Prof. dr hab. inż. Zdzisław Zakęś
Zakład Akwakultury
Instytut Rybactwa Śródlądowego
im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie
e-mail: z.zakes@infish.com.pl

Olsztyn, 31 stycznia 2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Jacka Arkadiusza Potorskiego

pt. „Ocena potencjału probiotycznego szczepu *Carnobacterium maltaromaticum* w podchowie wybranych gatunków ryb"

wykonanej na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr hab. inż. Iwony Gołaś, prof. UWM i promotora pomocniczego dr hab. Anny Gotkowskiej-Płachta

Recenzję wykonano w związku z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie; Pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo prof. dra hab. Tomasza Daszkiewicza z dnia 21 grudnia 2021 roku (syg. - WBZ-DZ.6350.13.2019/2021.6)

Uwagi ogólne – zasadność wyboru tematu rozprawy

Akwakultura jest zaliczana do najprężniej rozwijających się sektorów produkcji żywności. Jej funkcjonowanie determinowane jest jednak dostępem do ograniczonych zasobów, m.in. wody, terenu i surowców paszowych. Rosnące zapotrzebowanie na komponenty paszowe pozyskiwane ze środowiska wodnego, tj. mączki rybnej i oleju rybnego, *nota bene* obserwowane też w innych branżach, skutkuje coraz szerszym stosowaniem alternatywnych źródeł białka i tłuszczu w paszach dla ryb, które z uwagi na swoją specyfikę nazywane są coraz powszechniej akwapaszami. Stosowanie zamienników mączki rybnej i oleju rybnego, głównie pochodzenia roślinnego, skutkuje obniżeniem wartości odżywczej akwapasz i może negatywnie wpływać na wskaźniki hodowlane oraz stan zdrowotny ryb. Należy też pamiętać, że intensyfikacja produkcji w akwakulturze, stosowanie dużych zagęszczeń obsad, a także stresotwórczych zabiegów hodowlanych mogą wpływać na dobrostan organizmów wodnych i zwiększać ryzyko infekcji. Obecnie, w celu poprawy m.in. stanu zdrowotnego ryb czy też strawności składników pokarmowych akwapasz coraz częściej stosuje się tzw. funkcjonalne dodatki do pasz, do których należą m.in. probiotyki.

Tematyka przedmiotowej rozprawy doktorskiej zatytułowanej „**Ocena potencjału probiotycznego szczepu *Carnobacterium maltaromaticum* w podchowie wybranych gatunków ryb**" mieści się obszarze badań żywieniowych związanych ze stosowaniem probiotycznych dodatków do akwapasz. Odnotować należy, że działanie probiotyków jest dość szerokie i często bardzo korzystne. Polega m.in. na przywracaniu i zachowaniu naturalnej mikrobioty przewodu pokarmowego, ochronie przed patogenami, syntezie enzymów trawiennych i witamin, czy też stymulacji układu odpornościowego. Podkreślić warto, że ich szersze wykorzystanie w akwakulturze może znacząco ograniczyć stosowanie antybiotyków. Potencjalnie probiotyki mają duże znaczenie nie tylko dla ochrony zdrowia ryb, ale również ich konsumentów. Z informacji zawartych w pierwszym akapicie recenzji wynika, że tego typu badania mają zarówno duże walory poznawcze, jak i aplikacyjne. Ich potencjalny utylitaryzm zwiększa fakt objęcia badaniami dwóch gatunków istotnych dla intensywnej akwakultury, tj. pstrąga tęczowego i suma afrykańskiego. Odnotować też należy, że eksperymenty podchowowe, realizowane w ramach przedmiotowej dysertacji, Kandydat prowadził w prototypowych systemach recyrkulacyjnych (RAS), a więc wykorzystując innowacyjną, bardzo perspektywiczną technologię produkcji organizmów wodnych. Z uwagi na nowatorski charakter technologii RAS lista gatunków o dopracowanych, kompleksowych biotechnikach tuczu w tego rodzaju urządzeniach nie jest zbyt długa, ale znajdują się na niej właśnie dwa wyżej wymienione taksony.

