

Poznań, 7.04.2016

Prof. dr hab. Małgorzata Jędrzycka
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Beszterdy pt.: „Studia nad podatnością nowych odmian pszenicy na fuzariozę i tworzenie zearalenonu wraz z oceną skutków zdrowotnych u ludzi i zwierząt”

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Golińskiego oraz dr hab. Agnieszki Waśkiewicz. W strukturze Uniwersytetu Katedra Chemii znajduje się na Wydziale Technologii Drewna jednakże ze względu na tematykę pracy przewód doktorski prowadzony jest na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu UP w Poznaniu. Na Wydziale tym doktorantka ma szansę na zdecydowanie bardziej fachową ocenę prowadzonych przez siebie badań. Dość dziwny zapis widnieje na stronie tytułowej, sugeruje on, że Katedra Chemii należy do Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu.

Finansowanie badań

Doktorantka była stypendystką w projekcie „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski” poddziałanie 8.2.2. Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Oświadczenie, opatrzone logotypami Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Samorządu Województwa Wielkopolskiego oraz Europejskiego Funduszu Społecznego znajduje się na ostatniej stronie dysertacji doktorskiej. Uważam, że informacja o finansowaniu powinna się znaleźć na bardziej eksponowanym miejscu pracy (np. w formie podziękowania na pierwszych kartach dysertacji, a w formie oświadczenia, tam gdzie się obecnie znajduje).

Struktura pracy – ocena formalna

Recenzowana praca składa się ze 161 stron, 17 rycin, 66 tabel w głównej części pracy oraz 11 tabel w załącznikach, 5 fotografii (również umieszczonych w załącznikach) oraz 331 pozycji literaturowych. Praca przygotowana jest bardzo starannie pod względem edytorskim, a wszystkie tabele przedstawiono zgodnie z podobnym schematem, co sprawia bardzo korzystne wrażenie już przy pierwszym wertowaniu pracy.

Pracę napisano według struktury właściwej dla klasycznych rozpraw doktorskich. Rozpoczyna ją spis treści (3 strony), wykaz najważniejszych skrótów (1 strona), wstęp (31 stron), założenia i cele pracy (1 strona). Opis materiałów i metod obejmuje 15 stron. Bardzo rozbudowana część wynikowa została przedstawiona na 43 stronach, a – co jest bardzo budujące – dyskusja wyników zajmuje 35 stron. Taka proporcja pomiędzy poszczególnymi rozdziałami sprawia, iż czytelnik dowiaduje się nie tylko o wynikach badań własnych Doktorantki, ale także o konfrontacji tych wyników z badaniami prowadzonymi obecnie w Polsce i na świecie. Na podstawie wykonanych badań Autorka sformułowała 12 wniosków, zakończonych ogólną konkluzją. Praca zawiera 2-stronicowe streszczenia w wersji polsko- i angielskojęzycznej, które w wystarczającym stopniu zapoznają czytelników z zawartością pracy.

Merytoryczna ocena pracy

Praca doktorska pani mgr inż. Moniki Beszterdy poświęcona jest zależnościom pomiędzy przydatnością odmian pszenicy ozimej na porażenie ich kłosów przez wszędobylski gatunek *Fusarium culmorum*, ilością wytwarzanego zearalenonu (mykotoksyna tworzona przez *Fc*), jakością ziarna i wartością technologiczną uzyskanej z niego mąki oraz pieczywa. Co więcej, elementem badań była także ocena stężeń tej toksyny w tkankach macicy i jajników loszek skarmianych paszą zawierającą niskie dawki zearalenonu oraz ocena zawartości tej toksyny w surowicy krwi pacjentów z terenu województwa wielkopolskiego. Ważnym materiałem roślinnym była pszenica – główne zboże konsumpcyjne i paszowe – oraz wytwarzane z niej produkty. Pani mgr inż. Monika Beszterda zajęła się zatem wyjątkowo ważną i aktualną problematyką badawczą. Co więcej, Autorka nie ograniczyła się do jednego wąskiego aspektu badań, jaki bezpośrednio wynikałby z zakresu umiejętności Katedry, w której wykonywała główną część analiz, lecz także zawarła w swej pracy bardzo wszechstronne analizy dotyczące całej drogi badanej toksyny, od momentu jej wytworzenia w warunkach polowych, aż do oceny wpływu na zawartość tej toksyny w tkance płynnej (krew) u ludzi i w żeńskich organach rozrodczych loszek. Tak wszechstronne spojrzenie na badane

