



Wrocław, 20.09.2024

Dr hab. inż. Barbara Żarowska, prof. uczelni  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,  
Ul. Chełmońskiego 63  
51-630 Wrocław  
Tel. 71 3207740  
e-mail: [barbara.zarowska@upwr.edu.pl](mailto:barbara.zarowska@upwr.edu.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski  
pt. „Ocena skuteczności atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej przeciwko fitopatogenным  
grzybom”,  
promotor: dr hab. Irena Maliszewska

#### **Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji**

Recenzja została wykonana w oparciu o uchwałę 893/49/RDND10/2021-2024 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 10 lipca 2024 r. w związku z postępowaniem wszczętym celem nadania stopnia naukowego doktora Pani mgr inż. Darii Katarzynie Nowinski, przekazaną pismem Pana dr hab. Roberta Górę, prof. uczelni, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne z dnia 10 lipca 2024.

#### **Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego**

Ochrona roślin przed fitopatogenami grzybowymi stanowi jedno z największych wyzwań współczesnego rolnictwa i biotechnologii roślin. Odpowiadają one za znaczące straty w produkcji rolniczej na całym świecie powodując choroby roślin, które obniżają plony oraz jakość produktów rolnych i prowadzą do dużych strat żywności. Tradycyjne metody ochrony roślin, oparte na stosowaniu chemicznych fungicydów, choć skuteczne, niosą ze sobą liczne problemy, takie jak rozwój odporności patogenów, negatywny wpływ na środowisko oraz zagrożenie dla zdrowia ludzi. Mając powyższe na uwadze niezwykle ważne jest podjęcie kompleksowych badań zmierzających do opracowania alternatywnych metod ochrony roślin przed tymi mikroorganizmami.

W tym kontekście postawiony w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Darii Katarzynie Nowinski cel badań, koncentrujący się na ocenie skuteczności plazmy niskotemperaturowej generowanej za pomocą reaktora z wyładowaniami z barierą dielektryczną pod ciśnieniem atmosferycznym z powietrzem jako gazem roboczym w inaktywacji patogenów grzybowych, doskonale



wpisuje się w ten nurt badawczy. Dotychczasowe badania wykazały, że plazma niskotemperaturowa może skutecznie inaktywować różne mikroorganizmy, w tym bakterie i grzyby, ale mechanizmy jej działania na fitopatogeny grzybowe są wciąż słabo poznane.

Podjęte przez Doktorantkę badania obejmujące określenie nie tylko mechanizmu działania plazmy niskotemperaturowej na komórki grzybów fitopatogennych ale również ocenę zmian cech morfologicznych i fizjologicznych, a także zmiany ich patogeniczności pod wpływem wielokrotnego traktowania komórek grzybów plazmą niskotemperaturową w badaniach *in vitro* i *in vivo* pozwoliły na sformułowanie ważnych spostrzeżeń i wniosków, które mogą być wykorzystane w naukowej dyskusji, projektowaniu przyszłych badań, ale także mają duże znaczenie aplikacyjne w przemysłowych uprawach roślin, gdzie kontrola fitopatogenów grzybowych jest kluczowa dla utrzymania wysokiej jakości i wydajności produkcji. W dłuższej perspektywie technologia ta może przyczynić się do zmniejszenia zużycia środków ochrony roślin oraz stanowić ważny krok w kierunku bardziej zrównoważonego rolnictwa.

#### Formalna ocena pracy

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi opracowanie pisemne, liczące wraz ze spisem tabel, wykresów i rysunków 225 stron. Na ostatnich dwóch stronach maszynopisu przedstawiony został dorobek naukowy Doktorantki. Układ pracy jest typowy dla opracowań o charakterze eksperymentalnym i obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wprowadzenie przedstawiające stan wiedzy w dziedzinie podejmowanych badań, cel pracy, materiały i metody badań, wyniki z dyskusją, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. Poszczególne rozdziały pracy układają się w logiczną całość. Część wyników zawartych w pracy została opublikowana w czasopiśmie z listy JCR, a Doktorantka jest jednym ze współautorów tych publikacji.

W pracy zacytowano 332 pozycje literaturowe, które w zdecydowanej większości stanowią artykuły naukowe z liczących się czasopism, opublikowane po 2015 roku. Ta część rozprawy, wraz z wprowadzeniem oraz elementami dyskusji zamieszczonej w opisie wyników badań pozwalają stwierdzić, że oceniana rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki chemiczne.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski napisana została zrozumiałym oraz poprawnym językiem. Proporcje poszczególnych części pracy są prawidłowe, a uzyskane wyniki zinterpretowano i przedyskutowano poprawnie. Od strony formalnej rozprawa nie budzi zastrzeżeń i spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej.

