

Szczecin, 28 maja 2025 roku

Dr hab. inż. Agnieszka Herosimczyk, prof. ZUT
Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Modou Mangan, MSc.

**pt. „Impact of selected bioactive substances delivered *in ovo* on gut health and
production performance of broiler chickens”**

**wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. inż. Marii Siwek-Gapińskiej w
Katedrze Biotechnologii i Genetyki Zwierząt Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja
Śniadeckich oraz prof. dr rer. nat. habil. Corneli C. Metges in Institute of Nutritional
Physiology, Research Institute for Farm Animal Biology (FBN)**

Podstawa prawna i ocena formalna

Podstawą formalno-prawną przygotowania recenzji stanowi uchwała Rady naukowej dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z dnia 28 marca 2025 roku (nr 14/8/2024/2025). Ocenę rozprawy doktorskiej wykonano zgodnie z wymogami art. 190 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 poz. 1571). Przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki formalne określone w wyżej wymienionej ustawie. Materiały zostały przygotowane prawidłowo, w sposób umożliwiający zapoznanie się z osiągnięciem naukowym oraz jego właściwą i pełną ocenę.

Problem naukowy i znaczenie badań

Zakaz stosowania antybiotykowych promotorów wzrostu, przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiej jakości i wydajności produkcji, stanowi jedno z głównych wyzwań, przed

którymi stoi obecnie branża drobiarska. Sytuacja ta skłania do intensyfikacji działań zmierzających do poszukiwania alternatywnych strategii poprawiających parametry zdrowotne oraz produkcyjne drobiu. W tym kontekście szczególne zainteresowanie budzą prebiotyki i probiotyki. Ich szeroko udokumentowany, pozytywny wpływ na organizm obejmuje m.in. modulację składu mikrobioty jelitowej poprzez promowanie wzrostu korzystnych dla jelit szczepów bakterii przy jednoczesnym ograniczeniu ich kolonizacji przez drobnoustroje chorobotwórcze, a także stymulację układu immunologicznego, zwłaszcza tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego (GALT). W konsekwencji te biologiczne czynne związki przyczyniają się do utrzymania homeostazy jelitowej, zwiększając tolerancję organizmu wobec stresorów środowiskowych oraz wspomagając procesy trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. Chociaż pre- i probiotyki są najczęściej stosowane u drobiu w formie dodatków paszowych, coraz większe zainteresowanie budzi możliwość ich aplikacji już na etapie rozwoju zarodkowego. W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano metodę *in ovo*, polegającą na iniekcji substancji bioaktywnych tj. galaktooligosacharydów (GOS) lub *Lactobacillus plantarum* do komory powietrznej jaja kurzego w 12. dniu inkubacji. Ta nowoczesna technika umożliwia wczesne kształtowanie korzystnego profilu bakteryjnego jelit oraz inicjację dojrzewania układu immunologicznego w pierwszych dniach życia piskląt.

Pomimo rosnącego zainteresowania tą metodą, nadal brakuje pełnej wiedzy na temat biologicznych oraz molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za trwałe efekty fenotypowe, obejmujące między innymi poprawę wskaźników produkcyjnych, rozwój morfologiczny jelit, oraz charakterystykę zmian profilu ekspresji genów między innymi związanych z odpowiedzią immunologiczną czy stresem oksydacyjnym w wybranych tkankach brojlerów kurzych. Nie jest również jednoznacznie określone, które szczepy probiotyczne oraz które substancje prebiotyczne wykazują największą skuteczność w tym zakresie, zwłaszcza w warunkach intensywnej produkcji drobiarskiej. Biorąc powyższe pod uwagę, należy stwierdzić, że Pan mgr Modou Mangan trafnie sformułował problem badawczy, którego wybór znajduje swoje uzasadnienie w aktualnym stanie wiedzy naukowej. Podjęte przez Doktoranta badania są w pełni zasadne zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i praktycznego.

