



dr hab. inż. Witold Szczurek, prof. IZ-PIB
Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa

Balice, dnia 9 kwietnia 2020 roku

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Abdelbasset Benzertiha, MSc

pt. **“The usage of insect biomass in broiler chicken diets and its impact on growth performance and immune system response”**

Tytuł w polskojęzycznym brzmieniu:

„Zastosowanie biomasy owadów w dietach kurcząt rzeźnych a wyniki odchovu i odpowiedź układu immunologicznego”

wykonanej w Katedrze Żywienia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr. hab. Damiana Józefiaka (promotor) oraz dr Agaty Józefiak (promotor pomocniczy).

Formalną podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Zootechniki i rybactwo Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz pismo Dziekana Wydziału z dnia 28.02.2020 r. (nr rejestracyjny pisma WZM-4000-01/2020).

Kwestie hodowli i wykorzystania owadów jako źródła składników odżywczych, głównie białek i lipidów, dla zwierząt gospodarskich, towarzyszących oraz akwakultury to obecnie jeden z najbardziej „gorących” tematów badawczych w wielu akademickich i nieakademickich ośrodkach naukowych na całym świecie. Potwierdza to ilość najnowszych publikacji w tym zakresie. Dla przykładu, projekty realizowane w różnych instytucjach zaowocowały opublikowaniem w ciągu ostatnich kilkunastu miesięcy aż 34 artykułów w niezwykle „popularnym” czasopiśmie *Animals* wydawnictwa MDPI. Znaczący wzrost produkcji i wykorzystania w żywieniu zwierząt materiałów paszowych z owadów postrzegany jest jako jedno z przyszłościowych rozwiązań dla zrównoważonego rolnictwa w Europie i innych rejonach świata, bowiem hodowle owadów nie konkurują z zasobami żywności ani użytkowaniem gruntów, a ponadto maksymalizują korzyści z gospodarowania odpadami i produktami ubocznymi poprzez wykorzystanie ich jako substratu pokarmowego. Opracowanie i wdrożenie wydajnych metod produkcji „surowca owadziego” oraz sposobów jego przetwarzania leży także w sferze działań badawczo-rozwojowych coraz liczniejszych spółek kapitałowych i startupów poszukujących modelu biznesowego, który zapewniłby im zyskowny wzrost. Organizacja IPIFF (Międzynarodowa platforma na rzecz stosowania owadów w żywności i paszach) zrzesza w tej chwili 46 tego typu przedsiębiorstw, w większości ulokowanych na

terenie Europy. Ponieważ jak dotąd produkcja owadów odbywa się w relatywnie niewielkiej skali, konieczne jest, obok wypracowania standardów legislacyjnych, zoptymalizowanie warunków produkcji w celu obniżenia kosztów. Analizy rynkowe pokazują bowiem, że ceny odtłuszczonych mączek z różnych gatunków owadów (60-80% BO) są wielokrotnie wyższe od cen notowanych dla wysokiej jakości mączek rybnych czy śruty sojowej typu Hipro (62-65% BO). Dla praktyki oznacza to ograniczenie, a nawet całkowity brak możliwości użycia tego typu mączek owadzych jako zasadniczego źródła białka w paszach pełnoporcjowych stosowanych np. w masowym odchowie trzody chlewnej i drobiu rzeźnego.

