

Jabłonna 12.06.2025

Dr hab. Anna Tuśnio
profesor instytutu

Zakład Żywienia Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Instytucka 3
05-110 Jabłonna

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Modou Mangan

**pt.: „Wpływ wybranych substancji bioaktywnych dostarczanych *in ovo* na zdrowie jelit i
wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów”**

**przygotowanej pod opieką naukową prof. Marii Siwek z Katedry Biotechnologii
Zwierząt i Genetyki, Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt, Politechniki Bydgoskiej im.
Jana i Jędrzeja Śniadeckich oraz pod opieką promotora pomocniczego prof. dr hab.
Cornelii C. Metges z Research Institute for Farm Animal Biology (FBN) in
Dummerstorf, Niemcy**

Podstawa formalna recenzji

Podstawę formalną recenzji stanowi Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z dnia 28 marca 2025 r., nr 2/NCS.50.7.2025 w sprawie powołania na recenzenta w postępowaniu doktorskim mgr Modou Mangan.

Problem naukowy

Okres wylęgu jest bardzo ważnym momentem w życiu kurcząt brojlerów, od którego zależy przebieg odchowu stada. Zdrowe pisklęta charakteryzują się lepszym wzrostem i wysoką

przeżywalnością. Skutecznym sposobem na poprawę kondycji i jakości kurcząt jest technologia iniekcji *in ovo*, która umożliwia uodpornienie i dokarmienie piskląt w okresie rozwoju embrionalnego, a także ukształtowanie korzystnego profilu bakteriologicznego i zmniejszenie stresu związanego z etapem wylęgu. Technologia *in ovo* jest znana i stosowana w praktyce drobiarskiej od dosyć dawna. W latach 90 w Stanach Zjednoczonych wprowadzono szczepienie *in ovo* przeciwko chorobie Mareka. Nowoczesne linie kurcząt brojlerów są selekcjonowane pod kątem większego tempa wzrostu, wyższej końcowej masy ciała i większego udziału mięśni piersiowych w tuszce. Wiąże się to z większym zapotrzebowaniem zarodków m. in. na białko, energię czy składniki mineralne.

Wycofanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu z produkcji drobiu spowodowało wzrost zainteresowania probiotykami i prebiotykami w żywieniu ptaków. Składniki te mogą wpływać na zmniejszenie namnażania się patogenów w jelitach drobiu. Prebiotyki nie tylko korzystnie wpływają na skład mikroflory przewodu pokarmowego, ale także stymulują układ odpornościowy ptaków. Badania dotyczące podawania oligosacharydów z rodziny rafinoz metodą *in ovo* w 12 dniu inkubacji wykazują pozytywny wpływ prebiotyków na tworzenie korzystnego profilu bakteryjnego w jelitach. Ponadto podawanie aminokwasów tą metodą, składników mineralnych, węglowodanów, ekstraktów roślinnych lub witamin do jaja pokazuje, że ten sposób odżywiania może mieć pozytywny wpływ na przeżywalność zarodków, ich status immunologiczny, morfologię jelit i masę narządów. Mikrobiota przewodu pokarmowego odgrywa u drobiu ważną rolę w utrzymaniu dobrostanu ptaków, poprawiając reakcje immunologiczne, wchłanianie składników odżywczych i wykorzystanie energii, a także utrzymując układ pokarmowy w prawidłowej kondycji. Wczesna kolonizacja jelit kurcząt przez pożyteczną florę bakteryjną przeciwdziała także potencjalnym wyzwaniom środowiskowym i patogennym. Korzystna flora bakteryjna jest również niezbędna do rozwoju układu immunologicznego oraz rozwoju przewodu pokarmowego. Wczesne podanie korzystnych bakterii oraz składników bioaktywnych, które wspomagają zasiedlenie jelita przez bakterie probiotyczne, może modulować skład mikrobioty jelitowej i pośredniczyć w programowaniu wczesnego życia kurcząt brojlerów. Technologia *in ovo* przyczynia się także do wyznaczania nowych kierunków w żywieniu kurcząt, wpływając na rozwój prenatalny i fenotyp w późniejszym okresie wzrostu. Technologia ta wpływa również na lepsze wyniki produkcyjne przy zachowaniu odpowiedniego dobrostanu ptaków.