Opis i ocena pracy

Przedłożona do oceny dysertacja Pana mgr Modou Mangan ma formę opracowania opartego na tematycznie spójnym zbiorze trzech publikacji, uzupełnionych o autoreferat stanowiący podsumowanie zawartych w nich badań. W autoreferacie wyodrębniono rozdziały charakterystyczne dla tego typu opracowań tj.: spis treści, wstęp, listę artykułów stanowiących przedmiot rozprawy, wykaz skrótów, hipotezę, założenia oraz cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i końcowe wnioski, piśmiennictwo, abstrakt w języku

angielskim oraz polskim. Dodatkowo, w formie załączników, dołączono kopie publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji oraz oświadczenia współautorów. Warto również zaznaczyć, że praca ta została napisana jasnym i czytelnym językiem naukowym, który ułatwia zrozumienie omawianych zagadnień. Stronę formalną dysertacji oceniam jako prawidłową, odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Pragnę również podkreślić, że niniejsza praca finansowana była ze środków unijnego programu ramowego w zakresie badań naukowych i innowacji na lata 2014-2020 „Horyzont 2020” w ramach projektu MonoGutHealth (nr 955374), co potwierdzają stosowne oświadczenia zawarte w publikacjach.

W skład tematycznie powiązanego cyklu publikacji naukowych wchodzi jeden artykuł przeglądowy oraz dwie prace oryginalne, które zostały zebrane pod wspólnym tytułem: **„Impact of selected bioactive substances delivered *in ovo* on gut health and production performance of broiler chickens”**:

- (1) **Mangan M.**, Siwek M. (2024). Strategies to combat heat stress in poultry production – A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108, 576-595. (IF₂₀₂₄ = 2,2; punkty MNiSW₂₀₂₄ = 100 pkt.)
- (2) **Mangan M.**, Reszka P., Połtowicz K., Siwek M. (2025). Effects of *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide administered *in ovo* on hatchability, chick quality, performance, cecal histomorphology and meat quality traits of broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 109, 667-681. (IF₂₀₂₄ = 2,2; punkty MNiSW₂₀₂₄ = 100 pkt.)
- (3) **Mangan M.**, Połtowicz K., Metges C.C., Siwek M. (2025). Modulatory effects of *in ovo* delivery of galactooligosaccharide and *Lactobacillus plantarum* on antioxidant capacity, gene expression and selected plasma metabolite parameters of broiler chickens. *Journal of Applied Genetics*, 66, 421-434. (IF₂₀₂₄ = 2,0; punkty MNiSW₂₀₂₄ = 140 pkt.)

W rozprawie doktorskiej dwie z wyżej wymienionych publikacji (nr 2 oraz 3) zostały uwzględnione jako prace opublikowane w 2024 roku, zgodnie z datą ich udostępnienia w wersji elektronicznej, po akceptacji do druku. Wersje tych prac nie zawierały jeszcze pełnych danych bibliograficznych, które ukazały się dopiero w maju bieżącego roku. W związku z tym w recenzji pozwoliłam sobie uzupełnić opisy tych prac o aktualne informacje.

Wszystkie artykuły wchodzące w zwarty tematycznie cykl prac zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanych w bazie JCR. Łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor przedstawionego cyklu publikacji wynosi 6,40, co przekłada się na 340 punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych MNiSW (2024 r.). Powyższe parametry bibliometryczne w mojej ocenie są odpowiednie do ubiegania się o stopień naukowy doktora. We wszystkich tych pracach Pan mgr Modou Mangan figuruje jako pierwszy autor, a jego wkład w ich powstanie

był kluczowy. W przypadku pracy przeglądowej (publikacja nr 1) polegał on na planowaniu koncepcji publikacji, doborze odpowiedniej literatury, napisaniu oraz opracowaniu końcowej wersji manuskryptu. Natomiast w odniesieniu do publikacji nr 2 i 3, Doktorant był odpowiedzialny za zaplanowanie eksperymentu, przeprowadzenie badań *in ovo*, zebranie prób, wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie danych oraz przygotowanie i opracowanie końcowej wersji manuskryptu.

Chciałabym podkreślić, że wszystkie wyniki badań wraz z opisem metodycznym oraz dyskusją, przedstawione w dysertacji zostały opublikowane w czasopismach naukowych o ugruntowanej renomie. Prace te przeszły pomyślnie proces recenzji przeprowadzonej przez niezależnych ekspertów. W związku z tym zwalnia mnie to z obowiązku ich ponownej, szczegółowej analizy, pozostawiając mi ocenę spójności, wartości naukowej oraz oryginalności ujęcia problemu badawczego zaprezentowanego w monograficznej kompilacji rozprawy doktorskiej.

