

Instytut Rybactwa Śródlądowego

im Stanisława Sakowicza

Państwowy Instytut Badawczy

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej**

pt. „Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Kucharczyka (promotor)

i dr Michała Krzysztofa Łuczyńskiego (promotor pomocniczy)

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Naukowej Zootechniki i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dn. 18.03.2025 r. (WBZ-DZ.5201.2.2024.RD).

Przedstawiona wysokiej Radzie Naukowej rozprawa doktorska Pani mgr Martyny Arciuch-Rutkowskiej stanowi spójny tematycznie cykl trzech wieloautorskich publikacji opatrzone wspólnym tytułem „Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych”. Doktorantka kontynuuje w nich zainicjowany przed laty nurt badań Promotora, Pana prof. dr hab. Dariusza Kucharczyka skoncentrowany na poznaniu aktualnych uwarunkowań determinujących rozwój akwakultury. Doktorantka dokonała analizy najnowszych doniesień naukowych i zbadała wpływ wybranych związków organicznych w paszy na efekty podchowu narybku trzech gatunków ryb cennych w akwakulturze, suma afrykańskiego, hybrydy jesiotrów rosyjskiego i syberyjskiego oraz siei. Weryfikując postawione hipotezy Doktorantka wykorzystała dostępne i zaawansowane metody badawcze wymagające posiadania wiedzy z zakresu fizjologii, biochemii, immunologii i genetyki ryb. Temat przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej uważam za aktualny i istotny dla nauki oraz praktyk stosowanych w zrównoważonej hodowli ryb.

Uzasadnienie - uwagi ogólne

Intensyfikacja produkcji w zrównoważonej akwakulturze uwzględniającej bezpieczeństwo żywnościowe i dobrostan ryb obligują hodowców i producentów żywności do zastosowania rozwiązań opartych na innowacyjnych strategiach żywieniowych. Pasze wzbogacane w naturalne związki bioaktywne podnoszą jakość materiału biologicznego, odpowiadają na rosnące oczekiwania konsumentów, w tym wymogi dotyczące ograniczania wpływu hodowli na środowisko.

Rozwój technik badawczych pozwala obecnie wskazać na szereg substancji biologicznie czynnych w surowcach pochodzenia roślinnego, zwierzęcego czy mikrobiologicznego. Choć niektóre bioaktywne substancje dostarczane są stale z pokarmem ryb, to odpowiednia ich podaż w paszach komponowanych poprawia dobrostan ryb hodowlanych co przekłada się na ich wzrost, przeżywalność oraz odporność na choroby. Dodatkowo, immunostymulujący wpływ tych związków zmniejsza konieczność stosowania antybiotyków i chemioterapeutyków i w konsekwencji chroni środowisko wodne oraz bioróżnorodność.

Zainteresowanie paszami wzbogacanymi w związki organiczne, np. ekstrakty roślinne, oleje z alg, fitobiotyki czy pre- i probiotyki jest nadal aktualne. Substancje te poprzez katalizowanie, inhibicję, regulację procesów fizjologicznych i metabolizm na poziomie komórkowym modyfikują mikrobiom ryb, wykazują działanie antyoksydacyjne i przeciwwirusowe. Wyzwaniem jest optymalizacja składu pasz w poszukiwaniu najbardziej efektywnych dla danej hodowli składników paszowych. Warto zaznaczyć, że żywienie we wczesnych etapach ontogenezy ma długoterminowy wpływ na metabolizm, tempo wzrostu i stan zdrowotny ryb. Dlatego z dużym uznaniem odnoszę się do pracy badawczej przeprowadzonej przez Panią mgr Martynę Arciuch-Rutkowską.