Warto podkreślić, że badania Kandydata stanowią kontynuację i twórcze rozwinięcie prac badawczych prowadzonych w Katedrze Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej UWM Olsztynie. Niniejsza dysertacja jest bowiem tematycznie związana z jednym z nurtów badawczych koordynowanych przez Panią dr. hab. Iwonę Gołaś, prof. UWM, dotyczącym wykorzystania narzędzi i technik mikrobiologicznych w akwakulturze, a ściślej rzecz ujmując w żywieniu organizmów wodnych. Zauważyć warto, że badany przez Doktoranta szczep bakterii został wyizolowany w trakcie wcześniejszych badań prowadzonych w tej Katedrze, a wyniki uzyskane przez mgra Jacka Potorskiego w przedmiotowej rozprawie wnoszą istotny wkład do zasobu wiedzy dotyczącej tej interesującej problematyki.

Struktura rozprawy i jej ocena formalna

Przedmiotowa rozprawa doktorska została opracowana w formie uznawanej za klasyczną, tj. manuskryptu spisanego na 130 stronach, z tego 100 stron stanowi test rozprawy (strona tytułowa i spis treści zostały zamieszczone na pierwszych 5 stronach). Dodatkowe 20

stron stanowi spis piśmiennictwa (176 pozycji), a na pozostałych 10 zamieszczono spis tabel, rysunków i fotografii, a także streszczenie w języku polskim i angielskim wraz ze słowami kluczowymi. W tekście pracy zamieszczono 17 tabel, 12 rysunków i 15 fotografii. Moim zdaniem takie sformatowanie testu ułatwiło znakomicie zapoznanie się i przeanalizowanie jej treści. Klasyczny układ pracy, podział na rozdziały i podrozdziały jest przejrzysty i odpowiada standardom pracy naukowej.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp został opracowany obszernie, wyczerpująco i interesująco. Skład się on z kilku podrozdziałów, których tematyka jest ściśle związana z tematem i celami rozprawy. Autor odniósł się w nim do obiektów badań, tj. pstrąga tęczowego i suma afrykańskiego, trafnie podkreślając ich znaczenie dla sektora akwakultury. Odpowiednio nakreślił specyfikę hodowli ryb w systemach recyrkulacyjnych, trafnie identyfikując tzw. „wąskie gardła" tej technologii (m.in. brak szeroko rozumianej standaryzacji tych urządzeń, w tym wymogów dotyczących mikrobiologicznej jakości wody). Kolejne podrozdziały stopniowo przybliżają czytelnika do meritum badań przedmiotowej rozprawy. Szeroko, bazując na bogatej literaturze, odniósł się do problematyki stosowania probiotyków. Przedstawił charakterystykę bakterii probiotycznych z rodzaju Carnobacterium, celnie argumentując wybór izolatu *Carnobacterium maltaromaticum* i możliwości wykorzystania tego gatunku bakterii w intensywnej akwakulturze. Całość Wstępu została napisana komunikatywnie, także czytelnik bez problemu, może określić cel pracy, przed zapoznaniem się z rozdziałem Cel i zakres badań, co jest świadectwem odpowiedniej wartości tego rozdziału. Zasadniczym celem rozprawy było określenie potencjału probiotycznego środowiskowego szczepu bakterii *Carnobacterium maltaromaticum* oraz zbadanie możliwości zastosowania tego izolatu w akwapaszach. Wyspecyfikowane cztery cele szczegółowe są tematycznie spójne i pozwoliły na postawienie trafnych hipotez badawczych i hipotez przeciwstawnych.

