



Prof. dr hab. inż. Karol Fijałkowski

Szczecin, dn. 09/11/2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Ramesha Nirmali Wishna Kadawarage

pt. „Stymulacja *in-ovo* jako narzędzie do poprawy zdrowia jelit kurcząt brojlerów”

wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Genetyki Zwierząt, Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt,

Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Marii Siwek-Gapińskiej

oraz dr Rity Hickey

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich nr 3/8/2023/2024 z dnia 30 sierpnia 2024 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej Pani mgr Rameshy Nirmali Wishna Kadawarage.

Podstawę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stanowi cykl trzech, powiązanych tematycznie artykułów naukowych, o charakterze eksperymentalnym, opublikowanych w 2024 r:

1. **Ramesha N. Wishna-Kadawarage**, Martin Jensen, Szymon Powałowski, Rita M. Hickey and Maria Siwek, *In-vitro* screening of compatible synbiotics and (introducing) “prophybiotics” as a tool to improve gut health, *International Microbiology* (Springer), 2024, 27, 645–657, <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00417-2>, punkty MNiSW - 40, IF - 2,3.
2. **Ramesha N. Wishna-Kadawarage**, Rita M. Hickey and Maria Siwek, *In-vitro* selection of lactic acid bacteria to combat *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in broiler chickens, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Springer), 2024, 40, 133, <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03946-8>, punkty MNiSW - 70, IF - 4,0.
3. **Ramesha N. Wishna-Kadawarage**, Katarzyna Połtowicz, Agata Dankowiakowska, Rita M. Hickey and Maria Siwek, Prophybiotics for *in-ovo* stimulation; validation of effects on gut health and production of broiler chickens, *Poultry Science* (Elsevier), 2024, 103, 4, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103512>, punkty MNiSW - 140, IF - 3,8.

Łączna wartość wskaźnika Impact Factor prac przedstawionych w cyklu wynosi 10,1, a liczba punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi 250. Wszystkie artykuły stanowiące rozprawę doktorską opublikowane zostały w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wydawanych przez wydawnictwa Springer oraz Elsevier, a więc równie reprezentujących wysoki poziom naukowy, a tym samym przeszły staranną weryfikację redakcyjno – formalną oraz merytoryczną.

Badania eksperymentalne prowadzone przez Doktorantkę w ramach recenzowanej pracy zostały sfinansowane z programu European Union's Horizon 2020.

Dobór problematyki badawczej i tematu rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest ciekawą pracą przedstawiającą, w sposób kompleksowy i szczegółowy oryginalne i nowatorskie rozwiązanie dotyczące stymulacji *in-ovo* z wykorzystaniem bakterii probiotycznych oraz przeciwdrobnoustrojowych substancji bioaktywnych, w celu stymulacji wzrostu bakterii komensalnych w jelitach rozwijających się zarodków, a docelowo również poprawy zdrowia jelita kurcząt brojlerów. Produkcja i dobrostan brojlerów oraz bezpieczeństwo żywności opartej na mięsnych produktach drobiowych są w dużym stopniu uzależnione od zdrowia ich jelit. Zdrowie jelit jest krytycznym wyzwaniem w produkcji bez antybiotyków. Jak powszechnie wiadomo układ pokarmowy drobiu jest szczególnie podatny na zakłócenia w równowadze mikrobioty jelitowej, co może prowadzić do chorób tych zwierząt. Pisklęta brojlerów wykluwają się w stosunkowo sterylnym środowisku zewnętrznym, ponadto, w przeciwieństwie do ssaków, nie mają kontaktu z matką przy narodzinach, a ze względu na dłuższe okna wylęgowe, doświadczają opóźnień w dostępie do paszy i wody, które są pierwszymi źródłami egzogennych drobnoustrojów komensalnych będących podstawą do budowania mikrobiomu jelitowego. Z tych powodów kolonizacja jelit pożytecznymi bakteriami komensalnymi jest opóźniona. W tym kontekście, warto zaznaczyć, że już od pierwszego dnia życia prawidłowe funkcjonowanie układu trawiennego wpływa na dalszy rozwój piskląt i często decyduje o jego przetrwaniu. Kluczowa w procesach trawienia i wchłaniania pokarmu mikrobiota przewodu pokarmowego odgrywa istotną rolę w zdrowiu i wydajności produkcyjnej ptaków. Proces namnażania się mikrobioty jelitowej trwa nawet kilka tygodni, podczas których jelita są narażone na kolonizację patogennymi bakteriami, w tym z rodzajów *Salmonella* i *Campylobacter*. Jelito odgrywa kluczową rolę w układzie odpornościowym, będąc pierwszą linią obrony przed patogenami wnikającymi do organizmu przez układ trawienny. Z kolei mikrobiom jelitowy, składający się z różnorodnych drobnoustrojów, pełni kluczową funkcję w odporności jelitowej kurcząt, wpływając na odpowiedź immunologiczną. Co szczególnie istotne, wiele bakterii komensalnych może wspierać tę odpowiedź, chroniąc jelita przed patogenami. Dlatego mikrobiota przewodu pokarmowego piskląt zasługuje na szczególną uwagę, mając znaczenie dla zdrowia od pierwszych dni ich życia, a tym samym istotny wpływ na osiągnięte wyniki produkcyjne. Ponadto utrzymanie zdrowego mikrobiomu jelitowego brojlerów jest kluczowe dla kontrolowania patogenów żołądkowo-jelitowych przenoszonych przez żywność, w tym bakterii z rodzajów *Campylobacter* i *Salmonella*, które są jednymi z najczęstszych etiologicznych czynników zaburzeń żołądkowo-jelitowych u ludzi, spowodowanych spożyciem żywności, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego.

