

dr hab. Andrzej Łozicki, prof. SGGW
Samodzielna Pracownia Żywienia Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Martyny Kozłowskiej
pt.: „Świeża i zakiszana lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) jako źródło saponin
oddziaływujących na poziom produkcji metanu oraz proces biouwodorowania u krów
mlecznych”

wykonanej pod opieką prof. dr hab. Małgorzaty Szumacher z Katedry Żywienia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz dr. hab. Artura Józwika, profesora Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk

1. Na ocenianą rozprawę składają się trzy spójne tematycznie oryginalne prace naukowe:

- Szumacher-Strabel M., Stochman A., Cieślak A., Kozłowska M., Kuźnicki D., Kowalczyk M., Oleszek W., *Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage*, Journal of Science of Food and Agriculture. 2019 Mar 30; 99(5). Doi: 10.1002/jsfa.9419 (IF-3.638; pkt. MEiN -100);
- Kozłowska M., Cieślak A., Józwik A., El-Sherbiny M., Stochman A., Oleszek W., Kowalczyk M., Filipiak W., Szumacher-Strabel M., *The effect of total and individual alfalfa saponins on rumen methene production*, Journal of Science of Food and Agriculture. 2020 Mar 30; 100(5). Doi: 10.1002/jsfa.10204 (IF-3.638; pkt. MEiN -100);
- Kozłowska M., Cieślak A., Józwik A., El-Sherbiny M., Gogulski M., Lechniak D., Gao M., Yanza Y. R., Vazirigohar M., Szumacher-Strabel M., *Effects of partially replacing grass silage by lucerne silage cultivars in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, and fatty acid composition in the rumen and milk of dairy cows*, Animal Feed Science and Technology. 2021 Jul 01: 277. DOI:101016/j.anifeedsci.2021.114959 (IF-3.247; pkt. MEiN -200).

Prace zostały opublikowane w latach 2019-2021 w czasopismach umieszczonych na liście A w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki. Łączny ich IF wynosi 10,523, a liczba punktów MNiE to 400, i należy uznać to za wysoką punktację w przypadku osoby starającej się o stopień naukowy doktora. Publikacje są wieloautorskie. Doktorantka podaje swój procentowy udział w każdej z nich oraz zakres zaangażowania w prowadzone badania i przygotowanie pracy. W jednej z tych publikacji udział Doktorantki wynosił 15%, a w dwóch pozostałych odpowiednio 59% i 61%. Zbiór trzech publikacji został opatrzony zwartym opracowaniem, przygotowanym w języku angielskim, podzielonym na części: streszczenia w języku angielskim (2 strony) i polskim (3 strony), wstęp (5 stron), hipotezy i cele badań (2 strony), materiały i metody badawcze (10 stron), omówienie wyników badań (3 strony), dyskusja (5 stron), wnioski (1 strona) oraz bibliografia (8 stron, obejmująca 51 pozycji). Dysertację uzupełniają kopie prac naukowych oraz oświadczenia współautorów dotyczące udziału w publikacjach. Opracowanie stanowi logicznie skonstruowaną całość, pozwalającą na ocenę spójności badań i sformułowanie syntetycznych wniosków.

2. Wraz z postępującymi zmianami klimatu prowadzonych jest szereg działań, w tym badań, które mają służyć zahamowaniu tych zmian. Wśród nich dąży się do ograniczenia emisji zanieczyszczeń z produkcji rolniczej, w tym produkcji zwierzęcej, która jest odpowiedzialna za emisję dużych ilości gazów cieplarnianych. Głównym producentem gazów cieplarnianych pochodzenia antropogenicznego są przeżuwacze, które wytwarzają duże ilości metanu. Podejmowane są liczne badania, które mają służyć opracowaniu strategii i systemów chowu ograniczających emisję metanu do środowiska. Wśród czynników pozwalających na redukcję emisji metanu szczególnie ważnym jest żywienie, gdzie poprzez odpowiednie przygotowanie pasz, modyfikację składu dawki pokarmowej czy też stosowanie różnych dodatków paszowych można w znaczącym stopniu ograniczyć metanogenezę. Należy podkreślić, że w tym nurcie badań duże osiągnięcia ma zespół badawczy, w którym pracowała Doktorantka.