Istnieją jednak przesłanki uzasadniające przypuszczenie, że dzięki obecności zarówno defenzyn – antydrobnoustrojowych peptydów kationowych określanych w literaturze akronimem AMP – o właściwościach bakteriostatycznych oraz immunomodulujących (w odpowiedzi odpornościowej nieswoistej AMP pełnią rolę podobną jak przeciwciała w odpowiedzi adaptacyjnej), jak i chityny budującej oskórek insektów – o udowodnionych właściwościach immunostymulujących, nawet niewielki dodatek do paszy odwodnionej masy owadziej może korzystnie wpływać na status zdrowotny, a w konsekwencji na produktywność kurcząt brojlerów. W powyższe zagadnienie w znacznej części wpisuje się tematyka przedłożonego mi do oceny anglojęzycznego opracowania, ze streszczeniem w języku polskim, autorstwa Pana Abdelbasset Benzertiha, MSc, ubiegającego się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Opracowanie Kandydata jest oparte na cyklu trzech recenzowanych oryginalnych artykułów naukowych prezentujących wyniki trzech niezależnych eksperymentów (Dośw. 1, Dośw. 2 oraz Dośw. 3) przeprowadzonych na rosnących kurczętach brojlerach (kurkach) zestawu Ross 308. Pierwszy artykuł został opublikowany w renomowanym periodyku Poultry Science (IF2018=2,216; 140 punktów), dwa pozostałe w czasopiśmie Animals (IF2018=1,832), które w ocenie gremium powołanego przez MNiSW zasłużyło na 100 punktów. Wszystkie te publikacje to prace wieloautorskie (6-7 współautorów), w których Doktorant jest pierwszym autorem. Na podstawie załączonych oświadczeń o merytorycznym wkładzie pozostałych autorów w powstanie przedmiotowych prac (od 2% do 35%), można stwierdzić, że udział Pana Abdelbasset Benzertiha był znaczący (do 65%) i polegał między innymi na współplanowaniu eksperymentów oraz omówieniu ich wyników. Partycypacja w nich obojga Promotorów (z rolą autorów korespondencyjnych) wskazuje na Ich rzetelną opiekę naukową nad Doktorantem w trakcie wykonywania badań i istotną pomoc w szybkim dopracowywaniu ostatecznych wersji tekstu artykułów, zwłaszcza tych opublikowanych w periodyku Animals.

W **pierwszej publikacji** (Poultry Science, <https://doi.org/10.3382/ps/pez450>) Kandydat referuje wyniki stosowania bardzo niskiego dodatku pełnotłustych mączek z larw chrząszczy z rodziny czarnuchowatych: mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*, TM) oraz drewnojada (*Zophobas morio*, ZM) do pełnoporcjowej mieszanki paszowej dla kurcząt odchowywanych w systemie podłogowym przez 5 tygodni (1-35 dzień życia). Użyte w badaniach mączki scharakteryzowano zarówno pod względem zawartości podstawowych składników chemicznych, składu aminokwasowego, profilu kwasów tłuszczowych, jak i zawartości chityny. Prezentowane w tym artykule wyniki dotyczą dwóch pierwszych eksperymentów. W Dośw. 1 obie mączki TM i ZM stosowano w ilości 2 lub 3 g na kg paszy (0,2% lub 0,3% diety), wprowadzając grupy kontrolne: pozytywną (dodatek jonoforowego antybiotyku salinomycyny) i negatywną (bez ocenianych dodatków). W Dośw. 2, przy podobnym układzie grup kontrolnych, każdą z mączek wprowadzano do paszy w proporcji 0,3% diety (3 g/kg). Zakres prezentowanych w tej pracy zmiennych zależnych obejmuje podstawowe wskaźniki

produkcyjne odchowu, niektóre wskaźniki biochemiczne krwi, a spośród sygnalizowanych w tytule rozprawy parametrów charakteryzujących odpowiedź układu immunologicznego – stężenie immunoglobulin klasy IgM, IgA i IgY oraz stężenie wybranych cytokin: interleukin 2 i 6 oraz kachektyny oznaczone metodą ELISA. W obu eksperymentach włączonych do publikacji Doktorant udowodnił jednoznacznie korzystny, potwierdzony statystycznie, wpływ 0,3% dodatku maczki z TM (o prawie dwukrotnie wyższej zawartości chityny w porównaniu z mączką ZM) na przyrost masy ciała brojlerów w trakcie całego okresu odchowu. W podobnie jednoznaczny sposób wykazał wysoką skuteczność działania obu testowanych mączek (przy obydwu stosowanych poziomach dodatku do paszy) w kierunku obniżenia stężenia immunoglobulin klasy IgM we krwi ptaków, stwierdzając także potwierdzony statystycznie ujemny związek korelacyjny między poziomem tych immunoglobulin a przyrostami masy ciała kurcząt. Wyniki dotyczące parametrów biochemicznych krwi (koncentracja niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych, białka całkowitego, albumin, glukozy, triacylogliceroli i cholesterolu całkowitego) oraz reszty analizowanych wskaźników funkcjonowania układu odpornościowego nie dały jednak klarownej odpowiedzi odnośnie wpływu badanych dodatków, w tym także salinomycyny jako związku odniesienia. Podzielałam pogląd Doktoranta, wyrażony w końcowej konkluzji pracy, o potrzebie dalszych badań nad wykorzystaniem mączek owadzych jako paszowych dodatków funkcjonalnych, dodając, że również w kierunku ustalenia efektu przeciwzapalnego i antystresowego substancji bioaktywnych zawartych w tych produktach.