Zaproponowany przez Doktoranta **tytuł dysertacji** uważam za trafny i w pełni odzwierciedlający treść opracowania. Uzasadnienie wyboru przedmiotu badań oraz problemu badawczego zostało przedstawione w rozdziale zatytułowanym „**Wstęp**”, który obejmuje trzy strony wydruku. Autor klarownie scharakteryzował znaczenie mikrobiomu jelitowego w utrzymaniu zdrowia oraz wysokiej produktywności kurcząt broilerów. Zwrócił również uwagę na wyzwania związane z zakazem stosowania antybiotykowych promotorów wzrostu w produkcji drobiarskiej, podkreślając konieczność poszukiwania alternatywnych i bezpiecznych rozwiązań, które umożliwią m.in. zachowanie dobrostanu, poprawę statusu zdrowotnego, a tym samym maksymalizację potencjału genetycznego ptaków. W tym kontekście Doktorant przedstawił technologię *in ovo* jako innowacyjną metodę wspierającą wczesne kształtowanie korzystnego profilu bakteryjnego jelit oraz inicjację dojrzewania układu immunologicznego w pierwszych dniach życia piskląt. Przegląd literatury oparto na licznych i właściwie dobranych źródłach, co stanowi bardzo dobre tło dla sformułowanych celów badawczych oraz przybliży czytelnikowi aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Należy jednak zaznaczyć, że miejscami przegląd ten jest dość ogólnikowy i koncentruje się głównie na efektach fizjologicznych oraz produkcyjnych. Warto byłoby go uzupełnić o opis molekularnych mechanizmów działania pre- i probiotyków aplikowanych *in ovo*, w tym aktywacji szlaków sygnałowych prowadzących do zmian ekspresji genów i białek w wybranych tkankach u kurcząt brojlerów. Szerszy kontekst biologiczny wzbogaciłby wstęp oraz stanowiłby klarowne powiązanie z zagadnieniami poruszonymi w dalszych częściach pracy. Końcowa część rozdziału, w której Autor wprowadza czytelnika w tematykę badań własnych, zawiera elementy wymagające doprecyzowania. W tym miejscu Doktorant po raz pierwszy posługuje się skrótami LP oraz GOS, nie podając ich rozwinięcia. Ponadto, w opisie pierwszego celu pracy Pan mgr Modou Mangan wspomina o

analizie licznych pre- i probiotyków w badaniach *in vitro*, podczas gdy z dalszej części pracy wynika, że testowano wyłącznie szczepy probiotyczne.

W kolejnej części rozprawy, zatytułowanej „**Hipoteza, założenia oraz cel pracy**”, Pan mgr Modou Mangan w oparciu o analizę aktualnego stanu wiedzy poprawnie sformułował hipotezę badawczą oraz jasno określił cel główny i cele szczegółowe pracy. Pierwszy z celów szczegółowych dotyczył selekcji prebiotyków i probiotyków wykazujących najkorzystniejsze właściwości w zakresie ich działania antyoksydacyjnego, na podstawie testów przesiewowych przeprowadzonych *in vitro*. W tym miejscu zasadne byłoby doprecyzowanie tego celu, ponieważ jak wynika z dalszych części pracy, analizy te prowadzone były wyłącznie na wybranych szczepach probiotycznych. Zastosowany w badaniach *in vivo* prebiotyk (GOS) został wybrany na podstawie danych uzyskanych z wcześniejszych eksperymentów prowadzonych w jednostce macierzystej Doktoranta. Kolejny cel odnosił się do optymalizacji dawek obu substancji bioaktywnych (GOS oraz *L. plantarum*) w kontekście ich efektywnej aplikacji metodą *in ovo*. Ostatni z celów badawczych dotyczył oceny wpływu podania tych substancji *in ovo* na jakość tuszek oraz wybranych wskaźników jakości mięsa kurcząt brojlerów. W mojej ocenie cel ten również wymaga doprecyzowania, wskazując, że analizy przeprowadzono na brojlerach rasy Ross 308 w 35. dniu życia. Ponadto zasadne byłoby rozszerzenie sformułowanego celu o dodatkowe aspekty badawcze, które zostały faktycznie zrealizowane przez Doktoranta. Obejmują one ocenę parametrów produkcyjnych, analizy histomorfologiczne jelita ślepego, ocenę wskaźników biochemicznych krwi, identyfikację genetyczną wybranych szczepów bakterii w próbkach kału i treści jelita ślepego oraz analizę ekspresji genów w śledzionie, wątrobie, mięśniu piersiowym oraz błonie śluzowej jelita ślepego kurcząt.

