

Poznań, dnia 19 styczeń 2023 r.

prof. dr hab. Agnieszka Waśkiewicz
Katedra Chemii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana **mgr. Roberta Kosickiego**

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

wykonanej w Katedrze Fizjologii i Toksykologii, na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Twarużek, profesor uczelni.

Podstawą przygotowania oceny rozprawy doktorskiej jest pismo Pana dr. hab. Igora Chybickiego, profesora uczelni – Przewodniczącego Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych z dnia 23 listopada 2022 roku oraz uchwała tejże Rady (BS/230/2022).

Dobór i znaczenie tematu

Bioróżnorodność zarówno grzybów mikroskopowych obecnych w płodach rolnych jak i samych roślin sprawiają, że nieustannie zmienia się profil toksycznych metabolitów przez grzyby tworzonych. To z kolei pociąga za sobą konieczność nieustannego weryfikowania wiedzy na temat patogenów grzybowych, powstających mykotoksyn, warunków biosyntezy tych związków i ich szkodliwości dla ludzi, zwierząt i roślin. Szerokie spektrum działań toksycznych i zazwyczaj wysoka termostabilność sprawiają, że obecność mykotoksyn w płodach rolnych i żywności nadal niesie ze sobą poważne zagrożenia zdrowotne.

W chwili obecnej problematyka występowania mykotoksyn w produktach spożywczych i ich oddziaływania na organizm ludzki została dość dobrze poznana lecz monitoring oparty na stosownych rozporządzeniach, normach, regulacjach prawnych i rozwiniętej sieci

laboratoriów analitycznych jest skoncentrowany głównie na obecności tych ksenobiotyków w zbożach i ich produktach.

Pojawiające się w ostatnich latach doniesienia o obecności mykotoksyn w aktykach spożywczych oraz w roślinach innych niż zboża np. w szparagach, papryce, ziarnie kakao, figach, orzechach, serach, a także w niektórych fermentowanych produktach np. w sosie sojowym oraz suplementach diety, wskazują na kolejne - dotychczas nie objęte normami - ważne z punktu widzenia konsumenta, źródła zanieczyszczeń żywności.

Ponadto, rozwój nowoczesnych technik analitycznych pozwala oznaczać profil wtórnych metabolitów grzybowych w jednym biegu analitycznym przy coraz niższych limitach detekcji, z uwzględnieniem skoniugowanych form tych toksycznych metabolitów (związanych najczęściej z matrycą roślinną bądź grzybową), które uwalniane do form podstawowych w procesie trawiennym stanowią dodatkowe zagrożenie zdrowotne.

Podjęta w rozprawie doktorskiej tematyka bardzo dobrze wpisuje się w ten nurt badawczy i obejmuje zagadnienia związane z identyfikacją mykotoksyn w różnych matrycach przy użyciu nowoczesnych technik chromatograficznych.

Struktura pracy - ocena formalna

Pan mgr Robert Kosicki przedstawił do oceny jednotematyczny cykl sześciu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej pod wspólnym tytułem „*Ocena współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym*”. Rozprawa doktorska została przygotowana starannie w postaci 109-stronicowego Autoreferatu składającego się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, teoretycznego wstępu, celów badawczych, omówienia wyników wraz z ich dyskusją, wniosków końcowych oraz bibliografii zawierającej 242 odnośniki literaturowe. Ponadto, integralną część Autoreferatu (w postaci załączników) stanowią kopie 6 publikacji naukowych wraz z oświadczeniami współautorów o ich wkładzie w powstanie manuskryptów. W trzech pierwszych pracach oraz w ostatniej (D1-3, D6) Doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem o wysokim procentowym udziale w ich przygotowaniu (50-70%), natomiast w czwartej i piątej publikacji (D4, D5), jako jej drugi autor, ma udział 50%. We wszystkich przedłożonych publikacjach, które ukazały się w latach 2016-2021 Doktorant pełnił kluczową rolę będąc odpowiedzialnym za koncepcje badawcze, wykonanie większości prac eksperymentalnych, opracowanie i analizę wyników oraz redakcję manuskryptu. Prace naukowe zostały opublikowane

w czasopismach z listy *Journal Citation Report* o sumarycznym wskaźniku IF=17,988 i sumie punktów 700 zgodnie z wykazem listy A czasopism punktowanych MEiN.