W koncepcję modyfikacji składu dawki przez wprowadzanie do niej komponentów, które poprzez swój skład mogą ograniczyć syntezę metanu wpisują się badania prowadzone przez Doktorantkę. W badaniach przeprowadzonych na krowach mlecznych zajęto się lucerną, jako paszą, która wprowadzona do dawki dla przeżuwaczy, może ograniczyć metanogenezę. Lucerna jest cenną rośliną paszową, która daje wysoki plon suchej masy z hektara, charakteryzuje się wysoką zawartością wartościowego białka oraz jest dobrym źródłem składników mineralnych i witamin. Jest to zatem pasza, która może być i jest wartościowym komponentem dawek pokarmowych dla przeżuwaczy, w tym krów mlecznych. Lucerna to również roślina, która zawiera w swoim składzie

stosunkowo dużo wtórnych metabolitów roślinnych - saponin. Związki te, jak wskazują liczne badania, mogą wpływać na przebieg procesów fermentacyjnych w żwaczu, w tym na ograniczenie syntezy metanu m.in. poprzez ograniczanie rozwoju pierwotniaków, które współdziałają w metanogenami.

Badania, które składają się na ocenianą pracę, a zaprezentowane są w trzech załączonych publikacjach, stanowią kompleksowe podejście do zagadnienia oceny lucerny jako paszy, która zastosowana w dawkach dla krów mlecznych może wpływać na przemiany żwaczowe i ograniczyć metanogenezę.

Doktorantka wraz z zespołem badawczym badała zawartość i profil saponin w różnych odmianach lucerny oraz wpływ kiszenia na zawartość tych związków w paszy. Następnie badała wpływ saponin, w tym poszczególnych związków do nich zaliczanych, na wskaźniki fermentacji w żwaczu, produkcję metanu i liczebność bakterii, pierwotniaków i metanogenów w żwaczu. Wreszcie w badaniach *in vitro* i *in vivo*, w których analizowano efekt zastosowania w dawkach kiszonki z lucerny Doktorantka określała wskaźniki przebiegu fermentacji, wpływ zastosowanej paszy na profil kwasów tłuszczowych w płynie żwacza oraz mleku, a także produkcję i podstawowy skład mleka.

3. Charakterystyka prac będących podstawą ocenianej pracy doktorskiej

3.1. W pracy *Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage* analizowano całkowitą zawartość saponin oraz poszczególnych związków zaliczanych do tej grupy w 10 odmianach lucerny. Badano również strukturalne zmiany w obrębie saponin pod wpływem zakiszania paszy. Analizowano także czy zmiany w zawartości saponin w kiszzonej lucernie były związane ze zmianami w podstawowym składzie odżywczym kiszonki.

Za istotne wyniki tych badań uważam wskazanie odmian lucerny o najwyższej zawartości saponin. Ciekawym i ważnym jest również wykazanie jak proces zakiszania wpływa na poszczególne związki zaliczane do tej grupy oraz stwierdzenie, że po zakiszeniu oznaczana całkowita zawartość saponin była dwu- do trzykrotnie większa w stosunku do zawartości w materiale świeżym.

3.2. Druga praca, *The effect of total and individual alfalfa saponins on rumen methene production*, dotyczyła oceny wpływu saponin na wskaźniki fermentacji w żwaczu, produkcję metanu i liczebność bakterii, pierwotniaków i metanogenów. Dla zbadania tego efektu przeprowadzono eksperymenty z użyciem dwóch krótkoterminowych technik fermentacji płynu żwacza: batch culture i Hohenheim gas test (HGT).

Przeprowadzono cztery testy techniką Hohenhein gas test (HGT) dla zbadania wpływu zwiększonych poziomów całkowitej ilości saponiny wyekstrahowanych z materiału świeżego i zakiszanego dwóch odmian lucerny (Kometa i Verko) na między innymi całkowitą liczbę bakterii, pierwotniaków, populację wybranych metanogenów oraz na całkowitą produkcję gazów i metanu. W testach batch culture badano efekt zastosowania siedmiu wybranych saponin pozyskanych z odmiany lucerny Kometa na wybrane wskaźniki fermentacji w żwaczu – pH, produkcję NH₃, strawność *in vitro* suchej masy, całkowitą ilość wytworzonych gazów, produkcję metanu, liczbę bakterii, pierwotniaków oraz metanogenów.

Badania w tych eksperymentach potwierdziły wyższą zawartość saponin w materiale zakiszonym w stosunku do świeżego. Za istotne wyniki tych eksperymentów uważam stwierdzenie, że zakiszana lucerna odmiany lucerny Verko i Kometa może być dobrym źródłem saponin, mogących ograniczyć produkcję metanu bez negatywnego wpływu na podstawowe parametry fermentacji.