zagadnienie wzbudza moje najwyższe uznanie, nie tylko względem ambitnej Doktorantki, lecz także obojga promotorów, którzy z pewnością znacznie dopomogli w badaniach od strony organizacyjnej i z całą pewnością zasłużyli na podziękowania umieszczone na początku dysertacji.

Opracowanie przygotowane przez Doktorantkę zawiera bardzo rozbudowaną część wstępną, w której przedstawiono charakterystykę aktualnego rynku zbóż na świecie i w Polsce, ze szczególnym uwzględnieniem pszenicy, informację na temat różnych gatunków pszenic oraz kompendium wiedzy o pszenicy zwyczajnej. Z bardzo umiejętnie dobranych pozycji literatury, zarówno klasycznej jak i najnowszej, a także z danych GUS, IUNG, IOR i COBORU czytelnik pracy dowiadyuje się o istotności problemu uprawy zbóż w światowej i krajowej produkcji rolniczej, o dominującym udziale pszenicy w powierzchni uprawy zbóż, jej plonach oraz warunkach klimatycznych i glebowych sprzyjających jej uprawie. Opis znajdujący się w tej części pracy jest poprawny, treściwy i zawiera bardzo nieliczne uchybienia. Przykładowo, na str. 9 podano wyniki prognoz dotyczących „bieżącego roku”; zapewne chodzi o rok 2015, w którym pisano pracę, Autorka musi jednak mieć świadomość, że ciekawa praca znajdzie czytelników i później, i będzie wtedy kłopot z ustaleniem, który rok uznano za bieżący. Czy giełdę towarową w Budapeszcie można uznać za „giełdę o charakterze lokalnym” (str. 9)?

Pszenica i ryż stanowią podstawę wyżywienia ludności na świecie, lecz to pszenica zajmuje pierwsze miejsce w produkcji a ponadto jest głównym zbożem uprawianym w klimacie umiarkowanym, w którym znajduje się Polska. W Krajowym Rejestrze odmian znajduje się ponad 80 odmian pszenicy o różnych parametrach jakościowych. Jak się można dowiedzieć z bardzo szczegółowego przeglądu odmian, zarejestrowano nawet odmianę z przeznaczeniem na ciastka (grupa K). Pomimo skarmiania trzody chlewnej paszami zawierającymi znaczne ilości pszenicy, najbardziej pożądane są odmiany jakościowe, a nie pastewne. Na cele paszowe przeznaczane są bowiem odmiany jakościowe, które nie dotrzymały parametrów jakości i z tego powodu zostały zdyskwalifikowane.

Dysertacja doktorska zawiera badania dotyczące jakości ziarna i wartości technologicznej mąki oraz uzyskanego z niej pieczywa. W związku z powyższym Doktorantka zapoznaje czytelników z parametrami jakościowymi charakteryzującymi wartość technologiczną ziarna i mąki pszennej oraz omawia rolę tych parametrów na poszczególnych etapach uprawy i przerobu materiału. Dzięki szczegółowemu opisowi budowy ziarniaka, można łatwiej przyswoić i zrozumieć znaczenie tych parametrów np. dla wartości wypiekowej mąki.

Budowa okrywy owocowo nasiennej pszenicy oraz części zarodka zawierają w sobie nazwy łacińskie, czy nie powinny być napisane kursywą? Z jakiegoś względu Autorka konsekwentnie jej nie stosuje, czy słusznie (str. 14)?

