

dr hab. Grzegorz Formicki, prof. UP  
Instytut Biologii,  
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych,  
Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie

Kraków, 30.01.2023

### Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Iwony Ałtyn

Praca nosi tytuł „Analiza substancji niepożądanych – wtórnych metabolitów grzybów pleśniowych w surowcach roślinnych oraz otrzymywanych z nich suplementów diety”. Została napisana przez mgr Iwonę Ałtyn pod opieką Pani dr hab. Magdaleny Twarużek, prof. uczelni na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy.

Skażenie żywności grzybami pleśniowymi jest problemem rangi światowej. Grzyby pleśniowe są organizmami wszędobylskimi charakteryzującymi się szybkim wzrostem w sprzyjających warunkach. Dobre warunki do rozwoju grzybów, a przez to ryzyko skażenia żywności tymi organizmami występują na każdym etapie jej produkcji, przetwarzania i przechowywania. Żywność, w której grzyby pleśniowe i ich metabolity przekroczą dopuszczalne poziomy nie nadaje się do spożycia. Zarodniki grzybów pleśniowych mogą bowiem u człowieka wywołać reakcje alergiczne. Natomiast wtórne metabolity grzybów pleśniowych – mikotoksyny – mają właściwości toksyczne, teratogenne i rakotwórcze. Silne właściwości toksyczne grzybów pleśniowych oraz wysokie ryzyko skażenia żywności tymi organizmami stanowią problem natury zdrowotnej, ekonomicznej i społecznej. Z tego względu ochrona żywności i zdrowia człowieka przed grzybami pleśniowymi stały się przedmiotem zainteresowania dużych międzynarodowych instytucji chroniących zdrowie i stanowiących prawo.

W pracy, którą powierzono mojej ocenie Autorka postawiła sobie za cel zbadanie suplementów diety oraz surowców, z których suplementy te powstają pod kątem skażenia grzybami pleśniowymi i mikotoksynami, a także oszacowanie stopnia zagrożenia konsumentów związanego z obecnością grzybów pleśniowych i mikotoksyn w suplementach diety. W krótkim wstępie, który poprzedza część teoretyczną Autorka uzasadniła cel podjętych badań tym, iż suplementy diety nie zostały uwzględnione w prawie żywnościowym i w związku z tym

brakuje zasad i wymagań jakie powinny spełniać te produkty pod względem bezpieczeństwa konsumentów.

Praca ma strukturę, która rzadko stosowana jest w rozprawach doktorskich z zakresu nauk biologicznych. Tekst został podzielony na dwie duże części zatytułowane „Część teoretyczna” i „Część doświadczalna”. Część teoretyczna została podzielona na 5 podrozdziałów tj. „Potencjalne zanieczyszczenia suplementów diety”; „Ogólne zasady prawa żywnościowego”; „Suplementy diety”; „Aspekty prawne bezpieczeństwa suplementów diety na terenie Unii Europejskiej”; „Bezpieczeństwo stosowania suplementów diety”. Część teoretyczną kończy podrozdział zatytułowany „Cel i zakres pracy”, który został wyłączony z numeracji podrozdziałów i w ten sposób wyodrębniony z części teoretycznej. Część doświadczalna zbudowana jest z rozdziałów, które są charakterystyczne dla prac doświadczalnych. A mianowicie: „Materiał”, „Metody” i „Wyniki”. Rozdziały „Dyskusja” i „Wnioski końcowe” zostały wyłączone z numeracji rozdziałów, które tworzą część doświadczalną. Na początku pracy został zamieszczony wykaz skrótów i akronimów. Natomiast na końcu pracy znajdują się bibliografia, spisy rycin, tabel i wykresów oraz załączniki. Autorka nie zamieściła streszczenia. Całość obejmuje 266 stron tekstu, 40 rycin, 33 tabele, 94 wykresy i 74 strony załączników. Bibliografia zawiera 476 pozycji. Przynajmniej tyle naliczyłem, gdyż Autorka nie wprowadziła numeracji do spisu literatury. Praca jest zatem niezwykle obszerna i warto podkreślić, że bardzo ładna pod względem graficznym. Jej napisanie z pewnością kosztowało Autorkę ogromną ilość pracy nie licząc czasu i pracy, które poświęcono na przeprowadzenie badań. Wysiłek jaki Autorka włożyła w tą dysertację zasługuje na uznanie. Wydaje mi się jednak, że cele można było osiągnąć znacznie łatwiej, przy mniejszym wysiłku i z korzyścią dla tej rozprawy.