Problem badawczy, który podjął Doktorant, bardzo dobrze wpisuje się w obecny trend poszukiwania możliwości efektywnego wykorzystania technologii *in ovo* w produkcji kurcząt

brojlerów. Dlatego też problematyka poruszana w rozprawie doktorskiej przez mgr Modou Mangan jest istotna i ważna dla tej dziedziny nauki.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi seria trzech publikacji powiązanych ze sobą tematycznie, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych przez Journal Citation Report, których Impact Factor wynosi 2,2; 2,2; i 2,0 pod wspólnym tytułem „**Wpływ wybranych substancji bioaktywnych dostarczanych *in ovo* na zdrowie jelit i wyniki produkcyjne kurcząt brojlerów**”. Dwie publikacje to artykuły oryginalne, a jedna to praca przeglądowa. We wszystkich trzech publikacjach Doktorant jest pierwszym Autorem. W oświadczeniu do pierwszej publikacji Doktorant zadeklarował swój udział w postaci: planowania i projektowania treści manuskryptu, polegającego na przeszukiwaniu literatury oraz napisaniu i poprawieniu jego pierwszej wersji. W drugiej publikacji Doktorant przedstawił swój wkład w manuskrypt jako planowanie i projektowanie doświadczenia, przeprowadzenie i zarządzanie doświadczeniem *in ovo*, pobieranie próbek, wykonanie analiz, zbieranie i analizę danych oraz napisanie i korektę pierwszej wersji manuskryptu. W oświadczeniu do trzeciej publikacji Doktorant opisał swój wkład jako planowanie i projektowanie doświadczenia, przeprowadzenie i kierowanie doświadczeniem *in ovo*, pobieranie próbek, wykonanie analiz, zbieranie i analizę danych, napisanie i korektę pierwszej wersji manuskryptu. Informacje o indywidualnym wkładzie każdego ze Współautorów również są zawarte w rozprawie doktorskiej. Na podstawie tych informacji można wnioskować, że Doktorant jest wiodącym Autorem opublikowanych prac i odegrał znaczącą rolę w prowadzonych badaniach. Należy podkreślić, że pod względem treści i formy prezentowane publikacje są tematycznie ze sobą powiązane i stanowią podstawę osiągnięć naukowych Doktoranta.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska składa się z 6 rozdziałów, z których część ma także podrozdziały i liczy łącznie 122 strony z oświadczeniem Doktoranta, oświadczeniami Współautorów oraz z załączonymi publikacjami. Struktura rozprawy jest klasyczna i składa się ze: Wstępu do tematu badawczego, Spisu tematycznie powiązanych artykułów naukowych, Hipotezy, Celów i zakresu badań, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Podsumowania, Bibliografii, Abstraktu w języku angielskim i polskim oraz załączników (kopie publikacji, oświadczenie Autora i oświadczenia Współautorów). Taki układ rozprawy doktorskiej pozwolił Doktorantowi na szczegółowe przedstawienie zagadnień

badawczych, wskazanie założeń podjętych badań, metod ich realizacji oraz przedstawienie najważniejszych wyników badań i ich wniosków. Doktorant wykorzystał bardzo obszerny spis bibliografii, obejmujący 91 pozycji. Ich dobór jest trafny i odpowiada aktualnemu stanowi wiedzy na temat podejmowanej przez Doktoranta tematyki badawczej, jednakże nie udało się Doktorantowi uniknąć błędów ortograficznych w niektórych nazwiskach autorów.