W Polsce powierzchnia zbóż ozimych obejmuje około 4,5 mln ha, z czego prawie jedną trzecią zajmuje pszenica, a następnie niewiele ponad połowę obszaru pszenicy zajmują pszenżyto i żyto. Koniecznością jest zatem częsty powrót pszenicy na to samo stanowisko, co wiąże się z jej narażeniem na choroby, w tym głównie patogeny z królestwa grzybów. Wskaźnikiem biomasy grzybowej w ziarnie i innych płodach rolnych oraz w produktach żywnościowych jest często ergosterol, podstawowy sterol budujący membrany komórkowe grzybni i zarodników a zatem związek kluczowy dla wzrostu komórek grzybowych. Powszechnie uznaje się, że ergosterol nie jest obecny w materiale roślinnym wolnym od grzybów, a zatem stanowić może wskaźnik stopnia porażenia danego materiału przez grzyby. Oznaczenia stężenia ergosterolu prowadzone są przy pomocy metod opartych na chromatografii, co umożliwia standaryzację i automatyzację procesu, przy stosunkowo niewielkich kosztach analiz. Co więcej, z powodu szybkiej degradacji tego związku po śmierci komórki stężenie ergosterolu w badanym materiale można uznać za indikator żywej biomasy grzybów. Metoda jest szeroko stosowana nie tylko do analizy występowania i stężenia tego związku w ziarnie zbóż lecz także jako biomarker biomasy grzybów w glebie, ściekach, materiałach budowlanych a nawet w bioaerozolach zawartych w powietrzu. W niniejszych badaniach Autorka oznaczała stężenia ergosterolu w ziarniakach pszenicy, mące oraz otrębach i oznaczała korelację pomiędzy tym parametrem, a zasiedleniem badanego materiału przez grzyby rodzaju *Fusarium*.

Podrozdział poświęcony fuzariozie kłosów rozpoczyna się od zbędnego powtórzenia wcześniej podawanych faktów na temat monokultur pszenicy, niemniej Doktorantka szybko przechodzi do dość szczegółowego opisu choroby i gatunków *Fusarium*, które ją wywołują, przedstawiając gatunek *F. culmorum* jako dominujący w chłodniejszych obszarach naszego globu, w odróżnieniu od gatunku *F. graminearum*, który poraża płody rolne w cieplejszych i bardziej wilgotnych regionach klimatycznych na świecie. Mało satysfakcjonujący jest opis inicjacji rozwoju choroby. Czy rzeczywiście niezbędne jest mechaniczne uszkodzenie tkanki, by doszło do porażenia kłosa pszenicy przez *F. culmorum*? Jaką tkankę Autorka ma na myśli (str. 24, linijka 12)? Jak ma się ta informacja do badań aerobiologicznych, wskazujących na przemieszczanie się inokulum (zarodniki stadium generatywnego a także zarodniki konidialne) z prądami powietrza? Doktorantka zna te prace i je przytacza, niemniej jednak opis infekcji roślin pszenicy jest trochę enigmatyczny i przedstawiony mało klarownie.

W kontraście do zagmatwanego opisu fitopatologicznego fragmentu pracy jest część poświęcona charakterystyce zearalenonu, jego biosyntezy i produktów rozpadu oraz szkodliwemu działaniu dla ludzi i zwierząt. Ten związek chemiczny o bardzo wysokiej temperaturze topnienia (161-162°C) jest jedną z najsilniej działających niesteroidowych substancji o charakterze estrogenym, tworzonym w warunkach naturalnych. Pod względem rozpowszechnienia jest to trzecia substancja spośród najczęściej identyfikowanych w tkankach roślin i zwierząt. Spośród grzybów rodzaju *Fusarium* powszechnie obecnych w naszej strefie klimatycznej tworzą go gatunki *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* i *F. semitectum*. Autorka poświęca dużo uwagi biotransformacji zearalenonu, bowiem metabolizm tego związku i jego przemiany w organizmach zwierząt są częściowo także przedmiotem niniejszych badań. Szczegółowy opis przemian tego związku u różnych gatunków zwierząt wskazuje na świnie, jako szczególnie wrażliwe na estrogenne działanie zearalenonu. Co ciekawe, ten mykoestrogen przyjmowany w najniższej dawce powodował znaczący wzrost macicy u szczurów, natomiast w silnych dawkach masa tego organu była niska. Autorka na kilku stronach tekstu przedstawia skutki działania zearalenonu jako estrogenu, bowiem na tego typu aktywności tego związku skupia się niniejsza praca, ale podkreśla także fakt, iż związek ten może też przynosić liczne inne niepożądane skutki w niemal wszystkich tkankach i narządach, w tym w mózgu. Po zapoznaniu się z tym wszechstronnym i dogłębnym przeglądem badań nad wpływem zearalenonu czytelnik dysertacji nie ma najmniejszych wątpliwości co do wysokiej szkodliwości tego związku i poważnych zagrożeń dla zdrowotności ludzi i zwierząt, które może nieść żywność i pasza zawierająca tę mykotoksynę.

