

Rzeszów, 28.01.2023 r.

Prof. dr hab. Marek Koziarowski, dr h.c.
Instytut Biologii i Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

OCENA

rozprawy doktorskiej

mgra Roberta Kosickiego

pt: Ocena współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy z dnia 23.11.2022 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Katedra Fizjologii i Toksykologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, pod opieką naukową Promotora dr. hab. Magdaleny Twarużek, profesora uczelni.

Na rozprawę doktorską składa się sześć oryginalne prace, opublikowane w latach 2016 - 2022 w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 17,988.

Poniżej wyszczególniono publikacje Doktoranta, wchodzące w skład dorobku naukowego przedłożonego w ramach ubiegania się o stopień doktora nauk biologicznych:

1. Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016; 215:165-180. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012 (punkcja MEiN = 200; IF = 1,755) Udział procentowy: Kosicki R 60%, Błajet-Kosicka A 20%, Grajewski J 10%, Twarużek M 10%
2. Kosicki R, Twarużek M, Dopierała P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). *Toxins (Basel)*. 2020; 12(6):423. doi: 10.3390/toxins12060423 (punkcja MEiN = 100; IF = 4,546) Udział

- procentowy: Kosicki R 50%, Twarużek M 20%, Dopierała P 10%, Rudzki B 10%, Grajewski J 10%
3. Kosicki R, Twarużek M, Kannenberg K, Grajewski J. Contamination of Acorns of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.), as Feed Material, by Moulds and Mycotoxins. *Ann Anim Sci.* 2021; 21(3):977-990. doi: 10.2478/aoas-2021-0020 (punkacja MEiN = 100; IF = 2,090) Udział procentowy: Kosicki R 70%, Twarużek M 10%, Kannenberg K 10%, Grajewski J 10%
 4. Grajewski J, Kosicki R, Twarużek M, Błajet-Kosicka A. Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption. *Toxins (Basel).* 2019; 11(5):254. doi: 10.3390/toxins11050254 (punkacja MEiN = 100; IF = 3,531) Udział procentowy: Grajewski J 20%, Kosicki R 50%, Twarużek M 10%, Błajet-Kosicka A 20%
 5. Twarużek M, Kosicki R, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Ałtyn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon.* 2020; 188:172-177. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.10.021 (punkacja MEiN = 100; IF = 3,033) Udział procentowy: Twarużek M 20%, Kosicki R 50%, Kwiatkowska-Giżyńska J 10%, Grajewski J 10%, Ałtyn I 10%
 6. Kosicki R, Buharowska-Donten J, Twarużek M. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. *Toxicon.* 2021; 200:183-188. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.08.002 (punkacja MEiN = 100; IF = 3,033) Udział procentowy: Kosicki R 70%, Buharowska-Donten J 20%, Twarużek M 10%

Łączny Impact Factor (IF) dla prac naukowych wchodzących w skład cyklu wynosi 17,988. Suma punktów MEiN 700.

Do oceny dołączony został manuskrypt napisany w języku polskim stanowiący kompendium uzyskanych wyników przedstawionych w pracach oryginalnych.

Indywidualny wkład Doktoranta w powstanie zaprezentowanych oryginalnych prac potwierdzony przez współautorów należy uznać za wystarczający do przedłożenia ich Dostojnej Radzie Naukowej w celu procedowania dalszego postępowania. Doktorant uczestniczył między innymi w planowaniu eksperymentów, pobieraniu materiału do badań, przeprowadzaniu analiz i opracowaniu wyników (oświadczenia PT Współautorów w załączeniu). We wszystkich przedstawionych do oceny pracach wkład Doktoranta przekraczał 50 %.

Tematyka załączonych publikacji dotyczy zagadnień związanych z współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym.

Przedstawiony do oceny manuskrypt, bez załączonych kserokopii oryginalnych prac i oświadczeń współautorów liczy 109 stron. Zawiera następujące rozdziały: Streszczenie, Abstrakt, Wprowadzenie w tematykę mikotoksyn wraz z charakterystyką głównych grup mikotoksyn, Strategie wyeliminowania zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w materiałach Roślinnych, Cele pracy, Materiały i metody, Metodyka statystyki, Wyniki i dyskusja, Wnioski oraz liczne pozycje piśmiennictwa. Manuskrypt napisany jest poprawnym językiem z zachowaniem wymagań przewidzianych dla opracowań naukowych. Dodatkowo w treści manuskryptu Autor zaprezentował 14 tabel i 16 rysunków.

