

Prof. dr hab. Wojciech Szweda

Olsztyn, 20.09.2023 r.

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Grzegorza Wiszniewskiego**

pt. „Wpływ naturalnych preparatów zawierających enzymy owocowe na organizm sterleta
(*Acipenser ruthenus*)”

wykonanej pod naukowym kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja K. Siwickiego (promotor)
i dr inż. Sylwii Jarmołowicz (promotor pomocniczy)

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu dr inż. Grzegorza Dietricha z dnia 04.09.2023 r. (RN-000-40/2023) w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie z dnia 15.12.2021 r. o powołaniu mnie na recenzenta.

W ostatnich kilkunastu latach obserwuje się postępujący proces intensyfikacji produkcji zwierząt akwakultury, wpływający na wzrost zapotrzebowania na paszę, konieczność optymalizacji wykorzystania składników pokarmowych, w tym alternatywnych źródeł białka w żywieniu ryb, zwłaszcza w zamkniętych obiegach recyrkulacyjnych (RAS), przy jednoczesnym utrzymaniu dobrego stanu zdrowia poprzez odpowiednie działania w zakresie profilaktyki ogólnej oraz immunoprofilaktyki nieswoistej i swoistej. Dlatego wzrasta zainteresowanie związkami typu probiotyki, prebiotyki, synbiotyki, czy roślinne substancje aktywne, zwłaszcza pochodzenia naturalnego. Wykazano, że o ile w przypadku zwierząt stałocieplnych enzymy egzogenne wpływają na poprawę wartości odżywczej paszy

i zmniejszenie zanieczyszczenia środowiska, w przypadku ryb zagadnienia te są słabiej poznane, aczkolwiek dotychczasowe wyniki są obiecujące. Stwierdzono również, że substancje te mają działanie immunostymulujące, co w dobie ograniczeń w stosowaniu antybiotyków stwarza szansę lepszego wykorzystania nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej w ochronie zdrowia ryb.

Zatem podjęcie badań przez Doktoranta należy uznać za w pełni uzasadnione ze względów poznawczych i praktycznych, tym bardziej, że wpływ wybranych do badań enzymów na procesy fizjologiczne organizmów wodnych nie został do tej pory dostatecznie zbadany.

Rozprawa doktorska mgr inż. Grzegorza Wiszniewskiego stanowi spójny tematycznie cykl trzech wieloautorskich publikacji opatrzoney wspólnym tytułem „Wpływ naturalnych preparatów zawierających enzymy owocowe na organizm sterleta ((*Acipenser ruthenus*)”.

W skład cyklu wchodzi następujące prace:

1. Wiszniewski G., Jarmołowicz S., Hassaan M. S., Mohammady E. Y., Soaudy M. R., Łuczyńska J., Tońska E., Terech-Majewska E., Ostaszewska T., Kamaszewski M., Skrobisz M., Adamski A., Schulz P., Kaczorek E., Siwicki A.K.: The use of bromelain as a feed additive in fish diets: Growth performance, intestinal morphology, digestive enzyme and immune response of juvenile Sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture Nutrition* 2019, 25(6): 1289-1299, doi.org/10.1111/anu.12949 (IF₂₀₁₉=2,231)
2. Wiszniewski G., Jarmołowicz S., Hassaan M.S., Soaudy M.R., Kamaszewski M., Szudrowicz H., Terech-Majewska E., Pajdak-Czaus J., Wiechetek W., Siwicki A.K.: Beneficial effects of dietary papain supplementation in juvenile sterlet (*Acipenser ruthenus*): Growth, intestinal topography, digestive enzymes, antioxidant response, immune response, and response to a challenge test. *Aquaculture Reports* 2022, 22: 100923, doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100923 (IF₂₀₂₂=3,385)
3. Wiszniewski G., Jarmołowicz S., Hassaan M.S., Kamaszewski M., Szudrowicz H., Terech-Majewska E., Kowalski K., Martynow J., Szczepański J., Siwicki A.K.: Dietary effect of actinidin enzyme on growth, digestive enzymes activity, immunity, liver and intestine histology of juvenile sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture Reports* 2022, 25: 101196, doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101196 (IF₂₀₂₂=3,385)

W przedstawionym cyklu, opublikowanym w latach 2019 – 2022, wszystkie publikacje to prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w renomowanych czasopismach

znajdujących się w bazie JCR – Aquaculture Nutrition (1 praca) i Aquaculture Reports (2 prace). Współczynnik wpływu (Impact Factor – IF) tych publikacji wynosi 2,231 i 3,385, a sumaryczny IF prac tego cyklu - 9,001.

Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, we wszystkich Doktorant jest pierwszym autorem, a Jego wkład pracy w ich powstanie w ujęciu procentowym został określony na 50%, co znalazło potwierdzenie w stosownych oświadczeniach współautorów. Stanowi to dowód pierwszoplanowej roli Doktoranta w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu publikacji.

