

OPPONENSI VÉLEMÉNY

Bartók Tibor: „Új fumonizin mikotoxinok azonosítása HPLC/MS módszerekkel”
című doktori értekezéséről

A doktori értekezés témaválasztása rendkívül időszerűnek mondható. Mind tudományos, mind gyakorlati, gazdasági és élelmiszer-biztonsági szempontból fontos kutatási terület.

A gabonafélék penészgombával való fertőződése a mezőgazdaság számára régóta ismert jelenség. A penészgombák másodlagos anyagcseretermékei a mikotoxinok az élelmiszerláncba bekerülve súlyos megbetegedéseket okozhatnak az állati és az emberi szervezetben egyaránt. Európai felmérések szerint az élelmiszerláncban leginkább a *Fusarium*-toxinok terjedtek el. A *Fusarium*-toxinok jelentős része már a termőföldön termelődhet és fertőzheti a gabonaféléket. A *Fusarium*-toxinok mellett kiemelkedő jelentőségűek az *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxinok is. A legismertebb *Fusarium*-toxinok közé tartoznak a Jelölt által vizsgált fumonizinek. A *Fusarium*-toxinok kimutatására számos módszer áll rendelkezésre, kémiai és immunanalitikai módszerek egyaránt. A modern eljárások, a tömegspektrométerrel kapcsolt kromatográfiás módszerek új lehetőségeket nyitnak többféle toxin egyidejű kimutatására és a még fel nem derített vegyületek meghatározására.

Általános észrevételek

A Jelölt több évtizedes munkássága során nagy jártasságot szerzett az elválasztástechnikai/kromatográfiás analitikai módszerek alkalmazásában. Az MTA doktori cím megszerzéséért benyújtott dolgozat sajnálatos módon nem tükrözi eddigi munkássága alapján elvárható tudományos minőségi színvonalat. A dolgozatban bemutatott kísérletsorozat eredményeinek többsége még nem kellően mérettetett meg a nemzetközi szakirodalom porondján, mivel csupán „közlésre beküldve” megjegyzéssel, meg sem említve a folyóiratot vagy „megjelenés alatt” nem említve az azonosítási számot, került be az értekezés eredményeit tartalmazó publikációs jegyzékbe (tézisfüzet: 9., 11., 13., 14.).

A felsorolt 14 publikáció között három magyar nyelvű egy oldalas előadás összefoglaló (tézisfüzet: 4., 6., 7.), is feltüntetésre került, ami a fentiek tekintetében nem számítható publikációnak.

Az is megválaszolandó kérdés, hogy hogyan osztoztak a tudományos fokozat/cím elnyerése érdekében beszámítható közös publikációk (tézisfüzet: 8., 10.) tekintetében egyik szerzőtársával, Tölgyesi Lászlóval, aki 2013. januárjában ugyanezen publikációkra alapozva védte meg PhD dolgozatát, és akinek nem a Jelölt volt témavezetője.

A fentiek ellenére, tekintetbe véve a Jelölt teljes munkásságára vonatkozó pozitív véleményemet, javasoltam a nyilvános védés kitűzését és készítettem el opponensi véleményemet.

Formai szempontból a doktori értekezés 152 számozott oldalt tartalmaz, melyben 51 ábra és 22 táblázat található. A értekezés felépítését tekintve a következő fejezetekből áll: 3 oldal „Rövidítések jegyzéke”, 3 oldal „Bevezetés és célkitűzések”, 39 oldal „Irodalmi áttekintés”, 9 o. „Anyagok és módszerek”, 68 o. „Eredmények és megvitatásuk”, ezt követi a 4 oldalas „Összefoglalás, új eredmények”, 1 oldal „További feladatok, lehetőségek a

fumonizin kutatásban”, 22 oldal „Irodalomjegyzék” 282 irodalmi hivatkozással, köztük saját közleményeivel és végül 1 oldalas „Köszönetnyilvánítás ” zárja a dolgozatot.

