

Prof. dr hab. Zdzisław M. Migaszewski, prof. zw. UJK
Zakład Geochemii i Ochrony Środowiska
Instytut Chemii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
25-406 Kielce
ul. Świętokrzyska 15G
tel: 041 349-70-26
e-mail: zmig@ujk.edu.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anny Katarzyny Kojty pt. „Skład mineralny, właściwości bioindykacyjne i ocena wartości odżywczej owocników borowika kasztanowego *Imleria badia* (Fr.) Vizzini z wybranych regionów na obszarze kraju” wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Falandysza.

Problematyka bioakumulacji pierwiastków śladowych, zwłaszcza z grupy tzw. metali „ciężkich”, w różnych gatunkach grzybów oraz ich potencjalnego wpływu na zdrowie człowieka jest przedmiotem badań prowadzonych od kilkudziesięciu lat w różnych ośrodkach naukowo-badawczych na świecie. Ponieważ grzyby stanowią ważny składnik diety człowieka, dlatego też wyjaśnienie wpływu czynników biologicznych i środowiskowych na poziomy zawartości pierwiastków toksycznych w ich owocnikach nabiera szczególnego znaczenia zwłaszcza na obszarach zanieczyszczonych w wyniku współczesnej i historycznej eksploatacji i przeróbki rud metali i węgla oraz spalania paliw kopalnych (kaustobiolitów). W tym kontekście istotne jest również zagadnienie oceny stopnia przyswajania tych pierwiastków przez organizm człowieka w aspekcie ryzyka toksykologicznego związanego ze spożyciem różnych przetworów grzybowych. Z tego też względu recenzowana praca doktorska mieści się w nurcie badawczym wymienionej problematyki. Przedmiotem badań były próbki kapeluszy i trzonów borowika kasztanowego *Imleria badia* (Fr.) Vizzini oraz podłoża glebowego (w ośmiu z dziewięciu stanowisk), pobrane z kilku oddalonych regionów na obszarze kraju. Zakres badań obejmował oznaczenia 20 pierwiastków w naturalnych próbkach grzybów oraz odpowiednio *in vitro* – w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka. Praca została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Falandysza, znanego specjalisty z zakresu biogeochemii grzybów, który od wielu lat zajmuje się badaniem zawartości metali i metaloidów w różnych gatunkach tej grupy taksonomicznej w kontekście toksykologicznym i żywieniowym, jak również interakcji geochemicznych zachodzących między owocnikami a ich podłożem glebowym.

Ocena redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska Pani Anny Katarzyny Kojty liczy 159 numerowanych stron, 34 ryciny, 56 tabel oraz 199 pozycji bibliograficznych – w zdecydowanej większości oryginalnych artykułów naukowych z listy Journal Citation Reports (JCR). Tuż po stronie tytułowej i podziękowaniach, umieszczony jest „Spis treści” i „Wykaz zastosowanych skrótów”, a następnie krótki „Wstęp”, „Hipotezy badawcze” i „Cele naukowe”, w których

przedstawiono podstawowe informacje dotyczące terminologii i ekologii borowika kasztanowego oraz odpowiednio zakres, zadania i cele wykonanych przez Doktorantkę badań. Stanowią one bardzo dobre wprowadzenie do właściwej części teoretycznej, w skład której wchodzi cztery podrozdziały: „Wartość odżywcza grzybów”, „Nagromadzenie składników mineralnych w grzybach”, „Charakterystyka gatunku *Imleria badia*” i „Modele przewodu pokarmowego in vitro w badaniach biodostępnych składników pokarmowych oraz związków niebezpiecznych dla zdrowia człowieka”.

Część eksperymentalna pracy z licznymi elementami teoretycznymi obejmuje z kolei następujące rozdziały: „Metoda badawcza”, „Wyniki”, „Ocena wartości odżywczej oraz ryzyka toksykologicznego związanego ze spożyciem owocników borowika kasztanowego”, „Porównanie otrzymanych wyników z danymi przedstawionymi w piśmiennictwie naukowym”, „Podsumowanie i wnioski” i „Piśmiennictwo”.

