

prof. dr hab. Adam Waśko
Kierownik Katedry Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Skromna 8, 20 -704 Lublin
e-mail: adam.wasko@up.lublin.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.: „**Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji/transformacji mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie bezpieczeństwa żywności.**”

wykonanej przez **mgr inż. Martę Modrzewską** w Zakładzie Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
pod kierunkiem promotora **dr hab. inż. Marcina Bryły, prof. IBPRS-PIB** oraz promotora pomocniczego **dr inż. Dominika Popowskiego**

Podstawę formalną realizacji recenzji stanowi Uchwała Rady Naukowej nr X/159/2024 Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno Spożywczego im. Profesora Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie (z dnia 12.12.2024 r.) oraz rozprawa doktorska mgr inż. Marty Modrzewskiej.

Podstawę prawną stanowi art. 190 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (DZ.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt.: „Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji/transformacji mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie bezpieczeństwa żywności” stanowi spójny tematycznie cykl czterech publikacji w tym jednej przeglądowej opublikowanych w latach 2022-2024 w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym posiadających indeks wpływu IF i znajdujących się w części A wykazu czasopism



Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). W tym miejscu należy zaznaczyć że publikacja czwarta (P4) wchodząca w skład ocenianej rozprawy na czas przygotowania recenzji znajdowała się na etapie recenzji redakcyjnej. Są to następujące pozycje:

1. **Modrzewska, M.**, Bryła, M., Kanabus, J., Pierzgalski, A. *Trichoderma* as a biostimulator and biocontrol agent against *Fusarium* in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities. *Plant Pathology* 2022, 71(7), 1471-1485. doi: 10.1111/ppa.13578.
2. **Modrzewska, M.**, Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T., Bryła, M. *Trichoderma* versus *Fusarium* - inhibition of pathogen growth and mycotoxin biosynthesis. *Molecules* 2022, 27(23), 8146. doi: 10.3390/molecules27238146
3. **Modrzewska, M.**, Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Bryła, M., Cramer, B., Humpf, U.H., Twarużek, M. Antagonistic properties against *Fusarium sporotrichioides* and glycosylation of HT-2 and T-2 toxins by selected *Trichoderma* strains. *Scientific Reports* 2024, 14(1), 5865. doi: 10.1038/s41598-024-55920-x
4. **Modrzewska, M.**, Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A., Urbaniak, M., Bryła, M. Impact of selected *Trichoderma* isolates on metabolomic profiles of two *Fusarium proliferatum* strains.

Suma punktów MEiN za wymienione publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, według komunikatu MEiN obowiązującego w roku wydania prac wynosi 420, a ich sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 11,73. We wszystkich pracach tworzących cykl Doktorantka jest pierwszym autorem publikacji, jak również Pani mgr Modrzewska pełniła rolę autora korespondencyjnego w dwóch z czterech pracach.

Przesłana do recenzji dysertacja składa się z 11 rozdziałów, zawierających oprócz kopii opublikowanych prac 78 stronicowy maszynopis. Układ pracy jest typowy dla opracowań o charakterze eksperymentalnym. Obejmuje część teoretyczną zawierającą: **Streszczenie pracy** w języku polskim i angielskim, **Wprowadzenie** oraz **Przegląd Piśmiennictwa**, będący uzasadnieniem wyboru tematu pracy, w którym zawarto

podstawy naukowe i przedstawiona w ramach rozprawy tematyka badawcza. W dalszej części dysertacja zawiera **Hipotezy cel i zakres pracy**, a także **Materiał i Metody badawcze**. Następnie Autorka **Omówiła Publikacje** wchodzące w cykl, a także zamieściła **Materiały uzupełniające**, rozdział ten zawiera wybrane wyniki i ich dyskusję pochodzące ze wszystkich prac eksperymentalnych. **Podsumowanie i wnioski** oraz **Spis piśmiennictwa** obejmujący 143 pozycje, a także **Oświadczenia współautorów** o udziale w opracowaniu publikacji. Z oświadczeń współautorów publikacji wynika, że Doktorantka brała udział w doborze właściwych metod do realizacji celu badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników i ich interpretacji, przygotowywaniu i redagowaniu manuskryptów.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym w świetle aktualnych przepisów prawa praca spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej.