A dolgozat gördülékeny elbeszélő stílusban íródott. Az értekezésben jelentősebb számú gépelési hiba nem található.

- Gyakran visszatérő magyartalanság azonban pl.: a kis és nagy értékek helyett alacsony és magas koncentrációk (tartalom) említése, amely az angolszász nyelvű irodalom olvasásából eredhet. Helytelen szavak: „legoptimálisabb” (helyesen legideálisabb vagy optimális); acilálódik helyesen acileződik; gradiens helyesen gradiens.
- Formai hibaként említhető, hogy az ábrák és táblázatok betűmérete és betűtípusa eltér (nem egységesen) a szövegtörzstől. Különösen a sokkal kisebb betűméret alkalmazása nehezíti az olvashatóságot.
- A címek után (ábrák és táblázatok) nem kell pontot tenni.
- A két oldalra került ábrák és táblázatok címeit az új oldalon is fel kell tüntetni (27. ábra; 5. és 7. táblázat)
- A többsoros címek esetén a szöveget célszerű egymás alá rendezni, hogy a fejezet sorszáma önállóan jelenhessen meg.
- A táblázatokban szereplő mintaszámok sorszámai. A magyar helyesírásnak megfelelően pontot kell tenni a számok után.
- Az ábrákat és táblázatok jobban el kell választani (pl. 2-2 sor kihagyásával) a szövegtörzstől, mivel azok önálló egységei a dolgozatnak.
- Nem a bekötés szerinti jobb alsó sarokban van az oldalszám (a többi oldalon megfelelően) a következő oldalakon: 69., 70., 72., 76., 81., 88., 93., 104. és 107. oldal.
- Az SI mértékegység rendszer használata mérnöki tudományos dolgozatokban alapvető fontosságú (perc-min, ml-cm³, stb.).

Köztudott, hogy manapság nehéz egyedül magas színvonalú tudományos kutatásokat végezni, ugyanakkor a csoportmunka eredményeiből a Jelölt a tudományos cím eléréseért benyújtott értekezésében a leginkább saját munkájának tekinthető eredményeket kell, hogy önállóan készített írásos munkában összefoglalja. A szöveges részben több esetben is zavarólag hat (pl. az anyagok és módszerek leírásánál) a többes szám alkalmazása, és nehezítheti a dolgozatban bemutatott kutatómunka Jelöltre vonatkozó értékelését.

Részletes értékelés

1. Rövidítések jegyzéke

- A Rövidítések jegyzéke hasznos útmutató az olvasó számára. A következetességet figyelembe véve az összeállításból kimaradtak a következők: T, HT (6.o.), MRC (9.o.), H (12.o.), FUM (17.o.), NRRL (18.o.), KS, AT, DH, MT, ER, KR, ACP, TE (19.o.), NADPH (26.o.), VERT (48.o.)
- PPE hibás a megnevezés „edema”
- Dőlt S betűvel: S-adenozil-metionin

2. Bevezetés és célkitűzések

- A téma fontosságának rövid bemutatását követően 7 pontban fogalmazta meg a kollektív kutatómunka célkitűzéseit, melyek fő területei a módszerkidolgozás és módszerfejlesztés a fumonizinek kimutatására HPLC/MS kapcsolt módszerekkel,

különböző növényfajokból származó *Fusarium verticillioides* izolátum fumonizin B₁₋₄ termelőképességének *in vitro* vizsgálata valamint új fumonizinek kimutatása.

- Az értekezés téziseit tartalmazó külön füzetben ebből csak 5 pont szerepel (kimaradt az 5. és 6. pont).

