

Dr hab. Barbara Kowalik
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Jabłonna, dn. 03.04.2025r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Szulc pt. " Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu jagniąt otrzymujących dodatki nośników biologicznie aktywnych substancji", wykonanej pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Adama Cieślaka na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Ocena formalna rozprawy

Ocena rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie pisma (WWZ-4000-03/2025) Dziekana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Pani prof. dr hab. Małgorzaty Szumacher, członka korespondencyjnego Polskiej Akademii Nauk, z dnia 14.03.2025 r.

Pani mgr Paulina Szulc, tytuł magistra uzyskała 04.07.2017r. na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora. Jest zatrudniona w spółce BGW Sp. z o.o. na stanowisku Naukowca ds. biologii molekularnej.

Problem naukowy i znaczenie badań

Roślinne dodatki paszowe takie jak, zioła lub inne mniej znane rośliny mogące zastąpić tradycyjne komponenty pasz, niosą ze sobą duży potencjał w postaci biologicznie aktywnych substancji, wpływających na zdrowie i dobrostan zwierząt gospodarskich, a także na aspekty klimatyczne, w szczególności ograniczanie emisji gazów cieplarnianych. Działania takie doskonale wpisują się w założenia zrównoważonej produkcji zwierzęcej. Dlatego też w ostatnich latach kładzie się duży nacisk na realizowanie badań rozwojowych i aplikacyjnych, o dużym potencjale innowacyjnym, prowadzących do poszukiwania nowych źródeł pasz, bogatych w substancje biologicznie czynne. Wspomniane związki to przede wszystkim wtórne metabolity roślin np. taniny, olejki eteryczne, saponiny, flawonoidy. Wysoka zawartość substancji bioaktywnych w dawce pokarmowej dla przeżuwaczy, może modulować procesy metanogenezy oraz lipolizy tłuszczu i biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu. Zmiany te mogą prowadzić do ograniczenia produkcji metanu oraz poprawy jakości produktów pochodzenia zwierzęcego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Szulc, dobrze wpisuje się w najnowsze trendy badań nad zastosowaniem mieszanek ziołowych oraz kiszonki paulowni, które stanowią bogate źródło związków bioaktywnych. Wybór problemu badawczego przez Doktorantkę wydaje się w pełni zasadny, zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Przeprowadzone

doświadczenia *in vitro* jak i *in vivo* na jagniętach, wiążą się z badaniami nad poszukiwaniem skutecznego sposobu ograniczenia produkcji metanu przez przeżuwacze. Natomiast głębsze poznanie wpływu związków bioaktywnych zawartych w paszach, na procesy lipolizy i biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu, pozwoli m.in. na podniesie jakości produktów zwierzęcych, głównie mięsa i mleka.

Opis i ocena pracy

Przedłożona do oceny dysertacja doktorska mgr Pauliny Szulc stanowi spójny tematycznie zbiór dwóch prac naukowo-badawczych pod wspólnym tytułem „Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu jagniąt otrzymujących dodatki nośników biologicznie aktywnych substancji”. Prace te zostały opublikowane w 2020 r. oraz 2024 r., w czasopiśmie indeksowanych w bazie „*Journal Citation Reports*”. Łączna wartość punktacyjna prac wynosiła: 240 pkt MNiSW₂₀₂₄ i IF zgodnie z rokiem opublikowania był równy 5,040. Doktorantka w obu publikacjach jest pierwszym autorem. Warty jest również podkreślenia fakt, że publikacje, te powstały we współpracy z naukowcami z Polski, Słowacji, Indii i Stanów Zjednoczonych Ameryki, a zakres badań i analiz, jak pokazują wyniki rozprawy, był rozległy, co w moim przekonaniu uzasadnia zespołowość autorstwa publikacji, a także jest cennym doświadczeniem dla Doktorantki na przyszłość. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów oraz opis ich wkładu w badania oraz powstanie manuskryptów. Wkład Kandydatki obejmował: współudział w opracowaniu hipotezy badawczej, przeprowadzenie doświadczeń *in vitro*, wykonanie podstawowych analiz chemicznych, oznaczenia wskaźników fermentacyjnych i kwasów tłuszczowych w paszy i żwaczu, oznaczenie liczebności mikroorganizmów żwacza, współudział w dyskusji i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu publikacji do druku. Przeprowadzone badania były finansowane w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki, ze środków Słowackiej Agencji Badań i Rozwoju oraz przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości”, a także ze środków statutowych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach UP w Poznaniu.

Załączone dwie publikacje zostały opatrzone zwięzłym opisem, obejmującym 76 stron maszynopisu, przygotowanym zgodnie z wymogami stawianymi dysertacjom doktorskim. Taki opis bez wątplenia ułatwia pracę recenzentowi w zakresie merytorycznej oceny dysertacji. Ponadto daje pełny obraz stanowiący ciąg następujących po sobie etapów badań, przechodząc przez zwięzły opis wyników, dyskusji i wniosków. Pojawiające się w opisie rozprawy niedociągnięcia, można skorygować w załączonych publikacjach.