Druga publikacja (Animals, <https://doi.org/10.3390/ani9121128>) stanowi kontynuację prezentacji pozostałych danych eksperymentalnych zebranych w Dośw. 1, w tym: współczynników strawności jelitowej białka ogólnego i ekstraktu eterowego diet doświadczalnych, względnej (%) aktywności enzymów trzustkowych w treści dwunastnicy, odczynu pH treści niektórych odcinków przewodu pokarmowego, a także – w oparciu o analizy treści jelit ślepych – stężenia lotnych kwasów tłuszczowych, aktywności wybranych enzymów bakteryjnych z grupy hydrolaz glikozydowych oraz liczebności bakterii wybranych kompleksów i rodzajów określonej techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) z zastosowaniem łącznie 5 sond oligonukleotydowych. Na podstawie potwierdzonych statystycznie zmian w obrębie tych dwóch ostatnich parametrów Kandydat wykazał: (1) możliwość korzystnej modyfikacji bioty bakteryjnej jelit ślepych w kierunku zwiększonego udziału i/lub aktywności populacji metabolizujących di- i oligosacharydy oraz polisacharydy złożone z merów glukozy o wiązaniach α -1,4- i α -1,6-glikozydowych jako efekt wprowadzenia do paszy 0,2% dodatku mączki z larw drewnojada (ZM); (2) inhibujący efekt dodatku mączki z larw ZM (0,2% i 0,3% diety) oraz TM (0,3% diety) na liczebność bakterii kompleksu *Bacteroides-Prevotella* obejmującego szereg patogennych gatunków, w tym enterotoksynotwórcze szczepy *Bacteroides fragilis*.

Trzeci artykuł z proponowanego cyklu prac (Animals, <https://doi.org/10.3390/ani9030116>), referujący wyniki Dośw. 3 na kurkach Ross 308 utrzymywanych parami w klatkach metabolicznych, dostarcza pogłębionych informacji o skutkach zastosowania oleju wyekstrahowanego nadkrytycznym CO₂ z suszonych larw mącznika młynarka (TM) jako alternatywnego względem oleju palmowego (PO) i tłuszczu drobiowego (PF) źródła kwasów tłuszczowych w diecie kukurydziano-sojowej. Prezentowane w tej pracy efekty włączenia do paszy tych źródeł tłuszczu w ilości 50 g/kg diety (trzy grupy żywieniowe, odpowiednio PF, PO i TM), oprócz wskaźników produkcyjnych odchowu ptaków w okresie 7-30 dzień życia, względnej masy wątroby i trzustki, względnej aktywności lipazy, trypsyny i amylazy trzustkowej w treści dwunastnicy, wybranych parametrów biochemicznych krwi i tkanki wątrobowej (parenchymy?)