3. Irodalmi áttekintés

- Az irodalmi részben alapos, áttekintő összefoglalást adott a fumonizin kutatás legfontosabb területeiről: a fumonizineket termelő gombafajokról, a fumonizinek bioszintéziséről és ennek genetikai szabályozásáról, az analitikai módszerekről, toxicitás vizsgálatokról, valamint az élelmiszerbiztonságot érintő kérdésekről.
- Dicséretes, hogy bizonyos fejezetek végén össze is foglalja a legfontosabb megállapításokat (pl. 2.1., 2.4., 2.6.).
- Hibás idézések: **11.o.** Musser és Platner 1996 lásd. Irodalomjegyzék 1997; **24.o.** Gutleb és mtsai kimaradt az évszám (2002); **25.o.** Merrill és mtsai 1996 helyesen Merrill és Sweeley 1996; **26.o.** Hannun és mtsai 1993 helyesen Hannun és Bell 1993.
- 46.o. az LOQ-t helytelenül kimutatási határként említi, helyesen meghatározási határ (limit of quantification).

4. Anyagok és módszerek

- A minták előkészítésére és meghatározására vonatkozóan a módszerek bemutatása többségében kellően részletes.
- Hiányoznak azonban a módszerkidolgozásra vonatkozó alapvető adatok, a validálás (ha volt ilyen) körülményei stb., és az eredmények fejezetben sincsenek bemutatva a „kidolgozott” módszerre vonatkozó teljesítményjellemzők.
- Nem derült ki, hogy hány független ismételtsben, hány párhuzamos elemzést végeztek, milyen adatokon alapulnak a statisztikai elemzések.
- Kérdésként merült fel bennem, hogy miért rizstenyészetet választottak a fumonizinek felszaporítására? A kukorica nem lett volna kézenfekvőbb?
- Befolyásolja-e a tápközeg minősége (különbözősége) a mikotoxin termelés minőségi és mennyiségi adatait? Mennyire reprodukálható a rizstenyészetben végzett fumonizinek termeltetése, kinyerése a minőségi és mennyiségi meghatározás tekintetében?
- A 3.6.1. és 3.6.2. pontban alkalmazott nagyságrendekben eltérő koncentrációjú (10 ng/cm³ ill. 1 ng/μl) FB₁ referencia oldatok készítésénél mi indokolta az oldószer összetételi eltérést (MeCN/H₂O ill. MeOH/H₂O), ha a leírás szerint a HPLC-s elválasztás körülményei megegyeztek?
- Hány pontos kalibrációt alkalmaztak a külső standard módszeres mennyiségi értékelésnél (10 pg/μl – 500 ng/μl)? Mi volt a lineáris tartomány?
- Milyen hibával értelmezhetők a mennyiségekre vonatkozó adatok?
- A mazsola- és vöröshagymaminták vizsgálatánál az *Aspergillus* fajok izolálására vonatkozóan nincs leírás illetve megadva irodalmi hivatkozás.
- A mazsolaminták vizsgálatánál a hozzáadott referencia anyagra vonatkozó viszonylag kis (kb. 50%) visszanyerési százalék alapján a mintákra megállapított koncentráció értékek messzemenő következtetések levonására nem alkalmasak.
- Apróbb hiba egyes vegyületek írásmódja (MeOH, MeCN). A vegyületeket helyes képlettel kell szerepeltetni vagy a fentieket a rövidítésjegyzékbe beírni.

5. Eredmények és megvitatásuk

- A Jelölt a következő területeken együttműködésben elért eredményeket mutatta be:
 - o Magyarországon begyűjtött *Fusarium verticillioides* izolátumok fumonizin B₁₋₄ termeléséről *in vitro* körülmények között
 - o Új fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS módszerrel történt azonosítása meredekebb gradiens elválasztás felhasználásával
 - o Új fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS és TOFMS módszerrel történt azonosítása kevésbé meredek gradiens elválasztás felhasználásával
 - o Fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS meghatározása mazsolából és mazsolából izolált fekete *Aspergillus* fajokkal fertőzött táptalajmintákból
 - o Fumonizinek RP-HPLC/ESI-ITMS azonosítása vöröshagymában

Az eredményeket ismertető alfejezetek szemléletes leírásban tartalmazzák a kísérletes munka részleteit és a kapott eredmények értékelését, amelyeket statisztikai módszerekkel is elemezett.

