

Prof. dr hab. Zenon Zduńczyk
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
Zakład Biologicznych Funkcji Żywności
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marcina BARSZCZA p.t. "*Aktywność flory bakteryjnej i stan bariery ochronnej błony śluzowej jelita grubego młodych świń żywionych paszami z dodatkiem inuliny*", wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Skomiała oraz promotora pomocniczego dr Marcina Taciaka w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk

Ocena strony formalnej rozprawy

Promotor pracy, promotor pomocniczy oraz doktorant złożyli stosowne oświadczenia, co do zgodności opracowania z warunkami wymaganymi do przedstawienia rozprawy doktorskiej, w tym samodzielnego opracowania problemu badawczego, bez naruszania praw autorskich osób trzecich.

Na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską składają się dwie anglojęzyczne publikacje w czasopismach naukowych, w których Marcin Barszcz jest pierwszym autorem, a pozostali dwaj współautorzy złożyli stosowane oświadczenia, wskazujące kluczową rolę doktoranta w prowadzeniu badań i publikowaniu prac. Przedłożone publikacje uzupełniono polskojęzyczną monografią prezentującą wybrany problem badawczy, cele i metody realizowanych badań oraz podsumowaniem wyników.

Z przedstawionych do oceny prac, jedną zaakceptowano do druku w *Animal Production Science* (IF 0,902, 35 pkt. w ocenie parametrycznej MNiSzW), a drugą opublikowano w *Archives of Animal Nutrition* (IF = 1,319, 30 pkt.). Obie rozprawy są pracami zespołowymi, w obu przypadkach z udziałem trzech osób: doktoranta i promotorów, którzy deklarują swój udział w realizacji i publikacji wyników badań, odpowiednio na 60% (doktorant) oraz 20% i 20% (promotorzy).

Stosownie do powyższych ustaleń oraz faktu, że prace opublikowano w wysoko notowanych czasopismach naukowych, stwierdzam, że formalna strona przedstawionej rozprawy doktorskiej nie budzi wątpliwości.

Ocena merytoryczna rozprawy

1. Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy

Kluczowym aspektem poznawczym pracy było udokumentowanie zmian w składzie i aktywności mikrobioty oraz stanie bariery ochronnej błony śluzowej jelita grubego młodych świń w zależności od pochodzenia, struktury chemicznej i zawartości w diecie spolimeryzowanych fruktanów. Praktycznym aspektem pracy była ocena przydatności inuliny z cykorii o różnym stopniu spolimeryzowania i suszu z bulw topinamburu w stymulacji składu i funkcjonowania mikrobioty przewodu pokarmowego młodych świń. Zagadnienie to, szczególnie po wprowadzeniu unijnego zakazu stosowania antybiotyków paszowych w żywieniu zwierząt jest popularnym i ciągle ważnym kierunkiem badań. Dopóki bowiem nie ustali się ilościowej relacji między typem i dawką dodatków klasyfikowanych jako prebiotyczne (analogicznie probiotycznych i synbiotycznych), a kluczowymi efektami fizjologicznymi (składem i aktywnością mikrobioty, wskaźnikami statusu zdrowotnego jelit i efektami produkcyjnymi) żywieniowa przydatność licznej grupy preparatów oligo- i polisacharydowych będzie zagadnieniem otwartym.

W rozdziałach *Wstęp* i *Przegląd literatury* polskojęzycznej monografii, jak też w rozdziale *Introduction* obu prac, zasygnalizowano najważniejsze zagadnienia dotyczące realizowanej tematyki badawczej, tj. (1) skład i rolę stabilnej mikrobioty w utrzymaniu zdrowia jelit świń, (2) czynniki stabilizujące skład i funkcje mikrobioty jelitowej, (3) dotychczasowe doświadczenia ze stosowaniem w żywieniu świń preparatów inuliny, (4) fizjologiczna rola produktów fermentacji, w tym głównych produktów (sumy i poszczególnych krótkołańcuchowych kwasów), w odżywianiu tkanek, ochronie integralności nabłonka jelit oraz stymulacji układu immunologicznego oraz (5) struktura i fizjologiczne właściwości fruktanów, w tym spolimeryzowanej inuliny.

Przegląd piśmiennictwa oceniam jako kompletny pod względem zakresu analizowanych zagadnień i merytorycznie spójny, umożliwiający trafny wybór kierunku, zakresu i metod badań.

Powyższe stwierdzenie to nie dotyczy jednego zagadnienia; eksperymentalnych przesłanek do zastosowanych ilości inuliny w diecie (1, 2 lub 3%). W jednym z fragmentów monografii (strona 45 i 46) przytoczono pracę Halas i wsp. (2010), jako przykład doświadczenia, w którym stosowano 4 i 8% inuliny w diecie, jednakże zagadnienie to nie było dyskutowane. W tym kontekście kieruję pytanie do doktoranta, czy znajduje przekonujący argument, że doświadczeniu własnym większa niż 3% dawka preparatu

inulinowego byłaby celowa?