Uważna lektura tego rozdziału nasunęła mi kilka uwag, natury formalnej i redakcyjnej, a mianowicie:

- nazywanie stawów ziemnych i betonowych "obiegami otwartymi" jest w moim odczuciu trochę niezgrabne. Może prowadzić do ich utożsamiania z wodami otwartymi, co nie do końca jest poprawne. Moim zdaniem właściwsze byłoby użycie terminu "systemy otwarte", co jednoznacznie odróżnia je od systemów recyrkulacyjnych i podkreśla ich nienaturalny, antropogeniczny charakter;

- ujednolicenia wymaga sposób przywoływania pozycji literatury w tekście Wstępu i pozostałych rozdziałach. Należy zdecydować się na system chronologiczny lub alfabetyczny i konsekwentnie go stosować w całej pracy;
- usystematyzowania wymaga sposób podawania łacińskich nazw organizmów. Zazwyczaj przyjmuje się, że nazwę łacińską należy podawać przy pierwszym przywołaniu danego taksonu w publikacji. Przy kolejnym, można stosować nazwę polską lub łacińską. Oczywiście nie jest zabronione jednoczesne podawanie w całej pracy nazwy polskiej i łacińskiej taksonu, najważniejsze by przyjąć jakąś regułę i ją konsekwentnie stosować;
- używanie terminu „*parametry fizyko-chemiczne*" nie jest do końca poprawne. Są wskaźniki fizyczne albo chemiczne, chociaż można mówić o charakterystyce fizyko-chemicznej;
- w tabeli 1 podany jest gatunek „łosoś norweski", a odnosząc się do podanej nazwy łacińskiej (*Salmo salar*) poprawna polska nazwa tego gatunku powinna brzmieć „łosoś atlantycki".

Rozdział **Materiał i metody** ma charakter uporządkowany i w sposób usystematyzowany, zgodny z przyjętymi celami szczegółowymi opisuje materiał badawczy i stosowane procedury badawcze. Wysoko oceniam koncepcyjne atrybuty rozprawy ale zalecam doprecyzowanie i/lub poszerzenie informacji zawartych w kolejnych podrozdziałach tego rozdziału. Przykładowo:
- podając nazwę zbiornika wodnego (Jezioro Legińskie), czy też miejscowości (farmy rybne skąd pochodził materiał badawczy) zamieścić należałoby informacje pozwalające na ich zlokalizowanie, np. pojezierze lub region kraju;
- podstawowy skład pasz komponowanych należałoby poszerzyć o ich wartość energetyczną i określić czy dotyczy on masy suchej czy mokrej;
- wszystkie skróty (np. podłoże TSB, str. 24; MS-222, str. 34) powinny być wyjaśnione przy okazji ich pierwszego podawania w tekście pracy;
- doprecyzowania wymaga termin „*wody ubogiej w substancje pokarmowe*" (str. 27), powinien on być bardziej precyzyjny i jednoznaczny. W moim odczuciu szczegółowiej powinna być opisana procedura przygotowywania jałowych roztworów wodnych testowanych pasz komponowanych (str. 27);
- w przypadku amoniaku należałoby podać, czy określany był poziom całkowitego azotu amonowego czy też stężenie jego formy niezdysocjowanej (str. 33);
- wskazane byłoby doprecyzowanie opisu warunków przetrzymywania ryb w okresie ich aklimacji, dobowych zmian temperatury wody i żywienia ryb (np. rodzaj diety);