Struktura rozprawy - ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma postać manuskryptu liczącego 76 stron i obejmuje poza stroną tytułową w językach polskim i angielskim, Spis publikacji naukowych wraz z ich wskaźnikiem bibliometrycznym i wskaźnikiem oceny publikacji, Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie doktorskiej, Spis treści, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstęp, Hipotezy, cele badawcze oraz zakres badań, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Wdrożenie produktu w firmie ChemProf s.c., Spis literatury, Spis tabel, Spis rysunków oraz załączniki w postaci oświadczeń Doktorantki i współautorów o ich roli w publikacjach i kopie publikacji. Zasadniczą część dostarczonej dokumentacji stanowią kserokopie trzech prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej, w tym dwie prace opublikowane:

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K, Jasiński, S., Kucharczyk, D. (2024). Effects of the diet enrichment with β -glucan, sodium salt of butyric acid and vitamins on growth parameters and the profile of the gut microbiome of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). *Animal Feed Science and Technology*, 310, 115941 (IF 2,5; MNiSW – 200 pkt)

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K., Hussain, S.M., Kucharczyk, D. (2024). Next-Generation Sequencing to Determine Changes in the Intestinal Microbiome of Juvenile Sturgeon Hybrid (*Acipenser gueldenstaedtii*♀ × *Acipenser baerii*♂) Resulting from Sodium Butyrate, β -Glucan and Vitamin Supplementation. *Genes*, 15(10), 1276 (IF 2,8; MNiSW 100 pkt)

oraz jedna na etapie recenzji:

Arciuch-Rutkowska, M., Nowosad, J., Łuczyński, M.K, Kucharczyk, D. (2024). Effect of diet enriching with a sodium butyrate, β -glucan and vitamins on growth, HSP70 gene expression and gut microbiome of *Coregonus maraena* fry. *Research in Veterinary Science*, w trakcie recenzji (IF 2,2; MNiSW 100 pkt.)

W przedstawionym cyklu opublikowanym w 2024 r. jak i przedłożonym do publikacji, ujęte są oryginalne prace twórcze, w języku angielskim. Prace opublikowane są w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie JCR o współczynniku wpływu IF 2,5 i

2,8. Trzecia praca jest na etapie recenzji w Research in Veterinary Science, czasopiśmie znajdującym się w bazie JCR, o współczynniku wpływu IF 2,2.

Wszystkie prace są opracowaniem zbiorowym, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednej również autorem korespondencyjnym. Wkład pracy Doktorantki w ich powstanie jest wiodący co potwierdzają stosowne oświadczenia współautorów. Doktorantka opracowała koncepcję badań, wykonała część eksperymentalną, przeprowadziła analizy, zinterpretowała wyniki, przygotowała publikacje. Świadczy to o umiejętności Doktorantki w podejmowaniu i realizowaniu etapów badań naukowych i opanowaniu warsztatu badawczego.

Opublikowane prace stanowiące rozprawę doktorską były recenzowane stąd ich ponowna recenzja jest nieuzasadniona. Praca w recenzji jest przygotowana starannie. Doktorantka we Wstępie porusza aspekty będące przedmiotem badań, tj. akwakulturę siei, odporność ryb, właściwości mikrobiomu, absorpcję nutrientów, stres środowiskowy i powiązaną z nim syntezę białek oraz charakteryzuje testowane związki bioaktywne (β glukozę, maślan sodu, witaminy C, A, D₃, E, K). W mojej ocenie w rozdziale Materiał i metody należałoby wprowadzić nazwy grup eksperymentalnych i metodę izolacji bakterii jelitowych. Wyniki opatrzone są czytelnymi tabelami i wykresami. Dyskusja wyników badań z punktu merytorycznego jest prowadzona w sposób rzeczowy. Doktorantka nawiązuje w niej do wyników najnowszych prac co pozwala na właściwą i obiektywną ocenę uzyskanych rezultatów badań własnych. Cel badań uwzględniony we Wstępie został osiągnięty, co potwierdzają spójne z nim wnioski końcowe przedłożonej do publikacji pracy naukowej.

Ocena merytoryczna rozprawy

Publikacje uwzględnione w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych” są spójne tematycznie. W ich starannie przygotowanym opracowaniu przedłożonym do recenzji Doktorantka wyodrębnia rozdziały opatrzone nagłówkami, co ułatwia zapoznanie się z poszczególnymi zagadnieniami pracy. Dobór cytowań poświęconych podjętej problematyce badawczej stanowi trafną podbudowę merytoryczną wprowadzenia do tematu i części dyskusyjnej pracy.