Należy podkreślić, że Doktorantka wraz z zespołem badawczym byli pierwszymi, którzy analizowali efekt oddziaływania poszczególnych związków zaliczanych do saponin na przebieg fermentacji, produkcję metanu oraz populacje bakterii, pierwotniaków i metanogenów. Wykazali, że różne saponiny mogą wpływać na te wskaźniki w różny sposób. Zaobserwowano także, że efekt oddziaływania saponin może być różny w zależności od ich źródła, typu i koncentracji. W opisywanych eksperymentach silniejsze oddziaływanie na badane parametry przebiegu fermentacji wykazywały saponiny ekstrahowane z korzeni w porównaniu do części nadziemnych. Autorzy wskazali, że bardziej efektywne w oddziaływaniu na przebieg fermentacji są saponiny steroidowe niż triterpenowe.

3.3. W trzeciej pracy - Effects of partially replacing grass silage by lucerne silage cultivars in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, and fatty acid composition in the rumen and milk of dairy cows, przedstawiono wyniki czterech doświadczeń, w których badano efekt zastosowania w dawkach kiszzonek z lucerny odmian Kometa i Verko na przebieg fermentacji w żwaczu, proporcje kwasów tłuszczowych w płynie żwacza i mleku krów mlecznych oraz produkcję i skład mleka.

Dwa doświadczenia były to badania *in vitro* z wykorzystaniem techniki długoterminowej fermentacji, tzw. sztucznego żwacza (RUmen Simulation TEChnique; RUSITEK). W testach badano wpływ zastąpienia w dietach z dużym udziałem paszy objętościowej (65:35 w kg s.m. dawki pasza objętościowa:pasza treściwa) kiszzonki z traw kiszoną z lucerny – w jednym eksperymencie odmiany Kometa, a w drugim odmiany Verko. W badaniach tych analizowano wpływ dawki na takie

parametry jak pH, całkowitą produkcję gazów, produkcję metanu, zawartość lotnych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza, stężenie amoniaku oraz liczebność pierwotniaków.

W badaniach *in vivo* jedno doświadczenie przeprowadzono na krowach mlecznych z założonymi przetokami, natomiast drugie na krowach mlecznych w warunkach produkcyjnych. W doświadczeniach wykorzystano krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Analogicznie jak w doświadczeniach *in vitro*, w badaniach na krowach, w dawkach z dużym udziałem pasz objętościowych kiszonkę z traw częściowo zastępowano kiszonką z lucerny. W doświadczeniu na krowach przetokowanych badano wpływ diety na pH żwacza, udział lotnych kwasów tłuszczowych, produkcję metanu, całkowitą liczebność bakterii, pierwotniaków i metanogenów oraz parametry strawności dawki. Badano również skład kwasów tłuszczowych w płynie żwacza. W doświadczeniu w warunkach produkcyjnych badano produkcję i podstawowy skład mleka, profil kwasów tłuszczowych w mleku oraz produkcję metanu.

W doświadczeniach *in vitro* zauważalne było zmniejszenie produkcji metanu przy zastosowaniu kiszonek z lucerny, ale nie było ono istotne statystycznie. Nie stwierdzono wpływu dawki na liczebność pierwotniaków. Wprowadzenie do dawek kiszonki z lucerny istotnie zwiększało stężenie amoniaku w płynie żwacza oraz skutkowało poprawą strawności dawki.

W doświadczeniach *in vivo* na przetokowanych krowach w grupach otrzymujących kiszonki z lucerny stwierdzono istotnie mniejszą całkowitą koncentrację lotnych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza, zwiększenie stężenia amoniaku, spadek ogólnej liczby bakterii, pierwotniaków i metanogenów oraz mniejszą szacowaną emisję metanu. Stwierdzono także wpływ zastosowanych kiszonek na skład kwasów tłuszczowych płynu żwacza. Między innymi w grupach otrzymujących kiszonki z lucerny nastąpił wzrost udziału kwasów nasyconych kwasów C 12:0, C14:0 i C16:0 oraz niektórych kwasów wielonienasyconych np. cis-9, cis-12 C18:2 oraz trans-10, cis-12 C18:2. Chciałbym tutaj wskazać, że Doktorantka w omówieniu wyników, zapewne przez pomyłkę, pisze o wzroście udziału kwasów nienasyconych i wymienia kwasy nasycone (str. 23, wiersz 7). Zauważalny był także wpływ konkretnej odmiany na skład kwasów tłuszczowych w płynie żwacza – przy odmianie Kometa spadek kwasów nasyconych i wzrost nienasyconych. Wprowadzenie kiszonek prowadziło do większego pobrania suchej masy dawki, ale nie miało wpływu na jej strawność.