Ocena wyboru tematu i zakresu pracy

Mykotoksyny to toksyczne wtórne metabolity produkowane przez grzyby pleśniowe, takie jak *Fusarium*, *Aspergillus* czy *Penicillium*, które stanowią poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Zanieczyszczenie zbóż, pasz i produktów roślinnych mykotoksynami może prowadzić do poważnych konsekwencji zdrowotnych u ludzi i zwierząt, a także strat ekonomicznych w sektorze rolnym. W tym kontekście biokontrola, rozumiana jako wykorzystanie mikroorganizmów do zwalczania patogenów jawi się jako obiecująca i ekologiczna alternatywa dla chemicznych fungicydów.

W odniesieniu do ograniczania kumulacji mykotoksyn, biokontrola skupia się na dwóch głównych mechanizmach: ograniczeniu infekcji roślin przez grzyby mykotoksynotwórcze oraz bezpośredniej detoksykacji mykotoksyn poprzez mikroorganizmy lub ich enzymy. Najczęściej wykorzystuje się bakterie z rodzaju *Bacillus*, promieniowce (*Streptomyces*) i grzyby saprotroficzne z rodzaju *Trichoderma*. Szczególnie *Trichoderma* wykazuje zdolność do kolonizacji ryzosfery, konkurencji o przestrzeń i składniki odżywcze, produkcji enzymów litycznych (chitynazy, glukanazy) oraz syntezy związków o działaniu antybiotycznym, które ograniczają wzrost patogenów, takich jak



Fusarium graminearum czy *F. culmorum*. Dodatkowo, niektóre szczepy potrafią prowadzić proces biotransformacji mykotoksyn.

Tematyka pracy wpisuje się w priorytety współczesnej fitopatologii i agrobiotechnologii, zwłaszcza w kontekście strategii UE ograniczających stosowanie środków chemicznych w produkcji rolnej. Autorka słusznie identyfikuje niszę badawczą w zakresie biotransformacji mykotoksyn przez *Trichoderma* oraz niedostatecznego poznania szlaków metabolicznych tych grzybów. Pani mgr inż. M. Modrzewska w swojej dysertacji w sposób bardzo interesujący z punktu widzenia naukowego, ale również praktycznego połączyła oba wątki tworząc spójną rozprawę doktorską.

Oceniana dysertacja ma charakter interdyscyplinarny z zakresu szybko rozwijającego się zrównoważonego rolnictwa, toksykologii oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego w przemyśle spożywczym. Problem ten jest umiejscowiony w naukach rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia i może być podstawą opracowania dysertacji na stopień naukowy doktora.

Merytoryczna ocena pracy

Tytuł rozprawy jest zgodny z jej treścią.

Dysertacja zawiera oświadczenia Autorki, Promotora oraz Współautorów na temat samodzielności napisania prac dodatkowo zamieszczono informację na temat finansowania badań wykonanych w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej (NCN, OPUS 2019/33/B/NZ9/02743.). Z zamieszczonych oświadczeń wynika, że indywidualny wkład Doktorantki w powstanie każdej z nich, mieścił się w przedziale 60-80%. Jednocześnie w dwóch pracach Doktorantka podaje przy udziale procentowym niektórych autorów wartości 1% lub 2% w ocenie Recenzenta taki udział zasługuje na podziękowania na końcu pracy a nie współautorstwo. Mgr inż. M. Modrzewska brała udział w doborze właściwych metod do realizacji celu badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników ich interpretacji, przygotowywaniu i redagowaniu manuskryptów. W dalszej części dysertacji Doktorantka zawarła wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, uwzględniając punkty wg listy MEiN oraz sumaryczny Impact Factor wg listy JCR. Doktorantka zamieściła również Wykaz skrótów, który uważam za bardzo



potrzebny i dobrze że ten element pracy został uwzględniony. Kolejne części dysertacji to streszczenie w języku polskim i angielskim, które obejmują krótkie wprowadzenie, omówienie celu pracy i poszczególnych jej etapów oraz charakterystykę najważniejszych wyników.

W rozdziale zatytułowanym Wprowadzenie Autorka dokonała wprowadzenia w tematykę badawczą doktoratu oraz aspektów związanych z mikrobiologią, toksykologią i agronomią.