oraz strawności jelitowej białka ogólnego i ekstraktu eterowego paszy, obejmują również szczegółową analizę profilu kwasów tłuszczowych lipidów wątroby i mięśni piersiowych. Przeprowadzona przez Autora interesująca, szeroka dyskusja wyników uzyskanych w tym doświadczeniu, głównie w kontekście procesów przemiany lipidowej w wątrobie, zajmuje w pracy aż trzy strony zwartego tekstu. Brak znaczących różnic (wartość p statystyki $F \gg 0,2$) między wskaźnikami produkcyjnymi ptaków z poszczególnych grup żywieniowych oraz strawnością białka i tłuszczu surowego diet doświadczalnych był podstawą dla praktycznego wniosku o możliwości całkowitego zastąpienia oleju palmowego i tłuszczu drobiowego olejem z larw *Tenebrio molitor*. Co więcej, stosowanie tego oleju w diecie brojlerów pozwoliło na istotne podwyższenie udziału WNKT, w tym NNKT – α -linolenowego i linolowego – w strukturze kwasów tłuszczowych lipidów mięśni piersiowych. Jednak moim zdaniem publikacja ta w znikomym zakresie jest spójna z tematem rozprawy doktorskiej wyrażonym w jej tytule oraz z dwiema pozostałymi publikacjami (wpływ na wyniki odchovu?). Nie mogę bowiem z pełnym przekonaniem uznać wysokiej czystości oleju z TM za „biomasę owadów”, a żaden z ocenianych parametrów nie ma bezpośredniego związku z „odpowiedzią układu immunologicznego”.

Nie ulega wątpliwości, że manuskrypty tych trzech prac zostały ocenione przez (zwyczajowo) co najmniej dwóch niezależnych specjalistów, a prawdopodobnie również przez wydawców. Dlatego też bardzo trudno wysuwać krytyczne uwagi i prowadzić merytoryczną polemikę z treścią tych (już opublikowanych) artykułów. Niemniej jednak zaskakują mnie pozorne metodyczne różnice między Dośw. 1 i Dośw. 2 co do sposobu wprowadzenia dodatku mączek owadzych do mieszanek paszowych: w pierwszym przypadku „on top” (nie uwzględniony w recepturze), w drugim „calculated into the diets” (włączony do receptury). Zastanawiam się czy bioaktywne substancje (AMP, chityna) zawarte w 3-gramowej porcji mączki z TM lub ZM wprowadzanej do kg mieszanki paszowej mogły/miały w związku z tym działać „jakoś” inaczej? Ponadto, w moim przekonaniu nieporozumieniem jest szermowanie wartością prawdopodobieństwa (p) statystyki F (służącej w procedurze one-way ANOVA do testowania hipotezy zerowej o równości wartości przeciętnych) przy porównywaniu istotności różnic między średnimi dla poszczególnych grup (zabiegów) żywieniowych. W tym kontekście nasuwają się pytania: Cemu służył test *post hoc* Duncana (o deklarowanym poziomie istotności różnic przy wartości $p < 0,05$) wykonywany każdorazowo po otrzymaniu istotnej empirycznej wartości F ? Czy, przykładowo, w świetle wyników tego testu można twierdzić, że, w stosunku do wartości grup kontrolnych, oznaczona u ptaków z grup TM0,2%, TM0,3% i ZM0,2% liczebność (jtk) laseczek zgorzeli gazowej (*C. perfringens*) była niższa?

Pan Abdelbasset Benzertiha, MSc sporządził bardzo obszerną, podzieloną na 13 (sic) rozdziałów, klasyczną wersję rozprawy, charakterystyczną dla prac doktorskich składających się z nieopublikowanych materiałów. Obejmuje ona łącznie 117 numerowanych stron, a jej integralną częścią, oprócz ozdobników typu informacje o źródłach finansowania badań, wykaz skrótów czy podziękowania, są wydruki komputerowe kolejnych artykułów (rozdział nr XII) oraz oświadczenia o współautorstwie (rozdział nr XIII). Opracowując rozdział nr VII – „Materiał i metody” (ponad 7 stron), rozdział nr VIII – „Wyniki” (7 stron), rozdział nr IX – „Dyskusja” (niemal 10 stron) oraz rozdział nr X – „Wnioski”, Kandydat w naturalny sposób wykorzystał treść swoich (omówionych powyżej) publikacji, powielając de facto odpowiednie partie tekstu odnoszące się do kolejnych doświadczeń. Dzięki temu spełnił wymogi co do objętości rozprawy sprecyzowane przez RW w „Zaleceniach dotyczących przygotowania rozpraw doktorskich opartych o cykl publikacji naukowych” (http://www1.up.poznan.pl/animal/?page_id=10727 [dostęp: 2020-03-27]), a przy okazji wsparł przemysł papierniczy i nałożył na oceniającego konieczność formalnego sprawdzenia zgodności obu wersji. Niektóre wyniki tego porównania