Praca doktorska opracowana została bardzo starannie graficznie, z dbałością o przejrzystość i szczegóły. Nie mniej jednak zawartość poszczególnych rozdziałów Autoreferatu, począwszy od części teoretycznej a skończywszy na wynikowej, została niepotrzebnie rozbudowana o bardzo szczegółowe informacje metodyczne i wynikowe, które są zawarte w załączonych 6 publikacjach będących podstawą oceny.

Ocena merytoryczna pracy

Obszerną częścią autoreferatu jest wprowadzenie teoretyczne szeroko opisujące zagadnienia związane z patogenami grzybowymi i ich toksycznymi produktami metabolizmu wtórnego - mykotoksynami. W pierwszej części Autor przedstawił rys historyczny związany z odkryciem i scharakteryzowaniem pierwszych metabolitów grzybowych, a także skupił się na źródłach mykotoksyn i ich działaniu niepożądanym. Umieścił także rozdział dotyczący norm i regulacji prawnych obejmujących najwyższe dopuszczalne poziomy mykotoksyn w surowcach i produktach pochodzenia zbożowego oraz w paszach. Dokonał także - w kolejnym rozdziale - dokładnej charakterystyki głównych grup mykotoksyn zwracając uwagę na ich pochodzenie, budowę a także działanie toksyczne względem organizmów żywych. Ostatnią część wprowadzenia teoretycznego Autor poświęcił technikom ekstrakcyjnym i chromatograficznym wykorzystywanym w analizie jakościowej i ilościowej mykotoksyn. Tak obszerna i zawierająca niejednokrotnie bardzo podstawowe informacje na temat toksycznych metabolitów grzybowych część teoretyczna Autoreferatu - w mojej opinii - nie była konieczna do zrozumienia dalszej części pracy. Zabrakło w niej natomiast aktualnego spojrzenia na obecny stan wiedzy w zakresie zagrożeń związanych z bioróżnorodnością grzybów odpowiedzialnych za biosyntezę mykotoksyn, identyfikacją i toksycznością ich nowych pochodnych, a także odniesienia się do skuteczności metod ich usuwania ze środowiska. Przedstawione w części teoretycznej Autoreferatu zagadnienia poparto bogato cytowaną literaturą.

Cele pracy zostały określone bardziej jako cztery zadania badawcze, do których Doktorant konsekwentnie odwołuje się w części doświadczalnej i wynikowej dysertacji. Badania obejmowały opracowanie metod badawczych oznaczania mykotoksyn w różnych

matrycach (**pkt 1**), a następnie ich jakościową i ilościową analizę w: paszach (**pkt 2**), w żywności (**pkt 3**) oraz w surowicy krwi ludzkiej (**pkt 4**).

W części metodycznej Autoreferatu Doktorant bardzo szczegółowo opisał procedury dotyczące przygotowania próbek oraz stosowanych metod analitycznych. Należy zaznaczyć, że przygotowanie próbek do analiz chromatograficznych mykotoksyn wiązało się w przypadku każdej z matryc z opracowaniem innej procedury ekstrakcyjnej wymagającej optymalizacji szeregu parametrów.

Obszerny materiał badawczy zaowocował bardzo dużą liczbą wyników, które omówiono i przedstawiono w kolejnej, wynikowej części dysertacji. Rezultaty uzyskane w ramach każdego z zadań badawczych zostały podsumowane krótką dyskusją merytoryczną w odrębnych podrozdziałach. Uzyskane wyniki oprócz aktualnych danych na temat zanieczyszczenia mykotoksynami żywności i pasz wnoszą nowe informacje dotyczące często pomijanych źródeł tych metabolitów (zielona kawa, żołądź). Pewien niedosyt w tej części pracy budzi zbyt ostrożna interpretacja i ograniczona dyskusja ciekawych i wartościowych wyników mających znacznie większy potencjał poznawczy i aplikacyjny niż Doktorant odważył się wykazać i przedstawić. Na podstawie uzyskanych rezultatów, Autor sformułował 8 rozbudowanych wniosków.