2. Zdefiniowanie hipotez/celów badawczych

W polskojęzycznej monografii doktorant sformułował trzy hipotezy dotyczące potencjalnego oddziaływania na ekosystem jelit świń trzech czynników doświadczalnych: (1) zróżnicowanego stopnia spolimeryzowania inuliny w preparatach z cykorii, (2) preparatu inuliny z cykorii i bogatego w inulinę suszu z topinamburu oraz (3) preparatu probiotycznego, podawanego bez lub w połączeniu z preparatem inulinowym. W żadnej z tych, dość ogólnikowych, hipotez nie sformułowano przesłanek i oczekiwanego efektu fizjologicznego.

Z myślą o przyszłej pracy naukowej zwracam uwagę, że hipoteza badawcza to nie dowolne założenie, a założenie wyprowadzone z merytorycznych przesłanek, przedstawionych w przeglądzie piśmiennictwa, zatem wskazujących określone oczekiwania, które są eksperymentalnie weryfikowane.

W tym kontekście kieruję do doktoranta trzy pytania:

- jakich efektów fizjologicznych spodziewał się wprowadzając do diety preparaty inulinowe z cykorii o różnym stopniu spolimeryzowania?
- z jakich powodów spodziewano się zróżnicowanych efektów zastosowania preparatów inulinowych z cykorii i suszu z bulw topinamburu?
- jakie były oczekiwania co do sposobu (kierunku) modyfikacji wpływu preparatów prebiotycznych przez dodatek preparatu probiotycznego.

Niezależnie od przedstawionych uwag, kierunek i zakres projektowanych badań był dobrze uzasadniony w przeglądzie piśmiennictwa, a oceniane publikacje i polskojęzyczną monografię cechuje wysoka wartość poznawcza i użyteczna.

3. Zakres i metody badań

Część metodyczna badań, zarówno w załączonych publikacjach (co dość oczywiste), jak i w polskojęzycznej monografii jest wyczerpująca i należyście prezentuje najważniejsze elementy badań, mianowicie:

- pochodzenie i charakterystykę czynników doświadczalnych, tj. preparatów inuliny i suszu z topinamburu oraz preparatu probiotycznego, jak również sposobu i ilości wprowadzenia ich do diet;
- pochodzenia oraz sposób utrzymania zwierząt doświadczalnych, zestawionych w dostatecznie liczne grupy żywieniowe (poza jedną kwestią zasygnalizowaną dalej, w

odniesieniu o omówienia wyników badań);

- wyboru kryteriów oceny fizjologicznej reakcji zwierząt na zastosowane dodatki paszowe.

Mocną stroną przeprowadzonych badań była charakterystyka wielokierunkowego oddziaływania zastosowanych preparatów prebiotycznych i preparatu probiotycznego, tj. ocena wpływu na procesy fermentacyjne i liczebność wybranych grup mikroflory, wpływ na wskaźniki integralności błony śluzowej jelit oraz na wpływ kluczowe parametry układu odpornościowego związanego z błonami śluzówki jelit.

Słabą stroną części metodycznej było wprowadzanie do diet preparatów fruktanowych jako zamienników skrobi kukurydzianej, a nie innego typu błonnika pokarmowego, np. preparatu celulozowego. W zakresie analizowanych wskaźników reakcji fizjologicznej zwierząt słabą stroną pracy był brak pomiaru ilości treści pokarmowej w poszczególnych odcinkach i stopnia uwodnienia tej treści. Ze względu na znane żelotwórcze właściwości inuliny wskazane było sprawdzenie, czy składnik ten nie wpływał na tranzyt treści pokarmowej, a zawartość wody nie była czynnikiem zmniejszającym koncentrację składników, w tym krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w treści.

4. Wyniki badań i ich omówienie

Jak stwierdzono w doświadczeniu 1, zastosowanie w dietach młodych świń 1, 2 lub 3% inuliny o różnym stopniu polimeryzacji (≥ 10 lub ≥ 23) nie spowodowało jednoznacznego, zależnego od dawki, wpływu inuliny na procesy fermentacyjne i liczebność *Bifidobacterium* oraz wskaźniki integralności błony śluzowej jelit i funkcjonowania układu odpornościowego związanego z błoną śluzową. Niektóre wskaźniki charakteryzujące procesy fermentacyjne w jelicie grubym świń wskazywały, że w zestawieniu z oddziaływaniem inuliny z DP ≥ 10 , dodatek inuliny z DP ≥ 23 był bardziej efektywny, tj. zwiększał koncentrację sumy LKT, w tym kwasu masłowego, jednakże w stopniu niedostatecznym, aby obniżyć pH treści jelit i zwiększyć liczebność *Bifidobacterium*. Najniższy dodatek inuliny o wyższym DP zwiększył liczbę limfocytów śród nabłonkowych, a taki sam dodatek inuliny o niższym DP obniżył miano wydzielniczej immunoglobuliny A, w porównaniu z grupą kontrolną.