Rozdział „**Materiał i metody**” został podzielony na osiem logicznych podrozdziałów, w których szczegółowo przedstawiono założenia metodyczne rozprawy doktorskiej. W pierwszych dwóch podrozdziałach Doktorant dokonał charakterystyki wybranych szczepów probiotycznych (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*) koncentrując się głównie na ocenie ich potencjału antyoksydacyjnego. W kolejnych podrozdziałach omówiono metodykę dotyczącą sposobu przygotowania substancji bioaktywnych, tj. GOS oraz *L. plantarum*, a także sposobu ich aplikacji metodą *in ovo*. Opisano również procedury odnoszące się do sposobu oceny wskaźników wylęgowości oraz jakości piskląt. Ostatni, ósmy podrozdział Pan mgr Modou Mangan podzielił na dwanaście części, w których kolejno opisał przebieg eksperymentu *in vivo*, metody oceny wskaźników produkcyjnych oraz tych dotyczących jakości mięsa. Przedstawił również procedury identyfikacji genetycznej wybranych szczepów bakterii, analizy histomorfologicznej jelita ślepego, oceny wskaźników biochemicznych oraz sposób przeprowadzenia analiz transkryptomicznych. Podrozdział ten zakończony jest syntetycznym

podsumowaniem zatytułowanym „Analiza danych”. Na szczególną uwagę zasługuje szeroki zakres prowadzonych badań oraz różnorodność zastosowanych, wysokospecjalistycznych metod analitycznych. Świadczy to o dużym nakładzie pracy oraz wysokich kompetencjach Doktoranta w zakresie posługiwania się nowoczesnym warsztatem badawczym, w tym również umiejętność statystycznego opracowywania uzyskanych wyników. Jednakże, niniejsza część pracy zawiera elementy, który wymagałyby uzupełnienia. W mojej ocenie warto byłoby zamieścić akapit uzasadniający dobór dawek obu substancji bioaktywnych aplikowanych *in ovo*. Ponadto, na stronie 22 Autor podaje, że pod koniec doświadczenia w 35. dniu życia, do uboju wybrano 12 kurcząt na podstawie ich masy ciała, bez podania konkretnych ich wartości.

Opis uzyskanych **wyników** został przedstawiony na 13 stronach i dodatkowo poparty 10 rycinami oraz 4 tabelami. Ze względu na dużą ilość przeprowadzonych analiz, rozdział ten został podzielony na dwie odrębne części, co zwiększyło przejrzystość przedstawionych treści. Po lekturze tej części rozprawy można jednoznacznie stwierdzić, że Autor w pełni odniósł się do zaproponowanych celów badawczych, a sposób prezentacji wyników świadczy o jego wysokich kompetencjach w zakresie analizy i interpretacji tak dużej ilości danych. W kolejnym rozdziale zatytułowanym **"Dyskusja"**, obejmującym 6 stron wydruku, Pan mgr Modou Mangan szczegółowo omówił uzyskane wyniki, odnosząc je do aktualnego piśmiennictwa naukowego. Ta część pracy doktorskiej jest napisana poprawnym językiem naukowym, który sprawia, że narracja jest klarowna i niewątpliwie ułatwia czytelnikowi lekturę tekstu. W mojej ocenie ten fragment pracy stanowi bardzo mocny punkt całej dysertacji i świadczy nie tylko o bardzo dobrej znajomości literatury przedmiotu, ale również dojrzałości naukowej Doktoranta oraz jego gotowości do prowadzenia samodzielnej polemiki naukowej. Rozprawę dokorską wieńczy rozdział **„Podsumowanie”**, w którym Doktorant podaje dziewięć wniosków, które znajdują swoje odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań. Według mojej oceny do najważniejszych aspektów merytorycznych należy zaliczyć wykazanie, że stymulacja *in ovo* galaktooligosacharydami (GOS) lub *Lactobacillus plantarum* (LP) w 12. dniu inkubacji:

- nie wpływa negatywnie na wylęgowość ani jakość piskląt;
- wpływa na wzrost masy ciała kurcząt brojlerów w 35. dniu życia;
- powoduje istotny wzrost liczebności bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* w kale 7., 21., oraz 35-dniowych brojlerów kurzych, a także bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w 35. dniu życia;
- powoduje wzrost liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w treści jelita ślepego u 35-dniowych brojlerów;
- indukuje korzystne zmiany morfologiczne w jelicie ślepym, obejmujące zwiększenie wysokości i szerokości kosmków jelitowych;

- prowadzi do wzrostu ekspresji genów związanych z funkcjami immunologicznymi w jelicie ślepym 35-dniowych kurcząt brojlerów.

Rozdział „Piśmiennictwo” liczący osiem stron, zawiera obszerny zbiór literatury, obejmujący kluczowe pozycje z omawianej dziedziny. Nie mniej jednak mam pewne uwagi do tej części rozprawy. Pierwsza z nich dotyczy braku ujednolicenia w sposobie opisu cytowanych źródeł bibliograficznych. W niektórych przypadkach podawana jest pełna nazwa czasopisma, natomiast w innych jedynie jej skrócona wersja. Podobna niespójność dotyczy zamieszczenia adresów URL, które również pojawiają się wybiórczo przy niektórych pracach. W przypadku cytowanej pozycji autorstwa Smulikowskiej i Rutkowskiego (2018) tytuł publikacji nie został podany w całości, a ponadto brakuje pełnych danych afiliacyjnych. Dodatkowo, w spisie literatury znajduje się pozycja Dibner i Richards (2005), która nie została przytoczona w treści rozprawy. Z kolei praca autorstwa Dubowitz i Brooke (1973), cytowana w tekście, nie została ujęta w spisie literatury.

Oceniając niniejszą dysertację nie mam istotnych uwag krytycznych, zaś wymienione poniżej punkty mają formę zaproszenia do dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej.

1. Dlaczego do stymulacji *in ovo* GOS oraz *L. plantarum* wybrano 12. dzień inkubacji?
2. Biorąc pod uwagę fakt, antagonistycznego działania *Bifidobacterium* wobec wielu patogennych gatunków bakterii, m.in. *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* dlaczego Doktorant nie uwzględnił analizy ich obecności w kale oraz w śluzówce jelita ślepego u kurcząt brojlerów?
3. Wśród genów wybranych do analizy transkryptomicznej Pan mg Modou Mangan uwzględnił ekspresję okludyny w wątrobie oraz zona occludens-1 w mięśniach piersiowych. Jest to interesujący, choć nietypowy wybór. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić, czym kierował się przy ich doborze?
4. Opisane w pracy wyniki jednoznacznie wskazują, że Doktorant ostatecznie zdecydował się na stymulację *in ovo* *L. plantarum* ze względu na wysoki potencjał antyoksydacyjny tego szczepu probiotycznego. Dlaczego więc wśród analizowanych parametrów biochemicznych osocza krwi nie uwzględniono wskaźników stresu oksydacyjnego?
5. Czy stymulacja *in ovo* pre- i probiotykami ma, zdaniem Doktoranta, potencjał do zastosowania u innych gatunków drobiu?

Jednocześnie chciałabym podkreślić, że wymienione przez mnie uwagi w żaden sposób nie umniejszają bardzo wysokiej wartości merytorycznej niniejszej dysertacji.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Modou Mangan pt: „Impact of selected bioactive substances delivered *in ovo* on gut health and production performance of broiler chickens” spełnia warunki określone w art. 190 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 poz. 1571). **W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady naukowej dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich o dopuszczenie Pana mgr Modou Mangan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny rozprawy, jej innowacyjny charakter, imponujący zakres przeprowadzonych badań, chciałbym złożyć **wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Modou Mangan.**

Agnieszka Herosimczyk

dr hab. inż. Agnieszka Herosimczyk, prof. ZUT