Zawartość recenzowanej rozprawy doktorskiej jest zgodna z jej tytułem a przedstawione tezy są kompletne. Ogólnie biorąc, strukturę pracy i podział treści oceniam jako bardzo dobrą, choć z korzyścią dla odbioru rozprawy przez czytelnika byłoby jej uzupełnienie o streszczenie w języku angielskim. Zwraca uwagę bardzo duża ilość tabel, które mimo bardzo interesujących danych w znacznym stopniu utrudniają percepcję tekstu. Zdaniem recenzenta tabele 26-32 i 33-39 powinny być skompresowane odpowiednio do 4-ch tabel w ujęciu pionowym (jak w przypadku tabeli 13), natomiast tabela 56 licząca 10 stron w części tekstowej powinna być ujęta w aneksie załączonym do pracy. Zachowując układ alfabetyczny w „Piśmiennictwie”, Doktorantka przyjęła hierarchiczny system cytowania publikacji w części tekstowej pracy, który stosuje się w niektórych czasopismach. Nie wykazuje natomiast konsekwencji w cytowaniu publikacji 3-autorskich: raz cytuje trzech autorów (np. str. 12; Howe, Evans, Ketteridge, 1997), innym razem tylko pierwszego autora (np. str. 12; Krpata i inni 2009). Pewien dysonans budzi używanie w recenzowanej pracy terminów „skład mineralny”, „składniki mineralne” i „zawartość pierwiastków”, „pierwiastki” jako synonimów. Z punktu widzenia fizjologii nie jest to błąd (!), choć w większości dyscyplin nauk o Ziemi i środowisku przyrodniczym termin „skład mineralów” ma całkowicie odmienne znaczenie i oznacza po prostu „zawartość mineralów” lub „zawartość faz mineralnych”. Podobnie odmiennie rozumie się w fizjologii i biogeochemii znaczenie terminów: „bioaccessibility” i „bioavailability”.

Do mniej istotnych uchybień redakcyjnych obejmujących błędy terminologiczne, sformułowania żargonowe oraz drobne błędy językowe należą:

1. Str. 7. W „Wykazie zastosowanych skrótów” ICP-OES należy przetłumaczyć jako: *spektrometria emisji optycznej ze wzbudzeniem w indukowanej plazmie*.
2. Str. 9. We „Wstępie” należałoby uzupełnić zadanie „... regiony olkuski i chrzanowski, Góry Świętokrzyskie, ...” – jako obszar historycznej eksploatacji rud metali (Gałuszka i in., 2015).
3. Str. 21. Błąd w roku publikacji: Kalač, Burda, Staškova, 2001; powinno być 1991 (*vide* str. 149).
4. Str. 24. Część zdania, które należy odmienić przez przypadki: ... przedstawiony w pracach Deana i Ma (2007), Intawongse i Deana (2006) oraz Kleina i innych (2003).
5. Str. 28. Doktorantka powinna wyjaśnić z jakiego poziomu glebowego były pobierane próbki gleby: organicznego O (podpoziom Ofh), próchnicznego (A), a może poziomu przejściowego AE. Ma to duże znaczenie przy interpretacji wyników, ponieważ poszczególne poziomy glebowe wyróżniają się zróżnicowaną zawartością naturalnych sorbentów (substancji humusowych, minerałów ilastych, uwodnionych tlenków i wodorotlenków Fe, Mn i Al) i tym samym, różnymi właściwościami sorpcyjnymi i kompleksującymi.