Materiał badawczy przedstawiono bardzo szczegółowo, opis doświadczenia polowego jest kompletny, scharakteryzowano materiał grzybowy użyty do inokulacji, fazę rozwojową roślin w trakcie inokulacji. Z opisu odporności odmian przytoczonych z badań prowadzonych przez COBORU badane odmiany pszenicy były w znacznym stopniu odporne na fuzariozę kłosów; nieco bardziej podatne były odmiany chlebowe (grupa B), w tym zwłaszcza Kris i Muszelka.

Mało atrakcyjnie brzmi tytuł dysertacji („Studia nad...”) i niezgrabnie przedstawiono cel pracy („Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie...”). W rozdziale „Założenia i cele pracy” nie przedstawiono hipotezy badawczej, która poddana byłaby weryfikacji. Autorka wymienia kolejne etapy pracy, opisując raczej co zrobiono i w jakiej kolejności. Opis ten jest spójny, ale ma raczej formę monitoringu, aniżeli weryfikacji określonej tezy. Tymczasem sformułowanie takiej hipotezy nie byłoby trudne, przykładowo należało założyć,

iż długotrwałe ‘narażenie pokarmowe’ na zearalenon w niskich dawkach powoduje zwiększenie stężenia tego związku w osoczu krwi u ludzi oraz powoduje zwiększenie organów rozrodczych loszek. Natomiast w wynikowej części pracy każdorazowo formułowano hipotezy badawcze i testowano je z wykorzystaniem prawidłowo dobranych testów statystycznych. Wnioskowanie przeprowadzano na podstawie wyników tych analiz. Wynikowa część pracy została przygotowana wzorowo: logicznie ustawione analizy krótko opisano, wyniki wraz z testem statystycznym przedstawiono w tabeli a następnie pokrótce opisano, skupiając się na wartościach, które w statystycznie istotny sposób odbiegały od pozostałych.

W ramach swojej pracy doktorskiej pani mgr inż. Monika Beszterda:

- 1) wykonała towaroznawczą analizę ziarna pszenicy ozimej;
- 2) oznaczyła poziom ergosterolu oraz zearalenonu w ziarnie, mące i otrębach;
- 3) obliczyła korelacje pomiędzy poziomami stężeń ergosterolu oraz zearalenonu a wyróżnikami towaroznawczymi ziarna, a także obliczyła korelacje pomiędzy poziomami ergosterolu a zearalenonu w badanym materiale roślinnym;
- 4) oceniła wpływ narażenia pokarmowego zawierającego niskie stężenia zearalenonu na układ rozrodczy loszek niedojrzałych płciowo;
- 5) oznaczyła zearalenon w surowicy krwi ludzkiej.

