



Dr hab. Jacek Walczak  
Zakład Systemów i Środowiska Produkcji

Balice, 29.03.2019r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak** pt. **"Wpływ chelatu żelaza na parametry metaboliczne, immunologiczne i produkcyjne cieląt"** wykonanej pod kierunkiem promotora Pana dr hab. Roberta Kupczyńskiego prof. nadzw. oraz promotora pomocniczego Pana dr nauk wet. Michała Bednarskiego w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

### Wprowadzenie

Chów bydła należy do jednych z najważniejszych kierunków produkcji zwierzęcej w Polsce. Na uzyskiwane tu wyniki wpływ mają zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Do tych ostatnich należy niewątpliwie żywienie, także cieląt. Udoskonalone pod względem hodowlanym zwierzęta, szczególnie rasy holsztyno-fryzyjskiej, posiadają wyższe i specyficzne wymagania pokarmowe, zastrzone dodatkowo specyficznymi uwarunkowaniami technologicznymi, do których zaliczyć należy choćby wczesne odsadzenie cieląt. Prawidłowy odchów tych ostatnich, w tym pełne pokrycie zapotrzebowania pokarmowego, ma decydujący wpływ na ich stan zdrowia, rozwój, wzrost, wykorzystanie potencjału genetycznego oraz wartość hodowlaną przyszłej populacji czynnej. Wszystkie wymienione aspekty znajdują również odniesienie do efektów ekonomicznych uzyskiwanych w produkcji mleka.

### Ocena Formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera łącznie 105 stron, podzielonych na rozdziały:

1. Wstęp, s. 6-8.

Adres do korespondencji:  
32-083 BALICE, ul. Krakowska 1  
tel. : +48 12 35 72 700, +48 666 081 111  
fax : +48 12 422 80 65  
www.izoo.krakow.pl  
e-mail: sekretariat@izoo.krakow.pl

Adres siedziby:  
31-047 KRAKÓW, ul. Sarego 2  
tel. : +48 12 35 72 700, +48 666 081 111  
KRS 0000125481  
NIP 675-000-21-30  
REGON 000079728

2. Przegląd piśmiennictwa, s. 9-24.
3. Cel pracy i hipoteza badawcza, s.26.
4. Materiał i metody, s. 26-34.
5. Wyniki badań, s. 35-70.
6. Dyskusja, s. 71-84.
7. Wnioski, s. 85-86.
8. Spis tabel i wykresów, s. 87-88.
9. Piśmiennictwa, s. 98-102.
10. Streszczenie, s. 103-105.

Ponadto, na początku praca posiada spis treści oraz skorowidz użytych skrótów. W tekście zawarty jest 38 tabel, 1 wykres i 1 schemat. W piśmiennictwie wykazano 167 ponumerowane pozycje literatury, przeważnie angielskojęzycznej, pochodzące z okresu ostatnich 25 lat, jednak w przeważającej mierze z ostatniej dekady. Z wyjątkiem kilku pozycji o charakterze zaleceń referencyjnych, pozostałe stanowią oryginalne prace naukowe. Wszystkie wymienione rozdziały stanowią logiczną całość, zawierając wymagane, podstawowe elementy rozprawy doktorskiej. Praca mająca jednoznacznie charakter naukowy, napisana jest sprawnie, poprawnym językiem, a opisane badania przeprowadzono w skali technicznej, miały charakter eksperymentalny i znaczenie aplikacyjne. Podsumowując stwierdzić należy, że przedstawiona do oceny dysertacja formalnie spełnia wymogi stawiane w *ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.)*

## Ocena merytoryczna

### Podjęta tematyka badawcza

Ważnym problemem w odchowcie cieląt jest podaż, biodostępność i przyswajalność jonów żelaza. Braki w tym zakresie mają wieloraki, negatywny wpływ, tak w procesach hematopoezy, powstawania anemii, jak i upośledzenie wzrostu, przemian metabolicznych, a także odporności z koncentracją IGF-1 włącznie, zapadalności na choroby układu pokarmowego oraz oddechowego. Biodostępność jonów żelaza można zwiększyć poprzez ich chelatyzację z organicznymi ligandami np. aminokwasami. Badania nad suplementacją takimi dodatkami preparatów mlekozastępczych, jak i samego mleka odpajanych przez cielęta, uznać należy za bardzo potrzebne od strony naukowej i mocno uzasadnione gospodarczo.