Należy zaznaczyć, że Doktorant prowadził badania w ramach dwóch projektów, w tym jednego europejskiego. Badania były prowadzone w ramach projektu Unii Europejskiej Horyzont 2020 i grantu nr 955374 w ramach projektu MonoGutHealth.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Głównym celem badań będących podstawą do powstania rozprawy doktorskiej była poprawa kondycji przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów i wskaźników produkcyjnych ptaków poprzez wpływ na ich mikrobiom z zastosowaniem programowania *in ovo*. Doktorant wyznaczył również szczegółowe cele badawcze, które obejmowały:

- wybór prebiotyków i probiotyków, które mogłyby poprawić wzrost, stan zdrowia i wydajność kurcząt brojlerów, badania prowadzone były z wykorzystaniem testów przesiewowych *in vitro*;
- optymalizację dawkowania substancji bioaktywnych w celu skutecznego zastosowania technologii *in ovo* u kurcząt brojlerów;
- ocenę wpływu substancji bioaktywnych podanych *in ovo* na jakość mięsa i cechy tuszy kurcząt brojlerów.

Doktorant wysunął również hipotezę, że stymulacja *in ovo* *Lactiplantibacillus plantarum* i galaktooligosacharydem w 12 dniu rozwoju embrionalnego będzie modulować zdrowie jelit kurcząt, poprawiać ich rozwój, funkcje odpornościowe oraz poprawiać wydajność produkcji. Substancje bioaktywne zostały wybrane w doświadczeniu *in vitro*, a jego wyniki zostały poparte kompilacją badań innych autorów w artykule przeglądowym (druga publikacja). Na podstawie wyników doświadczenia *in vitro* Doktorant wybrał do dalszych badań na kurczętach brojlerach bakterie probiotyczne *Lactiplantibacillus plantarum* oraz galaktooligosacharyd (trzecia publikacja).

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorant przedstawił szczegółowe założenia metodyczne rozprawy doktorskiej. Badania zostały zaplanowane w następujących doświadczeniach:

1. Wybór substancji bioaktywnych w doświadczeniu *in vitro* z wykorzystaniem testu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl) do oceny zdolności wymiatania wolnych rodników i poziomu antyoksydantów badanych substancji bioaktywnych.
2. Na podstawie wyników doświadczenia *in vitro* spośród dwunastu probiotyków wybrano jeden o najlepszym wzroście i najwyższej zdolności wymiatania wolnych rodników; w doświadczeniu tym wybrano *Lactiplantibacillus plantarum* do stymulacji *in ovo*, a na podstawie danych literaturowych wybrano galaktooligosacharyd jako związek, który wpływa na łagodzenie stresu cieplnego, działa stymulująco na wczesną kolonizację jelit, poprawia wydajność i zdrowie ptaków. Wybrane substancje bioaktywne zostały podane do komory powietrznej jaja w 12 dniu rozwoju embrionalnego.
3. Przeprowadzono również doświadczenie na 300 jednodniowych pisklętach Ross 308. Doświadczenie trwało 35 dni, w którym badano wpływ podawania *Lactiplantibacillus plantarum* i galaktooligosacharydu na parametry przyżyciowe kurcząt brojlerów oraz jakość mięsa (np. pH, kolor mięsa, siłę ścinania, twardość, straty podczas kapania, straty podczas gotowania i rozmrażania). Ponadto oceniono wpływ substancji bioaktywnych na względną liczebność bakterii, histomorfologię jelita ślepego, metabolity osocza krwi i ekspresję genów w błonie śluzowej jelita ślepego, śledzionie, mięśni piersiowym i wątrobie.

W tym rozdziale Doktorant opisał również metody statystyczne, którymi posługiwał się do analizy uzyskanych wyników. Uważam ten rozdział za dobrze przygotowany i jasno opisany, tym bardziej, że w razie wątpliwości można odwołać się do tekstów załączonych publikacji, stanowiących podstawę rozprawy. Warto także podkreślić, że Doktorant przeprowadził analizy i obserwacje w bardzo szerokim zakresie.

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawił uzyskane wyniki w bardzo przejrzysty sposób. Został on starannie przygotowany, wyniki przedstawiono skrupulatnie, zachowując podział na poszczególne etapy zaplanowanych celów badawczych. Wyniki doświadczeń *in vitro*, jak i *in vivo* przedstawiono zarówno w tabelach, jak i na wykresach.

Rozdział „Dyskusja” został podzielony na kilka podrozdziałów, co uważam za bardzo dobry pomysł, ponieważ pozwoliło to Doktorantowi jasno odnieść się do wszystkich badanych czynników. Doktorant starannie dobrał literaturę, artykuły, które wykorzystał do dyskusji, pochodzą głównie z ostatnich 10 lat, a prezentowana rozprawa dobrze wpisuje się w obszar współczesnych badań. Dyskusja została zakończona podsumowaniem.