Wyniki badań pozwoliły Autorce na sformułowanie dwunastu wniosków. Większość z nich to właściwie podsumowanie wyników badań. Niektóre wnioski są dość niepoważne, np. wniosek 5 „Można przypuszczać, że istnieje ujemna zależność pomiędzy...”. Spekulacje można opisywać w rozdziale poświęconym dyskusji wyników, jednakże wnioski wynikają z wykonanych badań i nie ma tu miejsca przypuszczenia. Ta sama przygana dotyczy wniosku numer 7: „Uzyskane wyniki...[...] mogą wskazywać na istnienie zależności” – wyniki albo wskazują albo nie, wykonano przecież obliczenia statystyczne; określenie „mogą wskazywać” nic nie znaczy. Natomiast ‘prawdziwym’ wnioskiem jest konkluzja umieszczona na str. 135, w której pani mgr inż. Monika Beszterda reasumuje, iż badany przez nią związek toksyczny nie ulega efektywnej eliminacji w procesach przetwórstwa płodów rolnych i technologii żywności, ale wchłaniany jest przez układ pokarmowy i przedostaje się do krwi. Jest to wniosek natury ogólnej, rzeczywiście wynikający z przeprowadzonych badań, a zatem uprawniony. Po przedarciu się przez gąszcz 77 tabel oraz 15 rycin (2 pozostałe nie wynikają z niniejszych badań), przeczytanie tak ogólnego wniosku trochę rozczarowuje, bowiem jest to wiedza przedstawiona już we wstępnej części pracy. Szkoda, że na podstawie literatury

i wyników własnych nie pokuszono się o wyciągnięcia jakiegoś wniosku z punktu 12 (str. 135). Wykazano, że w surowicy krwi badanych ludzi bardzo często występuje zearalenon. Czytelnik dochodząc do tego miejsca dysertacji nie pamięta już czy są to poziomy bezpieczne dla zdrowia ludzi. Co więcej w osoczu aż 43% pacjentów znajdował się zearalenon – czy to bardzo źle, umiarkowanie źle, obojętnie dla zdrowia tych osób? Wydaje się (może niesłusznie), iż ziarno pszenicy jest obecnie bardzo rygorystycznie badane pod kątem zdrowotności. Skąd zatem zearalenon we krwi tak wielu osób? Najwyraźniej gromadzi się z wiekiem i jego część gromadzi się latami w organizmie, skoro największe stężenia wykryto we krwi ludzi starszych?

Pomimo braku sformułowania atrakcyjniejszych wniosków wyniki badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej wnoszą nową wiedzę, polegającą na uszczegółowieniu wielu zależności pomiędzy parametrami jakościowymi a stężeniem zearalenonu w ziarnie, produktach i organizmach konsumentów. Ziarno badanych odmian pszenicy ozimej z kłosów inokulowanych zarodnikami *F. culmorum* poddano szczegółowej i wszechstronnej analizie parametrów jakościowych. Stwierdzono, że po inokulacji jest ono wilgotniejsze, ziarniaki są mniejsze, mniejsza jest też gęstość ziarna i wyrównanie. Te informacje, choć może mało zaskakujące, wskazują na pogorszenie parametrów z jakimi może spotkać się producent rolny uprawiający pszenicę w latach o silnym ataku patogena i warunkach sprzyjających jego rozwojowi w roślinach.

Wiele badań prowadzonych do tej pory wykazywało podobne zależności, lecz zbiór kłosów prowadzono ręcznie i analizowano ziarno pochodzące z tak zgromadzonych próbek. Skutkowało to przeszacowaniem stopnia porażenia ziarniaków, albowiem przy zbiorze ręcznym analizowany jest cały materiał roślinny, natomiast przy zbiorze mechanicznym analizuje się wyłącznie materiał zebrany przy agrotechnice rzeczywiście prowadzonej w polu. W takich warunkach dochodzi do usunięcia znacznej frakcji nasion lekkich, których niedorozwój w znacznej części powodowany jest przez grzyby. Tymczasem nawet przy zbiorze mechanicznym uzyskano ziarniaki, z których chleb różnił się po wypieczeniu od tego, który uzyskano z ziarna zebranego z poletek, na których nie stosowano inokulacji.