W pierwszych rozdziałach części teoretycznej Autorka opisuje biologię grzybów pleśniowych skupiając się na pięciu rodzajach tj. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* i *Penicilium*. Jest to ciekawy, dobrze napisany tekst z odniesieniami do danych historycznych takich jak prace Linka z 1809 roku na temat *Penicilium* czy też prac z XIX wieku i pierwszej połowy XX wieku na temat aspergilozy. Główną krytyczną uwagą jaką mam do tej części jest przeładowanie tekstu cytacjami. Przykładem może być zdanie „Zanieczyszczenie wtórnymi metabolitami grzybów pleśniowych występuje powszechnie w produktach pochodzenia roślinnego, zwłaszcza w zbożach, nasionach, owocach, paszach dla zwierząt”, po którym Autorka zacytowała aż 5 prac naukowych, a wystarczyłoby w tym miejscu zacytować jedną pracę przeglądową. Nadmiar cytowanych tekstów powtarza się w tej pracy dość często co



doprowadziło do rozrostu spisu literatury do prawie pół tysiąca pozycji. Następnie Autorka przeszła do zagrożeń jakie stanowią grzyby pleśniowe dla zdrowia ludzi i zwierząt. Później omówione zostały mikotoksyny, w tym aflatoksyny, cytrynina, ochrakoksyna A, patulina, trichoteceny, zearalenon. Po czym Autorka ponownie wróciła do zagrożeń zdrowia ludzi i zwierząt, których powodem są mikotoksyny. Wydaje mi się, że byłoby lepiej gdyby tekst o biologii grzybów pleśniowych został połączony z tekstem o mikotoksynach lub gdyby te fragmenty zostały umieszczone bezpośrednio jeden po drugim, a dwa rozdzielone teksty o zagrożeniach dla zdrowia ludzi i zwierząt połączone. Przy takim układzie tekstu jak teraz u czytającego rodzi się poczucie chaosu. Nie mam jednak żadnych zastrzeżeń do merytorycznej wartości tego fragmentu pracy. Jest on ściśle związany z meritum dysertacji i stanowi dobre wprowadzenie do celu i zakresu pracy sformułowanych w jej dalszej części. Nie rozumiem natomiast dlaczego Autorka tak wiele miejsca poświęciła zagadnieniom prawa żywnościowego. Oczywiście pewne aspekty należało poruszyć, takie chociażby jak dopuszczalne poziomy mikotoksyn w środkach spożywczych, czy też wykazać, że suplementy diety nie zostały uwzględnione w przepisach prawa żywnościowego. Autorka te informacje słusznie w pracy zawarła, jednak tekst zatytułowany „Ogólne zasady prawa żywnościowego” jest według mnie całkowicie zbędny. Zajmuje on 8 stron, a jego treść znacznie odbiega od zagadnień, którymi zajmują się nauki biologiczne. Mam mieszane odczucia po przeczytaniu kolejnego fragmentu, który został zatytułowany „Suplementy diety”. Są tutaj fragmenty bardzo ważne i związane z meritum pracy jak definicja suplementów diety, krótka informacja o zapisach prawnych na temat suplementów i wykazanie braków pewnych uregulowań, a także informacje z jakich powodów ludzie korzystają z suplementów diety. Są w tej części fragmenty istotne ale nadmiernie rozbudowane jak znakowanie suplementów diety. Są fragmenty zbędne, jak „Etykietowanie suplementów diety” albo „Suplementy diety a środki lecznicze” przeładowane aspektami prawnymi. Są tutaj również skany ulotek informacyjnych, które można znaleźć w aptekach lub przychodniach lekarskich – zupełnie nie pasujące do rozprawy doktorskiej z zakresu nauk biologicznych, niepotrzebne wykresy przedrukowane z materiałów źródłowych np. wykres 4 pt. „Źródła informacji o suplementach diety – zmienna: płeć”. Uważam również, że wykresy 5 i 6 nic nie wnoszą do tej pracy.