Przeprowadzone badania wykonano jako samodzielną część większego projektu naukowego pt. „Wykorzystanie drożdży *Y. lipolytica* i *D. hansenii*, enzymów oraz toksyn killerowych do otrzymywania preparatów przydatnych w przemyśle i agrotechnice” (POIG.01.03.01-02-080/12). Problematyka ta wpisuje się tym samym w zakres biogospodarki, nowego pojęcia obejmującego wykorzystanie odnawialnych zasobów biologicznych do celów produkcji przemysłowej.

Podsumowując uznać należy, iż podjęcie badań nad wykorzystaniem oryginalnie opracowanego w innych pracach, chelatu żelaza do poprawy parametrów metabolicznych, odporności oraz produktywności cieląt, posiada duże znaczenie naukowe oraz ważny charakter aplikacyjny.

### Wstęp

W rozdziale tym Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia stosowania preparatów mlekozastępczych w żywieniu cieląt, ich receptur, stosowanych dodatków, w tym chelatów

jako nośników makro- i mikroelementów. Na stronie 6 proponuję zastąpić określenie „wybrane zioła” sformułowaniem „preparaty ziołowe”, bardziej ogólnym i o charakterze technicznym, zwłaszcza pod względem form fizycznych, obejmujących choćby ekstrakty. Również na tej stronie zapis jednoznacznie plasujący kazeinę jako odpad, nie wydaje się właściwy ze względu na aktualnie szerokie wykorzystanie tego białka, nawet do celów przemysłowych, w tym produkcji tworzyw sztucznych. Niewielka objętość wstępu, została zrównoważona w kolejnym rozdziale, poprzez szersze, wieloaspektowe omówienie, zasygnalizowanych problemów.

### **Przegląd piśmiennictwa**

We kolejnej części, podzielonej na 4 podrozdziały Doktorantka w sposób rzetelny i syntetyczny dokonała omówienia specyfiki neonatalnego okresu odchowu, cieląt włączając w to kwestie fizjologii zwierząt, jak również żywieniowych aspektów praktycznego pokrycia ich potrzeb bytowych i produkcyjnych. Rozdział rozpoczyna staranny opis problematyki pierwszych miesięcy życia w tej grupie technologicznej bydła, koncentrujący się na kwestiach zdrowotnych powodowanych brakiem odporności czynnej oraz na najczęściej spotykanych schorzeniach cieląt. W dalszej części rozdziału na tle aspektów rozwoju i wzrostu organizmu cielęcia, omówiono zagadnienia potrzeb pokarmowych, w tym zapotrzebowania i roli jonów żelaza, przechodząc do roli i znaczenia mleka i preparatów mlekozastępczych. Rozdział kończy się omówieniem dodatków funkcjonalnych w żywieniu cieląt, szeroko omawiając stosowane pre, pro i symbiotyki. W trakcie lektury odnotowano kilka uwag natury redakcyjnej. I tak na str. 10 w 2 akapicie określenie „zejść śmiertelnych” proponuje się zastąpić, może mniej zgrabnym, jednak fachowym terminem „upadków”. Na stronie 14 w pierwszym akapicie, na jego początku i końcu przytoczono to samo źródło literaturowe, przy czym jego powtórzenie wydaje się niecelowe, gdyż cały akapit odnosi się wyłącznie do tego źródła. Stwierdzono również brak w spisie literatury, zacytowanych w tym rozdziale pozycji: Dhama i in. 2009 (str. 11), pracy Morrison i in. 2010 (str. 22) oraz Robblee i in. 2003 (str. 23 i 24). Należy również poprawić pisownie źródła Mohr zgodnie ze spisem literatury na Mohri (str. 16). Nadto w kilku zaledwie miejscach stwierdzono brak spacji (str. 9, 12, 15). Wymienione błędy edytorskie nie mają większego znaczenia i nie wpływają na dobrą jakość tego rozdziału.