Sześć oryginalnych prac, w których zawarte są wyniki badań Doktoranta i współpracowników z Katedry Fizjologii i Toksykologii zostały opublikowane w czasopismach liczących się na arenie światowej nauki ocenianych przez afiliację współczynnika wpływu-IF. Informuje to recenzenta, że przed przyjęciem do druku poddane zostały wnikliwej analizie i ocenie przez recenzentów, uznanych w świecie specjalistów w zakresie badań nad mikotoksynami. Powołany na recenzenta pracy doktorskiej pozwolę sobie ocenić zaprezentowany autoreferat zgodnie z wymaganiami dla postępowań o uzyskanie stopnia doktora.

W zaprezentowanych pracach Doktorant dokonał oznaczenia poziomu najczęściej spotykanych mikotoksyn w różnorodnym materiale biologicznym. Czyni to zaprezentowane wyniki niezwykle wartościowe nie tylko w aspekcie poznawczym ale i praktycznym, szczególnie dzisiaj w epoce masowej produkcji żywności i rozwiniętego przechowalnictwa.

Ważność zaprezentowanych wyników dla medycyny ludzkiej jak i zwierzęcej powoduje, że ocena prezentowanych wyników musi być wysoka, zarówno w zakresie doboru tematyki badawczej, użytych nowoczesnych metod analitycznych, jak i celowości badań. Należy wspomnieć, że Katedra Fizjologii i Toksykologii Wydziału Nauk Biologicznych w Bydgoszczy zaliczana jest w Polsce i Europie do wiodących jednostek w zakresie badań nad biologią mikotoksyn.

Na bazie wcześniej opublikowanych wyników i wiedzy własnej zaprezentowanej w szeroko opracowanym wstępie Doktorant postawił sobie poniższe cele:

- Opracowanie metod badawczych oznaczania mikotoksyn w materiale roślinnym, paszach, żywności (piwo, zielona kawa), a także w płynie ustrojowym (surowica);
- Ocena stopnia zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w paszach:wraz z określeniem korelacji pomiędzy badanymi mikotoksynami;

- Porównanie występowania i zawartości ochratoksyny A w próbkach surowicy osób dializowanych i zdrowych.

W trakcie badań opracowano i wykorzystano najnowsze metody analityczne oparte na technikach ekstrakcji ciało stałe-ciecz lub ciecz-ciecz. Do oczyszczania ekstraktów zastosowano technikę ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem m.in. kolumnienek powinowactwa immunologicznego oraz kolumnienek wypełnionych materiałem jonowymiennym na bazie krzemionki. Do oznaczenia mikotoksyn w oczyszczonych ekstraktach zastosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS) lub z detektorem fluorescencyjnym (HPLC-FLD). Podane w tekście parametry oceny jakości oznaczeń wskazują, że wartość uzyskanych wyników jest niezwykle wysoka i charakteryzuje się dużą czułością oznaczeń. Dodatkowo do badań użyto odczynników najwyższej jakości i czystości, co pozwoliło na osiągnięcie wiarygodnych wyników. Użycie takich metod analitycznych odpowiednio pobrany materiał badawczy przy jasno określonym, w pełni zrealizowanym celu badań oraz dogłębna analiza uzyskanych wyników zaskutkowały przyjęciem prac do druku w wysoko impaktowych czasopismach.

W trakcie wykonywania badań Doktorant analizował obecność oznaczania aflatoksyn w surowcach i paszach ochratoksyny A (OTA) w zielonej kawie, surowcach i paszach, ochratoksyny A (OTA) w piwie, ochratoksyny A (OTA) w płynie ustrojowym, cytryniny w zielonej kawie, trichotecenów i zearalenonu (ZEN) w zielonej kawie, surowcach i paszach, trichotecenów i zearalenonu (ZEN) w piwie fumonizyn surowcach i paszach. W analizach wdrożono weloskładnikową metodę oznaczania mikotoksyn w materiale roślinnym.