Do najważniejszych osiągnięć ocenianej rozprawy doktorskiej należą poniższe obserwacje:

1. *Lactiplantibacillus plantarum* (stężenie 1×10^6) wykazywał najwyższą aktywność wymiatania wolnych rodników, co wskazuje na jego największy potencjał antyoksydacyjny spośród badanych substancji.
2. Zarówno probiotyk *Lactiplantibacillus plantarum*, jak i galaktooligosacharyd podane *in ovo* nie wpłynęły negatywnie na wylęgowość i jakość piskląt.
3. Stymulacja *in ovo* *Lactiplantibacillus plantarum* i galaktooligosacharydem wpłynęła na wysoką liczebność *Lactobacillus spp.* w odchodach kurcząt w różnych okresach życia.
4. Zaobserwowano wzrost populacji *Lactobacillus spp.* i *Bifidobacterium spp.* w treści jelita ślepego ptaków.
5. Wykazano pozytywny wpływ badanych substancji bioaktywnych na strukturę morfologiczną jelita ślepego kurcząt.
6. Na podstawie analizy ekspresji genów w błonie śluzowej jelita ślepego zaobserwowano znaczące zwiększenie ekspresji genów związanych z funkcjami odpornościowymi.

Wartościowe jest również ogólne podsumowanie przeprowadzonych badań, w którym Doktorant stwierdza, że stymulacja *in ovo* probiotykiem *Lactiplantibacillus plantarum* (o stężeniu 1×10^6) i galaktooligosacharydem (w ilości 3,5 mg/jajo) w 12 dniu rozwoju embrionalnego moduluje mikrobiotę jelitową od okresu okołowylęgowego oraz przez całe życie kurcząt, wpływa także pozytywnie na parametry odpornościowe oraz budowę morfologiczną jelita ślepego kurcząt bez pogorszenia parametrów przyżyciowych.

Uwagi i sugestie

Wysoko oceniam rozprawę doktorską przedłożoną mi do recenzji, jednak ze względu na obowiązki recenzenta muszę przedstawić pewne uwagi krytyczne:

1. W rozdziale 3.2. „Hypothesis, objectives and scope of the research” – “Scope of the research” Doktorant użył sformułowania: "However, the poultry industry is still affected". Co Doktorant miał na myśli? Najprawdopodobniej jest to niezbyt fortunnie użyte stwierdzenie. Z kontekstu tego fragmentu tekstu można się domyślać co Doktorant chciał przekazać, ale moim zdaniem to stwierdzenie jest zbędne.

2. W rozdziale 3.2. „Hypothesis, objectives and scope of the research” – “Scope of the research” Doktorant napisał: “The scope of this PhD dissertation specifically focuses on the impacts of *in ovo* stimulation of *Lactiplantibacillus plantarum* (LP) and galactooligosaccharides (GOS) on Ross 308 broilers and explores the positive impacts of GOS and LP on the gut microbiota, gut morphology, immune functions, antioxidant capacity, growth performance, health and general welfare”. Czy Doktorant badał i brał pod uwagę tylko pozytywny wpływ stosowanych substancji bioaktywnych?

3. W rozdziale 3.2. "Hypothesis, objectives and scope of the research" – “Scope of the research” – opis pierwszego eksperymentu powinien zawierać informacje o tym, jakie konkretne substancje bioaktywne były badane w tym doświadczeniu (doświadczenie *in vitro*). Informacje takie pojawiają się po raz pierwszy dopiero w rozdziale „Materiały i metody” w Tabeli 1.

4. Fragment w rozdziale „Materials and methods”, w którym Doktorant opisuje substancje bioaktywne wybrane do doświadczenia *in ovo*, jest nieczytelny i wymagałby w moim odczuciu przeredagowania, tak aby czytający nie miał wątpliwości w jakiej ilości zostały użyte galaktooligosacharydy podane do jaja.