### **Cel pracy i hipoteza badawcza**

Cel pracy sformułowano w jasny, czytelny sposób bezpośrednio powiązany z jej tytułem. Odnośnie sprecyzowanych poniżej celu, aż 5. hipotez badawczych należy jednak wyrazić pewne zastrzeżenia. O tyle, o ile pierwsze dwie hipotezy zasadniczo wyczerpując przedmiot zrealizowanych badań, są w zupełności merytorycznie wystarczające, to pozostałe wydają się już nieco zbędną próbą doprecyzowania tych pierwszych. Zastosowane ujęcie jest poprawne, lecz zdaje się wprowadzać zaburzenie formy, tym bardziej, że przywoływane w kolejnych hipotezach status immunologiczny, czy anemia stanowią wyraz zachodzących procesów fizjologicznych wymienionych wcześniej. Odnośnie ostatniej z hipotez (nr 5) wyrazić należy opinię, że w swojej drugiej części, nie tyle jest ona ogólnie znanym logicznym wnioskiem, ile do jej przebadania/udowodnienia potrzebna była by większa niż jeden, liczba innowacyjnych preparatów oraz badania o charakterystyce monitoringu. Również pierwsza część tej hipotezy wydaje się nadinterpretacją, bo o ile jak wspomniano w ocenie podjętej tematyki, praca dotyczy samodzielnych badań, ale z większej całości prac poświęconych również *Y. lipolytica*, to odnoszą się one zasadniczo do samego chelatu żelaza. Hipoteza 5 przynależna jest zatem do całości wspomnianego projektu. Stąd proponuję Autorce usunąć ten zapis. Co do pozostałych

hipotez, w celu uzyskania lepszej przejrzystości, poddają pod rozważenie połączenie treści hipotez 1 - 4 w jednym uproszczonym zapisie, bez przywoływania odniesień literaturowych. Te ostatnie mogą być wyłączone przed sformułowany cel i hipotezę jako swoiste, skondensowane do nich wprowadzenie.

### **Materiał i metody**

Doboru materiałów i metod dokonano w prawidłowy sposób, rozdzielając prace badawcze na dwa doświadczenia dotyczące wykorzystania chelatu w preparacie mlekozastępczym i pełnym mleku. W pierwszym przypadku oparte o analogi grupy zwierząt zróżnicowano pod względem dawki chelatu (0,0, 8,0 i 16,0). Przy odpajaniu mleka pełnego grupa kontrolna cieląt nie otrzymywała chelatu, a w doświadczalnej jego udział wynosił 16,0 g. Mimo żywieniowego charakteru doświadczenia, metodyka posiada również opis zastosowanych rozwiązań technologicznych/środowiskowych, co dodatkowo potwierdza dbałość o wyeliminowanie pozadoświadczalnych czynników zmienności. Częścią metodyki jest skrócony opis procesu otrzymywania chelatu.

Przeprowadzona ocena skuteczności działania dodatku chelatu objęła szerokie spektrum badań z wykorzystaniem objawów klinicznych biegunki, odwodnienia i żywotności cieląt, mikrobiologii kału, analizy chemicznej pasz i kału, badania morfologii oraz biochemii krwi łącznie z poziomem IgG, IgM, IGF-1, TNF $\alpha$ , a także parametrami równowagi kwasowo-zasadowej. W ocenie uwzględniono również wyniki produkcyjne cieląt. W metodyce przyjęto analizę statystyczną pozyskiwanych danych, tak pod względem obserwacji odstających, charakteru rozkładu oraz analizy istotności różnic. Dobór zaproponowanych tu metod i testów uznać należy za poprawny.

W omówieniu metodyki badań zaprezentowano zasadniczo wszystkie istotne informacje na temat rozwiązania problemu badawczego tj. doboru materiału badawczego, schematu doświadczeń i układu grup doświadczalnych, terminów, zakresu i sposobu pomiarów oraz użytej aparatury analitycznej wraz z metodami oznaczeń, a także wykorzystanych wzorów i sposobów wykonanych obliczeń. Koniecznym wydaje się jednak dokonanie kilku drobnych uzupełnień o charakterze formalnym, nie umniejszających pozytywnej oceny tego rozdziału pracy. W tym kontekście Doktorantka nie wspomina w jaki sposób mierzono temperaturę wewnętrzną. W spisie literatury brak jest zacytowanej pozycji Sunderland i in. 2003 (str 29). Dla badań laboratoryjnych krwi należy uzupełnić jakiego antykoagulanta użyto przy pobieraniu krwi oraz które z analiz przeprowadzono w surowicy i w pełnej krwi.