Problem zanieczyszczenia żywności i pasz mikotoksynami ma znaczący wpływ na gospodarkę. Powodują one straty produkcji roślinnej, zwierzęcej i stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi. Zgodnie z obowiązującymi przepisami, przekroczenie wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu mikotoksyn skutkuje zakazem dopuszczenia ich do obrotu krajowego jak i międzynarodowego. W okresie badań własnych Doktorant w ciągu 2 lat (2011-2014) przeanalizował łącznie 1384 prób surowców roślinnych i pasz (295 próbek kukurydzy, 143 próbki kiszzonek z kukurydzy, 466 próbek zbóż drobnoziarnistych oraz 480 próbek pasz pełnoporcjowych dla trzody chlewnej, drobiu i bydła) pod kątem obecności deoksyniwalenolu (DON), niwalenolu (NIW), toksyny T-2, toksyny HT-2, zearalenonu (ZEN), fumonizyny (FB), ochratoksyny A (OTA) i aflatoksyny (AF) (publikacja D1). W 24 badanych próbkach zawartość mikotoksyn przekroczyła poziomy wskazane przez UE (deoksyniwalenol w 4 próbkach kiszzonek z kukurydzy, 1 próbce pszenicy oraz 1 próbce paszy pełnoporcjowej; suma toksyn T-

2+HT-2 w 3 próbkach kukurydzy, 2 próbkach zbóż oraz 6 próbkach pasz; ZEN w 5 próbkach pasz pełnoporcjowych; OTA w 2 próbkach pasz).

Badania Doktoranta wykazały że surowce roślinne są w znacznym stopniu zanieczyszczone mikotoksynami, aczkolwiek w wielu przypadkach nie przekraczały wartości dopuszczalnych. Najczęściej występującymi mikotoksynami były deoksyniwalenol (DON) i zearalenon (ZEN) – obecne w ponad 95% próbek, a najbardziej zanieczyszczonymi matrycami były kukurydza i mieszanki paszowe. Dalsze wykonanie ponad 8000 oznaczeń w próbkach surowców roślinnych wykazało, iż w 75% badanych prób współwystępuje 5 mikotoksyn. Potwierdzono statystycznie istotne korelacje między stężeniami mikotoksyn dla deoksyniwalenolu (DON) i zearalenonu (ZEN) oraz dla toksyn T-2 i HT-2. Ponadto korelacje o słabej mocy stwierdzono dla mikotoksyn produkowanych przez różne gatunki pleśni (ochratoksyna A (OTA) i deoksyniwalenol (DON) oraz ochratoksyna A (OTA) i zearalenon (ZEN). Badania żołędzi wykazały wysokie stężenia kwasu mikofenolowego (14,6 mg/kg), a także patuliny (50 µg/kg).

Spośród mikotoksyn oznaczanych w próbkach piwa najczęściej wykrywanymi były ochratoksyna A (OTA), zearalenon (DON) oraz toksyna HT-2, co zdaniem recenzenta może być czynnikiem ryzyka. Doktorant stwierdził występowanie wyższych poziomów mikotoksyn w piwach rzemieślniczych, sugerując że powinny one być częściej badane, aby chronić zdrowie „pasjonatów piwa”. Badania zielonej kawy i suplementów diety zawierających jej ekstrakt wykazały częste zanieczyszczenie próbek ochratoksyną A (OTA) oraz pleśniami ją wytwarzającymi. Wyniki badań uzasadniają wdrożenie odpowiednich środków kontroli mikologicznej, zwłaszcza w odniesieniu do produkcji suplementów diety, w których najwyższe stężenie ochratoksyny A (OTA) wynosiło 31,4 µg/kg (wartość ponad 6-krotnie wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom dla kawy), a które są powszechnie uważane za zdrowe i bezpieczne. W badaniach ludzkich próbek biologicznych (surowica) nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniach ochratoksyny A (OTA) u osób zdrowych i poddawanych dializie, a także przy porównaniu wyników grupy kontrolnej i poszczególnych grup wiekowych. Średnie poziomy ochratoksyny A (OTA) u dializowanych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek oraz zdrowych ochotników były porównywalne z obserwowanymi w innych krajach europejskich (za wyjątkiem krajów bałkańskich, gdzie występuje bałkańska endemiczna nefropatia).

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie poniższych wniosków:

1. Opracowanie i adaptowanie do stosowania w badaniach własnych metodyki analiz spełnia kryteria ustanowione przez UE dla urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn.

