

Olsztyn, dnia 07.02.2022 r.

Prof. dr hab. Cezary Purwin
Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
ul. Oczapowskiego 5
10-719 Olsztyn

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Wilk

pt.: "*Wpływ inokulantu *Lactobacillus buchneri* na wartość pokarmowa kiszzonek z *Sorghum saccharum* (L.) Moench oraz procesy przemian żwaczowych*"

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Andrzeja Wilczkiewicza, prof. uczelni.

w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Ocena strony formalnej rozprawy

Promotor pracy oraz współautorzy złożyli stosowne oświadczenia, co do zgodności opracowania z warunkami wymaganymi do przedstawienia rozprawy doktorskiej, w tym samodzielnego opracowania problemu badawczego, bez naruszania praw autorskich osób trzecich. Na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską składają się dwie anglojęzyczne publikacje w czasopismach naukowych, w których Pani Martyna Wilk jest pierwszą i korespondencyjną autorką, co wskazuje na kluczową rolę doktorantki w prowadzeniu badań i publikowaniu prac. Przedłożone publikacje uzupełniono polskojęzyczną monografią prezentującą wybrany problem badawczy, zawierającą wstęp i przegląd piśmiennictwa, cel badań, hipotezy badawcze, dyskusję oraz podsumowanie oraz tabele i wykresy niepublikowane. Przedstawione do oceny prace opublikowano w dwóch różnych czasopismach, tj.: Journal of Animal and Feed Sciences, Pakistan Veterinary Journal. Wymienione tytuły notowane są w ocenie parametrycznej MNiSzW na liście A z ilością punktów odpowiednio 40 i 70 pkt, współczynnikiem wpływu w roku wydania odpowiednio 1,150 i 1,318. Łączna wartość pracy to: 110 pkt z listy A oraz sumaryczny IF w roku publikacji 2,468. Łączną ilość punktów wg punktacji listy MNiSzW na liście A można uznać za wartość względną, ponieważ po aktualizacji w roku wyniosłaby 170 pkt. Przedstawione

publikacje są pracami zespołowymi, sygnowanymi odpowiednio przez 5 i 7 autorów. Deklarowany przez Doktorantkę i potwierdzony przez pozostałych współautorów udział Doktorantki w realizacji obu przedstawionych prac wynosił 60%. Biorąc pod uwagę fakt pierwszego i korespondencyjnego autorstwa Doktorantki w publikacjach, uważam przedstawione udziały za wiarygodne, dzięki czemu formalna strona przedstawionej rozprawy doktorskiej nie budzi wątpliwości.

Ocena merytoryczna rozprawy

1. Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy

Stale zwiększający się niedobór wody na ziemi oraz emisja gazów cieplarnianych to dwa zjawiska znajdujące się w potwierdzonym naukowo związku przyczynowo-skutkowym. W centrum tego związku znajduje się produkcja zwierzęca, a w szczególności jej część oparta na chowie i hodowli przeżuwaczy. O ile aspekt emisji gazów przez przeżuwacze, a w szczególności ograniczenia metanogenezy w żwaczu znajduje coraz więcej miejsca w badaniach naukowych prowadzonych w Europie, a także w Polsce, o tyle druga część problemu wydaje się mniej dostrzegana przez badaczy naszej strefy klimatycznej. Natomiast produkcja pasz objętościowych w warunkach niedoborów opadów i obniżenia poziomu wód gruntowych jest problematyką w polskich badaniach pomijaną.

Ostatnie 30-lecie to dynamiczny rozwój i ogromny postęp w hodowli bydła i produkcji mleka w Polsce. Zmiany dotyczą przede wszystkim wzrostu potencjału genetycznego i wydajności oraz potrzeb pokarmowych krów mlecznych. Żywnienie opiera się na stałym wzroście udziału w dawkach krów pasz treściwych oraz dodatków paszowych przy jednoczesnym rosnącym udziale kiszonki z kukurydzy. Wynika to ze stałego wzrostu plonowania oraz poprawy wartości pokarmowej tego plonu objawiającego się przede wszystkim wzrostem zawartości skrobi. Jednak postęp genetyczny dotyczący budowy systemu korzeniowego oraz zużycia wody do produkcji biomasy kukurydzy okazuje się wciąż niewystarczający i czyni ją zawodną w latach suchych i bardzo suchych. Istnieją więc przesłanki do zwrócenia większej uwagi na gatunki roślin naturalnie przystosowanych do suszy wysoko i regularnie plonujących w takich warunkach oraz dających plon dobrej wartości pokarmowej. Do nielicznych roślin pastewnych spełniających takie wymagania należy sorgo.

Mimo obserwowanego postępu w produkcji zwierzęcej, technologia konserwacji pasz objętościowych oraz jakość uzyskiwanych pasz konserwowanych to obszar najbardziej

zaniebany w polskich gospodarstwach specjalizujących się w produkcji mleka i żywca wołowego. Z tego też tytułu wybór tematyki pracy doktorskiej uważam za wysoce zasadny.

We *Wstępie* pracy Autorka uzasadnia celowość podjętych badań stwierdzając, że kiszonki są czynnikiem limitującym produkcję mleka i status zdrowotny krów oraz, że jednym z kluczowych czynników wpływających na poprawę efektów zakiszania jest stosowanie dodatków dających możliwość sterowania fermentacją. Fermentacja jest procesem złożonym, polegającym na interakcji wielu grup drobnoustrojów tj. bakterii fermentacji mlekowej, octowej, masłowej, bakterii gnilnych oraz pleśni i drożdży. Dlatego konieczne staje się optymalne sterowanie procesem fermentacji przy pomocy dodatków biologicznych lub chemicznych.

Przegląd piśmiennictwa oceniam jako kompletny pod względem zakresu analizowanych zagadnień i merytorycznie spójny, umożliwiający trafny wybór kierunku, zakresu i metod badań. Doktorantka daje szeroki zakres informacji na temat typów użytkowych sorgo, ich charakterystyki botanicznej i agrotechnicznej, zastosowania w różnych gałęziach przemysłu. Dokładnie przedstawia dotychczasowe wyniki prac nad zastosowaniem sorgo w żywieniu zwierząt przeżuwających, charakteryzuje wartość pokarmową zielonki i kiszonki tj. zawarte czynniki antyżywniowe, jakość białka oraz skład frakcji węglowodanowych. Konfrontuje sorgo cukrowe i kukurydzę pod względem wielkości i jakości plonu uzyskiwanego w warunkach polskich oraz ich reakcje na stres wodny. Ponadto wykazuje także dużą znajomość problemów związanych z biochemią i mikrobiologią przemian żwaczowych. Na podkreślenie zasługuje jasne przedstawienie mechanizmów i uwarunkowań metanogenezy żwaczowej.

W rozdziale *Produkcja kiszonki i rodzaje dodatków kiszonkarskich* Autorka bardzo szczegółowo przedstawia fazy procesu zakiszania oraz charakterystykę grup dodatków. Jednak pewien niedosyt w tym miejscu pozostawia brak szczegółowej charakterystyki metabolizmu *Lactobacillus buchnerii* (Holzer i in. 2003), który wyróżnia tę pałeczkę wśród innych bakterii heterofermentacyjnych, przedstawienia tego zagadnienia oczekuję podczas obrony. Zbyt mało informacji zawarto także na temat wytlóków zastosowanych w części doświadczalnej pracy.

Uwagi szczegółowe:

Dyskusji wymaga stwierdzenie ze strony 30 wers 23: (...) przeżuwacze wykazują większą odporność na toksyny (...) czy nie należy użyć w tym miejscu pojęcia „oporność” rezerwując poprzednie dla odpowiedzi immunologicznej.

Zbyt uogólnieniem wydaje się stwierdzenie ze strony 30 wers 27, że „Kiszonki powstałe przy użyciu dodatków kiszonkarskich charakteryzuje lepsza stabilność tlenowa (...)”, ponieważ są takie dodatki których zastosowanie daje skutek odwrotny.

Tym bardziej, że na stronie 32 wers 12-16 Doktorantka podaje: „(...) dodatek preparatów chemicznych zawierających kwasy organiczne może powodować intensywniejszy wzrost grzybów lub wzmożony wzrost grzybów i wytwarzanie mikotoksyn, jako reakcję pleśni na stres środowiskowy”.

Odpowiedź może ułatwić informacja, że dodatki mikrobiologiczne są najczęściej połączeniem szczepów o różnym spektrum działania, podobnie jak dodatki chemiczne są mieszaninami kwasów karboksylowych działających w sposób niespecyficzny przez zakwaszenie środowiska oraz w sposób specyficzny, zróżnicowany wobec poszczególnych gatunków mikroflory bakteryjnej i grzybowej obecnej w kiszonkach.

Poprawy wymagają także niefortunne sformułowania: str. 38 wersy 24-26, oraz na str. 39 wersy 15-16.

2. Zdefiniowanie hipotez/celów badawczych

W rozdziale *Hipoteza i cel pracy* Doktorantka wyczerpująco przedstawiła cel i zakres projektowanych badań. Sformułowała hipotezę badawczą, uznając, że „Dodatek do zakiszanej biomasy *Sucrosorgo* 506 oraz do zakiszanych wytlóków *Sucrosorgo* 506 *Lactobacillus buchnerii* ma pozytywny wpływ na skład chemiczny, jakość i stabilność tlenową kiszonek oraz na profil fermentacji oraz proces biometanacji w żwaczu”.

Hipotezę badawczą Doktorantka uzupełniła celem głównym oraz celami szczegółowymi w brzmieniu odpowiadającym postawionym hipotezom.

Według porządku zawartego w celach szczegółowych, Autorka konsekwentnie dokonała przeglądu piśmiennictwa, przedstawiła wyniki oraz dyskusję, co ułatwia odbiór i analizę całej pracy.

3. Zakres i metody badań

Część metodyczna badań zawarta jest w rozdziałach *Material i metody* w załączonych publikacjach. Należyście prezentuje najważniejsze elementy badań. Układ badań jest jasno przedstawiony.

Testy skuteczności stosowanego dodatku oraz związane z nimi naukowe cele realizowano w warunkach laboratoryjnych. Uważam, że wybór takiego postępowania dał

pełną kontrolę nad warunkami i zagwarantował większą precyzję badań. Szereg prac porównawczych z dziedziny kiszonkarstwa wskazuje na znaczne różnice między wynikami uzyskiwanymi warunkach laboratoryjnych i produkcyjnych.

Ponadto jako bardzo ciekawy element poznawczy pracy oceniam inokulację wyłącznie *L. buchnerii* i ocenę skuteczności jego w zastosowaniu jednogatunkowym. Wysoko oceniam przyjęty zakres oceny skuteczności dodatku kiszonkarskiego, gdzie poza podstawowym składem chemicznym i profilem fermentacji kiszonek Autorka dokonała oceny składu frakcji węglowodanowych, podstawowych frakcji białkowych, a także składu aminokwasowego białka. Pewien niedosyt może budzić brak analiz mikrobiologicznych, szczególnie dotyczących liczebności drożdży i pleśni, aczkolwiek ocena stabilności tlenowej kiszonek daje dokładny obraz ich skuteczności. Wysoko oceniam poszerzenie oceny skuteczności dodatku *L. buchneri* do zakisznaych materiałów z Sucrosorgo 506 o metody *in vitro* rozkładalność żwaczową i strawność jelitową, a w szczególności o wskaźniki metanogenezy żwaczowej.

Należy także podkreślić, że realizacja części analitycznej pracy wymagała bardzo dużego zaangażowania czasowego i organizacyjnego Doktorantki.

Przedstawiona charakterystyka materiału badawczego oraz zastosowane metody dotyczące pobierania prób oraz wykonania analiz składu chemicznego i oceny jakości fermentacji nie budzą wątpliwości i można je uznać za adekwatne do celów prezentowanych badań. Oznaczone zostały wyłącznie składniki ściśle związane z zamierzonymi celami badawczymi. Tak staranne przygotowanie materiału badawczego dało możliwość zastosowania skutecznego modelu statystycznego do analizy ocenianych cech.

Uwagi szczegółowe:

- obok skali Fliega-Zimmera należałoby równolegle zastosować skalę DLG, co prawdopodobnie zwiększyłoby zbieżność ocen ze stabilnością. Skala Fliega obniża notę za zwiększoną zawartość kwasu octowego, co w przypadku inokulacji *L. buchneri* jest efektem zamierzonym.

4. Wyniki badań i dyskusja

Rozdział *Wyniki* został przedstawiony w ramach załączonych publikacji, uzupełniony tabelami i wykresami nie publikowanymi w pracach. Tabele i wykresy uzupełniające zawierają istotne dane na temat składu chemicznego zielonki i kiszonki z sucrosorgo,

produktów fermentacji, profilu aminokwasowego białka. Autorka krótko i logicznie je opisała. Natomiast obszerna dyskusja połączyła problematykę zawartą w obu publikacjach oraz materiał niepublikowany. Zarówno wyniki i dyskusja potwierdzają wartość poznawczą zrealizowanych badań. Domniemam, że trudny do interpretacji dla Doktorantki okazał się rozdział *Dyskusja*, gdzie zetknęła się z szeregiem nietypowych zmian składu, aczkolwiek często statystycznie nieistotnych. Autorka szczegółowo i skrupulatnie odniosła się do zmian, każdego ze składników szeroko dyskutując uzyskane wyniki z danymi piśmiennictwem. - Może pewien niedosyt pozostawia brak w dyskusji odniesień do kiszonek z kukurydzy, czyli rośliny, której sorgo ma być ewentualnym substytutem w dawkach pokarmowych.

Uwagi szczegółowe do rozdziału *Wyniki* oraz rozdziału *Dyskusja*:

- suma lotnych kwasów w tabeli 4, publikacja 1, zawiera także zawartość kwasu mlekowego, który nie jest kwasem lotnym,

- wykres 1 tytuł profil aminokwasowy Sucrosorgo 506 nie precyzuje czy dotyczy białka zielonki czy kiszonki,

- tytuł tabela 4,

- kontrowersyjne wydają się być stwierdzenia ze stron 60-61, cytuję: „W doświadczeniu D2 dodatek inokulantu bakteryjnego wpłynął na wzrost zawartości popiołu surowego, związków bezazotowych wyciągowych oraz węglowodanów strukturalnych w suchej masie”, w tym miejscu wypada mi nadmienić, że wzrost zawartości popiołu surowego i węglowodanów strukturalnych podczas zakiszania jest głównie skutkiem ubytku węglowodanów rozpuszczalnych zużytych. Nie należy także wzrostu zawartości popiołu łączyć z wyciekaniem soków, ponieważ w jego składzie oprócz związków organicznych są także składniki mineralne w nieoznaczonej proporcji. Ograniczenie wycieku soków przez dodatek kiszonkarski jest możliwe jeśli jest on absorbentem, inokulanty takich właściwości nie posiadają. Ograniczenie strat suchej masy poprzez inokulant może się odbywać przede wszystkim drogą zmniejszenia zużycia cukrów rozpuszczalnych, dzięki zwiększeniu efektywności fermentacji mlekowej przez wprowadzone bakterie, w takim przypadku mamy do czynienia ze zmniejszeniem zawartości popiołu. Autorka zależności te potwierdza na str. 62, cyt.: „Niższe pH w kiszonce S1 niż S0 może wynikać z lepszego wykorzystania WSC przez *Lactobacillus buchneri* (...).

- za bardzo ciekawy uważam fragment dyskusji na temat degradacji węglowodanów ściany komórkowej przez enzymy *L. Buchnerii*, jednak zdanie str. 62 twierdzące, że: „Wpływ esterazy kwasu ferulowego na strawność suchej masy kiszonki został potwierdzony

w doświadczeniu D1 nie jest do końca uprawnione, ponieważ Autorka nie oznaczała aktywności tego enzymu w kiszoncek w doświadczeniu D1,

- szerokie i wnikliwe potraktowanie w pracy przemian białkowych w roślinie traktowanej jako źródło energii jest wysoce uzasadnione, ponieważ zawierając 13 % białka ogólnego w suchej masie może ona stanowić główne źródło związków azotowych. Ta część dyskusji, poświęcona przemianom białkowych i aminokwasowych została przeprowadzona wzorowo,

- wyjaśnienie niskiego pH kiszonek na stronie 62 ułatwiłaby bardzo dyskusja na temat pojemności buforowej sorgo, która została przecież oznaczona,

- str. 67 wers 5 sformułowanie „właściwości grzybobójcze *L. buchneri*” należy zastąpić na grzybostatyczne,

- przydatne w dyskusji i pomocne w interpretacji byłoby porównanie obu zakiszanych surowców, w tym miejscu Autorka pisze, że „większość związków rozpuszczalnych jest ekstrahowana podczas wyciskania soku z biomasy roślinnej (...)”, nasuwa się pytanie dlaczego zawartość WSC w zielonce i wyłokach różniła się nieznacznie.

Podsumowując należy stwierdzić, że przeprowadzona przez Panią mgr inż. Martę Wilk dyskusja jest dowodem bardzo dobrej orientacji w piśmiennictwie oraz wnikliwej analizy wyników własnych oraz innych autorów. Podkreślić należy, że dyskusja została przeprowadzona w sposób jasny i zrozumiały.

5. Podsumowanie wyników badań

Formułowane w tym rozdziale stwierdzenia są w większości umiarkowane i ostrożne. Tak podsumowane wyniki potwierdzają, że zrealizowano cele szczegółowe pracy pogłębiając wiedzę w zakresie analizowanych zagadnień. Przede wszystkim Doktorantka udziela odpowiedzi na główny cel pracy czyli ocenę skuteczności dodatku *L. buchnerii* w zakiszaniu biomasy sorgo oraz fermentacji żwaczowej kiszonek. Niedosyt pozostawia brak konkluzji na temat wykorzystania *L. buchnerii*. *Pojawia się natomiast ocena sorgo jako rośliny pastewnej, jednak taka ocena nie była stawiana w celu pracy oraz analizowana w dyskusji.*

Uwagi:

Użycie pojęcia „strawność rzeczywista” kiszonki jest chyba nieadekwatne do sposobu jej określenia, raczej należałoby użyć strawność całkowita lub do końca jelita.

Ocena końcowa

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Wilk pt.: "*Wpływ inokulantu *Lactobacillus buchneri* na wartość pokarmowa kiszzonek z *Sorghum saccharum* (L.) Moench oraz procesy przemian żwaczowych*" dostarcza aktualnej i realnej wiedzy na temat przemian biochemicznych podczas zakiszania biomasy sorgo cukrowego. Dokonuje oceny skuteczności dodatku *L. buchnerii* w sferze jakości fermentacji i proteolizy, a także rozkładalności żwaczowej i strawności *in vitro* oraz metanogenezy w żwaczu. Jest podsumowaniem obszernych studiów eksperymentalnych, podporządkowanych ważnym celom poznawczym i praktycznym. W pracy wykorzystano właściwe, metody badawcze, pozwalające na przeprowadzenie na szeroką skalę badań i uzyskanie wiarygodnych wyników. Szerokie i kompleksowe wykorzystanie metod *in vitro* można uznać jako jej walor w świetle aktualnych trendów dotyczących wykorzystania zwierząt doświadczalnych. Zamieszczone w tekście recenzji uwagi nie umniejszają wartości pracy, ale stanowią element naukowej dyskusji w ramach podjętych problemów badawczych.

Uwzględniając wartość merytoryczną ocenianej pracy uważam, że stanowi ona osiągnięcie naukowe spełniające wymagania stawiane pracom naukowym zarówno w zakresie dziedziny i dyscypliny, w której wszczęto przewód doktorski, jak również dyscypliny i dziedziny wg nowej kwalifikacji, co upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Dyscypliny zootechniki i rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosku o dopuszczenie mgr inż. Martyny Wilk do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Olsztyn, 07.02. 2022 r.