### **Wyniki badań**

Prezentacja wyników badań objęła w pracy dwie części, dedykowane każdemu ze zrealizowanych doświadczeń. Każdorazowo omówienia uzyskanych wyników dokonano w poszczególnych podrozdziałach dedykowanych: analizie chemicznej paszy i kału, wynikom produkcyjnym, badaniom bakteriologicznym kału, badaniom klinicznym cieląt, parametrom hematologicznym krwi, równowadze kwasowo-zasadowej, makroelementom i elektrolitom, parametrom biochemicznym krwi, statusowi oksydacyjnemu, parametrom immunologicznym oraz parametrom gospodarki żelazowej. Przedstawienie wyników w poszczególnych podrozdziałach objęło formę tabelaryczną wraz z opisem. Układ tabel jest przejrzysty i czytelny z użyciem odpowiednich jednostek miar, chociaż dla pasz ujednolicić powinno się używane jednostki Energii brutto z wyrażeniem ich w układzie SI (MJ). Ponadto zamiast terminu „wartość dawki pokarmowej” zaleca się użycie tytułu „skład chemiczny i wartość pokarmowa”.

Wyjaśnienia wymaga dlatego w tabelach nie uwzględniono wszystkich parametrów morfologicznych krwi wymienionych w metodyce (brak RDW i PCT). Wszystkie tabele zawierają odniesienia do analizy statystycznej tj. SEM, P-value oraz oznaczonej istotności różnic. Całość wyników zaprezentowanych w rozdziale z wyjątkiem przywołanych wcześniej dwóch odstępstw, pokrywa się z założeniami metodyki, a ich przedstawienie wykonane zostało w należyty, logiczny i zrozumiały sposób.

### **Dyskusja**

W rozdziale tym Kandydatka odniosła się do uzyskanych wyników badań własnych wobec danych literaturowych, dokonując ich interpretacji oraz wynikających stąd uogólnień. Na tym tle uzyskano zgodność wyników przeprowadzonych badań, dokumentując różnice powstałe na z tytułu odmiennego dawkowania chelatu żelaza w odpajonym przez cielęta preparacie mlekozastępczym i mleku pełnym. Zarówno tok rozumowania, użyta argumentacja jak i dobór źródeł, nie pozostawiają zastrzeżeń. Układ dyskusji odpowiada przyjętym w metodyce i omówieniu wyników, analizom poszczególnych parametrów. Nie wszystkie z określonych wcześniej istotności różnic znalazły swe omówienie w tym rozdziale. Nawet jeśli Autorka uznała je za niezwiązane z czynnikiem doświadczalnym, formalnie taką interpretację należałoby zamieścić w przedstawionym tekście. Pewien niedosyt, budzić może sztywny dyskurs prowadzony jedynie na poziomie pojedynczych parametrów, a nie problemów, bez próby syntezy wieloaspektowości przeprowadzonych analiz, podparcia innymi parametrami. W odniesieniu do mleka pełnego i morfologii krwi dla stwierdzonych istotności różnic MCH i MCHC, należy pogłębić dyskusję zwłaszcza, że wniosek nr 2 mówi o zasadniczym braku wpływu stosowania chelatu w tym zakresie. W kontekście wniosku nr 2, bardziej szczegółowo odnieść należy się do istotności różnic w poziomie IgG oraz IgM dla preparatu mlekozastępczego, ale stwierdzonych jedynie dla średnich z grup z całości doświadczenia, których nota bene nie obejmuje przyjęta metodyka. Brak jest natomiast różnic dla tych parametrów na poziomie porównywanych okresów życia cieląt, co z kolei uzasadnia istniejące wnioskowanie. Wykorzystanie średnich z całości okresu pomiarowego i odnotowanych tu istotności różnic dla szeregu innych parametrów, winno znaleźć wyjaśnienie i interpretację, gdyż przeważnie nie są one potwierdzone dla poszczególnych terminów pomiarowych. Nadto, interpretacja na poziomie średnich z całości okresu obarczona jest wpływem zmienności wynikającej z rozwoju organizmu cielęcia. Niemniej, zastosowane podejście gwarantuje jednak większą przejrzystość dyskusji wobec wielokierunkowości zrealizowanych analiz. Wymienione uwagi nie umniejszają całościowej wysokiej jakości przeprowadzonego dyskursu i późniejszego wnioskowania.