W Przeglądzie piśmiennictwa szczegółowo omówiono: (1) rolę grzybów w ekosystemach, ze szczególnym uwzględnieniem ich oddziaływań wzajemnych; (2) charakterystykę grzybów *Fusarium* i ich mykotoksyn – przedstawiono najważniejsze gatunki patogeniczne dla zbóż oraz właściwości, występowanie i toksyczność wytwarzanych przez nie mykotoksyn; (3) charakterystykę grzybów z rodzaju *Trichoderma* – ich biologię, zastosowania biotechnologiczne, zdolności antagonistyczne i biostymulujące; (4) dotychczasowe dane o szlakach metabolicznych *Trichoderma* związanych z degradacją mykotoksyn (m.in. przytoczono znane przykłady biotransformacji toksyn, takie jak przemiana deoksyniwalenolu do form sprzężonych); oraz (5) znaczenie praktyczne wykorzystania *Trichoderma* w kontekście bezpieczeństwa żywności, czyli potencjalne zastosowanie tych grzybów do ograniczania skażenia płodów rolnych mykotoksynami. Przegląd piśmiennictwa jest napisany bardzo rzetelnie i świadczy o dużej znajomości tematu przez Autorkę. Na uwagę zasługuje fakt, że w przeglądzie uwzględniono najnowsze publikacje (w tym z lat 2022–2024), a informacje przedstawiono w sposób syntetyczny i zrozumiały. Literaturę dobrano celnie, obejmując zarówno podstawowe prace przeglądowe, jak i szczegółowe badania eksperymentalne związane z podjętą problematyką. Można stwierdzić, że Doktorantka dogłębnie przeanalizowała aktualny stan wiedzy i na tej podstawie właściwie uzasadniła podjęcie własnych badań. Podsumowując, część wprowadzająca i przeglądowa pracy została opracowana na wysokim poziomie merytorycznym. Zapewnia czytelnikowi pełne zrozumienie tła naukowego rozprawy i jednoznacznie wskazuje, jakie zagadnienia pozostają nierozwiązane. Tym samym tworzy solidne podstawy teoretyczne pod sformułowanie celów i hipotez badawczych.

W kolejnym rozdziale dysertacji Autorka w sposób prawidłowy stawia główny cel



badawczy uzupełniony o trzy cele szczegółowe. Można stwierdzić, że tak sformułowane cele badawcze spełniają wymagania stawiane pracom doktorskim przez RDN a związanych z uzupełnieniem luki w wiedzy związanej z tematem dysertacji. Doktorantka przedstawiła również wybrany do rozwiązania problem naukowy w formie jasno opisanych 3 hipotez badawczych. W ocenie Recenzenta hipotezy te są prawidłowo zbudowane, jednoznaczne i zostały w dalszej części pracy sprawdzone przy pomocy odpowiednio dobranych metod. Oceniam, że cele pracy zostały sformułowane wyraźnie i konkretnie, a przyjęte hipotezy były trafne i logiczne. Stanowiły one spójną podstawę do zaplanowania eksperymentów. W dalszych częściach rozprawy doktorantka konsekwentnie dążyła do realizacji tych założeń, co będzie omówione poniżej.

Kolejny rozdział pracy stanowi opis Materiałów i metod badawczych wykorzystanych przez Doktorantkę w zaprezentowanych publikacjach. Zastosowana w rozprawie metodyka badawcza jest rozbudowana i dobrana adekwatnie do postawionych celów. Autorka wykorzystała szereg nowoczesnych metod z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej oraz analityki chemicznej, co nadaje pracy charakter interdyscyplinarny. Autorka zastosowała nowoczesny warsztat badawczy (UHPLC-HRMS, dPCR, metabolomika nieukierunkowana), ale niekiedy brakuje informacji o które chciałbym w tym miejscu zapytać:

Uwaga, jaka nasunęła mi się w trakcie zapoznawania się z informacjami zawartymi w powyższym rozdziale:

1. Nie dostrzegłem danych walidacyjnych dla zastosowanych metod analitycznych – np. poziomów granic oznaczalności (LOQ) i granic wykrywalności (LOD) dla analizowanych mikotoksyn lub wydajności odzysku w eksperymentach ekstrakcyjnych w pracach P3 i P4 w przeciwieństwie do pracy P2 czy zostały one wykonane w wymienionych pracach?

Niezależnie od powyższej uwagi należy pochwalić doktorantkę za tak szerokie i wielowymiarowe podejście do tematu. Pozwoliło ono na wielostronną weryfikację hipotez przy użyciu niezależnych technik (np. efekty antagonistyczne potwierdzano zarówno na poziomie makroskopowym, jak i molekularnym; wpływ na toksyny oceniano ilościowo i jakościowo). W mojej ocenie, pod względem doboru metod badawczych praca stoi na bardzo wysokim poziomie.