2. Badania własne wykazały, że surowce roślinne, jak i pasze są w znacznym procencie zanieczyszczone mikotoksynami, z wartościami (wyznaczonymi przez UE)względnie niskimi. Niemniej jednak należy pamiętać, że poziomy te ustalone są dla pojedynczych parametrów, a w naturze zwykle występuje w badanym materiale kilka mikotoksyn, a ich biologiczny efekt może się istotnie różnić, między innymi zsumować.
3. Stwierdzono statystycznie istotne korelacje o różnej mocy (od silnej do średniej) pomiędzy stężeniami mikotoksyn dla deoksyniwalenolu (DON) i zearalenonu (ZEN) (istotne) oraz dla toksyny T-2 i HT-2. Oraz korelacje o słabej mocy dla ochratoksyny A (OTA) i deoksyniwalenolu (DON) oraz ochratoksyny A (OTA) i zearalenonu (ZEN).
4. W piwie stwierdzono najczęściej występowanie ochratoksyny A (OTA), deoksyniwalenolu (DON) oraz toksyny HT-2. Przy czym wyższe ich wartości Doktorant stwierdził w piwach produkcji rzemieślniczej.
5. Badania żołądźi jako potencjalnego materiału paszowego wykazały wysokie stężenia kwasu mikofenolowego (14,6 mg/kg), a także patuliny (50 µg/kg), substancji o działaniu teratogennym i rakotwórczym.
6. Badania zielonej kawy i suplementów diety zawierających jej ekstrakt wykazały częste zanieczyszczenie próbek ochratoksyną A (OTA) oraz pleśniami ją wytwarzającymi
7. Wyniki badań uzasadniają wdrożenie odpowiednich środków kontroli mikologicznej, zwłaszcza w odniesieniu do produkcji suplementów diety, w których najwyższe stężenie ochratoksyny A (OTA) wynosiło 31,4 µg/kg (wartość ponad 6-krotnie wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom dla kawy), a które są powszechnie uważane za zdrowe i bezpieczne.
8. Badania próbek biologicznych (surowica) nie wykazały statystycznie istotnych różnic w stężeniach ochratoksyny A (OTA) u osób zdrowych i poddawanych dializie. Nie stwierdzono również statystycznie istotnych różnic w stężeniach OTA przy porównaniu wyników grupy kontrolnej i poszczególnych grup wiekowych. Badania potwierdziły narażenie polskiej populacji na OTA. Średnie poziomy OTA u dializowanych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek oraz zdrowych ochotników były porównywalne z obserwowanymi w innych krajach europejskich (z wyjątkiem krajów bałkańskich, gdzie występuje BEN)

Podsumowując Autor w autoreferacie po raz pierwszy zaprezentował wyniki badań, w którym na tym samym materiale biologicznym – wykazał obecność różnych mikotoksyn, co wskazuje na konieczność prowadzenia badań obecności i ich poziomów równolegle. Taki układ

metodyki pozwala jednoznacznie określić stopień zagrożenia obecnością mikotoksyn dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Czyni to zaprezentowany cykl badań niezwykle wartościowym i wiele wnoszącym do nauki nie tylko w zakresie podstawowym, ale i aplikacyjnym. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że pomimo określania współzależności pomiędzy wieloma mikotoksynami, uzyskane wyniki po analizie statystycznej w treści przedstawione zostały w sposób czytelny i zrozumiały, co jest przydatne przy ocenie możliwości działania synergistycznego.

Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie wraz z załączonymi oryginalnymi opublikowanymi pracami stanowią cenny wkład do nauki i poznania zagrożeń włączonych w produkcję pasz, jak i żywności dla ludzi i zwierząt.

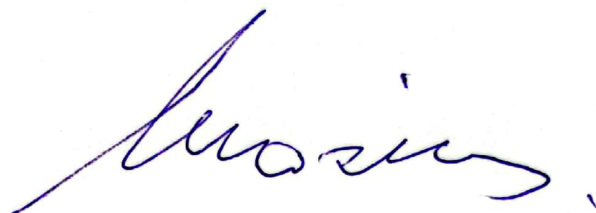
W ocenianym opracowaniu oraz załączonych pracach Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki będący kontynuacją szeroko pojętej problematyki badawczej macierzystej jednostki, w szczególności Pani Profesor Promotor oraz badań Kierownika Katedry Pana Profesora Jana Grajewskiego, oraz znajomość światowego piśmiennictwa, która umożliwia szeroką dyskusję w odniesieniu do wybranych zagadnień badawczych. Już dzisiaj można mówić o powstaniu szkoły badań nad mikotoksynami w Katedrze. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorant posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Roberta Kosickiego pt: **Ocena współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym** w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ocenianą pracę doktorską można zrekapitulować *Pro Bono Hominum et animalium*.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich twórczy charakter, co również uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kosinski', is written in a cursive style.