#### Ocena merytoryczna pracy

Praca doktorska mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski obejmuje szeroko zakrojony zakres badań, który wymagał znajomości różnych technik mikrobiologicznych, analiz chemicznych, biochemicznych i biofizycznych, co świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego prowadzenia interdyscyplinarnych badań naukowych.



**Tytuł pracy** koresponduje z wyznaczonym celem i treścią rozprawy i w mojej opinii dobrze informuje o tym czego dotyczy praca.

We **Wprowadzeniu** Autorka opisała rys historyczny działań mających na celu zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego ludności na świecie, przyczyny i etapy strat żywności w łańcuchu dostaw, grzybowe patogeny roślin i ich wpływ na bezpieczeństwo żywnościowe oraz czynniki ich wirulencji, charakterystykę grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Botrytis* i *Alternaria*, strategie kontroli grzybów fitopatogennych, a także zimną plazmę atmosferyczną i możliwość jej wykorzystania w inaktywacji mikroorganizmów. Ta część pracy oparta o obszerny przegląd literatury, stanowi dobre wprowadzenie w zakres prowadzonych badań, nakreślając genezę pracy i zasadność podjętego tematu.

**Cel pracy** został sformułowany jako „ocena skuteczności plazmy niskotemperaturowej generowanej za pomocą reaktora z wyładowaniami z barierą dielektryczną pod ciśnieniem atmosferycznym z powietrzem jako gazem roboczym w inaktywacji patogenów grzybowych na powierzchni materiałów powszechnie stosowanych w przechowalnictwie, na przykładzie tektury i drewna”. W mojej opinii nie oddaje on w pełni, potwierdzonej wieloma testami, intencji Autorki. Wprowadzenie precyzuje Ona ten cel poprzez wymienienie zakresu przeprowadzonych badań, jednakże w mojej ocenie lepszym odzwierciedleniem celu pracy byłaby sformułowanie go jako ocena skuteczności i określenie mechanizmu działania plazmy niskotemperaturowej z powietrzem jako gazem roboczym w inaktywacji fitopatogenów grzybowych oraz określenie jej wpływu na zmiany patogeniczności grzybów w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

Rozdział **Materiały i metody** został przygotowany precyzyjnie, a zawarte opisy metodologii przeprowadzonych badań pozwalają na odtworzenie doświadczeń. Na podkreślenie zasługuje konsekwentna realizacja zaplanowanych badań, co wymagało od doktorantki dużego zaangażowania i dobrej organizacji pracy.

Tym niemniej w odniesieniu do tej części pracy nasuwają mi się pewne pytania i wątpliwości:

- w tabeli 2 zamieszczono wykaz wykorzystywanych w badaniach podłoży, jednakże w przypadku niektórych nie zamieszczono ich przeznaczenia. Moją wątpliwość budzi również wybór i skład niektórych pożywek. W przypadku wielu hodowli i analiz (m. in. do hodowli grzybów na płytkach, izolacji grzybów ze środowiska, oznaczania liczby jednostek kolonie na krążkach drewnianych i tekturowych poddanych działaniu niskotemperaturowej plazmy, oceny szybkości wzrostu oraz wrażliwości grzybów fitopatogennych poddawanych wielokrotnej ekspozycji na plazmę niskotemperaturową na nadtlenek wodoru) Doktorantka wykorzystywała podłoże DPA. Pożywkę SDACH (Sabouraud z choloramfenikolem) stosowała do izolacji grzybów strzępkowych ze środowiska oraz oceny czystości mikrobiologicznej drewna skrzyń traktowanych plazmą niskotemperaturową. Identyfikację izolatów ze środowiska przeprowadziła natomiast na podłożu PDA. Czym była uzasadniona taka różnorodność podłoży? Czy nie lepiej byłoby do tych hodowli i analiz zastosować standardowo wykorzystywane do hodowli grzybów podłoże syntetyczne z glukoza i ekstraktem drożdżowym PDA, uzupełnione ewentualnie antybiotykiem w celu zahamowania wzrostu bakterii przy izolacji szczepów ze środowiska?