6. Str. 36-39. Autorka powinna zaznaczyć w jakim laboratorium (laboratoriach) były wykonywane oznaczenia 19 pierwiastków śladowych metodą ICP-OES przy użyciu dwóch różnych spektrometrów Optima 2000 DV Perkin Elmer i Agilent 5100 VDV oraz rtęci przy użyciu analizatora MA-2000 Nippon Instruments Corporation. Czy Doktorantka sama wykonywała te analizy?
7. Str. 40. W ramach kontroli jakości należy też podać sumaryczną wartość rozszerzonej niepewności pobierania, przygotowania i analizy próbek (na poziomie ufności 0,95), która nie powinna przekraczać 25-30% (Paślawski P., Migaszewski Z.M. 2006. The quality of element determinations in plant materials by instrumental methods. *Polish Journal of Environmental Studies* 15 (2A), part I: 154-164). W przypadku publikacji wyników badań wystarczy podać tylko zakres procentu odzysku (z ang. *percentage recovery*).
8. Str. 42. Tabela 12 jest zbędna, ponieważ prawie wszystkie wartości są poniżej granicy oznaczalności.
9. Str. 48. Brak zgodności tekstu z wynikami w tabeli 13. Potas i magnez przeważają w glebie (niewyjaśniona przy tym jest zbyt duża zawartość w trzonie grzyba na str. 50). Podobnie, wyższe zawartości glinu występują na ogół w trzonach a nie w kapeluszach grzybów.
10. Str. 49-54. Co oznaczają kreski w Tabeli 13 – poniżej granicy oznaczalności czy też brak oznaczeń?
11. Str. 50. Błąd w wartościach średniej i zakresu zawartości potasu w trzonie grzyba. Jak wytłumaczyć tak wysoką zawartość tego pierwiastka w trzonie w porównaniu z kapeluszami i podłożem glebowym. W tym ostatnim występują minerały ilaste a niekiedy skalenie zawierające potas. Wątpliwości budzi też bardzo mała zawartość tego pierwiastka w glebie ze Złotoryi (str. 53).
12. Str. 85. Niejasne wydzielenie Al i Fe (<1 g) w stosunku do Ca, K, Mg i Mn (100 – 1000 mg/kg).
13. Str. 93-94 (tabele 29-30) i str. 96 (Tabele 36-37) kolumna z fosforem powinna poprzedzać kolumnę z niklem.
14. Str. 99. (Tabele 29, 31, 32) zamiast (Tabele 36, 38, 39).
15. Str. 99-100. Niektóre ubytki zawartości pierwiastków są niezgodne z ich odpowiednikami w tabelach.
16. Str. 133. Powinno być „Duże zawartości oznaczanych pierwiastków ...” a nie „Duża zawartość analizowanych pierwiastków ...”
17. Kursywa dla gatunków: *Xerocomus badius* (str. 144), *Triticum aestivum* L. (str. 151), *Xerocomus badius* (str. 153), *Agaricus bisporus* (str. 158).
18. Niewłaściwe umiejscowienie pozycji bibliograficznych w „*Piśmiennictwie*”: Bernaś E., Jaworska G., 2010 (str. 140), Gadd G.M., 1993 (str. 146), Wienk K.J.H. i in., 1999 (str. 158), Ziemmermannova et al., 2001 (str. 159).

Trzeba podkreślić, że praca jest napisana bardzo poprawną polszczyzną a błędy stylistyczne i interpunkcyjne należą do rzadkości (niewzględzone w recenzji). Zwraca uwagę szczególnie poprawne zredagowanie „*Spisu literatury*” wraz z odpowiednimi odwołaniami do części tekstowej pracy.

Moje uwagi, co do strony redakcyjnej nie obniżają oceny rozprawy, jako bardzo wartościowego opracowania naukowego zawierającego ogromną ilość materiału faktograficznego (wyniki oznaczeń 20 pierwiastków w różnych częściach morfologicznych grzybów). Bardzo pozytywnie oceniam sposób prezentacji zestawień graficznych.