We wstępie Autorka zwraca uwagę na ograniczenia w rozwoju akwakultury spowodowane czynnikami stresogennymi, tj. spowolnienie tempa wzrostu, zwiększone ryzyko wystąpienia chorób oraz wskazuje na konsekwencje stosowania antybiotyków. Następnie właściwie uzasadnia celowość profilaktycznej suplementacji pasz substancjami aktywnymi o właściwościach immunostymulujących. Jakkolwiek Doktorantka używa poprawnego terminu „nie antybiotykowe immunostymulatory” to w kontekście prowadzonych badań trafniej byłoby zastąpić je określeniem „naturalne immunostymulatory”, częściej spotykanym w literaturze naukowej. Doktorantka w sposób zwięzły i trafny charakteryzuje substancje aktywne zastosowane w doświadczeniach żywieniowych, podkreślając jednocześnie ich potencjalny wpływ na organizm ryb. Szczegółowo przedstawia mikrobiom ryb, wskaźniki odporności i poziomu stresu będące przedmiotem analiz badawczych oraz akwakulturę badanych gatunków.

Do tej części mam drobne uwagi. Autorka wskazuje na ograniczony dostęp światła jako czynnik ograniczający syntezę witaminy D₃ u ryb podczas gdy równorzędnym, zwłaszcza w przypadku ryb pelagicznych jest obecność łusek i pigmentu. Mała uwaga dotyczy precyzji w stosowanym nazewnictwie. Witaminę E określa się potocznie jako tokoferol, lecz obejmuje ona kilka tokoferoli i tokotrienoli, spośród których α -tokoferol wykazuje najwyższą aktywność

biologiczną. Podobnie „oś podwzgórze-przysadka-nadnercza” należałoby zastąpić terminem „oś podwzgórze-przysadka-komórki śródnerczowe/interrenalne”. U ryb brak anatomicznie wyodrębnionych nadnerczy, stąd odpowiednikiem osi HPA (z ang. *hypothalamus-pituitary-adrenal*) ssaków jest oś HPI (z ang. *hypothalamus-pituitary-interrenal*), która reguluje odpowiedź stresową w tym wydzielanie kortyzolu przez komórki steroidogenne zlokalizowane w obrebie nerki/śródnercza. Doktorantka właściwie precyzuje czynniki modulujące mikrobiom jelitowy. W moim odczuciu zabrakło jedynie odniesienia zależności mikrobiomu od taksonu, w tym wzrostu tendencji jego różnorodności u ryb drapieżnych, wszystko czy roślinożernych. Autorka starannie i szczegółowo klasyfikuje linie obrony organizmu, reakcje immunologiczne stąd błąd w stwierdzeniu, że „odporność swoista jest mniej zróżnicowana niż nieswoista” nie był zapewne zamierzony. To odporność swoista (nabyta) jest znacznie bardziej zróżnicowana i specyficzna niż odporność nieswoista (wrodzona).

Doktorantka stawia trafne hipotezy badawcze i ogólny cel badań spójny z tytułem rozprawy. W szczegółowych celach badań Doktorantka wskazuje na prowadzone analizy (mikrobiom, kortyzol, ekspresja genu, lizozym) pomijając skład jakościowy i ilościowy suplementu paszowego oraz gatunki ryb. Cele zestawione są w ujęciu chronologicznym, stąd też zapewne przeprowadzenie doświadczeń, które nie jest właściwym celem badawczym, zostało tak określone przez Doktorantkę.

Zakres prowadzonych badań Autorka rozprawy przedstawiła na czytelny, starannie przygotowanym schemacie, uwzględniając wszystkie niezbędne informacje metodologiczne. W Materiałach i metodach Doktorantka pamiętała o ważnych aspektach zamieszczając oświadczenia etyczne, informacje o pochodzeniu ryb, podchowach wstępnych, aklimatyzacji, warunkach podchowu, przygotowaniu mieszanek i paszy eksperymentalnej, przebiegu eksperymentów, prowadzonych analizach i opracowaniu statystycznym danych. W przejrzystym zestawieniu tabelarycznym materiałów i metod znalazło się określenie „saturacja” i „natlenienie”. W tym miejscu proszę o zasadność podawania wartości dwóch parametrów. Polskie Normy definiują bowiem zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie w mg/L i jest to parametr jakości wody również w zaleceniach dla hodowli ryb.