W rozdziale zatytułowanym „Omówienie publikacji”, mgr Modrzewska przedstawiła wybrane wyniki zawarte w poszczególnych publikacjach. Ogólnie wszystkie z zaprezentowanych wyników stanowiących efekty eksperymentów pochodzących z cyklu powiązanych tematycznie publikacji to bardzo dobrze przygotowane i zinterpretowane dane wpisujące się w dyscyplinę nauk jaką jest technologia żywności i żywienia. Już pierwsza praca cyklu (P1) stanowi niezwykle wartościowy przykład pracy przeglądowej opisującej potencjał grzybów z rodzaju *Trichoderma* jako organizmów stosowanych w biokontroli przeciw *Fusarium* na zbożach. Praca ta daje dobrą podbudowę teoretyczną – autorka zebrała w niej informacje literaturowe oraz wstępne wyniki wskazujące na efektywność niektórych szczepów *Trichoderma* w hamowaniu wzrostu *Fusarium*. Dzięki tej pracy Doktorantka potwierdziła zasadność dalszych badań eksperymentalnych i pomogła zawęzić listę obiecujących szczepów antagonistycznych. Artykuły P2–P4 przedstawiają oryginalne badania doktorantki, których wyniki w pełni potwierdzają hipotezy H1–H3. Wykazano, że szczepy *Trichoderma* silnie antagonizują *Fusarium*, istotnie ograniczając wzrost jego grzybni w warunkach współhodowli na pożywkach stałych. Przykładowo, w eksperymencie P2 średnica kolonii *F. culmorum* i *F. sporotrichioides* zmniejszyła się o 50–70% w obecności *Trichoderma*. Ilościowy PCR potwierdził znaczne obniżenie poziomu DNA patogenów, co wskazuje na ich zahamowaną proliferację i potwierdza hipotezę H1. Autorka zaobserwowała również swoistość działania: skuteczność antagonizmu różniła się między izolatami, przy czym kilka (np. AN515, AN523, AN705 – *T. atroviride* i *T. viride*) wykazało szczególnie silne działanie wobec różnych szczepów *Fusarium*. Identyfikacja tych izolatów stanowi cenny wynik aplikacyjny.

W przedstawionych pracach Doktorantka potwierdziła również hipotezę H2 – obecność *Trichoderma* znacząco ograniczała biosyntezę mykotoksyn przez *Fusarium*. W warunkach współhodowli odnotowano kilkukrotne obniżenie stężenia toksyn T-2, HT-2, DON i zearalenonu, sięgające ponad 80% względem kontroli. Sugeruje to zakłócenie metabolizmu wtórnego patogenów, prawdopodobnie na skutek stresu wywołanego konkurencją lub działaniem inhibitorów. Wyniki te mają istotne znaczenie aplikacyjne, wskazując na potencjał *Trichoderma* w ograniczaniu ryzyka skażenia mykotoksynami i wspierają hipotezę H2.

Wyniki związane z hipotezą H3 wykazały, że *Trichoderma* może detoksykować



mykotoksyny poprzez ich biotransformację. W pracy P3 po raz pierwszy udokumentowano glikozylację toksyn T-2 i HT-2 – HPLC-MS/MS potwierdziła obecność ich glikozydów, w tym 3-O- β -D-glukozydu HT-2, co dowodzi aktywności enzymatycznej *Trichoderma*. To pionierskie odkrycie rozszerza dotychczasową wiedzę o mechanizmach detoksykacji. Dodatkowo, w P4 zaobserwowano zmiany w metabolizmie fumonizyn, sugerujące ich częściową degradację. Wyniki te wskazują, że *Trichoderma* nie tylko hamuje rozwój patogenów, ale może także aktywnie neutralizować ich toksyny, co otwiera nowe perspektywy badawcze.

Chociaż jako Recenzent nie czuję się uprawniony do oceny publikacji poddanych już uprzednio procesowi recenzji w czasopiśmie o wysokiej renomie, to czytając powyższą część dysertacji nasunęła mi się jedna uwaga i pytanie:

Uwaga: Ma charakter czysto edycyjny i subiektywny nie wpływający na ocenę dysertacji. Czy wyniki zawarte w rozdziale „Materiały uzupełniające” są wynikami dotychczas nie opublikowanymi? Dlaczego Autorka nie zdecydowała się umieścić kopii prac w załączniku na końcu pracy a wybrane wyniki z wszystkich prac nie zostały umieszczone w jednym rozdziale co ułatwiłoby czytelnikowi analizę wyników?