Kolejna dawka przepisów prawa znajduje się w rozdziale pt. „Aspekty prawne bezpieczeństwa suplementów diety na terenie Unii Europejskiej”. Autorka wymienia i obszernie cytuje tutaj akty prawne Unii Europejskiej i Polski odnoszące się do suplementów i substancji leczniczych. Analizuje niuanse takie jak kiedy stosowane jest prawo krajowe a kiedy Unijne. Opisuje procedurę wprowadzania suplementu do obrotu. To wszystko moim zdaniem jest zbędne, a już



na pewno niepotrzebne są obszerne fragmenty polskiego prawa żywnościowego i teksty z dyrektyw i rozporządzeń stanowiących prawo Unijne. Są też istotne informacje – np. wykaz składników, które można stosować do produkcji suplementów wraz z najwyższymi tolerowanymi poziomami spożycia tych składników. Jednak rozdział jest przeładowany informacjami nieistotnymi dla tej pracy. Praca zyskałaby gdyby ten rozdział skrócić z 8 do najwyżej 2 stron. Autorka powinna również skrócić rozdział pt. „Bezpieczeństwo stosowania suplementów diety”. Przede wszystkim dlatego, że jest on w głównej mierze wypełniony dosłownymi i bardzo obszernymi cytatami z raportu NIK z 2017 roku, które należałoby wyrzucić a pozostawić wyłącznie informacje istotne dla tej pracy. Zdecydowanie niepotrzebne są tutaj kolejne skany ulotek z ostrzeżeniami publicznymi o wycofaniu suplementów diety. Na właściwe tory rozumowania Autorka wróciła w rozdziale pt. „Cel i zakres pracy”, w którym zgodnie z metodologią przyjętą w naukach biologicznych została postawiona hipoteza i określone cele – główny i robocze. Hipoteza mówi, że suplementy diety zawierają mikotoksyny, a zastosowanie nowoczesnych metod analitycznych umożliwi określenie ryzyka zdrowotnego dla konsumentów.

Kolejna część pracy została zatytułowana „Część doświadczalna”. Nie jest to dobry tytuł, gdyż doświadczenie w biologii polega na przeprowadzeniu badań w kontrolowanych przez eksperymentatora warunkach. Natomiast ta praca bazuje na obserwacji zjawiska, na które badacz nie ma wpływu. Bardziej odpowiedni byłby tytuł „Część badawcza”, albo „Część praktyczna”, skoro poprzedzającą część zatytułowano „Część teoretyczna”.

Rozdział ten rozpoczyna się od podziału materiału badawczego według formy, w której został zbadany i liczby przebadanych próbek każdej formy. W sumie zostało przebadanych 290 próbek. Liczba próbek poszczególnych suplementów nie budzi zastrzeżeń oprócz kilku przypadków. Płyn z głogu dwuszyjkowego był reprezentowany tylko przez 3 próbki, tabletki z ostropestu plamistego przez 3 próbki, tabletki z wierzbownicy drobnokwiatowej przez 2 próbki, tabletki ze stewii 2 próbki. Przebadano tylko jedną próbkę płynu z pyłku pszczelego. **W związku z powyższym chciałbym prosić Autorkę, o wyjaśnienie w czasie publicznej obrony, czym kierowała się przy doborze próbek do badań? Dlaczego występują duże różnice w liczebności próbek różnych suplementów? Czy mała liczba próbek niektórych suplementów nie wpłynęła na jakość wyników i wnioski?**

Dalej Autorka przeszła do charakterystyki suplementów wybranych do badań. Opis ten obejmuje materiał, z którego są one wykonywane i jego pochodzenie. Uwaga Autorki koncentruje się również na właściwościach zdrowotnych suplementów. To bardzo interesujący tekst. Mam jednak wrażenie,



że większość z informacji tutaj zaprezentowanych powinna znaleźć się w części teoretycznej zastępując obszerne analizy prawa żywnościowego. Techniczny opis wykonanych analiz, użytych odczynników, materiałów i sprzętu został zrobiony zgodnie z obowiązującymi zasadami w naukach biologicznych i nie budzi moich zastrzeżeń. Na uwagę zasługuje użycie nowoczesnych i bardzo czułych metod jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją fluorescencyjną i wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją tandemowej spektrometrii mas. Narażenie konsumentów obliczono wykorzystując medialne stężenia mikotoksyn wykazane w badaniach i dawki spożywanego suplementu w przeliczeniu na masę ciała.