Ocena merytoryczna rozprawy

Część teoretyczna pracy, mimo że została opracowana w sposób bardzo zwięzły (7 stron), zawiera najważniejsze treści, które dotyczą wartości odżywczej wybranych grzybów jadalnych, ich składu pierwiastkowego, pozycji taksonomicznej borowika kasztanowego oraz modeli przewodu pokarmowego *in vitro* UBM w aspekcie biodostępności składników. Doktorantka w tej części pracy zwraca uwagę na problemy związane z brakiem certyfikowanych materiałów odniesienia w badaniach biodostępności w układzie pokarmowym. Należy podkreślić szerokie wykorzystanie metod chemometrycznych (analizy głównych składowych, analizy korelacji, analizy skupień/wiązkowej) do stwierdzenia statystycznie istotnych zależności między zawartościami pierwiastków w częściach morfologicznych grzybów oraz w różnych układach *in vitro*.

Część eksperymentalna świadczy o bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę metodyki badań oraz tematycznego zagadnienia. Zawartości pierwiastków w kapeluszach i trzonach grzybów oraz w ich podłożu glebowym są opisane w sposób przejrzysty i profesjonalny oraz prawidłowo zinterpretowane. Doktorantka wykazała podwyższoną zawartość większości pierwiastków w owocnikach borowika kasztanowego w stosunku do podłoża glebowego. Bioakumulacyjne właściwości tego gatunku grzyba przejawiają się nawet w przypadku małej zawartości pierwiastków w glebie. Badania potwierdziły wpływ zarówno źródeł geogenicznych (gleby i pośrednio podłoża skalnego) i antropogenicznych na skład chemiczny owocników borowika kasztanowego. Należy jednak zaznaczyć, że wpływ na wahania zawartości pierwiastków w owocnikach mogą mieć również inne czynniki środowiskowe, w tym topografia terenu, stosunki wodne, nasłonecznienie, fenologia – szczególnie w przypadku pobierania próbek w okresie kilku lat. Zaznacza się przy tym statystycznie istotne zróżnicowanie zawartości pierwiastków w kapeluszach (Ag, Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sr i Zn) i trzonach (Ag, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, K, Mn, Na, Ni, P, Pb, Rb i Zn) grzybów pobranych z sześciu kompleksów leśnych, z tym, że do najbardziej różniących się należy zaliczyć Puszcę Napiwodzko-Ramucką, Złotoryję, Karpacz i Porążyn. Na podstawie analizy głównych składowych, stwierdzono również zróżnicowane zawartości Ag, Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Sr i Zn oraz szeregu współzależności (powinowactwa biochemicznego par niektórych pierwiastków, wartości median $Q_{k/t}$) między kapeluszami i trzonami borowika kasztanowego.

Interesująco przedstawiają się również wyniki oznaczeń pierwiastków w różnych przetworach grzybowych. W wyniku blanszowania i marynowania stwierdzono znaczący spadek zawartości pierwiastków, z wyjątkiem ołowiu i rtęci. W grzybach marynowanych największe ubytki stwierdzono dla rubidu $94\pm 2\%$ w kapeluszach i $97\pm 1\%$ w trzonach oraz potasu – odpowiednio $92\pm 2\%$ i $96\pm 1\%$. Wykazano też, że grzyby mrożone i przetworzone nie różniły się pod względem zawartości Ag, Al, Ba i Cu ($p < 0,05$).

Wyniki wykonanych badań wykazały bardzo zróżnicowany stopień biodostępności pierwiastków występujących w owocnikach borowika kasztanowego w symulowanym układzie pokarmowym w zależności od rodzaju przetworu grzybowego, np. największe udziały frakcji biodostępnych stwierdzono w trzonach mrożonych i marynowanych fazy I – $86\pm 5\%$ (Sr), w grzybach mrożonych i marynowanych fazy I – $84\pm 1\%$ (Mg) i grzybach suszonych i blanszowanych 15 min. fazy I – $80\pm 11\%$ (Rb), z kolei najmniejsze w trzonach mrożonych i blanszowanych 5 min. fazy II – $0,26\pm 0,01\%$ (Al) i trzonach mrożonych fazy II – $0,6\pm 0,3\%$ (Cu). Podobnie w przypadku Wasilkowa stwierdzono statystycznie istotne różnice w stopniu biodostępności wielu pierwiastków w grzybach przetworzonych (blanszowanych 5, 10 i 15 min. i marynowanych) w stosunku do grzybów nieprzetworzonych. Większą biodostępność w fazie żołądkowej (fazie I) wykazują Al, Ba, Cu, Mn, Rb, Zn i Sr, natomiast w fazie żołądkowo-jelitowej (fazie II) – odpowiednio Cd, Cr i Fe. Proces blanszowania