- inna wątpliwość dotyczy składu podłoża do oznaczania aktywności proteolitycznej BAP, które, zgodnie ze składem zamieszczonym w tabeli 2, zawiera aż 30 gramów sacharozy lecz jest pozbawione białka indukującego produkcję proteaz. Na jakiej podstawie dobrano pożywkę o takim składzie? Autorka wskazując to podłoże powołuje się na publikację Rodarte i wsp. z 2011 r, w której jednak wykorzystywano pożywkę mineralną zawierającą, jako jedyne źródło węgla kazeinian sodu w stężeniu 5 g/L,
- na stronie 68 Doktorantka napisała, że w trakcie badań stosowała wystandaryzowane za pomocą komory Howarda zawiesiny grzybów o końcowej gęstości  $10^5 - 10^6$  jtk/ml. Za pomocą komór zliczeniowych liczymy komórki, w związku z tym jednostką w tym przypadku powinna być ilość komórek w 1 ml (kom/ml), a nie jednostek tworzących kolonie w ml (jtl/ml), jak w przypadku określania ilości żywych komórek określanymi metodą hodowlaną na podstawie wyrosłych na płytkach kolonii. Do tej kwestii mam również pytanie: jaką gęstość zawiesin grzybowych stosowano w poszczególnych testach? Aby możliwe było określenie skuteczności inaktywacyjnego działania plazmy niskotemperaturowej na komórki mikroorganizmów w każdym teście wyjściowa gęstość populacji powinna być taka sama, a pomiędzy gęstością na poziomie  $10^5$  kom/ml, a  $10^6$  kom/ml jest bardzo duża różnica w ilości komórek (90%),
- proszę o wyjaśnienie w jakim celu przy oznaczaniu minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC) nadtlenu wodoru (str. 77) posiew na płytce bez tego czynnika wykonywano z każdego dołka płytki 96-dołkowej, która wcześniej posłużyła do oznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC). Posiew z dołków, w których widoczny był wzrost grzybni w tym przypadku jest bezzasadny.
- w jakim celu do hodowli służącej uzyskaniu filtratów zawierających metabolity grzybów strzępkowych wielokrotnie traktowanych plazmą niskotemperaturową, do podłoża BBJ dodawano nasiona ogórka (str. 87, rozdział 3.12.5)?,
- tytuł podrozdziału 3.12.8 „Zdolność grzybów fitopatogennych poddanych wielokrotnemu działaniu plazmy do infekcji roślin ogórka” powinien być zmieniony gdyż nie dotyczy działania tych grzybów na wyrosnięte już rośliny, a ich wpływu na zdolność kiełkowania nasion ogórka w zainfekowanej glebie. Może lepszym wyrażeniem byłoby zatytułowanie tego rozdziału jako „Wpływ grzybów fitopatogennych poddanych wielokrotnemu działaniu plazmy na kiełkowanie nasion ogórka”.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie zwrócić również uwagę na pewne niedociągnięcia zauważone w tym rozdziale niefortunne sformułowania:

- zamiast wyrażenia „stężenie inokulum” bardziej poprawnie jest stosowanie określenia „gęstość inokulum”,
- str. 68 Autorka napisała, że „Stężenie każdego inokulum potwierdzano metodą szeregu dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiewu na podłoże DPA”. Tą metodą określano liczbę żywych komórek w hodowlach inokulacyjnych, która nie zawsze odpowiada gęstości populacji oznaczonej za pomocą komory Howarda,



- str. 89, tabela 4 – zamiast sformułowania „bardzo ciężka infekcja” należałoby zastosować określenie bardzo silna infekcja.

Kolejna część pracy to **Wyniki i dyskusja**. Stanowi ona zasadniczą część rozprawy, a szczegółowy opis wyników odzwierciedlający wieloetapowe prace badawcze, ich przejrzyste zaprezentowanie, staranne udokumentowanie w postaci 20 tabel, 17 wykresów i 25 rysunków oraz zobiektywizowanie prawidłowo dobranymi metodami statystycznymi jest niewątpliwym atutem ocenianej rozprawy. Autorka umiejętnie skonfrontowała je z wynikami innych autorów, zajmujących się zbliżoną tematyką badawczą. Ta część pracy świadczy o dużej umiejętności wnikliwej i krytycznej analizy wyników badań własnych w odniesieniu do uzyskanych przez innych badaczy, a przytoczona mnogość cytowań dowodzi, że Doktorantka swobodnie i z dużą znajomością porusza się w tematyce pracy.