W doświadczeniu produkcyjnym na krowach zastosowanie kiszonki z lucerny nie miało istotnego wpływu na produkcję mleka oraz zawartość w nim tłuszczu i białka, ale skutkowało mniejszą produkcją metanu. W tłuszczu mleka krów otrzymujących kiszonki z lucerny stwierdzono wyższą zawartość kwasów nasyconych, a niższą kwasów wielonienasyconych, co było szczególnie widoczne przy kiszonce z odmiany Verko. Pewne różnice w składzie kwasów tłuszczowych mleka

stwierdzono między grupami otrzymującymi kiszonki z lucerny i bardziej korzystny był przy kiszonce z odmiany Kometa. Ta odmiana miała także wyraźniejszy wpływ na zmniejszenie produkcji metanu. Podsumowując to doświadczenie autorzy wskazywali, że kiszonka z lucerny Kometa zmniejszała emisję metanu, ale kosztem zwiększenia zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych w mleku.

W podsumowaniu całości badań składających się na pracę Doktorantka stwierdza, że proces kiszenia lucerny zwiększa zawartość bioaktywnych saponin i zmienia ich skład. Wykazano, że saponiny dzięki swoim właściwościom antypierwotniaczym, antymetanogennym i antybakteryjnym modulują procesy zachodzące w żwaczu, zmieniając między innymi skład lotnych kwasów tłuszczowych i profil kwasów tłuszczowych płynu żwacza oraz ograniczają produkcję metanu.

Włączenie do dawek dla krów mlecznych kiszonki z lucerny bogatej w saponiny poza tym, że ogranicza emisję metanu, wpływa również na profil kwasów tłuszczowych mleka. Spośród badanych odmian Doktorantka wskazuje odmianę Kometa jako tę, która ma silny potencjał ograniczania emisji metanu bez negatywnego wpływu na fermentację w żwaczu i korzystniejszy wpływ na skład kwasów tłuszczowych mleka. Doktorantka podsumowuje, że kiszonka z lucerny odmiany Kometa, jako źródło saponin może być z powodzeniem stosowana jako wartościowy składnik dawek pokarmowych, który dodatkowo ogranicza metanogenezę.

4. Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym poprosić Doktorantkę o krótki komentarz do następujących zagadnień:

- Interesujący jest wzrost oznaczanej całkowitej zawartości saponin w materiale zakiszonym w porównaniu do świeżego. Co prawda Doktorantka przedstawia dwie hipotezy, które mogą to tłumaczyć, ale chciałbym zapytać, do której z nich skłania się Pani bardziej.
- Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników badań, jaki poziom saponin w dawkach dla krów mlecznych uważa Doktorantka za optymalny, biorąc pod uwagę efektywność oddziaływania na przebieg fermentacji w żwaczu oraz bezpieczeństwo z punktu widzenia ich potencjalnie negatywnego oddziaływania na zwierzę.
- Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę wskazują na efekt zmniejszenia liczebności pierwotniaków pod wpływem działania saponin. Czy możliwe jest, że w dłuższej perspektywie czasowej pierwotniaki mogą się przystosowywać do obecności saponin i uodparniać na ich działanie.
- Chciałbym również zapytać, jakie Pani zdaniem są obecnie najbardziej obiecujące i efektywne strategie żywieniowe obniżenia metanogenezy?

Podsumowanie

Rozprawę doktorską Pani mgr **Martyny Kozłowskiej** pod tytułem „**Świeża i zakiszana lucerna siewna (*Medicago sativa L.*) jako źródło saponin oddziałujących na poziom produkcji metanu oraz proces biouwodorowania u krów mlecznych**” oceniam wysoko. Podjęty przez Kandydatkę temat jest bardzo istotny zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Stwierdzam, że wykorzystane techniki eksperymentalnej metody analiz laboratoryjnych i obliczeń statystycznych, umożliwiły uzyskanie ciekawych i wiarygodnych wyników. Wysoko oceniam również poprawność prowadzenia dyskusji i wnioskowania.

Chciałbym również podkreślić, że wykonane badania były pracochłonne i trudne, wymagały od Doktorantki wiedzy, dużych umiejętności i doświadczenia eksperymentalnego. Jestem też przekonany, że ich wykonanie nie byłoby możliwe bez zaangażowania i pomocy ze strony Państwa Promotorów oraz zespołu współpracowników.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr **Martyny Kozłowskiej** pod tytułem „**Świeża i zakiszana lucerna siewna (*Medicago sativa L.*) jako źródło saponin oddziałujących na poziom produkcji metanu oraz proces biouwodorowania u krów mlecznych**” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r.: o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. Nr 65, z 2003 r., poz. 595, z póź. zm.) oraz przepisom wprowadzającym ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z póź. zm.) i tym samym spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim wg w/w ustaw. Zwracam się do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr **Martyny Kozłowskiej** i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

