieku swobodnego- 24 godz.

- opracowanie statystyczne wyników jest też trochę enigmatycznie przedstawione, chodzi mi o układ w jakim były analizowane zebrane dane. Na przykład w tab. 9 z wynikami mamy tylko 3 grupy i z wcześniejszego opisu - pkt.5.4.1. Analiza mikrobiologiczna paszy i okrężnicy wynika, że do oznaczeń mikrobiologicznych pobrano próby łącznie od 30 osobników (czyli nie pobrano prób od tuczników z grupy EM-3Z?) , a już w kolejnych tabelach mamy wyniki dla 4 grup i jakie są tam liczebności?



6. **Wyniki i ich omówienie** to bardzo dobrze napisany rozdział w pracy, uzyskane wyniki przedstawione są w czytelnych tabelach i na ciekawych pod względem graficznym wykresach.

- we wspomnianej już wcześniej Tab.9 brakuje wyników dla Grupy EM-3Z, dlaczego?

- Tab.11, ostatni analizowany parametr to "Grubość mięśnia", chyba powinno być dodane LD, jest to istotne gdyż pozostałe analizy mięsa przeprowadzane były na próbach mięśnia *Longissimus dorsi*, ale na jego lędźwiowej części czyli LL (*Longissimus lumborum*) i ta informacja powinna się znaleźć w tytule tabeli bądź wykresu, które to elementy pracy powinny być w pełni informatywne same w sobie.

7. **Dyskusja**, zwłaszcza na samym początku brakuje tu prawdziwej dyskusji, wprowadzenie ma charakter dalszego przeglądu literatury. W drugiej części, przy ocenie wartości rzeźnej i analizach laboratoryjnych jest już znacznie lepiej. Uważam, że za dużo przedstawiono tutaj informacji związanych z funkcjonowaniem układu odpornościowego podczas gdy w pracy własnej nie oceniano statusu zdrowotnego czy wybranych parametrów immunologicznych.

Moim zdaniem, w odróżnieniu do cytowanych w pracy autorów, probiotyki mają przede wszystkim działanie immunoprotektywne. Poprzez podaż różnych pożądaných bakterii staramy się wpływać na mikrobiom gospodarza po to, by właśnie nie pobudzać nadmiernie jego układu immunologicznego (czyli nie aktywować do obrony i nie zaburzać dalszego dojrzewania). Oczywiście nie oznacza to, że przy suplementacji probiotyków nie obserwujemy wzrostu koncentracji różnych parametrów odporności komórkowej czy humoralnej, ale interpretacja tego wzrostu nie jest wcale taka oczywista. Działanie immunostymulujące mają z kolei prebiotyki. Drożdże z kolei są dodatkiem o właściwościach synbiotycznych - to taki pro- i prebiotyk w jednym, który może wykazywać zarówno działanie immunoprotektywne jak i immunostymulujące stąd interpretacja wpływu tego dodatku na organizm gospodarza może być wyzwaniem.

8. Pracę podsumowuje 14 stwierdzeń i 7 wniosków, w moim subiektywnym odczuciu lepiej brzmi tytuł rozdziału: Podsumowanie i wnioski. O tym czy cel pracy został zrealizowany dowiadujemy szukając odpowiedzi na postawione w pracy cele. W samych wnioskach brakuje mi odpowiedzi na 3 i 4 cel szczegółowy, choć w spostrzeżeniach takie odpowiedzi są - nie dało się z tego wyciągnąć żadnego wniosku? Mimo podjętej próby rozdzielenia spostrzeżeń od wniosków, to te ostatnie w większości sugerowałabym zmodyfikować.



Wniosek 7 odpowiada na cel podstawowy pracy i ja dałabym go jako pierwszy.