Opracowanie przedstawione przez Doktoranta, zawierające publikacje stanowiące rozprawę doktorską, liczy 31 stron maszynopisu i obejmuje, poza stroną tytułową w językach polskim i angielskim oraz podziękowaniami, Wykaz przedmiotowych publikacji, Spis treści, Streszczenia w językach polskim i angielskim, Wstęp i cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Literaturę oraz załączniki w postaci oświadczeń Doktoranta i współautorów o udziale w publikacjach i kopie publikacji.

We „Wstępie” Doktorant szczegółowo uzasadnił potrzebę podjęcia badań, wynikającą z intensyfikacji produkcji w akwakulturze, poszukiwania nowych rozwiązań w żywieniu ryb, zwłaszcza w systemach zamkniętych oraz konieczności wspierania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej jako alternatywa konwencjonalnych środków profilaktyczno-leczniczych. Omówił właściwości i zastosowanie enzymów owocowych – bromelainy, papainy i aktynidyny zwracając uwagę, że wpływ tych enzymów na procesy fizjologiczne zwierząt akwakultury został jak dotychczas słabo poznany i wymaga dalszych badań.

Cel pracy został jasno określony i obejmował ocenę wpływu podawania z paszą 1% i 2% dodatku enzymów owocowych – bromelainy (z łodyg i owoców ananasa), papainy (z lateksu papai) i aktynidyny (z owoców kiwi) na tempo wzrostu, histologię wątroby i przewodu pokarmowego, aktywność wybranych enzymów trawiennych oraz wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej. Badania przeprowadzono na młodocianych formach sterleta (*Acipenser ruthenus*), ryby rozpowszechnionej w akwakulturze, odpornej na manipulacje i stres oraz łatwo adaptującej się do nowych warunków środowiskowo – żywieniowych.

W „Materiałach i metodach” omówiono skrótowo warunki prowadzenia doświadczeń, zasady przygotowywania paszy doświadczalnej, oceniane wskaźniki hodowlane, metody badań

aktywności enzymów trawiennych, analizy histologicznej wybranych tkanek oraz badane wskaźniki immunologiczne.

Badania przeprowadzono w Zakładzie Ichtiologii, Hydrobiologii i Ekologii Wód IRS-PIB w Olsztynie. Utworzono trzy oddzielne obiegi recyrkulacyjne (RAS), złożone z trzech basenów o pojemności 280 dm³ każdy. Do badań użyto łącznie 180 ryb podzielonych na trzy grupy – dwie doświadczalne i jedną kontrolną (trzy warianty żywieniowe) w trzech powtórzeniach, każdorazowo poddawanych 7-dniowej aklimatyzacji. W trakcie doświadczenia, trwającego 56 dni stale monitorowano właściwości fizyko-chemiczne wody (temperatura, zawartość tlenu i azotu amonowego, pH). Stosowano komercyjną paszę Nutra T-2.0 (Skretting, Francja) z dodatkiem bromelainy, papainy lub aktynidyny odpowiednio 1g i 2g/100g paszy (grupy doświadczalne) lub bez dodatku enzymów w grupie kontrolnej, którą przechowywano w temp. +4°C i podawano rybom 12x/dobę, raz w tygodniu korygując dawkę pokarmową. Dokonywano pomiarów masy ciała i długości całkowitej oraz określano wskaźniki wzrostu i wykorzystania paszy – dobowy i względny przyrost masy ciała (DGR i SGR) oraz współczynniki – kondycji ryb (CF), pokarmowy pasz (FCR), wydajności wzrostowej białka (PER), wątrobowosomatyczny (HSI) i trzewiowosomatyczny (VSI). Pobierano wycinki jelita przedniego i tylnego i oceniano aktywność enzymów endogennych – fosfatazy alkalicznej i kwaśnej, aminopeptydazy leucynowej, tripsyny, lipazy i amylazy. W ostatnim dniu doświadczenia pobrano wątrobę i środkowy odcinek przewodu pokarmowego celem oceny wielkości hepatocytów i ich jąder, a w jelicie mierzono grubość mięśniówki, wysokość fałdów jelitowych, enterocytów i przestrzeni nadjądrowej oraz wielkość jąder enterocytów. W zakresie wskaźników immunologicznych w płazmie krwi mierzono poziom białka całkowitego i immunoglobulin, aktywność lizozymu i zawartość ceruloplazminy (wskaźniki nieswoistej odpowiedzi humoralnej), a w śledzionie określano aktywność metaboliczną i fagocytarną makrofagów oraz aktywność proliferacyjną limfocytów T i B. Szczegóły metodyczne zostały przedstawione w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy programu GraphPad Prism lub SAS (Soft. Inc., USA), a różnice między grupami oceniano jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz testami post hoc Tukeya lub Duncana. Wartości przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe.

W kolejnym podrozdziale „Wyniki” Doktorant przedstawił skrótowo, opisowo i tabelarycznie uzyskane w trzech eksperymentach wyniki badań, oddzielnie w zakresie wskaźników wzrostowych i wykorzystania składników pokarmowych, wpływu enzymów

owocowych na aktywność enzymów trawiennych, analizy histologicznej wątroby i jelita cienkiego oraz parametrów nieswoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej.