W doświadczeniu 2, w którym diety różnicowano dodatkiem różnych preparatów inulinowych (inuliny z cykorii i suszu z bulw topinamburu w równoważnej ilości 1, 2 lub 3% inuliny) oraz preparatu probiotycznego, stwierdzono wiele różnic analizowanych parametrów,

nie wskazujących jednakże ukierunkowanego wpływu zastosowanych dodatków na procesy fermentacyjne, liczebność wybranych grup bakterii oraz funkcjonowanie GALT.

Podsumowanie wyników obu doświadczeń było bardzo trudne dlatego wysoko oceniam, opracowany przez doktoranta rozdział Dyskusja, niezależnie od wielu kwestii nierozstrzygniętych lub zweryfikowanych negatywnie. W mojej ocenie przedstawiona do oceny praca doktorska bardzo dobrze dokumentuje liczne problemy, konieczne do rozwiązania w spójnej ocenie przydatności różnych preparatów prebiotycznych w sterowaniu składem i aktywności mikrobioty jelit, ochronie integralności jelit i funkcjonowania GALT.

5. Podsumowanie wyników badań

Odpowiednio do wyników prezentowanych w dwóch publikacjach i monografii ich podsumowaniem jest sześć stwierdzeń, numerowanych cyframi rzymskimi, a zamieszczonych w rozdziale Wnioski monografii. Użycie czasu przeszłego trafniej kwalifikowałoby je jako zestawienie najważniejszych wyników, poprzedzające niżej sformułowany wniosek, wskazujący że stymulowaniu ekosystemu jelit na większą skutecznością cechowała się inulina o wyższym stopniu polimeryzacji, a jeszcze bardziej suszu z bulw topinamburu, ograniczający fermentację proteolityczną i zwiększający populację *Bifidobacterium* w jelicie grubym. Kolejnym wnioskiem było stwierdzenie, że dodatki inuliny, zarówno w postaci czystych preparatów jak i suszu z topinamburu, nie wzmacniają bariery ochronnej jelita grubego prosiąt, a zastosowany preparat probiotyczny nie wspomaga działania inuliny o średnim stopniu polimeryzacji ≥ 23 , ani suszu z bulw topinamburu.

Przytoczone stwierdzenia dowodzą, że zrealizowano zasadnicze cele pracy doktorskiej, niezależnie od faktu, że niektóre hipotezy badawcze zweryfikowano negatywnie. Jak wskazywałem wcześniej nie ustalono dotąd ilościowej relacji między typem i dawką dodatków prebiotycznych, a kluczowymi efektami fizjologicznymi, tj. składem i aktywnością mikrobioty, wskaźnikami statusu zdrowotnego jelit i efektami produkcyjnymi u świń. W tej trudnej drodze publikacje przedstawione jako podstawa rozprawy doktorskiej są znaczącym krokiem, weryfikującym szereg ważnych aspektów poznawczych i praktycznych. Kontynuowanie tych badań, ze względu na aktualność tematyki oraz nabytą wiedzę i kwalifikacje metodyczne doktoranta, jest w pełni uzasadnione.

Doktorant, jako jeden z celów przyszłych badań, wskazuję potrzebę wyjaśnienie przyczyn odnotowanych rozbieżności dotyczących w wielkości populacji *Bifidobacterium* oraz oddziaływanie inuliny na bakteryjny rozkład białka w jelicie grubym świń. W tym

kontekście za konieczne uznaje zbadanie wpływu czynników genetycznych (rasy) na skład i aktywność flory bakteryjnej jelita grubego świń. Po lekturze oryginalnych publikacji i monografii nie jestem pewien, czy w drugim doświadczeniu odchowywane prosięta, przed transportem do obiektu doświadczalnego, były przyzwyczajane do paszy z zawartością inuliny. Wcześniejsza, przed odsadzeniem prosiąt, stymulacja flory bakteryjnej może mieć znaczenie, być może nie mniejsze niż różnice genetyczne prosiąt.

Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Marcina Barszcza p.t. *"Aktywność flory bakteryjnej i stan bariery ochronnej błony śluzowej jelita grubego młodych świń żywionych paszami z dodatkiem inuliny"*, jest podsumowaniem obszernych studiów eksperymentalnych, podporządkowanych ważnym celom poznawczym i praktycznym. W pracy wykorzystano właściwe, nowoczesne metody badawcze, pozwalające na uzyskanie wiarygodnych wyników, poszerzających wiedzę o przydatności spolimeryzowanych fruktanów w sterowaniu składem i fizjologicznymi efektami pobudzania flory bakteryjnej jelit młodych świń oraz stymulowania barier ochronnych śluzówki jelit i związanego z błoną śluzową układu immunologicznego.

W podsumowaniu powyższych ocen stwierdzam, że oceniana praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, określonym w ustawie z dnia 14. marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym z zakresu sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 59, Dz. U. z 2005 nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455) i przedstawiam Wysokiej Radzie Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Barszcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 02.12.2016 r.