### **Wnioski**

Postawione w tym rozdziale wnioski w sposób logiczny wynikają bezpośrednio z treści pozostałych, omówionych rozdziałów. Oprócz 7 szczegółowych wniosków na końcu zamieszczono również ogólne stwierdzenie, odnoszące się do wykorzystanego w badaniach preparatu o jego korzystnym znaczeniu praktycznym. W przypadku drugiego i trzeciego z wniosków, ich końcowe brzmienie uzależnić należy od wcześniejszego zalecenia poszerzenia dyskusji i rozstrzygnięcia kwestii zbiorczych średnich z całości pomiarów. Odnośnie wniosku nr 5 zaleca się jego zasadnicze przerehabilitowanie ze względu na brak całościowego potwierdzenia w przeprowadzonej analizie statystycznej uzyskanych wyników. Z tych samych

względów zalecić należy rezygnację z treści wniosku nr 6 oraz gruntowne przerehabilitowanie wniosku nr 7.

### **Spis tabel i wykresów**

Zamieszczony spis obejmuje wszystkie pozycje występujące w tekście i nie zawiera uchybień.

### **Piśmiennictwo**

Dokonany przez Doktorantkę dobór krajowego i zagranicznego piśmiennictwa ocenić należy za prawidłowy i wystarczający. Znaczna jego część opublikowana została na przestrzeni ostatnich 10 lat. Nie wszystkie wykazane tu pozycje wykorzystano w tekście pracy (Choi i Kim, 2004; Creech i in., 2004; Heinrichs i in., 1995; Novais i in., 2016; Papadopoulos i in., 2009). Ponadto, spis wymaga uzupełnień o wskazane wcześniej, zacytowane a nie wykazane źródła literaturowe.

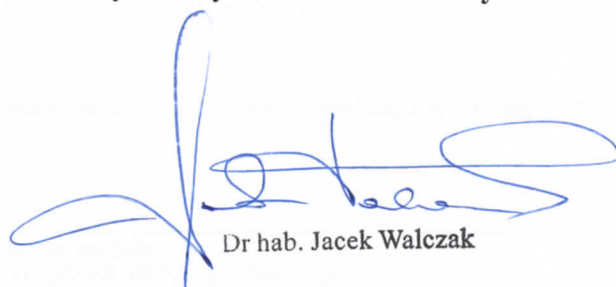
### **Streszczenie**

Praca kończy się streszczeniem w języku polskim i angielskim z wykazem słów kluczowych. Oba zapisy pozostają w dobrej skondensowanej formie, oddają treść pracy.

### **Podsumowanie oceny**

Powstałe w trakcie lektury pracy uwagi i zalecenia omówiono w poprzednich częściach oceny wraz ze sporadycznymi korektami redakcyjnymi. Wszystkie one w niczym nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, którą oceniam zadawalająco. Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki zakres analityczny przeprowadzonych badań i włożony w nie wkład pracy. Spójne tematycznie podejście do praktycznych kwestii wykorzystania chelatu żelaza w żywieniu cieląt i poprawy na tym tle ich stanu zdrowia oraz produktywności, rzetelność realizacji badań oraz interpretacji wyników, uznać należy za oryginalne rozwiązanie ważkiego gospodarczo problemu w oparciu o metody naukowe.

**Biorąc pod uwagę podkreślone w recenzji walory opracowania, znaczący i nowatorski jej charakter stwierdzam, że dysertacja Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak spełnia warunki 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. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia doktora. W związku z tym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Budny-Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. Jacek Walczak