Kolejny rozdział „Dyskusja” obejmuje syntetyczną, krytyczną analizę wyników badań własnych w świetle tych uzyskanych przez innych badaczy u różnych gatunków ryb.

Z przeprowadzonych badań Doktorant sformułował 6 wniosków, które w pełni pokrywają wytyczony obszar badań i dowodzą spełnienia założonych celów badawczych.

Opracowanie kończy wykaz 64 pozycji starannie dobranego, numerowanego, angielskiego piśmiennictwa. W przypadku stosowania numeracji pozycji piśmiennictwa nie ma potrzeby podawania w opracowaniu nazwisk autorów cytowanych prac, wystarczą numery.

Na końcu opracowania przedstawiono kopie publikacji stanowiących rozprawę doktorską, przeplatane oświadczeniami współautorów.

Tematyka publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską jest merytorycznie spójna. Umiejętnie określone i zaplanowane, a następnie konsekwentnie wykonane eksperymenty, przy użyciu różnorodnych metod i technik badawczych, z udziałem zespołu współpracowników, przyniosły szereg bardzo interesujących i wartościowych wyników o znaczeniu zarówno poznawczym, jak i aplikacyjnym, mogących znaleźć szerokie zastosowanie w akwakulturze.

Badania wykazały, że suplementacja paszy enzymami owocowymi, uzyskanymi z owoców ananasa (bromalaina), papai (papaina) i kiwi (aktynidyna) ma korzystny wpływ na poprawę wykorzystania składników pokarmowych i tempa wzrostu sterleta. Badane substancje stymulowały sekrecję enzymów trawiennych w jelicie cienkim wspomagając trawienie pokarmu oraz miały wpływ na zwiększenie powierzchni absorpcyjnej enterocytów i wchłanianie składników odżywczych. W trakcie badań nie stwierdzono zmian patologicznych w narządach wewnętrznych ryb oraz negatywnego wpływu na wybrane parametry fizykochemiczne wody. Podkreślenia wymaga stymulujący wpływ wszystkich badanych substancji na wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej ryb. Dowiedziono zatem przydatności enzymów owocowych – bromelainy, papainy i aktynidyny jako dodatków funkcjonalnych w żywieniu ryb, mogących jednocześnie stanowić ważny element immunoprofilaktyki nieswoistej w akwakulturze.

Reasumując należy stwierdzić, że spójny tematycznie cykl trzech publikacji, stanowiący rozprawę doktorską, większościowego współautorstwa mgr inż. Grzegorza Wiszniewskiego w opracowaniu założeń badawczych, wykonaniu badań, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu dokumentacji oraz tworzeniu i korekcie publikacji jest oryginalnym, kompleksowym i wartościowym opracowaniem dotyczącym oceny wykorzystania naturalnych preparatów zawierających enzymy owocowe na wzrost produktywności i stan zdrowia form młodocianych sterleta. Opracowanie to może przyczynić się optymalizacji wykorzystania pasz i skuteczniejszej ochrony zdrowia ryb poprzez stymulację odpowiedzi immunologicznej. Przeprowadzone badania zawierają szereg elementów nowatorskich, zostały wykonane metodycznie poprawnie, z zastosowaniem metod i technik właściwych dla tego typu badań, a Doktorant przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazał się odpowiednią wiedzą merytoryczną oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i współpracy w zespołach badawczych.

Prace stanowiące rozprawę doktorską były przed opublikowaniem recenzowane, dlatego ich ponowna recenzja jest nieuzasadniona. Przedstawione przez Doktoranta opracowanie jest elementem pomocniczym, stanowiącym pewne uzupełnienie i podsumowanie samych publikacji. W moim przekonaniu recenzja tego jednorazowego opracowania, które nie będzie podlegało publikacji na wzór monograficznych rozpraw doktoranckich nie jest konieczna, aczkolwiek powinno ono być przygotowane poprawnie.

Szczegółowa analiza przedstawionego opracowania zawiera pewne usterki czy niedociągnięcia, zaznaczone w tekście w trakcie czytania, których w recenzji nie będę wyszczególniał. Istotniejsze w mojej ocenie są odpowiedzi na pytania dotyczące celu wykonania tych badań, opracowania publikacji tworzących cykl jednotematyczny, elementów nowatorskich, jakie wnoszą one do nauki, wykonawstwa zgodnego z przyjętymi założeniami badawczymi przy pomocy nowoczesnych metod i technik badawczych i ewentualnie wskazanie nowości w badanym obszarze, jakie pojawiły się od momentu opublikowania prac wchodzących w skład cyklu. Odpowiedzi na te pytania można znaleźć w tekście opracowania, dlatego moja ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Grzegorza Wiszniewskiego jest wysoce pozytywna.

We wniosku kończącym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, stanowiąca spójny tematycznie cykl trzech publikacji pod wspólnym tytułem „Wpływ naturalnych preparatów zawierających enzymy owocowe na organizm sterleta (*Acipenser ruthenus*)” odpowiada warunkom określonym w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo

o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), dlatego przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Grzegorza Wiszniewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wojciech Szweda