- Az eredmények között nem tüntette fel a kidolgozott módszerre vonatkozó teljesítményjellemzőket. A közöltek alapján a módszer inkább tekinthető adaptációnak, mint valódi módszerfejlesztésnek.
- Az eredmények jóságára vonatkozó kérdéseimet a 4. pont alatt már feltettem.
- Az ábrákra és táblázatokra vonatkozó megjegyzéseimet az általános részben fogalmaztam meg.
- Hibás idézések: **57.o.** Visconti és mtsai 1994 helyesen Visconti és Doko 1994
- 58.o. A teljes variációk - helyesen teljes variancia
- 12. ábrán (fekete-fehér) nem értelmezhető a fekete vízszintes vonalak melletti magyarázó szöveg (rozs, emberi szem, fokhagyma)
- A 63. oldalon jelzett (4.2. fejezet) 16. ábra átkerült a következő fejezetbe.
- 7., 9., 11., 13., 14., 15., 17., 18. táblázat fejlécében nem a balról-jobbra olvasási szabálynak megfelelő a felirat

6. Összefoglalás, új eredmények

- Az összefoglalásban kiemeli a széleskörű együttműködésben végzett kutatásaik fő eredményeit. Szerencsésebb lett volna tézisszerűen bemutatni az új eredményeket.
 - o Először térképezték fel Magyarországon a *Fusarium verticillioides* elterjedtségét. Megállapították, hogy a *F. verticillioides* legalább két különböző kemotípusa kíséri a kukoricánövényt.
 - o Számos új fumonizin és fumonizin izomert azonosítottak, ezek között kiemelt jelentőségűnek tartották az FD, FBX, FP analógokat.
 - o Szerkezeti izomerek elválasztására ajánlott RP-HPLC oszlop és kevésbé meredek gradiens alkalmazásával a korábbinál hatékonyabb elválasztást értek el FB₁ és FB₅ toxinok izomerjeinek vizsgálatakor.
 - o TOFMS eljárást a Jelölt és munkatársai először alkalmazták fumonizin izomerek azonosítására.
 - o Először mutatták be biológiai mintából a 3-*epi*-FB₄ és FB₄ toxinok elválasztását.

7. További feladatok, lehetőségek a fumonizin kutatásban

- A Jelölt kutatásai fő eredményei alapján hét pontban foglalta össze a jövőbeni teendőkre vonatkozó javaslatokat.

8. Irodalomjegyzék

- Az irodalomjegyzékben 282 szakirodalmat sorolt fel.
- Nelson és mtsai 1993 nincs idézve a szöveges részben.
- Nem tekinthető irodalmi forrásnak a megjelenés alatt álló illetve közlésre beküldött 5 saját közlemény, így azoknak a dolgozat irodalomjegyzékében való szerepeltetése hibás (Bartók és mtsai 2011a és 2011b; Kocsubé és mtsai 2011; Szécsi és mtsai 2011; Varga és mtsai 2011). Az elektronikusan elérhető, még meg nem jelent szakirodalmak esetén a doi szám közlése szükséges.

Összefoglalva megállapítható, hogy a Jelölt értekezésében széleskörű együttműködésben végzett kutatásainak eredményeiről számolt be, amelyek közül az alábbiakat tartom kiemelkedőnek:

- A Jelölt és munkatársai először térképezték fel Magyarországon a *Fusarium verticillioides* elterjedtségét.
- Először alkalmazták a HPLC/TOFMS eljárást fumonizin izomerek azonosítására.

Az értekezés nyilvános vitára bocsátását a jelölt eddigi munkásságára tekintettel javasolom és eredményes védelem esetén részére az MTA doktora cím odaítélését támogatom.

Egyéb kérdéseim:

- Az élelmiszerbiztonság növelése érdekében milyen kilátások vannak a mikotoxinokra (fumonizinekre) rezisztens gabona hibridek előállítására?
- Mikorra várható az egészségügyi kockázat megítélésben fontos ún. eltűrhető napi beviteli érték (TDI) meghatározása fumonizinekre?

Budapest, 2013. január 15.

Simonné Sarkadi Livia
MTA Doktora