

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski

**pt. *Ocena skuteczności atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej
przeciwko fitopatogennym grzybom***

**w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne,
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Ireny Maliszewskiej, prof. PWr**

Podstawę opracowania recenzji stanowiło pismo dr hab. inż. Roberta Góry, prof. uczelni, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej, z dnia 17 lipca 2024 r.

Celowość podjęcia problemu naukowego

Straty i marnotrawstwo żywności to globalny problem na wszystkich etapach łańcucha rolno-spożywczego, zagrażający bezpieczeństwu żywnościowemu i generujący wiele negatywnych skutków o istotnym wpływie na zasoby naturalne, środowisko przyrodnicze i gospodarkę. Problem ten znalazł odzwierciedlenie w unijnych strategiach zrównoważonego rozwoju i przyjętej we wrześniu 2015 r. Agendzie na rzecz Zrównoważonego Rozwoju 2030. Szacuje się, że w krajach Unii Europejskiej marnowanych jest 57 mln ton żywności rocznie, co stanowi 127 kg w przeliczeniu na mieszkańca. W Polsce ilość marnowanej żywności to blisko 5 mln ton w skali roku. Komisja Europejska w Strategii „od pola do stołu” zobowiązała się do zmniejszenia o połowę ilości odpadów żywnościowych na mieszkańca do 2030 r. Realizacja tego celu ma przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa żywnościowego i zmniejszyć presję na środowisko naturalne. W globalne i unijne cele z zakresu zrównoważonego rozwoju i zwiększenia bezpieczeństwa żywnościowego w pełni wpisują się badania służące opracowaniu skutecznych metod zapobiegania psuciu żywności i jej utrwalania. W tym kontekście wybór problemu badawczego przez mgr inż. Darię Nowinski, dotyczący inaktywacji pleśni powodujących psucie żywności na powierzchni opakowań stosowanych w przechowywaniu, jest w pełni uzasadniony i aktualny. Przeprowadzone kompleksowe badania z zastosowaniem atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej

pozwoliły Doktorantce uzyskać wyniki, które są cennym osiągnięciem naukowym, przyczyniającym się do rozwoju dyscypliny nauki chemicznej. Wyniki te poza aspektem poznawczym mają również charakter aplikacyjny i są ważne ze względów społecznych, ekonomicznych i środowiskowych.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter doświadczalny. Układ pracy odpowiada przyjętemu dla tego typu opracowań i obejmuje 8 rozdziałów, w tym wprowadzenie z przeglądem literatury dotyczącej podjętego problemu badawczego, cel i zakres pracy, materiały i metody oraz rozdziały stanowiące omówienie wyników wraz z dyskusją, podsumowanie i wnioski. W pracy zamieszczono także streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz zastosowanych skrótów, bibliografię, spis tabel, wykresów i rysunków oraz dorobek naukowy Autorki, obejmujący wykaz publikacji i konferencji naukowych. Praca liczy 227 stron, a wyniki zostały przedstawione w 16 tabelach, na 17 wykresach i 11 rysunkach. Podział rozdziałów na podrozdziały sprawia, że układ pracy jest bardzo przejrzysty. W pracy wykorzystano bogaty zbiór literatury ściśle związanej z tematyką rozprawy, liczący 329 pozycji piśmiennictwa światowego, przy czym 73% stanowią publikacje z ostatnich 10 lat.

Ocena merytoryczna pracy

Ciekawe i dobrze napisane Wprowadzenie stanowi przegląd aktualnej literatury i wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką pracy. Autorka omówiła problem zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego w aspekcie strat żywności i zwiększającego się popytu na żywność w związku ze stałym wzrostem liczby ludności na świecie. Znaczącą część Wprowadzenia Doktorantka poświęciła na opisanie roli pleśni w stracie żywności, spowodowanej chorobami roślin uprawnych na początkowych etapach łańcucha rolno-spożywczego, psuciem środków spożywczych pochodzenia roślinnego oraz zanieczyszczeniem żywności mykotoksynami. Zostały także omówione czynniki wirulencji grzybów fitopatogennych, z uwzględnieniem adhezji i tworzenia biofilmu, sekrecji fitotoksyn i enzymów degradujących strukturę roślinnej ściany komórkowej oraz uwalniających z komórek roślinnych składniki odżywcze wykorzystywane przez pleśń. Autorka w kolejnych podrozdziałach scharakteryzowała te gatunki grzybów strzępkowych, które były zastosowane w badaniach, tj. *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *Botrytis cinerea* i *Alternaria alternata*. W tym kontekście brakuje we wprowadzeniu omówienia ryzyka i zagrożeń wynikających z występowania pleśni *F. tricinctum* na etapie upraw i/ lub przechowywania żywności.

Ostatni podrozdział Wprowadzenia stanowi opis dostępnych strategii kontroli grzybów fitopatogennych na kolejnych etapach łańcucha rolno-spożywczego. W tej części Autorka dokładniej opisała zasadę działania i przykłady zastosowania zimnej plazmy atmosferycznej oraz wykazała znaczenie opakowań stosowanych w przechowywaniu żywności jako potencjalnych źródeł zanieczyszczenia żywności pleśniami, co uzasadnia kierunek i przyczynę podjętych w pracy badań. Moje uwagi dotyczą jedynie doprecyzowania pewnych sformułowań użytych przez autorkę we Wprowadzeniu, tj:

str. 25 „Rozwój chorób grzybiczych w przechowywanych produktach rolnych zależy od wielu czynników, zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych, do których zaliczamy: zawartość wody w zanieczyszczonym produkcie (tj. aktywność wodna), czas przechowywania, zdrowie i kondycja fizyczna i fizjologiczna produktu przeznaczonego do przechowywania, obecność owadów i roztoczy, temperatura i wilgotność podczas przechowywania, a także rodzaj struktury magazynowej.” Co Autorka rozumie przez „zdrowie i kondycja fizyczna i fizjologiczna produktu przeznaczonego do przechowywania”?

str. 30 „Podczas infekcji grzyby nekrotroficzne aktywnie manipulują maszyną komórkową gospodarza w celu tłumienia mechanizmów obronnych.” Proszę o krótkie wyjaśnienie, na czym ta manipulacja polega.

str. 32 „Dojrzały biofilm tworzy struktury rozrodcze, umożliwiające rozprzestrzenianie się poprzez uwalnianie zarodników.” Rozumiem, że chodzi o końcową fazę tworzenia biofilmu, czyli jego dyspersję, a nie tworzenie specjalnych struktur rozrodczych?

str. 34 „Warstwa ta jest złożoną i zróżnicowaną mieszaniną długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, węglowodorów, aldehydów, alkoholi pierwszorzędowych i drugorzędowych, ketonów i estrów wosków, natomiast naskórek składa się z nierozpuszczalnego materiału polimerowego zwanego kutyną.” W botanice nie funkcjonuje pojęcie naskórek w odniesieniu do zewnętrznej warstwy epidermy utworzonej przez woski kutykularne. Prawidłowe byłoby użycie terminu kutyna w opisie tej części kutykuli.

W mojej opinii Wprowadzenie stanowi odpowiednią podbudowę teoretyczną prezentowanej pracy doktorskiej i świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w problematyce, którą porusza w swojej rozprawie.

W oparciu o dokonany przegląd piśmiennictwa Doktorantka przedstawiła w pełni uzasadniony cel, który został jasno sformułowany. Autorka nie określiła hipotez badawczych, ale podała obejmujący kilka etapów zakres pracy. Układ badawczy został dobrze zaplanowany, umożliwiając realizację celu pracy, którym była ocena skuteczności atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej w inaktywacji patogenów grzybowych na powierzchni materiałów

powszechnie stosowanych w przechowalnictwie, na przykładzie tektury i drewna. Należy podkreślić, że znaczącą część badań stanowiło rozpoznanie mechanizmów działania plazmy niskotemperaturowej na grzybnię pleśni oraz wpływu wielokrotnego traktowania plazmą na wybrane cechy związane z patogennością badanych gatunków pleśni wobec roślin. W mojej ocenie te istotne i wartościowe elementy pracy powinny znaleźć odzwierciedlenie w celu pracy albo hipotezach badawczych.

Rozdział Materiały i metody został starannie przygotowany, a zastosowane metody w przeważającej części dokładnie opisane. Do części metodycznej mam kilka pytań:

- W pkt 3.5 opisano analizę czystości mikrobiologicznej nasion ogórka gruntowego po dezynfekcji w 15% roztworze H_2O_2 . Dlaczego liczbę grzybów i bakterii oznaczano w wodzie po płukaniu nasion, a nie bezpośrednio na nasionach jak w standardowej analizie żywności?
- W pkt 3.8 dokładnie opisano izolację pleśni z powierzchni drewnianych skrzyń, ale brakuje kluczowych informacji dotyczących ich identyfikacji, między innymi stosowanych kluczy diagnostycznych, sekwencji starterów i warunków reakcji PCR lub odniesienia do literatury.
- Pkt 3.9.1. zawiera opis przygotowania zawiesin pleśni, który w mojej ocenie wskazuje, że uzyskane i stosowane w dalszych badaniach zawiesiny mogą zawierać zarówno fragmenty grzybni, jak i ich zarodniki. Natomiast w pracy (dalszych częściach metodyki, wynikach i podsumowaniu) wielokrotnie pojawia się stwierdzenie o badaniu wpływu plazmy na aktywną metabolicznie grzybnię, grzybnię lub grzyby strzępkowe w stanie wegetatywnym. Czy zostały przeprowadzone jakieś analizy wykluczające występowanie zarodników w badanych zawiesinach?
- Przy badaniu wpływu wielokrotnego traktowania pleśni plazmą niskotemperaturową na ich wrażliwość na środki grzybobójcze, Autorka zastosowała inne jednostki w metodyce (tabela 3) i wynikach (tabele 8 i 9), podając stężenie preparatów grzybobójczych. Jednak jednostki te (% v/v i $\mu\text{l/ml}$ oraz % m/v i mg/ml) nie są tożsame, co powinno być uwzględnione przy podawaniu wartości stężeń.
- Zastanawia mnie także stosowanie sterylnej wody dejonizowanej w przygotowaniu zawiesin pleśni oraz analizach mikrobiologicznych. Standardowo stosowane są roztwory izotoniczne, aby uniknąć zmniejszenia żywotności mikroorganizmów na skutek procesów osmotycznych, np. bufor PBS (wymieniany w tabeli 2 wśród podłoży mikrobiologicznych i buforów stosowanych w pracy) lub fizjologiczny roztwór soli.

Najobszerniejszy rozdział Wyniki i dyskusja (str. 93-171) stanowi zasadniczą część pracy i jest oryginalnym osiągnięciem Doktorantki. Podział tego rozdziału na 7 części odpowiada

zadaniom badawczym realizowanym w kolejnych etapach pracy. Doktorantka szczegółowo omówiła uzyskane w pracy wyniki i przeprowadziła ich dyskusję, wyjaśniając stwierdzone zależności w oparciu o cytowaną literaturę źródłową. Należy zaznaczyć ograniczoną liczbę publikacji, do których mogła się odnieść Autorka, porównując własne wyniki z uzyskanymi przez inne zespoły badawcze. Trudność ta w szczególności świadczy o oryginalności przeprowadzonych przez Autorkę badań. Wartościowym elementem jest wprowadzony w kolejnych podrozdziałach krótki opis zastosowanej metody badawczej oraz uzasadnienie podjętych analiz, co wskazuje na bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do realizacji badań i przemyślane ich zaplanowanie, a także podkreśla ich celowość. Podczas czytania tego rozdziału nasunęło mi się kilka pytań i spostrzeżeń:

- Pkt. 4.1 – W wynikach jest tylko wzmianka o generowaniu wzbudzonych form (RFT i RFA) w generatorze DBD, z odesłaniem do opublikowanych wyników. Wydaje mi się, że warto by było podać podstawowe wyniki, zwłaszcza, że oznaczenie opisane jest w metodyce pracy.
- Na większości wykresów zastosowane są różne skale dla poszczególnych szczepów. Uważam, że zastosowanie jednakowej skali lepiej obrazowałoby różnice międzyszczepowe.
- Na rys. 23 zdjęcia *F. oxysporum* DSM 12646 P0 i P10 wydają się być identyczne, ale być może to jedynie mój subiektywny odbiór. Rozumiem, że celem badań, których wyniki przedstawiono w pkt 4.6.2 była ocena zmian morfologii strzępek grzybów po wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową, ale może Doktorantka poczyniła jakieś obserwacje dotyczące wpływu plazmy niskotemperaturowej na morfologię konidiów pleśni (widocznych np. na zdjęciu *B. cinerea* DSM 877 – Rys. 22)?
- Dla *F. tricinctum* Ft11S-23 po 15-krotnym traktowaniu plazmą niskotemperaturową Doktorantka stwierdziła zmniejszenie wielkości kolonii na podłożu agarowym o 25,9% do 45,9% w zależności od czasu hodowli (Tabela 6) i jednocześnie wzrost suchej masy grzybów o 1,8% po hodowli w podłożu płynnym (Wykres 5). W jaki sposób można wyjaśnić te różnice?
- Podrozdział 4.6.3 Doktorantka kończy stwierdzeniem, że „spadek produkcji biomasy może zatem wynikać z redukcji liczby żywych komórek (stężenia inokulum) podczas obróbki plazmą.” Z czego zatem może wynikać przyrost biomasy, obserwowany zwłaszcza dla *F. culmorum* DSM 1094 i *A. alternata* Aa10S-23? Czy może być wynikiem stymulującego działania wielokrotnej ekspozycji na subletalną dawkę plazmy niskotemperaturowej?
- Pkt 4.6.4 – Stwierdzone przez Doktorantkę zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu RFT w grzybni po działaniu plazmą niskotemperaturową jest w pracy bardzo dobrze przedyskutowane. Jednak u połowy badanych szczepów obserwowano obniżenie poziomu

RFT. Jak można wyjaśnić takie zjawisko i ewentualny wpływ na patogenność mikroorganizmów?

- W podrozdziale 4.6.5 Doktorantka stawia hipotezę o zależności pomiędzy szybkością wzrostu pleśni a ich wrażliwością na działanie nadtlenu wodoru. Proszę o podanie uzasadnienia i wyjaśnienia tej hipotezy.
- Tabela 8 – dla *F. tricinctum* Ft11S-23 P15 jako wartości MIC i MFC preparatu F5 podano odpowiednio 2,5 i 1,25 mg/ml. Czy to są prawidłowe wartości? Niespotykane jest, aby stężenie bójcze było niższe od hamującego wzrost. Czy pojawiające się wielokrotne oznaczenie \leq i \geq przy wartościach MIC i MFC oznacza, że przy 2 powtórzeniach uzyskano 2 różne wyniki, czyli np. $MFC \geq 40$ mg/ml oznacza, że w 1 powtórzeniu stężenie było równe 40 mg/ml, a w drugim powyżej tej wartości?

Pomimo tych kilku uwag, wysoko oceniam zrealizowane przez Doktorantkę badania ze względu zarówno na ilość przeprowadzonych analiz, jak i ich zakres. W mojej opinii szczególnie wartościowe było oznaczenie wpływu plazmy niskotemperaturowej na zmianę wrażliwości pleśni na preparaty przeciwgrzybicze oraz cechy warunkujące ich patogenność, w tym badania *in vivo* zdolności infekcji i rozwoju objawów chorobowych w tkance roślinnej.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka opracowała rozdział Podsumowanie i wnioski, który właściwie podsumowuje osiągnięcia przedstawione w rozprawie doktorskiej. Ilość uzyskanych wyników oraz często odmienna odpowiedź poszczególnych szczepów pleśni na traktowanie plazmą niskotemperaturową z pewnością stanowiły trudność w sformułowaniu konkretnych wniosków i przyjęta w pracy forma podsumowania jest w pełni uzasadniona. Do tej części pracy mam jedną uwagę, dotyczącą spostrzeżeń na str. 179 „...Masa roślin uprawianych w glebie inokulowanej zawiesiną *F. oxysporum* DSM 12646, *B. cinerea* DSM 877 oraz *A. alternata* DSM 62010 po dziesięcio- i piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę była zbliżona do masy roślin w grupie kontrolnej, jednocześnie w przypadku *F. oxysporum* DSM 12646 i *A. alternata* DSM 62010 traktowanie plazmą skutkowało znaczną poprawą tego parametru w porównaniu do roślin inokulowanych zawiesiną P0. Z kolei dla roślin inokulowanych *F. tricinctum* Ft11S-23 i *A. alternata* Aa10S-23 zaobserwowano wzrost masy wraz z zwiększaniem liczby ekspozycji grzybów na plazmę, jednak różnice nie były istotne statystycznie w porównaniu z roślinami inokulowanymi P0.” Wyniki w tabeli 18 wskazują, że traktowanie plazmą *A. alternata* DSM 62010 skutkowało zwiększeniem masy roślin w porównaniu do roślin inokulowanych zawiesiną P0, ale tylko po piętnastokrotnej ekspozycji na plazmę oraz że masa roślin inokulowanych *F. tricinctum* Ft11S-23 wzrasta wraz

ze zwiększaniem liczby ekspozycji grzybów na plazmę w porównaniu z roślinami inokulowanymi P0 w sposób statystycznie istotny.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem, w którym Doktorantka podjęła uzasadniony i aktualny problem badawczy. Założony przez Doktorantkę cel badań został osiągnięty, a przyjęty zakres badań w pełni zrealizowany. Przedstawione w pracy wyniki są źródłem wiedzy o charakterze naukowym, ale mają także potencjał aplikacyjny w zakresie zastosowania atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej w redukcji liczby pleśni na powierzchni opakowań stosowanych w przechowywalnictwie żywności, co może ograniczyć straty żywności związane z jej psuciem.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski pt. *Ocena skuteczności atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej przeciwko fitopatogennym grzybom* spełnia warunek oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień doktora i świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. Tym samym recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Darii Nowinski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

L. Zegłowska