Reasumując, zagadnienia których dotyczy recenzowana rozprawa doktorska są ważne i ciekawe oraz wpisują się w tematykę nurtu badań związanych z czynnikami wpływającymi na

prawidłowy rozwój i dojrzewanie przewodu pokarmowego, w tym przede wszystkim jelit brojlerów, ze szczególnym uwzględnieniem procesu budowania prawidłowej mikrobioty jelitowej, dzięki stymulacji *in-ovo*, jako kluczowego czynnika dla odporności jelitowej piskląt.

Ocena formalno-redakcyjna pracy

Praca doktorska Pani mgr Rameshy Nirmali Wishna Kadawaragewe, wliczając artykuły naukowe i oświadczenia współautorów liczy 114 stron. Praca napisana została w języku angielskim. Układ pracy oraz kolejność rozdziałów są poprawne i typowe dla dysertacji doktorskich opartych na cyklu spójnych tematycznie publikacjach naukowych. Załączone kopie publikacji stanowiące zasadniczą część rozprawy doktorskiej poprzedzone zostały krótkim opisem uzasadniającym spójność tematyczną cyklu publikacji rozprawy doktorskiej. Dysertację rozpoczyna informacja o projekcie, w ramach którego finansowane były badania, spis publikacji stanowiących rozprawę doktorską, a także wykaz skrótów, symboli i jednostek stosowanych w pracy. W dalszej części pracy Doktorantka zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim. Opisowa część dysertacji podzielona została na rozdziały uzasadniające przeprowadzone badania, prezentujące sformułowane hipotezy i cele, opisujące stosowane materiały i wykorzystywane metody oraz uzyskane wyniki, a także podsumowujące najważniejsze osiągnięcia z poszczególnych analizy. Na ostatnią część pracy składają się załączniki zawierające kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz oświadczenia współautorów poszczególnych publikacji.

Praca napisana jest poprawnym stylistycznie językiem, a także w sposób zrozumiały i staranny. Informacje teoretyczne, jak i wyniki przedstawione w tabelach i wykresach autoreferatu oraz poszczególnych publikacjach włączonych do cyklu stanowiącego rozprawę doktorską są czytelne i logiczne. Wszystkie uzyskane wyniki zaprezentowano w logicznej kolejności oraz zostały one szczegółowo omówione. Tytuł recenzowanej rozprawy znajduje odzwierciedlenie w jej treści, strukturze, założeniach badawczych i doborze materiału źródłowego. Informacje zawarte w rozprawie doktorskiej zostały poparte właściwie dobranym piśmiennictwem świadczącym o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki.

We wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Pani mgr Kadawaragewe jest pierwszym autorem, co świadczy o jej wiodącej roli w przeprowadzanych eksperymentach. Wkład Doktorantki w przygotowanie artykułów naukowych polegał na jej współudziale w opracowaniu koncepcji i wykonaniu eksperymentów (w tym eksperymentów *in-ovo*), zbieraniu i przeanalizowaniu uzyskanych wyników przeprowadzonych analiz oraz przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptu. Z całą pewnością świadczy to o dużej dojrzałości naukowej Autorki oraz jej samodzielności w organizacji warsztatu badawczego. Wkład Doktorantki, jak i poszczególnych autorów prac opisany w oświadczeniach współautorów jest zgodny z informacjami przedstawionymi w publikacjach naukowych (rozdziały „Authors' contributions”). W mojej opinii zaangażowanie Doktorantki w przeprowadzenie eksperymentów i przygotowanie publikacji stanowiących rozprawę doktorską jest wiodące i pomimo kilkusobowego zespołu autorów poszczególnych prac z łatwością można wyodrębnić jego udział w każdym z artykułów.

Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska Pani mgr Kadawaragewe to obszerny i dobrze wykonany eksperyment naukowy z wykorzystaniem bardzo szerokiego wachlarza metod, między innymi z zakresu mikrobiologii klasycznej jak i biologii molekularnej, w tym zaawansowanych technik genetycznych i chromatograficznych, analiz histomorfologicznych oraz technologii *in-ovo*. Zastosowane, liczne i różnorodne metody zostały właściwie dobrane do realizacji założonych celów badawczych. Z całą pewnością metodyczne zróżnicowanie wykonanych badań naukowych oraz ich prawidłowe dostosowanie do postawionego celu badawczego świadczy o profesjonalnym i wszechstronnym przygotowaniu Autorki do samodzielnego wykonywania części doświadczalnej pracy.

Doktorantka założyła, że stymulacja brojlerów metodą *in-ovo* z wykorzystaniem wyselekcjonowanych przez nią bioaktywnych substancji przeprogramuje mikrobiom jelitowy i wzmocni układ odpornościowy piskląt brojlerów, aby aktywować bezpośrednie i pośrednie szlaki odpowiedzialne za eliminację patogenów w jelitach. Autorka założyła również, że korzystne efekty związane z przeprowadzoną stymulacją *in-ovo* utrzymają się do końca okresu produkcji brojlerów, nawet bez dalszej suplementacji specjalnymi dodatkami paszowymi w trakcie ich chowu.

W tym celu Doktorantka przeanalizowała zgodności wybranych prebiotyków i probiotyków, które w dalszych etapach badań zastosowane mogłyby zostać w badaniach *in-ovo*. Ponadto, Autorka, zakładając, że niektóre fitobiotyki posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, jak również prebiotyczne, postanowiła zastosować je w połączeniu z probiotykami, również w kontekście zastosowań do stymulacji *in-ovo*. Podkreślając nowatorski charakter prowadzonych prac, do zastosowanej kombinacji probiotyku i fitobiotyku Doktorantka utworzyła własne określenie „prophybiotic”.

W pierwszym etapie badań Doktorantka określiła interakcje pomiędzy prebiotykami i fitobiotykami oraz probiotykami. Celem tych badań było wykazania, które z analizowanych substancji, a także przy jakim stężeniu nie hamują wzrostu bakterii probiotycznych. Następnie Autorka wytypowała szczepy probiotyczne, które charakteryzowały się największą aktywnością przeciwdrobnoustrojową względem chorobotwórczych szczepów *Campylobacter jejuni* i *Salmonella enterica*. Na podstawie dwóch powyżej eksperymentów *in vitro*, Doktorantka z sukcesem wytypowała zarówno szczep probiotyczny - *Leuconostoc mesenteroides*, jak i wskazała składnik fitobiotyczny oraz jego stężenie - ekstrakt z czosnku w stężeniu 0,5%, co z kolei w kolejnym etapie pracy umożliwiło jej przygotowanie protokołu stymulacji *in-ovo*, a w dalszych etapach badań również jego walidację. W wyniku kolejnych eksperymentów, Doktorantka udowodniła, że przygotowany i zastosowany przez nią protokół stymulacji *in-ovo* pozwala na uzyskanie korzystnych zmian jakościowo-ilościowych mikrobiomu jelita ślepego, jak również występujących w nim bakterii potencjalnie patogennych, umożliwia zróżnicowaną ekspresję genów związanych z odpornością w kluczowych narządach odpornościowych i przyczynia się do korzystnych zmian histomorfologicznych jelita ślepego kurcząt brojlerów. Ponadto, zgodnie z wynikami analizy parametrów wylęgu, masy ciała, uboju i jakości mięsa Autorka nie stwierdziła żadnych negatywnych skutków przeprowadzonej stymulacji.

Podsumowując, uzyskane przez Doktorantkę wyniki są cenne i dostarczają ważnych informacji o znaczeniu nie tylko poznawczym, ale również praktycznym. Z całą pewnością wyniki jakie uzyskała i zaprezentowała Doktorantka poszerzyły wiedzę na temat możliwości zastosowania stymulacji *in-ovo* z wykorzystaniem probiotycznych szczepów bakterii w połączeniu

z odpowiednio dobranym fitobiotykiem w celu zapewnienia długoterminowych korzystnych efektów (mikrobiom, odporność immunologiczna i histomorfologia jelita) u brojlerów.

Pytania do dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej:

Jaka jest gotowość wdrożeniowa opracowanego rozwiązania opartego o stymulację *in-ovo* z wykorzystaniem bakterii probiotycznych i fitobiotyków?

Jakie są kluczowe kierunki dalszych badań nad tym zagadnieniem, które umożliwią jego optymalizację i szerokie wdrożenie w praktyce?

Jakie są główne ograniczenia opracowanej metody i jaka może być przewidywana perspektywa czasowa ich rozwiązania?

Czy istnieje możliwość przeprowadzenia analiz opisanych w publikacjach 1 i 2 z użyciem pożywki symulującej środowisko jaja (zamiast MRS) oraz bakterii w formie biofilmów, a także z zastosowaniem innych testów niż pomiar OD (publikacja 1)?

Czy zidentyfikowany jest mechanizm, który kontroluje nadmierny rozwój bakterii probiotycznych po podaniu ich (w stosunkowo dużych ilościach) metodą *in-ovo*?

Zakładając, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów probiotycznych związana jest przede wszystkim z obniżonym pH, czy istnieje ryzyko efektu cytotoksycznego po podaniu tych drobnoustrojów metodą *in-ovo*?

Czy Autorka widzi możliwość zastosowania innych substancji bioaktywnych, w tym np. 1,8-cyneolu, którego zastosowanie w medycynie staje się coraz bardziej powszechne. Czy zdaniem Doktorantki związek ten mógłby również być wykorzystany w stymulacji *in-ovo*?

Podsumowanie i konkluzja końcowa

Całościowa ocena recenzowanej pracy doktorskiej przygotowanej przez Panią mgr Rameshe Nirmali Wishna Kadawaragewe jest w pełni pozytywna. Doktorantka udowodniła, że dysponuje dobrym warsztatem badawczym, który umożliwił jej uzyskanie oryginalnych wyników o dużej wartości, zarówno w aspekcie teoretycznym, jak i aplikacyjnym. Do najważniejszych mocnych stron dysertacji należy zaliczyć trafny, ciekawy i aktualny dobór problematyki badawczej (niezwykle istotnej, zarówno w aspekcie zdrowia zwierząt/brojlerów jak i ludzi), kompleksowy program badań empirycznych, biegłe posługiwanie się literaturą przedmiotu oraz umiejętne prowadzenie analizy uzyskanych wyników. Natomiast prezentacja osiągnięć naukowych w formie publikacji, w których Doktorantka występuje jako pierwszy autor i które opublikowane zostały w wysokiej jakości czasopismach naukowych świadczy o jej dojrzałości i samodzielności oraz podkreśla wartość naukową uzyskanych wyników.

Reasumując, Doktorantka udowodniła swoją dojrzałość intelektualną jako młody badacz i naukowiec oraz w mojej opinii jest w stanie podjąć się kolejnych wyzwań naukowych. Rozprawa doktorska pt. „Stymulacja *in-ovo* jako narzędzie do poprawy zdrowia jelit kurcząt brojlerów” wykonana w Katedrze Biotechnologii i Genetyki Zwierząt, Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt, Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Marii Siwek-Gapińskiej oraz dr Rity Hickey spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20

lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Rameshy Nirmali Wishna Kadawaragewe oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze wysoką wartość naukową ocenianego cyklu publikacji stanowiącego rozprawę doktorską, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich o jej wyróżnienie. Rozprawa doktorska Pani mgr Kadawaragewe wnosi nie tylko wiele cennych informacji do wiedzy o możliwościach i korzyściach z zastosowania stymulacji *in-ovo*, ale ze względu na możliwość wykorzystania uzyskanych przez Doktorantkę wyników w praktyce chodowlanej charakteryzuje się cennym i dużym potencjałem aplikacyjnym. Proponowane wyróżnienie jest również wyrazem mojego uznania dla Doktorantki za pracę włożoną w przeprowadzenie badań wyróżniających się oryginalnością zastosowanych metod oraz za umiejętność interpretacji uzyskanych danych, co niewątpliwie świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i wpływa na wysoki poziom naukowy prac wchodzących w skład cyklu stanowiącego jej rozprawę doktorską.

Kawal Fijałkowski