Wniosek 1 - w części odpowiada na pierwszy cel szczegółowy, ale nie dodano informacji o wielkości dawki czyli jest mało precyzyjny, może tak:

Najlepsze wyniki użytkowości tucznej i rzeźnej uzyskano w Grupie EM-3Z (0,3% dodatek probiotyków LAB i drożdży *S.cerevisiae* do paszy oraz zamglawianie ich 20% r-em).

lub

Najlepsze wyniki użytkowości tucznej i rzeźnej uzyskano przy kompleksowym zastosowaniu probiotyków LAB i drożdży *S.cerevisiae*: 3% dodatek do paszy oraz zamglawianie 20% roztworem.

Wniosek 2 - ten wniosek należy przeredagować, o tym, że istnieje ryzyko pogorszenia oczekiwanych wyników można napisać w spostrzeżeniach.

Wniosek 3 - zmodyfikowałabym lekko jego treść: "W badaniach własnych potwierdzono, że istnieje ujemna zależność pomiędzy procentową zawartością mięsa w tuszy a jego jakością i zawartością tłuszczu śródmięśniowego", gdyż te zależności wielokrotnie już anonsowano.

Wniosek 5 - może tak:

Odnotowano pogorszenie jakości technologicznej mięsa w grupie otrzymującej najwyższą dawkę ...

Wniosek 6 - może tak:

Odnotowano wpływ dodatku bakterii LAB i drożdży *S.cerevisiae* na redukcję bakterii z rodziny Enterobacteriaceae w mikrobiomie jelitowym.; drugą część tego wniosku należy przenieść do spostrzeżeń.

8. **Literatura**, jeszcze raz podkreślam, że wybrano do wykorzystania w pracy zbyt wiele pozycji. Na tym tle wydaje mi się też, że jest zbyt dużo artykułów dotyczących drobiu. Nie licząc Norm i Rozporządzeń w pracy zacytowano 115 pozycji polskich autorów (artykuły w języku polskim i angielskim) co dobrze świadczy o rozpoznaniu krajowego rynku specjalistów zajmujących się problematyką podjętą też w badaniach własnych.

Chciałabym podkreślić, iż przedstawione moje własne uwagi i zastrzeżenia nie umniejszają ogólnej wartości pracy. Doktorantka połączyła pracę w terenie - co obecnie naprawdę jest trudno zrealizować, z bogatym warsztatem laboratoryjnym. Mnogość różnych oznaczeń i analiz wymagała współpracy z wieloma osobami, co dobrze świadczy o umiejętnościach interpersonalnych samej Doktorantki jak i na pewno Promotora pracy.



O bardzo dużej staranności w redagowaniu pracy świadczy niezwykle mała liczba zauważonych błędów, znamienita ich większość występuje w spisie literatury: na str. 9 brakuje litery "w" ; na str. 82 jest "jaki" brakuje spacji; na str. 84 jest "performanceof" zamiast "performance of"; str. 89 jest "theiritters" brakuje spacji; str. 91 jest "earlyweaned" brakuje spacji; str. 93 jest "liveweight" brakuje spacji; str. 94 "nadprogramowe" pełne imię w poz.53; str.94 jest "ef-fect" zamiast effect; str. 96 jest "orfermented" brakuje spacji; str. 96 jest "chcks" powinno być chicks; str. 96 jest "ststus" zamiast status; str. 101 jest "Jakość" zamiast Jakość; str. 108 jest "drived" zamiast derived; str. 108 jest "odchowoy" zamiast odchowu; str. 113 jest "Poski" zamiast Polski; str. 113 jest "Przydatność" zamiast Przydatność; w Spisie literatury nie ma pozycji Kim i in. 2007 cytowanej w Dyskusji.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Łupkowskiej-Grygorcewicz pt. **„Wpływ mikroorganizmów probiotycznych wytworzonych w technologii EM[®] na jakość mięsa i wybrane wyniki produkcyjne tuczników”**, spełnia wymogi określone w artykule 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. z 2017 r., poz.1789). W związku z tym, przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wnioski o jej przyjęcie i dopuszczenie Autorki tej rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem