Politechnika Łódzka
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Łódź, 22 lipca, 2026 r.

dr hab. inż. Justyna Szulc, prof. PŁ
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ kultur probiotycznych na wybrane wskaźniki statusu zdrowotnego oraz wyniki produkcyjne brojlera kurzego”

wykonanej przez: lek. wet. Natalii Weroniki Gruchały

w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

pod kierunkiem: dr. hab. Łukasza Zielonki, prof. UWM

Podstawa wykonania recenzji

Recenzję sporządzono na podstawie Uchwały nr 15/2026 Rady Naukowej dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w sprawie wyznaczenia recenzentów w postępowaniu o nadanie stopnia doktora lek. wet. Natalii Weronice Gruchale w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria, przekazanej pismem Przewodniczącego Rady Naukowej, prof. dr. hab. Tomasza Maślanki, z dnia 15 maja 2026 r.

Recenzję opracowano zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust. 1–4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm., w tym Dz.U. z 2025 r. poz. 1162).

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria. Praca liczy 78 stron i ma układ typowy dla rozpraw eksperymentalnych. Obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim oraz pięć rozdziałów głównych, w tym 15-stronicowy wstęp (rozdział 1), 13-stronicowy opis materiałów i metod badawczych (rozdział 2), 20-stronicową prezentację wyników (rozdział 3), 8-stronicową dyskusję (rozdział 4) oraz 2-stronicowe podsumowanie i wnioski (rozdział 5). Pracę kończą bibliografia oraz spisy rycin i tabel. Rozprawa zawiera 6 tabel oraz 8 rycin (w tym 4 tabele w części metodycznej i 2 tabele w części wynikowej), które dokumentują zastosowaną metodykę badań oraz ilustrują uzyskane wyniki.

Konstrukcja pracy jest przejrzysta i odpowiada standardom przyjętym dla rozpraw doktorskich. Jest również zgodna z wytycznymi określonymi w załączniku nr 1 do Uchwały nr 362 Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 czerwca 2023 r., regulującej postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

Pewne zastrzeżenia budzi natomiast sposób formułowania części tytułów podrozdziałów. W kilku przypadkach są one nadmiernie rozbudowane (np. podrozdział 1.2. *„Zdrowie jelit" u brojlerów: definicje, biomarkery i pomiar (VH, CD, VH:CD)* czy 4.3. *„Mikrobiom (alfa-różnorodność, skład taksonomiczny, korelacja z morfologią i produkcją)"*). Ponadto nie zachowano pełnej konsekwencji w sposobie ich konstruowania, czego przykładem są podrozdziały: *„Wyniki produkcyjne"*, *„Morfometria – dwunastnica"*, *„Morfometria – jelito czcze"*, *„Morfometria – jelito biodrowe"* oraz *„Wyniki analizy mikrobiomu jelitowego"*. Widoczne są również rozbieżności pomiędzy spisem treści a treścią rozprawy. Przykładowo podrozdział 1.5. w spisie treści figuruje jako *„Metody i interpretacja wskaźników mikrobiomu"*, natomiast w tekście został rozszerzony do postaci *„Metody i interpretacja wskaźników mikrobiomu (niefachowy skrót dla czytelnika)"*. Zachowanie jednolitego sposobu formułowania tytułów podrozdziałów oraz ich pełnej zgodności ze spisem treści należy uznać za dobrą praktykę edytorską, której Autorka nie przestrzegała w pełni konsekwentnie.

Ponadto Autorka posługuje się licznymi skrótami (m.in. AGP, QPS, EFSA, VH, CD, VH:CD, FCR, SCFA, ASV, OTU, AMR, LAB, NGS, PCU), jednak w pracy zabrakło ich zbiorczego wykazu, który ułatwiłby czytelnikowi orientację w stosowanej terminologii. Nie wszystkie skróty zostały również konsekwentnie objaśnione przy pierwszym użyciu w tekście (np. FCR i VH:CD w streszczeniu na stronie 5, OECD–FAO, CWE oraz USA

FAS we wstępie na stronie 9). Autorka nie zawsze zachowywała także konsekwencję w zapisie nazw łacińskich kursywą. Uchybienia tego rodzaju występują m.in. na stronie 6 (słowa kluczowe: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium*), stronie 16 (*Salmonella*, *Campylobacter*) oraz wielokrotnie na stronach 28 i 57 (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis*).

Należy jednak podkreślić, że wskazane uchybienia mają wyłącznie charakter redakcyjny i nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej rozprawy.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje 119 pozycji literaturowych zestawionych na dziewięciu stronach (rozdział „*Piśmiennictwo*", s. 67–75), z czego ponad 99% stanowią publikacje anglojęzyczne. Bibliografia opiera się przede wszystkim na artykułach opublikowanych w renomowanych, indeksowanych czasopismach naukowych, w tym uwzględnianych w bazie Web of Science (m.in. *Poultry Science*, *Frontiers in Veterinary Science*, *Animals*, *Scientific Reports*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Nature Communications*, *Applied and Environmental Microbiology*, *Journal of Animal Science and Biotechnology*). Uwzględniono również publikacje w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna*, raporty instytucji międzynarodowych, takich jak Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), Europejska Agencja Leków (EMA) wraz z programem *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC), Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) oraz akty prawne odnoszące się do problematyki poruszanej w rozprawie.

Na podkreślenie zasługuje aktualność wykorzystanego piśmiennictwa – ponad 76% cytowanych publikacji pochodzi z lat 2014–2025. Starsze pozycje obejmują przede wszystkim prace o charakterze klasycznym (m.in. Shannon, Simpson, Bray-Curtis, Chao, Havenstein i in.), których wykorzystanie jest w pełni uzasadnione ich fundamentalnym znaczeniem dla rozwoju metod analizy różnorodności mikrobiologicznej oraz badań nad produkcyjnością brojlerów. Dobór literatury świadczy o bardzo dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy oraz umiejętności osadzenia prowadzonych badań zarówno we współczesnym, jak i historycznym kontekście naukowym.

Analiza wykazu piśmiennictwa pozwoliła jednak dostrzec kilka drobnych niedociągnięć redakcyjnych. Bibliografia nie została przygotowana całkowicie jednolicie – w części pozycji zastosowano pełny wykaz autorów, natomiast w innych zapis „et al.". Widoczne są również różnice w kompletności danych bibliograficznych (m.in. numery

DOI, zakres stron czy informacje wydawnicze), a także pojedyncze rozbieżności pomiędzy cytowaniami zamieszczonymi w tekście i wykazem piśmiennictwa. Uwagi te mają wyłącznie charakter formalny i pozostają bez wpływu na wysoką ocenę przygotowania teoretycznego Doktorantki.

Wprowadzenie do treści rozprawy

Produkcja drobiu należy do najszybciej rozwijających się gałęzi światowego rolnictwa i stanowi jedno z najważniejszych źródeł białka zwierzęcego. Intensyfikacja produkcji brojlerów kurzych wiąże się jednak z koniecznością utrzymania wysokiego statusu zdrowotnego stad oraz uzyskiwania optymalnych wyników produkcyjnych przy jednoczesnym ograniczaniu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu (AGP). Wprowadzenie zakazu ich stosowania w Unii Europejskiej oraz narastający problem oporności drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe przyczyniły się do intensywnego rozwoju badań nad alternatywnymi strategiami żywieniowymi, ukierunkowanymi na poprawę zdrowia przewodu pokarmowego, efektywności wykorzystania paszy oraz bezpieczeństwa produkcji drobiarskiej.

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie badaczy budzą probiotyki, uznawane za jedną z najbardziej perspektywicznych metod wspomagania zdrowia jelit i poprawy wyników produkcyjnych brojlerów. Ich działanie wykracza poza prostą modulację składu mikrobioty przewodu pokarmowego i obejmuje również wpływ na integralność bariery jelitowej, odpowiedź immunologiczną gospodarza oraz efektywność wykorzystania składników pokarmowych. Coraz liczniejsze doniesienia naukowe wskazują ponadto na ścisłe zależności pomiędzy składem mikrobiomu jelitowego, morfologią jelita cienkiego i wynikami produkcyjnymi ptaków, choć mechanizmy leżące u podstaw tych zależności nadal nie zostały w pełni wyjaśnione.

W tym kontekście szczególnego znaczenia nabiera poszukiwanie nowych szczepów probiotycznych oraz optymalizacja sposobu ich stosowania, umożliwiające jednoczesną poprawę zdrowotności i produkcyjności drobiu oraz ograniczenie stosowania antybiotyków zgodnie z założeniami koncepcji One Health i aktualną polityką Unii Europejskiej w zakresie przeciwdziałania narastaniu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Przedłożona do recenzji rozprawa **podejmuje aktualną i ważną problematykę dotyczącą wpływu preparatu probiotycznego zawierającego szczepy**

Lactiplantibacillus plantarum **ATM14 oraz** ***Bifidobacterium animalis*** **ATM30 na wyniki produkcyjne brojlerów kurzych, histomorfologię jelita cienkiego oraz strukturę mikrobiomu przewodu pokarmowego**. Badania przeprowadzono na 360 brojlerach linii Cobb-500, wykorzystując kompleksowy zestaw metod obejmujący ocenę parametrów produkcyjnych, analizę histomorfometryczną jelita cienkiego oraz charakterystykę mikrobiomu z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji. Tak szerokie ujęcie problematyki badawczej wpisuje się w aktualne światowe trendy badań nad żywieniem drobiu i poszukiwaniem skutecznych alternatyw dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu, a jednocześnie uzasadnia podjęcie przez Doktorantkę przedstawionej tematyki badawczej.

Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny, łącząc zagadnienia z zakresu żywienia zwierząt, mikrobiologii, biologii molekularnej, patologii oraz weterynarii produkcyjnej. Tak kompleksowe ujęcie problemu badawczego należy uznać za jedną z istotnych zalet przedstawionej pracy, zwiększającą jej wartość poznawczą oraz aplikacyjną.

Ocena merytoryczna pracy

Recenzowana rozprawa doktorska rozpoczyna się rozdziałem „Wstęp", który stanowi merytoryczne uzasadnienie podjęcia badań oraz dobrze wprowadza czytelnika w problematykę pracy zatytułowanej *„Wpływ kultur probiotycznych na wybrane wskaźniki statusu zdrowotnego oraz wyniki produkcyjne brojlera kurzego"*. Część teoretyczna została opracowana w sposób logiczny i uporządkowany, prowadząc czytelnika od ogólnej charakterystyki współczesnej produkcji drobiarskiej, poprzez zagadnienia dotyczące zdrowia przewodu pokarmowego, aż do omówienia możliwości wykorzystania probiotyków jako alternatywy dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu.

Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący fizjologii przewodu pokarmowego brojlerów, omawiając współczesne definicje zdrowia jelit oraz znaczenie integralności bariery jelitowej dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. W przejrzysty sposób opisuje budowę i rozwój jelita cienkiego, wyjaśnia biologiczne znaczenie podstawowych parametrów histomorfometrycznych, takich jak wysokość kosmków jelitowych (VH), głębokość krypt (CD) oraz stosunek VH:CD, a także wskazuje czynniki środowiskowe i żywieniowe wpływające na ich wartość. Szczególnie wartościowe jest przedstawienie zależności pomiędzy architekturą jelita, składem mikrobiomu przewodu pokarmowego i

wynikami produkcyjnymi drobiu, co stanowi dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej rozprawy.

Istotną część przeglądu literatury stanowi omówienie probiotyków stosowanych w żywieniu drobiu. Doktorantka przedstawia współczesne definicje probiotyków, mechanizmy ich działania, zasady kwalifikacji szczepów do statusu Qualified Presumption of Safety (QPS) oraz wymagania bezpieczeństwa określone przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Szczegółowo charakteryzuje właściwości szczepów *Lactiplantibacillus plantarum* oraz *Bifidobacterium animalis*, opisując ich wpływ na skład mikrobiomu, integralność bariery jelitowej, odpowiedź immunologiczną oraz ograniczanie kolonizacji przewodu pokarmowego przez drobnoustroje patogenne. Uzupełnieniem tej części są rozważania dotyczące dróg podawania probiotyków, zależności dawka–efekt oraz czynników determinujących skuteczność suplementacji. Kolejne podrozdziały poświęcono regulacjom prawnym dotyczącym stosowania probiotyków jako dodatków paszowych w Unii Europejskiej oraz założeniom koncepcji One Health, podkreślając znaczenie ograniczania stosowania antybiotyków w produkcji zwierzęcej jako jednego z najważniejszych wyzwań współczesnej weterynarii. Wprowadzenie zamyka syntetyczne omówienie metod analizy mikrobiomu jelitowego oraz interpretacji wskaźników różnorodności biologicznej.

Część teoretyczna została przygotowana bardzo starannie i świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu oraz umiejętności syntetycznego przedstawienia złożonych zagadnień biologicznych. Na szczególne podkreślenie zasługuje wykorzystanie licznych publikacji z ostatnich kilku lat, dzięki czemu przedstawiony przegląd literatury odzwierciedla aktualny stan wiedzy. Obok klasycznych prac dotyczących fizjologii jelit i działania probiotyków uwzględniono również najnowsze opracowania odnoszące się do mikrobiomu, koncepcji One Health oraz obowiązujących regulacji prawnych. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz umiejętności krytycznego śledzenia rozwoju reprezentowanej dyscypliny.

Na pozytywną ocenę zasługuje również sposób przedstawienia zagadnień związanych z histomorfometrią jelit i mikrobiomem przewodu pokarmowego. Autorka nie ogranicza się do zdefiniowania poszczególnych parametrów, lecz wyjaśnia ich znaczenie biologiczne oraz wzajemne zależności z funkcjonowaniem przewodu pokarmowego, efektywnością wykorzystania paszy i zdrowotnością brojlerów. Szczególnie wartościowe jest omówienie procesów zachodzących we wczesnym okresie życia piskląt oraz

przedstawienie współczesnych metod analizy mikrobiomu i interpretacji wskaźników alfa- i beta-różnorodności, które stanowią jeden z głównych elementów badań własnych.

Pomimo licznych zalet część teoretyczna nie jest jednak całkowicie pozbawiona mankamentów. W wielu miejscach Autorka bardzo szczegółowo referuje wyniki poszczególnych badań, natomiast rzadziej podejmuje próbę ich krytycznej analizy. W efekcie przegląd literatury miejscami przypomina kompilację aktualnych doniesień naukowych, podczas gdy od rozprawy doktorskiej oczekuje się również wskazania rozbieżności pomiędzy wynikami różnych autorów oraz jednoznacznego zdefiniowania problemów pozostających nadal nierozwiązanymi. Zabrakło także odrębnego podrozdziału wyraźnie identyfikującego lukę badawczą, stanowiącą bezpośrednią przesłankę do podjęcia badań własnych.

Należy jednak podkreślić, że choć wpływ probiotyków na zdrowie i produkcyjność drobiu był przedmiotem licznych wcześniejszych badań, przedstawiona rozprawa wnosi do tej problematyki nowe elementy. Oryginalność badań nie wynika z samego zastosowania probiotyków, lecz z oceny działania ściśle określonej kompozycji szczepów *Lactiplantibacillus plantarum* ATM14 oraz *Bifidobacterium animalis* ATM30 oraz kompleksowego powiązania wyników produkcyjnych z analizą histomorfometryczną i charakterystyką mikrobiomu jelitowego. Połączenie klasycznych metod zootechnicznych z nowoczesnymi narzędziami biologii molekularnej stanowi istotny walor naukowy rozprawy, choć wyraźniejsze zaakcentowanie tego aspektu we wprowadzeniu dodatkowo wzmocniłoby argumentację uzasadniającą podjęcie badań.

Nie zmienia to wysokiej oceny tej części rozprawy. **Wstęp został opracowany starannie, opiera się na aktualnym piśmiennictwie i w przekonujący sposób uzasadnia podjęcie przedstawionej tematyki badawczej, potwierdzając dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w dyscyplinie weterynari**a.

Cel rozprawy został sformułowany jasno i precyzyjnie, po uprzednim przedstawieniu hipotezy roboczej. Doktorantka postawiła sobie za zadanie ocenę wpływu preparatu probiotycznego zawierającego szczepy *Lactiplantibacillus plantarum* ATM14 oraz *Bifidobacterium animalis* ATM30 na wybrane wskaźniki zdrowotne i produkcyjne brojlerów kurzych, ze szczególnym uwzględnieniem zmian histomorfometrycznych oraz składu mikrobiomu jelitowego. Cel ten rozwinięto poprzez sformułowanie czterech hipotez badawczych odnoszących się do wpływu probiotyków

na parametry produkcyjne, architekturę błony śluzowej jelita cienkiego, różnorodność i strukturę mikrobiomu oraz zależność dawka–efekt.

Hipotezy są logicznie powiązane z celem pracy i mają charakter weryfikowalny. Na pozytywną ocenę zasługuje fakt, że obejmują zarówno aspekty praktyczne, jak i mechanistyczne. Pewne zastrzeżenia budzi natomiast hipoteza zakładająca zwiększenie alfa-różnorodności mikrobiomu jako jednoznacznego przejawu poprawy zdrowia jelit. W świetle współczesnej literatury zależność ta nie ma charakteru uniwersalnego i zależy od gatunku zwierząt, wieku oraz funkcjonalnego składu mikrobioty. Trafniejsze byłoby przyjęcie założenia, że zastosowanie probiotyku prowadzi do modulacji struktury mikrobiomu, której efektem mogą być korzystne zmiany biologiczne. Uwagi tej nie należy jednak traktować jako błędu koncepcyjnego, lecz raczej jako sugestię ostrożniejszego formułowania hipotez badawczych.

Drobnym mankamentem edytorskim jest również brak wyodrębnienia celu, hipotez i zakresu pracy w osobnym podrozdziale. Obecnie informacje te zamieszczono na końcu podrozdziału *„Metody i interpretacja wskaźników mikrobiomu (niefachowy skrót dla czytelnika)”*, podczas gdy ich wydzielenie poprawiłoby przejrzystość rozprawy, ułatwiło odnalezienie tych kluczowych elementów w spisie treści oraz lepiej podkreśliło ich znaczenie dla konstrukcji całej dysertacji.

Rozdział „*Materiały i metody*” zawiera przejrzysty i logicznie uporządkowany opis przeprowadzonych przez Doktorantkę badań, umożliwiający odtworzenie ich przebiegu. Autorka szczegółowo przedstawiła organizację eksperymentu, warunki utrzymania zwierząt, sposób podawania preparatu probiotycznego oraz procedury wykonania poszczególnych analiz laboratoryjnych.

Istotnym atutem części metodycznej jest kompleksowość zastosowanych metod badawczych. Autorka połączyła klasyczne wskaźniki produkcyjne z oceną histomorfometryczną oraz analizą mikrobiomu z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej. Tak szeroki zakres analiz pozwala na wieloaspektową ocenę działania badanego preparatu probiotycznego i stanowi niewątpliwy walor rozprawy.

Na pozytywną ocenę zasługuje również liczebność materiału badawczego. Przeprowadzenie doświadczenia na 360 brojlerach linii Cobb-500, podzielonych na trzy grupy doświadczalne z dziesięcioma replikami, zapewnia odpowiednią podstawę do uzyskania wiarygodnych wyników. Równie istotne jest zachowanie jednakowych warunków utrzymania wszystkich grup, co ogranicza wpływ czynników zakłócających.

Warto również podkreślić staranność przygotowania preparatu probiotycznego oraz kontrolę liczebności żywych komórek bakterii. Autorka przedstawiła nie tylko skład preparatu, lecz także procedury związane z jego przygotowaniem, namnażaniem oraz podawaniem zwierzętom. Tego rodzaju informacje są często pomijane w pracach eksperymentalnych, dlatego ich uwzględnienie należy ocenić pozytywnie.

Szczególnym walorem metodycznym rozprawy jest zastosowanie nowoczesnych metod analizy mikrobiomu. Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS), identyfikacji wariantów sekwencji amplikonów (ASV) oraz współczesnych narzędzi bioinformatycznych świadczy o właściwym doborze metod badawczych. Przyjęte podejście jest zgodne z aktualnymi standardami badań mikrobiologicznych i stanowi istotny walor naukowy pracy.

Pomimo wysokiej jakości części metodycznej dostrzegam jednak kilka elementów wymagających doprecyzowania.

Pierwsza uwaga dotyczy charakterystyki zastosowanego preparatu probiotycznego. W opisie metodyki zabrakło informacji, czy preparat miał postać płynną (np. cieczy pohodowlanej, zawiesiny w soli fizjologicznej lub innym medium), czy stałą (np. liofilizatu lub suszu rozpyłowego). Nie podano również, czy zawierał substancje pomocnicze, takie jak stabilizatory lub krioprotektanty, ani jak długo był przechowywany przed przygotowaniem roztworu do pojenia brojlerów.

Kolejna uwaga dotyczy oznaczania stężenia i żywotności bakterii w preparacie (str. 30). Doktorantka podaje, że analizę wykonywano metodą posiewów powierzchniowych, jednak nie sprecyzowano, czy stosowano rozcieńczenia seryjne oraz w jaki sposób zapewniono warunki mikroaerofilne i beztlenowe niezbędne do hodowli szczepów *Lactiplantibacillus* i *Bifidobacterium*.

Metodyka badań mikrobiomu została opisana szczegółowo i obejmuje wszystkie podstawowe etapy analizy – od izolacji DNA, poprzez przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie regionu V3–V4 genu 16S rRNA, aż po analizę bioinformatyczną z wykorzystaniem pakietów DADA2 i QIIME2. Kilka elementów wymaga jednak doprecyzowania. Nie jest jednoznacznie określone, czy analizie poddano materiał pobrany zarówno z jelita czczego, jak i ślepego, ponieważ opis pobierania próbek odnosi się wyłącznie do jelit ślepych. Warto byłoby również podać liczbę analizowanych próbek, bardziej szczegółowo opisać procedurę izolacji DNA oraz parametry kontroli jakości odczytów. Z metodologicznego punktu widzenia bardziej precyzyjne byłoby także

stwierdzenie, że sekwencjonowaniu poddawano amplikony regionu V3–V4 genu 16S rRNA, a nie sam gen. Ponadto zapis, że zastosowana analiza „zapewnia klasyfikację odczytów do poziomu gatunku", jest zbyt kategoryczny, ponieważ w przypadku regionu V3–V4 identyfikacja do poziomu gatunku nie zawsze jest możliwa. Uwagi te mają jednak charakter przede wszystkim metodyczny i redakcyjny i nie podważają wartości przeprowadzonych badań.

Opis zastosowanych analiz statystycznych zamieszczono na stronach 35–36. Zwiększeniu przejrzystości części metodycznej sprzyjałoby jednak wyodrębnienie tego opisu w osobnym podrozdziale.

W opisie warunków utrzymania ptaków Autorka podaje, że temperatura w odchowalni była następnie obniżana „zgodnie z zaleceniami firmy genetycznej". Sformułowanie to jest zbyt ogólne. Dla zapewnienia pełnej powtarzalności doświadczenia należało wskazać producenta wykorzystanej linii brojlerów (np. Cobb-Vantress lub Aviagen) oraz odwołać się do odpowiedniego podręcznika odchowu (*Management Guide*).

Do drobnych uchybień redakcyjnych należy zaliczyć również brak odwołań do tabel 1 i 2 w tekście, brak jednostek w tabeli 1 oraz brak objaśnień zastosowanych oznaczeń, takich jak „b.o." czy numery identyfikacyjne dodatków paszowych.

Przedstawione uwagi mają przede wszystkim charakter doprecyzowujący i redakcyjny, nie wpływają natomiast na zasadniczo wysoką ocenę części metodycznej. **Zastosowane metody są właściwie dobrane do postawionych celów badawczych i świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań eksperymentalnych**.

Rozdział „*Wyniki*" został opracowany w sposób przejrzysty i logiczny. Zachowano właściwą kolejność prezentacji danych, rozpoczynając od parametrów produkcyjnych, następnie przedstawiając wyniki analiz histomorfometrycznych, a kończąc charakterystyką mikrobiomu jelitowego.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują na korzystny wpływ suplementacji probiotycznej, szczególnie w wariancie D1 (z pojedynczą dawką badanego preparatu), na końcową masę ciała brojlerów. Efekt ten był widoczny już od drugiego tygodnia odchowu i utrzymywał się do zakończenia doświadczenia. Jednocześnie nie wykazano istotnych zmian w śmiertelności ptaków ani pobraniu paszy. Wyniki te należy uznać za biologicznie wiarygodne i zgodne z obserwacjami prezentowanymi w licznych publikacjach dotyczących zastosowania probiotyków w żywieniu drobiu.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka nie ograniczyła się do przedstawienia końcowych wartości masy ciała, lecz monitorowała przebieg wzrostu ptaków w kolejnych etapach doświadczenia. Pozwala to lepiej ocenić dynamikę działania badanego preparatu.

Interpretacja wyników dotyczących parametrów produkcyjnych wymaga jednak nieco większej ostrożności. W kilku miejscach rozprawy użyto sformułowań sugerujących ogólną poprawę wyników produkcyjnych, podczas gdy istotne statystycznie zmiany dotyczyły przede wszystkim masy ciała. Parametry takie jak współczynnik wykorzystania paszy (FCR) czy śmiertelność nie uległy równie jednoznacznej poprawie. Bardziej precyzyjne byłoby zatem stwierdzenie, że badany preparat korzystnie wpływał przede wszystkim na tempo wzrostu brojlerów, natomiast jego wpływ na pozostałe wskaźniki produkcyjne nie był istotny statystycznie. Uwagę tę należy traktować przede wszystkim jako wskazanie dotyczące precyzji interpretacji wyników.

Wyniki analiz histomorfometrycznych są wyjątkowo spójne we wszystkich ocenianych odcinkach jelita cienkiego. W grupie otrzymującej dawkę D1 obserwowano zwiększenie wysokości kosmków jelitowych, zmniejszenie głębokości krypt oraz wzrost wartości wskaźnika VH:CD. W grupie otrzymującej wyższą dawkę probiotyku efekt ten był mniej wyraźny, co może wskazywać na istnienie optymalnego zakresu dawkowania badanego preparatu.

Jedyną uwagę interpretacyjną budzi sposób formułowania wniosków dotyczących funkcjonowania jelita. Autorka wielokrotnie stwierdza, że zwiększenie wartości wskaźnika VH:CD świadczy o poprawie zdolności absorpcyjnych jelita. W literaturze przyjmuje się wprawdzie, że parametry te korelują z efektywnością wchłaniania składników pokarmowych, jednak należy pamiętać, że są one jedynie wskaźnikami pośrednimi. W przedstawionym doświadczeniu nie wykonywano badań funkcjonalnych dotyczących przepuszczalności bariery jelitowej, aktywności enzymów trawiennych ani ekspresji transporterów błonowych. Z tego względu bardziej ostrożne byłoby stwierdzenie, że uzyskane zmiany mogą sugerować poprawę funkcji absorpcyjnych przewodu pokarmowego.

Ponadto pewien niedosyt budzi sposób prezentacji wyników badań histomorfometrycznych. Rozdział zawiera wyłącznie zestawienia wartości liczbowych, natomiast zabrakło reprezentatywnych mikrofotografii preparatów histologicznych

poszczególnych odcinków jelita. Zamieszczenie takich ilustracji, najlepiej z zaznaczeniem mierzonych parametrów (VH i CD), pozwoliłoby czytelnikowi na wizualną ocenę obserwowanych zmian oraz stanowiłoby cenne uzupełnienie wyników ilościowych. Nie wpływa to na wartość przeprowadzonych analiz, jednak znacząco zwiększyłoby walory dokumentacyjne i poznawcze rozprawy

Analiza mikrobiomu stanowi jeden z największych walorów naukowych recenzowanej rozprawy. Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji oraz współczesnych narzędzi bioinformatycznych umożliwiło szczegółową charakterystykę zmian zachodzących w mikrobiocie jelitowej brojlerów. Szczególnie wysoko należy ocenić zastosowanie analizy opartej na wariantach sekwencji amplikonów (ASV), która obecnie stanowi rekomendowany standard w badaniach mikrobiologicznych. Pewnego doprecyzowania wymaga natomiast sposób kwalifikowania taksonów do kategorii „other" przedstawionej na rycinie 6. Nie jest jasne, jakie kryterium przyjęto dla określenia „taksony o niskiej obfitości i/lub nieprzypisane na poziomie rodzaju". Warto byłoby wskazać zastosowany próg odcięcia.

Przedstawione wyniki wskazują, że zastosowanie probiotyku wpłynęło na strukturę mikrobiomu oraz różnorodność biologiczną społeczności bakteryjnych. Obserwacje te pozostają zgodne z aktualnym stanem wiedzy dotyczącym mechanizmów działania probiotyków.

W tym miejscu warto jednak zwrócić, że Autorka interpretuje wzrost alfa-różnorodności jako przejaw poprawy zdrowia jelit. Jest to pogląd często spotykany w literaturze dotyczącej drobiu i w dużej mierze uzasadniony. Warto jednak zaznaczyć, że współczesne badania wskazują, iż zależność pomiędzy różnorodnością mikrobiomu a stanem zdrowia gospodarza nie ma charakteru uniwersalnego i zależy od wielu czynników, w tym wieku zwierząt oraz funkcjonalnego składu mikrobioty. Należy również pamiętać, że wyższa alfa-różnorodność nie zawsze oznacza korzystniejszy stan mikrobiomu, gdyż jej znaczenie zależy od stabilności i funkcjonalności całej społeczności drobnoustrojów. Z tego względu bardziej zasadne byłoby ostrożniejsze formułowanie wniosków w tym zakresie.

Za jeden z największych walorów części poświęconej prezentacji wyników należy uznać ich spójność biologiczną. Zmiany obserwowane na poziomie parametrów produkcyjnych pozostają zgodne z wynikami analiz histomorfometrycznych oraz charakterystyką mikrobiomu. Na podkreślenie zasługuje również zgodność uzyskanych

obserwacji z wynikami innych autorów. Świadczy to zarówno o wysokiej jakości przeprowadzonych badań, jak i o dobrze przemyślanej koncepcji eksperymentu.
Niemniej, czuję się w obowiązku zwrócić uwagę na kilka drobnych uchybień edytorskich. W rozdziale „*Wyniki*" zabrakło odwołań do części tabel i rycin, a tabela zamieszczona w sekcji 3.5 nie posiada tytułu ani objaśnień. Ponadto sposób prezentacji wyników nie jest w pełni jednolity – wyłącznie w części dotyczącej analiz metagenomowych pojawiają się odrębne podpunkty „Interpretacja" i „Wnioski ogólne", których brak we wcześniejszych sekcjach. Zwraca uwagę również niekonsekwentne stosowanie określeń „brojlery" i „kury" (m.in. s. 55–56), które nie są pojęciami tożsamymi. Uchybienia te mają jednak charakter wyłącznie redakcyjny i nie wpływają na wysoką ocenę uzyskanych wyników.

Dyskusja

Dyskusja została przygotowana na wysokim poziomie merytorycznym. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością aktualnego piśmiennictwa oraz umiejętnością odniesienia wyników własnych badań do rezultatów uzyskanych przez innych autorów. W większości przypadków trafnie interpretuje zarówno zgodności, jak i rozbieżności pomiędzy poszczególnymi publikacjami, podejmując próbę wyjaśnienia możliwych przyczyn obserwowanych różnic.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że dyskusja nie ogranicza się do prostego zestawienia wyników z danymi literaturowymi. Doktorantka podejmuje próbę wskazania biologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za uzyskane efekty, odnosząc się do roli krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, integralności bariery jelitowej oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej.
Należy jednak podkreślić, że proponowane mechanizmy mają charakter hipotetyczny. W ramach przeprowadzonych badań nie oznaczano stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA), ekspresji białek połączeń ścisłych ani markerów odpowiedzi immunologicznej. Bardziej precyzyjne byłoby zatem podkreślenie, że proponowane mechanizmy stanowią najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie uzyskanych wyników, zgodne z aktualnym stanem wiedzy, jednak nie zostały bezpośrednio zweryfikowane w niniejszym doświadczeniu. Poza tą drobną uwagą **rozdział został przygotowany dojrzale i świadczy o umiejętności krytycznej interpretacji wyników własnych badań**.

Recenzowaną rozprawę zamyka rozdział „*Podsumowanie i wnioski*”, obejmujący podrozdziały „*Cel i zakres pracy*”, „*Najważniejsze obserwacje eksperymentalne*” oraz „*Wnioski*”. Wnioski końcowe pozostają zgodne z przedstawionymi wynikami badań i w zdecydowanej większości wynikają bezpośrednio z uzyskanych obserwacji. Autorka prawidłowo wskazuje, że zastosowanie preparatu probiotycznego, szczególnie w dawce D1, korzystnie wpływało na wzrost brojlerów, architekturę błony śluzowej jelita oraz strukturę mikrobiomu.