dowodzą, że próby zmiany szyku zdań w stosunku do oryginału nie zawsze były korzystne (przykład: str. 37, wiersz 12 „...insect full-fat meals supplemented with a complete diet showed...”). Moim zdaniem szkoda, że Pan Benzertiha nie zdecydował się oprzeć struktury swojej monojęzycznej (co należy podkreślić) dysertacji na dwóch zasadniczych elementach: Wprowadzeniu (np. General Introduction) – wyjaśniającym problem badawczy opisany w publikacjach i kilkustronicowym Podsumowaniu (np. Overall Summary and Conclusions) – zawierającym syntezę badań i wyników oraz wnioski z nich płynące.

Spośród elementów przedstawionej do recenzji rozprawy oddzielnej analizie można poddać część zatytułowaną „Introduction”. To niezaprzeczalnie autorski rozdział Doktoranta. Pod względem merytorycznym rozdział ten został napisany poprawnie, głównie z wykorzystaniem najnowszej literatury naukowej z lat 2015-2019 i zawiera wiele cennych informacji uszeregowanych w logicznym porządku. W pierwszym akapicie Autor naświetla negatywne skutki środowiskowe zmasowanych upraw soi oraz olejowca gwinejskiego, z którego pozyskiwany jest olej palmowy, a następnie charakteryzuje owady jako alternatywne źródło wysokiej jakości białka oraz tłuszczu paszowego; prezentuje dane świadczące o sporej zmienności zawartości tych składników w zależności od gatunku owadów i przedstawia obecny stan prawny obowiązujący w Unii Europejskiej odnośnie stosowania mączek owadzich jako źródła PAP oraz wyekstrahowanego z nich tłuszczu w żywieniu zwierząt. W dalszych akapitach skupia się kolejno na wartości żywieniowej tłuszczu oraz białka owadów dla drobiu, prezentując min. wyniki licznych badań nad częściowym lub całkowitym zastąpieniem tym białkiem białka paszowego pochodzącego z poekstrakcyjnej śruty sojowej. Ostatnie fragmenty tego rozdziału Kandydat poświęca skrótowej charakterystyce działania chityny i peptydów AMP dla uzasadnienia hipotezy o możliwości wykorzystania niewielkich ilości mączek z owadów jako paszowych dodatków funkcjonalnych.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Mimo iż prace oryginalne składające się na ocenianą rozprawę doktorską pt. „Zastosowanie biomasy owadów w dietach kurcząt rzeźnych a wyniki odchowu i odpowiedź układu immunologicznego” nie stanowią w pełni zwartego tematycznie cyklu publikacji, uważam, że są dobrą podstawą dla ogólnie pozytywnej oceny dotyczącej wiedzy teoretycznej Autora, Jego umiejętności wykorzystania zaawansowanych metod analitycznych oraz biegłości w dyskusji wyników w oparciu o literaturę prawidłowo dobraną do omawianych zagadnień. Zaprezentowane przez Kandydata efekty stosowania w diecie kurcząt rzeźnych niewielkich ilości mączek z larw mącznika młynarka i larw drewnojada są bezsprzecznie cenną przesłanką dla dalszych badań z uwzględnieniem innych gatunków owadów, a wyniki dotyczące wykorzystania oleju z *Tenebrio molitor* mają bezpośrednie praktyczne znaczenie. Mam nadzieję, że moje krytyczne uwagi i sugestie dotyczące rozprawy przynajmniej częściowo będą pomocne Doktorantowi podczas dalszej pracy naukowej.

Uznaję, że przedstawiona do recenzji rozprawa w dostatecznym stopniu spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U., Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny *Zootechnika i rybactwo* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie jej Autora, Abdelbasset Benzertiha, MSc, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