W mojej opinii **tytuł** rozprawy jest poprawny i w pełni odzwierciedla treści zawarte w dysertacji. Jasno nawiązuje do ciągle aktualnej tematyki, a także ważnej problematyki poszukiwania komponentów paszowych, będących źródłem związków bioaktywnych, ograniczających procesy metanogenezy i biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu.

Dysertację rozpoczyna wykaz skrótów oraz jednostronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim. Natomiast rozdział *Przegląd piśmiennictwa* stanowi opis istniejącej wiedzy nt. źródeł i rozmiaru emisji metanu, procesu biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz możliwości modulowania przebiegu tego procesu w żwaczu. Na stronie 14 Doktorantka wymienia gatunki bakterii, które są zaangażowane w proces biouwodorowania w żwaczu. Podaje również, że w tym procesie uczestniczą także pierwotniaki. Czy wiadomo jakie gatunki lub rodzaje tych mikroorganizmów są najbardziej aktywne w tym procesie? Czytając ten rozdział odnoszę jednak wrażenie, że zawarta w nim wiedza jest ogólnie dostępna i znana, naukowcom, którzy „poruszają” się w tym obszarze badań.

Hipoteza badawcza i cel pracy zostały jasno sformułowane oraz są zgodne z przeprowadzonymi zadaniami badawczymi, w których sprawdzano możliwości zastosowania dodatków ziołowych i kiszonki z liści paulowni bogatych w substancje bioaktywne na możliwość ograniczenia procesów metanogenezy i biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu *in vitro* i *in vivo*.

Rozdział *Material i metody* został dobrze opisany, a brakujące szczegóły, można znaleźć w załączonych publikacjach. Doktorantka przeprowadziła dwa cykle badań.

I cykl obejmował doświadczenia *in vitro* i *in vivo*, a wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *PLoS One* w artykule pt. ‘Ruminal fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures’.

W doświadczeniu *in vitro* badano wpływ podania 2 mieszanek ziołowych stanowiących źródło związków bioaktywnych do płynu żwacza, który pobrano od owiec zainfekowanych lub niezainfekowanych nicieniami *Haemonchus contortus* na wskaźniki fermentacyjne, w tym stężenie metanu, liczebność mikroorganizmów i ilość długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Zauważyłam, że w tabeli 5 nie ma informacji o zawartości tłuszczu surowego w zastosowanych paszach. Podanie tych danych/ informacji byłoby uzupełnieniem wyników, tym bardziej, że praca dotyczy m.in. metabolizmu lipidów.

W doświadczeniu produkcyjnym badano wpływ związków bioaktywnych zawartych w mieszankach ziołowych, na takie same wskaźniki jak w badaniach *in vitro*. Warto dodać, że pobrano również próby krwi, mięsa i organów, w których oznaczono m.in. profil kwasów tłuszczowych. Na stronie 27 w opisie grup doświadczanych 3 i 4 dopatrzyłam się pomyłki zamiast „niezainfekowana” powinno być „zainfekowana”, co jest zgodne z opisem metodyki i wyników w publikacji.

II cykl obejmował doświadczenie *in vitro*, a wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Annals of Animal Science* w manuskrypcie pt. ‘Potential of Paulownia leaves silage in lamb diet to improve ruminal fermentation and fatty acid profile – an *in vitro* study’.

W doświadczeniu badano wpływ związków bioaktywnych zawartych w kiszonce z liści paulowni na wskaźniki fermentacyjne, w tym na stężenie metanu, liczebność mikroorganizmów i ilość długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w płynie żwacza owiec. Udział ww. kiszonki w materiale inkubacyjnym wynosił 25, 50, 75, 100%, a uzupełnienie oraz grupę kontrolną stanowiła kiszonka z

lucerny. W tabeli 6 dotyczącej zawartości związków bioaktywnych w liściach paulowni, Doktorantka podaje, że ilość izomeru kamneozydu była na poziomie 0,14 i 1,40 mg/ g SM. Podane wartości są również w publikacji, a różnica pomiędzy nimi jest dość znacząca. Czy w związku z tym wiadomo jaka była zawartość tego izomeru? W tabeli 8 podano, że w składzie dawki pokarmowej, użytej w inkubacji, znajduje się pasza treściwa. Czy Doktorantka może podać, z jakich komponentów składała się ta pasza?