5. W rozdziale 3.3.8.1 “*In vivo* experiment” Doktorant opisał mieszanki dla kurcząt, stwierdzając, że rodzaj mieszanki zależał od wieku ptaków, którym podawano mieszankę starter, grower i finisher, a następnie wymienił zawartość białka, odpowiednio 22,3%, 20,2% i 20,2% i napisał, że była to zawartość białka w diecie starter. Myślę, że to tylko błąd redakcyjny, ale proszę to wyjaśnić.

6. W rozdziale 3.3.8.3. “Carcass traits and meat quality analysis” Doktorant podał informację, że ptaki uśmiercano i pozostawiano do wykrwawienia przez około 90 sekund, a następnie w kolejnym zdaniu Doktorant stwierdził, że po 5 minutach wykrwawiania każdy ptak był oskubywany i patroszony – jest to pewna nieścisłość.

7. W rozdziale 3.4.2.5. “Body weight, feed intake and feed conversion ratio” Doktorant stwierdził: “However, by the end of the rearing period (day 35), the *in ovo* experimental groups had a slightly higher BW than those of the PC group. The findings demonstrated that GOS and LP enhanced the early growth performance of chicks (Table 6).” Myślę, że stwierdzenie "The findings demonstrated that GOS and LP enhanced the early growth performance of chicks" jest

przesadzone i Doktorant powinien być ostrożny w formułowaniu takich wniosków. Tylko ptaki z grupy LP miały istotnie większą masę ciała w wieku 7 dni w porównaniu do kurcząt z pozostałych grup. W wieku 35 dni zaobserwowano nieznacznie większą masę ciała u ptaków z grupy GOS i LP, ale były to różnice statystycznie nieistotne i na tej podstawie nie należy wyciągać wniosków na korzyść zastosowanych substancji bioaktywnych.

8. W rozdziale 3.4.2.6. “Slaughter, carcass traits assessment and meat quality analysis” odnosząc się do zdania i Tabeli 7: “However, regarding the cooling losses, the birds in the LP and GOS demonstrated significantly lower cooling losses than those of the PC group” niestety muszę stwierdzić, że na podstawie przedstawionych wyników nie można użyć takiego stwierdzenia, ponieważ różnica jest istotna tylko dla grupy LP w porównaniu z grupą PC, grupa GOS została oznaczona po analizie statystycznej jako „ab”, co oznacza, że jest podobna zarówno do jednej jak i drugiej grupy.

9. W rozdziale 3.5.2. “*In ovo* stimulation – indirect impact on host gut histology” Doktorant napisał: “The crypt depth is the main site of cell production and therefore participates in the renewal of cells”. Takie sformułowanie jest niefortunne, ponieważ nie jest prawdą, że głębokość krypty jest głównym miejscem produkcji komórek, ale poprostu krypta jest tym miejscem, więc poprawne zdanie powinno brzmieć: “Crypt is the main site of cell production...”e.t.c.

10. Uwaga ogólna: W rozprawie doktorskiej Doktorant często posługuje się formą w pierwszej osobie i formą bezosobową, np. opisując wyniki eksperymentów. Moim zdaniem Doktorant nie powinien stosować tych form zamiennie, lecz zdecydować się na jedną z nich i być konsekwentnym w całym tekście dysertacji.

Podsumowując ocenę, chciałabym stwierdzić, że powyższe uwagi i zauważone nieścisłości nie umniejszają mojej pozytywnej oceny całej rozprawy doktorskiej i zamieszczonych w niej publikacji. Wynikają one z funkcji recenzenta oraz z troski o poprawę czytelności i jakości rozprawy.

Uważam, że Doktorant wykazał się znaczną wiedzą naukową i praktyczną podczas przygotowywania artykułów zamieszczonych w rozprawie, co świadczy o jego bardzo dobrym przygotowaniu do planowania i prowadzenia badań oraz dyskusji naukowej. Oceniana

rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, a przedstawione wyniki mają zarówno wartość naukową, jak i praktyczną.

Oświadczam, że recenzowana praca w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonym w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20.07.2018 r. (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). W związku z powyższym rekomenduję Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich dopuszczenie mgr Modou Mangan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.