Jedyną uwagę stanowi sposób formułowania wniosków dotyczących mechanizmów działania probiotyku. Bardziej zasadne byłoby unikanie sformułowań sugerujących bezpośredni związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy zmianami mikrobiomu a poprawą parametrów produkcyjnych. Przedstawione badania wykazują istnienie spójnych zależności biologicznych, jednak nie pozwalają na jednoznaczne potwierdzenie mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowane efekty. Ponadto zamieszczanie odniesień literaturowych we wnioskach wydaje się zbędne, ponieważ zostały one uwzględnione w rozdziale „*Dyskusja*”. Pomimo tej uwagi uważam, że przedstawione wnioski są poprawne i stanowią logiczne podsumowanie przeprowadzonych badań.

Podsumowując, recenzowaną rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i metodologicznym. **Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością aktualnego stanu wiedzy oraz umiejętnością zaprojektowania i przeprowadzenia wieloaspektowego eksperymentu z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych**. Zgłoszone uwagi nie podważają wartości naukowej rozprawy, lecz mają charakter przede wszystkim doprecyzowujący, interpretacyjny lub redakcyjny. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętne połączenie klasycznych metod zootechnicznych z analizą histomorfometryczną oraz badaniami mikrobiomu, co znacząco zwiększa wartość poznawczą pracy i podkreśla jej interdyscyplinarny charakter.

Jednocześnie chciałabym zwrócić się do Pani lek. wet. Natalii Gruchały z prośbą o ustosunkowanie się do poniższych pytań, które wynikają z zainteresowania badawczego Recenzentki i dotyczą zagadnień szczególnie istotnych z punktu widzenia interpretacji uzyskanych wyników:

1. W przedstawionych badaniach najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu niższej dawki probiotyku (D1), natomiast zwiększenie dawki nie spowodowało dalszej poprawy wyników. Jakie mechanizmy biologiczne mogą odpowiadać za obserwowaną zależność dawka–efekt?
2. W pracy wykazano zmiany w składzie mikrobiomu oraz poprawę architektury jelita cienkiego. Czy na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że zmiany mikrobiomu były bezpośrednią przyczyną zmian histomorfometrycznych? Jakie dodatkowe badania należałoby przeprowadzić, aby wykazać taki związek przyczynowo-skutkowy? Jakie markery mogłyby potwierdzić rzeczywistą poprawę funkcji bariery jelitowej?
3. Jak wyjaśniłaby Pani sytuację, w której poprawie ulega architektura jelita, natomiast nie obserwuje się poprawy współczynnika wykorzystania paszy (FCR)?
4. Dlaczego zdecydowała się Pani na analizę mikrobiomu opartą na wariantach sekwencji amplikonów (ASV), zamiast zastosować klasyczne podejście oparte na jednostkach OTU?
5. W pracy analizowano skład mikrobiomu metodą sekwencjonowania genu 16S rRNA. Jakie są ograniczenia tej metody oraz jakie dodatkowe informacje można byłoby uzyskać, stosując sekwencjonowanie metagenomowe typu shotgun?
6. W jaki sposób skład podstawowej dawki pokarmowej może wpływać na skuteczność działania zastosowanych probiotyków?
7. Jakie były, Pani zdaniem, najważniejsze ograniczenia przeprowadzonego doświadczenia i w jaki sposób zaprojektowałaby Pani kolejne badania rozwijające uzyskane wyniki?
8. Czy uważa Pani, że uzyskane wyniki mogą zostać bezpośrednio przeniesione do warunków ferm komercyjnych? Jakie czynniki mogą ograniczać możliwość praktycznego wdrożenia przedstawionego rozwiązania?

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska lek. wet. Natalii Weroniki Gruchały pt. *„Wpływ kultur probiotycznych na wybrane wskaźniki statusu zdrowotnego oraz wyniki produkcyjne brojlera kurzego”* **stanowi wartościowe opracowanie naukowe o wysokich walorach poznawczych i aplikacyjnych oraz oryginalne rozwiązanie istotnego i aktualnego**

problemu naukowego. Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową, szeroką wiedzą teoretyczną w dyscyplinie weterynaria oraz umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych, obejmujących realizację złożonych doświadczeń eksperymentalnych oraz krytyczną analizę i interpretację uzyskanych wyników. Rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej wykorzystania probiotyków jako alternatywy dla antybiotykowych stymulatorów wzrostu w produkcji drobiarskiej, co ma szczególne znaczenie zgodnie z założeniami koncepcji One Health**.**

W mojej ocenie **przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania merytoryczne i formalne** określone w art. 187 ust. 1–4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jedn.: Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm., w tym Dz.U. z 2025 r. poz. 1162).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie **z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek. wet. Natalii Weroniki Gruchały oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy.**