grzybów prowadzi do większej biodostępności Mn, Rb i Zn, natomiast w przypadku grzybów suszonych i marynowanych – odpowiednio Fe, Mg, Mn, Rb, Sr i Zn.

Podsumowując wyniki oznaczeń frakcji biodostępnych pierwiastków, Doktorantka stwierdza wyraźny wpływ przetwarzania kulinarnego grzybów na większy udział frakcji biodostępnych pierwiastków w stosunku do grzybów suszonych i mrożonych, z tym, że czas blanszowania nie ma decydującego wpływu na zawartość pierwiastków w obu frakcjach biodostępnych. Wyniki badań wskazują, że 100 g przetworzonego kulinarnie borowika kasztanowego może pokryć poniżej 5% dziennego zapotrzebowania na Cu, Mn, Zn, Cr, Mg i Fe. Z kolei poziom biodostępności Cd i Pb bez uszczerbku na zdrowiu jest znacznie poniżej dopuszczalnych wartości dla przetworzonego kulinarnie borowika kasztanowego.

Należy jednak pamiętać, że symulacje w warunkach laboratoryjnych są modelami zredukowanymi, które nie muszą znaleźć odbicia w warunkach naturalnych. Na stopień biodostępności może mieć wpływ skład diety, pokarmów i napojów spożywanych razem z grzybami. Różne właściwości fizykochemiczne i chemiczne składników diety mogą wywoływać efekty synergistyczne i antagonistyczne między pierwiastkami.

Podsumowanie

Mimo pewnych niedociągnięć redakcyjnych sądzę, że w rozprawie doktorskiej znajdują się bardzo wartościowe dane, które mogą być uznane za nowatorskie. W szczególności za taki element nowatorski recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Katarzyny Kojty uznaję zbadanie wzajemnych relacji między zawartościami pierwiastków w kapeluszach i trzonach borowika kasztanowego oraz w podłożu glebowym z oddalonych kompleksów leśnych. Za unikatowe uważam też połączenie tych badań z eksperymentami prowadzonymi na przetworzonych kulinarnie grzybach w aspekcie biodostępności występujących w nich składników.

Nie bez znaczenia jest dorobek naukowy doktorantki, ściśle związany z prowadzonymi badaniami. Jest Ona współautorką 18 artykułów z listy JCR (w trzech z nich jest wiodącym autorem) o sumarycznym IF ok. 30 oraz 56 komunikatów naukowych przedstawionych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Niektóre artykuły były publikowane w tak wysoko punktowanych czasopismach, jak np. *Science of the Total Environment* (IF 4,099), *Food Chemistry* (IF 3,334), *Environmental Science and Pollution Research* (IF 2,618) lub *Journal of Geochemical Exploration* (IF 1,952).

Rekapitulując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Anny Katarzyny Kojty **spełnia wszelkie wymogi formalne i merytoryczne** stawiane pracom doktorskim i wnioskuje o podjęcie uchwały o **dopuszczeniu Doktorantki** do dalszego etapu postępowania kwalifikacyjnego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy oraz wyróżniający dorobek naukowy i popularyzatorski związany z badaniami biogeochemicznymi różnych gatunków grzybów, **stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej** mgr Anny Katarzyny Kojty pt. „Skład mineralny, właściwości bioindykacyjne i ocena wartości odżywczej owocników borowika kasztanowego *Imleria badia* (Fr.) Vizzini z wybranych regionów na obszarze kraju”

.....
Prof. dr hab. Zdzisław M. Migaszewski