- opis eksperymentalnych systemów RAS użytych w tych badaniach nie jest spójny z ich schematem (rys. 2). Dotyczy umieszczenia grzałek i kolektorów z lampami UV (str. 32-33);
- usystematyzowania wymaga sposób zapisu jednostek. Co prawda dominuje zapis z użyciem prawego ukośnika „/", ale stosowany jest też system wykładniczy (np. str. 34);
- przy podawaniu autora fotografii oprócz nazwiska należy podać inicjały imienia (np. fot. J.A. Potorski);
- opis przygotowywania pasz powinien być bardziej szczegółowy. Nasuwają się pytania: czy pasze komercyjne były w pierwszej kolejności mielone, a potem przeprowadzono proces ich regranulacji? Kiedy dodawano probiotyk, przed czy po natłuszczaniu? Czym natłuszczano paszę i w jakim celu? Czy natłuszczano również pasze kontrolne? (str. 34). W nauce obowiązuje kanon, że opis metod powinien być na tyle jasny i szczegółowy, by bez żadnych trudności cała metodyka mogła zostać odtworzona, niekoniecznie jedynie przez autora danych badań;
- w przypadku pomiarów ryb oraz części ciała (wątroba, jelito) należy podać precyzję ich wykonania (str. 43);
- opis procedur histologicznych powinien być doprecyzowany o informacje dotyczące dokładności pomiarów. W tekście znajduje się informacja, że cyt. „*Preparaty histologiczne (n=50 pomiarów z każdego gatunku ryb) analizowano pod kątem szerokości i wysokości jelita*". Nasuwa się pytanie, czy podana liczebność jest prawidłowa? Z wcześniejszych informacji wynika, że do badań histologicznych pobierano po 30 ryb danego gatunku (15 z grupy kontrolnej i 15 z grupy badawczej). Ten zapis sugeruje, że dla każdej ryby wykonywano zaledwie 1, ewentualnie 2 pomiary jelita. Czy rzeczywiście mierzono szerokość jelita? W jakim celu? Co to znaczy, że mierzono wysokość jelita? Na jakiej podstawie określono powierzchnię chłonną jelita, o której mówi się w rozdziale Wyniki? Nasuwa się też pytanie, dlaczego nie zastosowano alkoholu absolutnego lub acetonu w celu pełnego odwodnienia utrwalonych tkanek? Stosowanie alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (od 70 do 95%) nie zapewnia pełnego odwodnienia tkanek.
- w rozdziale Materiał i metody powinna znaleźć się też informacja na temat zgody Lokalnej Komisji Etycznej na pobór prób biologicznych w ramach przeprowadzonych badań. Jeśli zastosowane procedury takiej zgody nie wymagały, wówczas wskazane byłoby zamieszczenie informacji, że zostały one przeprowadzone zgodnie z rekomendacjami polskiego prawa i stosownej dyrektywy Unii Europejskiej.

Rozdział **Wyniki** został opracowany zgodnie z kolejnością celów rozprawy i podrozdziałów zawartych w rozdziale Materiał i metody. Jest to dość obszerny rozdział, 36.

stronicowy, co wynika bezpośrednio z szerokiego zakresu badań objętych przedmiotową dysertacją. Tekst tego rozdziału uzupełniają liczne tabele i rysunki, które dobrze porządkują tą część pracy. *Gros* wyników dotyczy badań mikrobiologicznych, stanowiących podstawę tej dysertacji. Do szczególnie cennych z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia zaliczyłbym wykazanie, że badany izolat:

- nie ma cech chorobotwórczości (brak aktywności hemolitycznej i proteolitycznej) i nie należy do bakterii patogennych;
- cechuje się odpornością na szereg antybiotyków stosowanych w akwakulturze;
- ma antagonistyczne oddziaływanie na wzrost i rozwój szczepów pospolicie występujących w obiektach akwakultury, np. chorobotwórczych bakterii z rodzaju Aeromonas, Pseudomonas i Yersinia, istotnie redukując ich liczebność w wodzie technologicznej, na skórze ryb i w przewodzie pokarmowym;
- dodany do pasz komponowanych poprawia istotnie bezpieczeństwo sanitarno-epidemiologiczne ich przechowywania, redukując liczebność i skracając czas przeżycia drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych.

Istotnym poszerzeniem badań mikrobiologicznych przedmiotowej dysertacji były wyniki testów żywieniowych, w których wykazano jednoznacznie, że dodatek badanego izolatu wpłynął istotnie na wskaźniki wzrostu i efektywność przyswajania pasz (współczynnik pokarmowy pasz). Reakcja na testowany czynnik była jednak specyficzna gatunkowo i uwidoczniła się bardziej u zimnolubnego pstrąga tęczowego niż u ciepłolubnego suma afrykańskiego. Za bardzo ważne uważam wykazanie pozytywnego wpływu badanego izolatu na strawność białka i związków bezazotowych wyciągowych (u obydwu taksonów), a także budowę histologiczną jelita środkowego, zwłaszcza zwiększenie jego powierzchni chłonnej.