Mimo starannego przygotowania rozprawy doktorskiej Autor nie ustrzegł się niedociągnięć i pewnych nieścisłości. Celem doprecyzowania niektórych fragmentów pracy mam kilka pytań i uwag:

- W publikacji 3 (D3) dotyczącej identyfikacji mikroorganizmów grzybowych i analizy mykotoksyn w próbkach żołądźci stwierdzono obecność różnych gatunków grzybów rodzaju *Penicillium*, nie zidentyfikowano natomiast grzybów innego rodzaju. Co skłoniło Doktoranta do opracowania wieloskładnikowej metody chromatograficznej zawierającej m.in. metabolity grzybów, które nie zostały zidentyfikowane w próbkach żołądźci? Jak można wytłumaczyć obecność toksyn fuzaryjnych w pojedynczych próbkach żołądźci przy jednoczesnym braku w nich grzybów rodzaju *Fusarium*? Czy istnieją podobne doniesienia literaturowe dotyczące tej matrycy?
- Zdziwienie moje budzi niewykorzystanie opracowanej dla próbek żołądźci wieloskładnikowej metody chromatograficznej służącej jednoczesnemu oznaczaniu wielu mykotoksyn do analizy próbek żywności i pasz pochodzenia zbożowego (publikacja D1, D2, D4, D5), które – jak powszechnie wiadomo - są głównym

źródłem różnych grup mykotoksyn tworzonych przez szeroki wachlarz patogenów grzybowych. Czym było spowodowane opracowanie innych metod, tylko dla głównych, najpowszechniej występujących metabolitów?

- W publikacjach D1, D2 w próbkach zbożowych oprócz toksyn fuzaryjnych oznaczano także ochratoksynę A (D1, D2) i aflatoksyny (D1). Proszę o wyjaśnienie dlaczego dla dwóch ostatnich mykotoksyn opracowano odrębną metodę chromatograficzną z wykorzystaniem detekcji fluorescencyjnej (HPLC/FLD), podczas gdy toksyny fuzaryjne oznaczono techniką LC-MS/MS? Podobna sytuacja dotyczy oznaczeń mykotoksyn w próbkach piwa (publikacja D4).
- W publikacji D5 analizowanym materiałem były ziarna zielonej kawy oraz różne formy suplementów diety zawierające ekstrakty kawowe. Proszę wyjaśnić czym podyktowany był wybór do oznaczeń tylko dwóch toksyn (ochratoksyny A i cytryniny) skoro na podstawie przeprowadzonych testów mikologicznych wykazano obecność zarówno grzybów *Aspergillus* jak i *Penicillium*, które są również odpowiedzialne za biosyntezę ważnych metabolitów - aflatoksyn.
- Jak mógłby Pan wytłumaczyć brak różnic w poziomie ochratoksyny A w próbkach surowicy krwi ludzkiej pobranych od pacjentów dializowanych i osób zdrowych (publikacja D6)? Czy przeprowadzony został wywiad medyczny pozwalający ocenić kondycję zdrowotną osób z obu grup (przebyte choroby, występujące schorzenia, dieta, tryb życia, itp.)? Takie informacje mogłyby być pomocne przy dyskusji wyników. Dlaczego zdecydowano się oznaczyć tylko jedną toksynę (ochratoksynę A) w tak ciekawej i ważnej z punktu widzenia zdrowia konsumenta matrycy?
- W części wynikowej Autoreferatu badania własne przeplatają się z wynikami innych autorów (niejednokrotnie są one dokładniej prezentowane i omawiane niż wyniki uzyskane w dysertacji) co zakłóca czytelność tej części pracy i rzetelność prowadzonej dyskusji. Zaprezentowanie najważniejszych wyników w tabelach/ na wykresach ułatwiłoby ich analizę. Ponadto, znajdują się tu także szczegółowe opisy metodyczne (np. opis pochodzenia próbek, miejsce ich pozyskania, chromatogramy itp.).

Podsumowując, prosiłabym Doktoranta o wyrażenie opinii, jaki widziałby aspekt użyteczny uzyskanych w dysertacji wyników badań i które z nich uznałby za najbardziej wartościowe i dlaczego.

Przedstawione w recenzji pytania, uwagi i spostrzeżenia nie obniżają wartości poznawczej i aplikacyjnej przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej, służą jedynie doskonaleniu warsztatu naukowego Doktoranta.

Posumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując analizę recenzowanej rozprawy doktorskiej Pana mgr. Roberta Kosickiego stwierdzam, że Doktorant w sposób prawidłowy i przemyślany zaplanował i przeprowadził prace eksperymentalne oraz właściwie dobrał nowoczesne techniki analityczne. Należy podkreślić, że realizacja zaprezentowanych badań wymagała dużego zaangażowania i umiejętności dobrej organizacji warsztatu badawczego, co świadczy o dużej aktywności i zaangażowaniu młodego Naukowca.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Roberta Kosickiego spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 marca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2016 r. poz. 1688 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych o dopuszczenie Pana mgr. Roberta Kosickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony.

Agnieszka Hańkiewicz