Na uwagę zasługuje z kolei fakt prowadzenia eksperymentów w tym samym obiegu recyrkulacyjnym w aspekcie analizy modyfikacji mikrobiomu mieszanką paszową u różnych gatunków ryb. Świadczy to o właściwym rozpoznaniu przez Doktorantkę tematu dotyczącego nie tylko mikrobiomu ale i holobiomu ryb hodowlanych i uzyskania rzetelnych wyników badań.

W rozdziale Wyniki Doktorantka zestawiała najistotniejsze dane dla eksperymentów na sumie afrykańskim, hybrydzie jesiotra i siei, w formie opisowej, tabelarycznej i na rysunkach, oddzielnie w zakresie wskaźników podchowu, mikrobiomu jelitowego, aktywności lizozymu, stężenia kortyzolu, ekspresji genu HSP70 w hepatocytach. Autorka starannie przygotowała 4 tabele i 13 rysunków, do których właściwie odnosi się w krótkim opisie istotnych wyników. Doktorantka posiadając duży materiał liczbowy potrafiła przedstawić wyniki analiz w formie porównawczej i skondensowanej.

Dyskusja wyników prowadzona jest w sposób dojrzały naukowo i rzeczowy. Na podstawie uzyskanych wyników autorka weryfikuje założenia przyjęte w pracy. Uzyskane i przeanalizowane w dyskusji wyniki pozwoliły Doktorantce na sformułowanie 11 wniosków, które weryfikują wszystkie postawione hipotezy badawcze. W Podsumowaniu Autorka trafnie i przejrzysto zestawia tabelarycznie uzyskane wyniki.

Szczegółowa analiza rozprawy zawiera jedynie drobne usterki, w tym edytorskie, które pojawiają się w tego typu opracowaniach. Istotne są jednak w mojej ocenie celowość wykonania badań, opracowanie publikacji tworzących jednotematyczny cykl, elementy nowatorskie jakie wnoszą one do nauki, wykonanie etapów badań zgodne z przyjętymi założeniami badawczymi przy pomocy nowoczesnych metod. Doktorantka potrafiła wybrać najlepszy wariant suplementacji wśród testowanych mieszanek, który wdrożony został w gospodarstwie rybackim i przetestowany w przemysłowej hodowli ryb akwariowych. W skali przemysłowej suplementacja paszy mieszanką z maślanem sodu, β -glukanem i witaminami (C, A, D₃, E, K) w ilości odpowiednio 50 i 20mg/l, zawartość witamin stała) wpłynęła na wzrost przeżywalności i tempa wzrostu jesiotrów. Produkt jest wdrażany pod nazwa FishQuatro w postaci preparatu do samodzielnego zastosowania przez hodowców.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wnoszą informacje istotne zarówno dla nauki jak i akwakultury. Doktorantka w rozprawie dowodzi dobrego opanowania warsztatu badawczego, umiejętności podejmowania i realizowania etapów badań naukowych, znajomości metod badawczych i wyzwań dla akwakultury. Stąd moja ocena rozprawy doktorskiej jest wysoce pozytywna.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Martynty Arciuch-Rutkowskiej pt. „Opracowanie składu przemysłowej mieszanki uzupełniającej pozytywnie wpływającej na wzrost, rozwój oraz odporność ryb hodowlanych” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku, poz. 1571 ze zm.). Przedkładam zatem Radzie Naukowej Zootechniki i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Martynty Arciuch-Rutkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Biorąc pod uwagę aplikacyjny charakter badań, zastosowane metody badawcze, wysoką jakość naukową i formę przygotowanego manuskryptu wnioskuję o wyróżnienie rozprawy przez Radę Naukową Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie stosowną nagrodą.

Dr hab. inż. Agata Cejko, prof. IRS-PIB