Uzyskane wyniki bezsprzecznie należy uznać za bardzo cenne i świadczące o ogromie pracy jaką Doktorant włożył w analizy laboratoryjne, opracowanie wyników i zredagowanie manuskryptu. Uważam, że zasadne byłoby jednak jego skrócenie poprzez np. usunięcie fragmentów będących w istocie powtórzeniem informacji zawartych w rozdziale Materiał i metody (np. wstępy do kolejnych podrozdziałów rozdziału Wyniki) czy też fragmentów bardziej pasujących do rozdziału Dyskusja. Nie wpłynęłoby to na jego wartość merytoryczną, a uczyniło bardziej przejrzystym i syntetycznym. W moim odczuciu informacje zawarte w podrozdziale *4.2.1. Parametry fizykochemiczne wody w układach eksperymentalnych* lepiej byłoby zamieścić w rozdziale Materiał i metody. Moje zastrzeżenie budzi też brak oznaczeń na fotografii prezentującej przekrój histologiczny przez jelito (fot. 15).

Uzyskane wyniki zostały w rzetelny i merytoryczny sposób osadzone w zasobach wiedzy dotyczącej przedmiotowej rozprawy i skonfrontowane z dostępną literaturą w rozdziale **Dyskusja**. W trzech podrozdziałach odniesiono się do zagadnień związanych z celami przedmiotowej rozprawy, trafnie argumentując oryginalność i znaczenie uzyskanych wyników. Analiza tego rozdziału, jak i całej rozprawy dowodzi, że Doktorant ma bogatą wiedzę ogólną i specjalistyczną dotyczącą problematyki przedmiotowej rozprawy doktorskiej. W rozprawie wykorzystano 176 pozycji piśmiennictwa; większość opublikowano w języku angielskim. Uwagę zwraca spora liczba prac najnowszych z lat 2020-2021. Rozdział **Literatura** został opracowany starannie i co istotne, w sposób zunifikowany. Wszystkie pozycje w nim zawarte zostały zacytowane w tekście rozprawy, i odwrotnie. Pewne niespójności Literatura → tekst rozprawy dotyczą jedynie pozycji 34, 100 i 104.

Całość rozprawy wieńczy rozdział **Podsumowanie**, w którym Doktorant wykazał, że założony w przedmiotowych badaniach cel zasadniczy, cele szczegółowe zostały zrealizowane, a postawione hipotezy badawcze pozytywnie zweryfikowane. Wykazano bowiem, że wyizolowany z wód otwartych szczep bakterii *Carnobacterium maltaromaticum* posiada potencjał probiotyczny, a suplementowanie nim komercyjnych, komponowanych akwapasz pozytywnie wpływa na wskaźniki efektywności podchowu badanych gatunków ryb w systemach recyrkulacyjnych. Odnoszę jednak wrażenie, że rozdział ten ma bardziej charakter streszczenia. W przypadku przygotowywania publikacji do druku sugerowałbym przygotowanie jednoznacznie brzmiących końcowych konkluzji i stwierdzeń.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne uważam, że wyniki uzyskane w przedmiotowej rozprawie powinny zostać udostępnione szerszemu gronu odbiorców. Opublikowanie ich w renomowanych periodykach naukowych umożliwi ich zaistnienie w międzynarodowym obiegu myśli naukowej. Moje krytyczne uwagi, często o charakterze formalnym i redakcyjnym, pomogą Doktorantowi, mam taką nadzieję, przygotować manuskrypt do wysłania do redakcji renomowanego czasopisma naukowego.

Generalnie stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana mgra Jacka Arkadiusza Potorskiego jest dziełem oryginalnym. Cechują ją szeroki zakres zrealizowanych badań, duże wartości poznawcze i aplikacyjne. Sposób zredagowania pracy i jej treść dowodzą, że Doktorant posiada bardzo ważne dla pracownika naukowego umiejętności planowania i realizacji inspirujących zamierzeń naukowych. Posiada On też zdolności

samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Moim zdaniem uzyskane w rozprawie wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki zootechnika i rybactwo. Uważam, że przedmiotowa rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), w zw. z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). W związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie rozprawy Pana mgra Jacka Arkadiusza Potorskiego do publicznej obrony.

prof. dr hab. inż. Zdzisław Zakęś