Metodyka badań nie zawiera informacji o przeprowadzonych analizach statystycznych. Opis analiz statystycznych został umieszczony mniej więcej w 2/3 rozdziału „Wyniki”. Czytający analizując wyniki nie wie jakie metody statystyczne zostały użyte i czy w ogóle jakieś użyto, a tabele i wykresy nie zawierają informacji na ten temat. Dobrze jednak, że analiza statystyczna została przeprowadzona. W opisie metod statystycznych Autorka informuje, że przeprowadzono badania rozkładu zmiennych i wobec braku rozkładu normalnego zdecydowano się na zastosowanie metod nieparametrycznych. Wstępne analizy statystyczne zostały zatem dobrze przeprowadzone. Szkoda, że Autorka nie podała poziomu istotności różnic, który przyjęła w badaniach. Dalsze obliczenia statystyczne były oparte na analizie korelacji rang Spearmana. Zostały policzone korelacje między zawartością grzybów pleśniowych i zawartością mikotoksyn w próbkach, korelacje między zawartością różnych grzybów pleśniowych w próbkach i pomiędzy zawartością różnych mikotoksyn oraz takie same korelacje w poszczególnych produktach i surowcach do przygotowania suplementów. Bardzo dobra jest graficzna prezentacja wyników tych analiz. Wyniki korelacji zostały ponadto opisane i dodatkowo przedstawione w tabelach umieszczonych w załączniku. Brakuje natomiast porównań statystycznych pomiędzy różnymi suplementami, ich formami i surowcami. Nie wiemy przez to czy różnice w stężeniu mikotoksyn i grzybów pleśniowych pomiędzy utworzonymi grupami badawczymi są statystycznie istotne. Ten brak może mieć wpływ na wnioski płynące z pracy. Mogło się przecież zdarzyć że do analiz trafiły próbki, które były wyjątkowo mocno lub słabo skażone. Analiza statystyczna pozwoliłaby ocenić jakie jest prawdopodobieństwo tego, że popełniony został błąd przy wnioskowaniu. Sugeruję, żeby przed publikacją tych wartościowych wyników przeprowadzić taką analizę np. wykorzystując, z racji braku rozkładu normalnego, test ANOVA Kruskala-Wallisa i wielokrotne porównanie średnich rang. Prezentacja wyników w tej pracy w postaci wykresów i tabel byłaby świetna gdyby zawierała dokładniejsze informacje na temat rodzaju średnich, rodzaju odchyleń i istotności



różnic. Niemniej jednak jej graficzna strona a przede wszystkim to jakie jest znaczenie zawartych w niej informacji zasługują na pozytywną ocenę.

Pozytywnie oceniam także rozdział „Dyskusja”, chociaż również i on zawiera pewne mankamenty. Autorka skupiła się tutaj przede wszystkim na porównaniu swoich wyników z wynikami podobnych prac prowadzonych przez innych autorów. Pod tym względem rozdział jest napisany dobrze. Wyniki uzyskane przez Autorkę są w znacznej mierze zgodne z wynikami podawanymi przez innych badaczy, którzy analizowali skażenie ziół wchodzących w skład suplementów albo leki i produkty spożywcze o podobnym składzie do suplementów diety analizowanych w tych badaniach. Zawarty tu przegląd literatury w połączeniu z wynikami własnymi Autorki uprawniają do potwierdzenia hipotezy o zagrożeniu jakie stanowi skażenie suplementów grzybami pleśniowymi i mikotoksynami dla zdrowia ludzi. W przeciwieństwie do wielu innych rozdziałów tej pracy dyskusja jest trochę za krótka. Przydało by się trochę więcej docieklivosti. Na przykład cytowana tutaj praca Bessaire i wsp. z 2019 roku wykazała, że współwystępowanie mikotoksyn w tym samym materiale badawczym było rzadkie i najczęściej ograniczone do dwóch różnych mikotoksyn. Natomiast w rozdziale wyniki Autorka wykazała, że w przypadku wielu suplementów nawet 50% próbek zawierało więcej niż dwie mikotoksyny. **Rodzi się zatem pytanie jakie czynniki wpływają na współwystępowanie grzybów pleśniowych i mikotoksyn? Proszę o doktorantkę o odpowiedź na to pytanie w czasie publicznej obrony. Autorka nie wyjaśniła w dyskusji dlaczego w różnych suplementach dominują różne grzyby pleśniowe. Proszę o podanie wyjaśnienia na obronie.**