Na uwagę zasługuje zwięzły i klarowny opis metod analitycznych, zarówno tych prostszych (m.in. analiza składu chemicznego pasz, amoniaku czy strawności suchej masy *in vitro*) jak i tych bardziej wyrafinowanych i skomplikowanych (m.in. analiza składu mikroflory, zawartości substancji bioaktywnych w ziołach i kiszonce z liści paulowni). Tu mam jedną drobną uwagę do nazewnictwa pierwotniaków (ta uwaga dotyczy również rozdziałów wyniki i dyskusja). Kandydatka pierwotniaki klasyfikuje raz do rzędów (nie do rodzaju str. 36) *Entodiniomorpha* i *Holotricha* innym razem do rodzin *Ophryoscolecidae* i *Isotrichidae*. Wprowadza to czytelnika w zamieszanie. W przypadku rzędów może warto użyć innej nomenklatury, zaproponowanej przez Lee i wsp. w 1985 roku, odpowiednio *Entodiniomorphida* i *Vestibuliferida*. Sugerowałabym, na poczet przyszłej pracy trzymanie się jednolitego nazewnictwa.

W rozdziale **wyniki** dopatrzyłam się kilku nieścisłości. Na stronie 40 Kandydatka podaje, że produkcja metanu w grupie kontrolnej zainfekowanej była mniejsza w porównaniu do grupy kontrolnej niezainfekowanej. Porównując te dane z tabelą 11, opis ten odnosi się raczej do produkcji ogólnej gazów. W tabeli 12 brak jest jednostek dla ogólnej liczebności bakterii i pierwotniaków. W tabeli 15 wyniki dla pierwotniaków z rzędów: *Holotricha* i *Entodiniomorpha* podano odwrotnie i powinny być wyrażone $10^4/\text{ml}$. Natomiast w tabeli 18 liczebność rodziny *Isotrichidae* wyrażona jest $10^5/\text{ml}$. Taki opis sprawia, że liczebność tej rodziny np. dla grupy ze 100 % udziałem kiszonki z lucerny, jest większa od ogólnej liczebności pierwotniaków lub rodziny *Ophryoscolecidae*, co jest mało prawdopodobne. W publikacji, o której mowa powyżej liczebność *Isotrichidae* wyrażona jest $10^3/\text{ml}$. Wszystkie te drobne uwagi, mają oczywiście charakter edytorski i wynikają z obowiązku recenzenta. Niemniej jednak, wyniki przeprowadzonych badań, pozwoliły Doktorantce na sformułowanie poprawnych wniosków, podsumowujących najważniejsze osiągnięcia odpowiadające założonym celom badawczym niniejszej pracy.

Rozdział **dyskusja** wyników napisany jest krótko i zwięźle (7 stron). Doktorantka porównuje efekty swoich badań z wynikami innych badaczy. Wykazała się znajomością tematu, przeprowadzając logiczne wyjaśnienia swoich wyników i spostrzeżeń. Jednak na stronie 56 Kandydatka stwierdza: „W badaniach z udziałem kiszonki z paulowni również zaobserwowano zwiększoną strawność suchej masy, co było związane ze wzrostem populacji bakterii proteolitycznych, takich jak *Prevotella* spp. i *Butyrivibrio fibrisolvens*”. Wydaje mi się, że to stwierdzenie jest trochę „nad wyrost”, ponieważ liczebności bakterii proteolitycznych (w tym *Prevotella* spp.) nie była analizowana przez Doktorantkę, a bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens* preferują jako źródło pokarmu bardziej węglowodany niż białko. Na

stronie 57 Kandydatka używa niefortunnego sformułowania „produkty odzwierzęce”. Myślę, że ten zwrot lepiej będzie brzmieć jako „produkty pochodzenia zwierzęcego”.

Kończącą część dysertacji stanowią 3 poprawnie zdefiniowane *wnioski*, w których Doktorantka stwierdza, że kiszonka z paulowni ogranicza populację metanogenów, emisję metanu oraz aktywność mikroorganizmów odpowiedzialnych za nasycanie nienasyconych wiązań tłuszczowych, co prowadzi do zwiększonej retencji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu, natomiast zastosowane mieszanki ziołowe mają ograniczony wpływ na ww. procesy. Na koniec, jeszcze jedna drobna uwaga, w pierwszym wniosku Doktorantka podała stężenia luteoliny i acetozidu w kiszonce z liści paulowni, odwrotnie.

Spis *bibliografii* zawiera 100 pozycji z czego 47 % stanowią publikacje z ostatnich 5 lat.

Odnosząc się do całej rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Szulc zatytułowanej **”Poziom produkcji metanu oraz stopień biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w żwaczu jagniąt otrzymujących dodatki nośników biologicznie aktywnych substancji”**, z przyjemnością stwierdzam, jest to praca wartościowa i stanowi oryginalny wkład w rozwój dyscypliny naukowej zootechnika i rybactwo, posiada dużą wartość zarówno pod względem naukowym jak i aplikacyjnym. Zostały spełnione warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2020 r. art. 187, poz. 85 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Pauliny Szulc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Barbara Kowalik, profesor instytut