W pracy zdecydowanie brakuje wyników testów fitopatologicznych. Samo zastosowanie zabiegu polegającego na opryskiwaniu kłosów zarodnikami grzyba niekoniecznie musi skutkować porażeniem kłosów i nie musi też oznaczać, iż to właśnie tenże gatunek jest sprawcą wszystkich opisanych efektów. Może się bowiem zdarzyć, iż na wilgotnym materiale roślinnym pojawiają się zupełnie inne grzyby chorobotwórcze, a także ich grzybowe nadpasożyty. W tym przypadku ergosterol byłby ich wskaźnikiem co

niekoniecznie przekładałoby się na porażenie ziarniaków przez *F. culmorum*. Kłosa z grupy kontrolnej poddano inokulacji wodą destylowaną, gdy tymczasem powinna ona zapewne być wcześniej stosowana do płukania nasion ryżu. W pracy nie wspomniano o sposobie przygotowania inokulum, więc można jedynie przypuszczać, że wyhodowano je na pożywce ryżowej a zawiesinę zarodników uzyskano przez ich wymywanie wodą destylowaną z kolbki, w której hodowano dwa podane izolaty patogena. Dlaczego zastosowano dwa izolaty? Czym się różniły i dlaczego właśnie te izolaty wybrano? Czy zainokulowane rośliny pszenicy przykryto agrowłókniną. Jeśli nie, to infekcja nie musiała się rozwinąć lub mogło to być naturalne porażenie roślin całkiem innymi izolatami rodzaju *Fusarium*, występującymi przecież w powietrzu w olbrzymich ilościach. Zakładam, iż tak się nie stało, ale mogło. Z tego powodu brak części fitopatologicznej i mikologicznej uważam za główny mankament niniejszej pracy. Przy tak rozbudowanej wiedzy na temat wartości wypiekowej ziarna oraz późniejszych parametrów oceny mykotoksyn w osoczu krwi ludzi oraz macicy i jajnikach loszek, obowiązkowo zastosowana analiza molekularna z zastosowaniem starterów gatunkowo specyficznych powinna wykazać, czy na badanym ziarnie pszenicy występowały grzyby użyte do inokulacji. Ewentualnie można też było zastosować prostą analizę polegającą na wykonaniu testu bibułowego. Nie wiadomo też jakie gatunki grzybów były obecne na kontroli. Przyroda nie zna pustki i także ziarniaki roślin kontrolnych – nie poddanych inokulacji były z pewnością zasiedlone przez różne grzyby. Inokulację wykonano jednorazowo, tym bardziej ocena mikrobiologiczna byłaby wysoce wskazana.

We wstępnej części pracy dowodzono, iż zearalenon może znajdować się nie tylko w tkankach organów ludzi i zwierząt i w krwi obwodowej (osocze), lecz także w moczu i żółci wydalanej z kałem. Z tego względu można się od razu zapytać dlaczego Autorka nie wykonała badań także w tych wydalinach ludzkich. Z pewnością byłoby ciekawe porównanie stężeń zearalenonu w krwi, moczu i kale. Czy było to podyktowane trudnościami technicznymi? wysokimi kosztami kolejnych analiz? brakiem dostępu do próbek? małą atrakcyjnością próbek? brakiem czasu na wykonanie kolejnych analiz lub wszystkimi tymi powodami po części?

Pracę przygotowano bardzo starannie. Napisana jest bardzo ładną polszczyzną, zdania sformułowane są poprawnie, błędy się bardzo nieliczne (np. agonista estrogenów – str. 38). Autorka kilkakrotnie pisze o ‘grzybach *F. culmorum*’, nie wiadomo dlaczego zastosowana jest tu liczba mnoga, bo to jeden gatunek; chodzi zapewne o dwa izolaty tego patogena?

Badania dotyczące konsekwencji spożywania żywności i pasz zawierających zearalenon mają dużą wartość poznawczą oraz praktyczną. W mojej ocenie rozprawa mgr Moniki Beszterdy spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Na tej podstawie **wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Moniki Beszterdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Małgorzata Jędrzycka