Wnioski zostały prawidłowo sformułowane. Mają one oparcie w wynikach i przeprowadzonej dyskusji. Stanowią podstawę do przyjęcia postawionej hipotezy i świadczą o tym, że cele pracy zostały osiągnięte. Wnioski z pracy stanowią również istotną przesłankę dla wprowadzenia monitoringu suplementów diety pod względem obecności grzybów pleśniowych i mikotoksyn. W tym miejscu chciałbym doktorantce zadać kolejne pytanie. W pracy przeprowadzone zostały obliczenia korelacji pomiędzy zawartością grzybów pleśniowych i mikotoksyn w różnych układach. Na opisanie tych korelacji poświęcono 16 stron w głównym tekście pracy i 36 stron załączników. Tymczasem w dyskusji w ogóle te obliczenia nie są wspomniane. Również nie znalazły one odzwierciedlenia we wnioskach. **W związku z powyższym chciałbym zapytać jaki był cel tych obliczeń?**

Spis literatury jak już wcześniej wspomniałem jest zbyt obszerny. Wydaje mi się, że Autorka mogła lepiej literaturę dobrać, co zmniejszyło by ilość cytowanych pozycji – na przykład poprzez cytowanie większej ilości prac przeglądowych i rezygnację z cytowania prac, które

niewiele wnoszą to tej dysertacji. Dziewięć prac wykazanych w spisie nie jest cytowanych w tekście pracy. Są to:

Abou-Donia, M.A. 2008. Microbiological quality and aflatoxinogenesis of Egyptian spices and medicinal plants. *Global Veterinaria*, 2(4): 175–181.

Aliyazicioglu, Y., Deger, O., Ovali, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioglu, Y., Karahan, C.S. 2005. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *Int Immunopharmacol*, 5:1652–1657.

Bolechová, M., Benešová, K., Běláková, S., Čáslavský, J., Pospíchalová, M., Mikulíková, R. 2015. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*, 47: 108–113.

Mc Cormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J. 2011. Trichthecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins (Basel)*, 3: 802–814.

Piacentini, K.C., Rocha, L.O., Savi, G.D., Carnielli-Queiroz, L., Fontes, L.D.C., Correa, B. 2019. Assessment of Toxigenic *Fusarium* Species and Their Mycotoxins in Brewing Barley Grains, *Toxins*, 11(1): 31.

Piacentini, K.C., Savi, G.D., Pereira, M.E.V., Scussel, V.M. 2015. Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chem.*, 187:204–209.

Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, Kevin, J., del Mazo, J., Grasl-Krapp, B., Hogstrand, C., Hoogrnboom, R.L., Leblanc, CH.J., Nebbia, S.C., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, CH., Marko, D., Oswald, P.I., Piersma, A., Routledge, M., Schlatter, J., Baert, K., Gergelova, P., Wallace, H. 2020. EFSA.Risk assessment of aflatoxins in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal*, 18(3): 6040.

Tassaneeyakul, W., Razzazi-Fazeli, E., Porasuphatana, S., Bohm, J. 2004. Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand. *Mycopathologia*, 158: 239–244.



Valadares-Deveza, M., Keller, K.M., Lorenzon, A.M.C., Nunes, T.L.M., Sales, O.E., Barth, O.M. 2015. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. Braz. J. Microbiol., 46: 1171–1176.

Cieszy mnie natomiast to, że Autorka powołuje się w swojej dysertacji na prace naukowe Pani profesor Twarużek, Pana prof. Grajewskiego oraz innych osób z zespołu badawczego Katedry Fizjologii i Toksykologii, którzy mają znaczące osiągnięcia w pracach badawczych nad grzybami pleśniowymi i mikotoksynami.

### Konkluzja

W swojej recenzji wskazałem wiele niedociągnięć występujących w pracy. Jest ona przede wszystkim zbyt obszerna. Należałoby usunąć duże fragmenty tekstu, które nie mają charakteru naukowego. Podobnie należałoby postąpić z niektórymi wykresami i rycinami. Inne, bardziej istotne części pracy, jak chociażby dyskusja powinny być rozwinięte. Obliczenia statystyczne powinny być uzupełnione i odpowiednio zinterpretowane. Niezaprzeczalnie praca zawiera bardzo mocne punkty, które przeważają nad słabszymi elementami. Są to: 1) istotne dla zdrowia ludzi i nowe zagadnienie badawcze; 2) wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu nowoczesnych i bardzo precyzyjnych metod; 3) wnioski, które wskazują konieczność poprawienia kontroli nad jakością suplementów diety pod kątem toksykologicznym oraz wprowadzenia zmian do prawa żywnościowego.

W związku z powyższym stwierdzam, że oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia kryteria określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy o dopuszczenie Pani mgr Iwony Ałtyn do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