Pytanie: Nie dostrzegłem w pracach danych toksykologicznych dotyczących produktów transformacji (jak α -ZOL czy DON-3G), mimo że ich potencjalna estrogenowość lub resztkowa toksyczność może mieć znaczenie dla bezpieczeństwa konsumenta czy takie badania były wykonane?

W przywołanym przez siebie powyżej rozdziale Autorka dokonała pogłębionej, rzetelnej dyskusji na tle literatury. Doktorantka trafnie porównuje własne obserwacje z danymi innych badaczy, wykazując bardzo dobre zrozumienie mechanizmów biologicznych. Przykładowo, obecność metabolitu 6PP i spadek poziomu mykotoksyn odnosi do znanych mechanizmów działania *Trichoderma*, takich jak konkurencja o prekursorzy czy zakwaszenie środowiska. Taka analityczna interpretacja potwierdza dojrzałość naukową i umiejętność krytycznej analizy danych.

Kolejną część pracy stanowi rozdział Podsumowanie oraz wnioski. Doktorantka sformułowała 7 precyzyjnych i bardzo dobrze sformułowanych wniosków podsumowujących całokształt realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej badań. Jednocześnie warto podkreślić, że przedstawione wnioski potwierdzają zarówno



poznawczy charakter jak i rozwojowy potencjał przedstawionej do oceny dysertacji. W podsumowaniu badań Autorka przedstawiła najistotniejsze ustalenia wynikające z rezultatów pracy, podała również kierunki dalszych badań nie odniosła się jednak do tego gdzie i przez kogo wyniki mogą być wykorzystane.

Bibliografia kończy ocenianą rozprawę doktorską zawiera 133 pozycji anglojęzycznych w większości pochodzących z ostatnich 10 lat oraz pozycje książkowe, raporty i akty prawne. Bibliografia jest przygotowana bardzo starannie, z dużą troską o szczegóły. Wszystkie nazwy czasopism podane zostały według tego samego klucza. Nie znalazłem poważniejszych uchybień w tym rozdziale.

Zawarte w cyklu prace są już opublikowane i poddane recenzjom, ja również oceniam je bardzo wysoko. To stwierdzenie pozwala jednocześnie Recenzentowi poprosić Doktorantkę o rozważenie następujących zagadnień podczas dyskusji:

1. Które enzymy *Trichoderma* uważa Pani za kluczowe w transformacji toksyn typu T-2 i ZEN i czy planuje Pani ich izolację lub charakterystykę?
2. Jakie są potencjalne skutki toksykologiczne dla konsumenta wynikające z obecności metabolitów takich jak DON-3G, α -ZOL lub fusarinol – i czy można uznać je za bezpieczne?
3. Jakie bariery technologiczne i regulacyjne dostrzega Pani w komercyjnym wdrożeniu preparatu opartego na szczepach *Trichoderma* do ochrony zbóż?

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodząc możliwości wykorzystania szczepów *Trichoderma* jako potencjalnych składników preparatów stosowanych w ochronie zbóż przed grzybami z rodzaju *Fusarium*. Sformułowane w rozprawie hipotezy badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane. Praca poszerza stan wiedzy w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Dysertacja została przygotowana starannie, z dużą dbałością o stronę naukową, językową i edytorską.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Marty Modrzewskiej, pt. „Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji/transformacji mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie bezpieczeństwa żywności” ma bardzo wysoką wartość naukową, a przedstawione przez mnie bardzo drobne i nieliczne uwagi, nie umniejszają jej merytorycznej wartości poznawczej oraz znaczenia podjętego problemu badawczego.

Uważam, że oceniana dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawartym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm). Doktorantka wykazała wysoką umiejętność prowadzenia badań naukowych, a także opracowania i interpretacji otrzymanych wyników w oparciu o aktualne piśmiennictwo z zakresu podjętej problematyki badawczej. Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Profesora Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Modrzewskiej do publicznej obrony oraz dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy ze względu na szeroki i interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań. Uzyskane wyniki w badaniach *in vitro* pozwoliły na określenie aktywności antygrzybiczej w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium* przez badane izolaty *Trichoderma*. W mojej ocenie badania mają praktyczne znaczenie w kontekście możliwości zastosowania wyselekcjonowanych izolatów jako składników preparatu stosowanego w biokontroli.