Z szeregu poruszanych przez Autorkę pracy problemów chciałabym zwrócić szczególną uwagę na wątki, które w moim odczuciu decydują w znacznym stopniu o wartości naukowej dysertacji. W mojej opinii największymi osiągnięciami Doktorantki jest określenie mechanizmu działania niskotemperaturowej plazmy na komórki testowanych grzybów strzępkowych oraz zbadanie wpływu wielokrotnego traktowania grzybów subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej na zmiany niektórych czynników patogeniczności zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Pomimo dużej ilości wyników udało się je przedstawić w sposób czytelny i staranny. Czytając tę część pracy chcę podkreślić umiejętność Doktorantki do prawidłowego zaprezentowania i opisanie wyników. Uzyskane bardzo ciekawe dane nie zawsze dały jednoznaczne odpowiedzi dotyczące wrażliwości badanych szczepów grzybów na działanie plazmy niskotemperaturowej, oceny zmian morfologicznych strzępek grzybów, poziomu stresu oksydacyjnego, jak również wartości minimalnego stężenia hamującego i bójkowego nadtlenu wodoru po wielokrotnym traktowaniu grzybów tym czynnikiem. Wskazane parametry różniły się w zależności od szczepu, podobnie jak zmiany niektórych czynników patogeniczności grzybów po wielokrotnym traktowaniu tych mikroorganizmów subletalną dawką plazmy niskotemperaturowej zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, jednakże przeprowadzona dyskusja dobrze to wyjaśnia i dokumentuje umiejętność analitycznego spojrzenia na problemy badawcze.

Rozprawę doktorską kończy rozdział **Podsumowanie i wnioski**, który pozwala stwierdzić, że Doktorantka zrealizowała cel pracy.

Lektura tej części pracy nasuwa również kilka uwag:

- pewnym uchybieniem dokumentacji pracy jest przedstawienie wykresów zamieszczonych w różnej skali osi Y, co nieco utrudnia porównywanie i interpretację uzyskanych przez Autorkę wyników, szczególnie kiedy na jednym rysunku widnieje kilka wykresów prezentujących ten sam parametr dla różnych szczepów,
- Doktorantka na str. 98 interpretując wyniki zamieszczone na wykresie 2 napisała, że „Traktowanie plazmą przez co najmniej 20 minut zapewniło pełną inaktywację mikroorganizmów w każdym powtórzeniu, co potwierdza wysoką skuteczność tego procesu.”



Z wykresu wynika jednak, że już 15 minutowe działanie plazmy zapewniło całkowitą inaktywację komórek,

- Autorka, opisując różne parametry, np. aktywność enzymatyczną, produkcję biomasy itp. często stosuje określenie „aktywność spadła”. Lepiej, w przypadku takiej tendencji zmian parametru używać określeń „obniżała się”, „była niższa” lub „mała”.

Podczas lektury pracy doktorskiej mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski nasunęły mi się pewne uwagi o charakterze dyskusyjnym, i tak:

- czym można tłumaczyć zwiększającą się zdolność do tworzenia biofilmu przez komórki szczepu *Fusarium culmorum* DSM 1094 wraz ze wzrostem liczby ich ekspozycji na plazmę niskotemperaturową?,
- czy w opinii Doktorantki stosunkowo niska aktywność karboksymetylocelulazy, ksylanazy i pektynazy nie była spowodowana słabym wzrostem szczepów w hodowlach, który w przypadku podłoża z karboksycelulozą dla większości szczepów wynosił 0,8 mg/ml, a w pożywkach zawierających jako źródło węgla ksylan i pektyny mieścił się w zakresie odpowiednio od 0,8 do 4 mg/ml i od 1 do 3 mg/ml?.

Zawarte w recenzji uwagi w niczym *nie umniejszają wartości pracy*, którą oceniam bardzo wysoko.

#### Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski pt. „Ocena skuteczności atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej przeciwko fitopatogennym grzybom” wykonana pod opieką dr hab. Ireny Maliszewskiej, prof. PWr. wpisuje się w nurt bardzo istotnych badań dotyczących zapobiegania stratom surowców żywnościowych pochodzenia roślinnego powodowanym przez fitopatogenne grzyby strzępkowe za pomocą niekonwencjonalnych metod inaktywacji tych mikroorganizmów.

Stwierdzam, że praca 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. z 2023, poz. 742 z późn. zm.) stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Autorka przygotowując pracę wykazała się wielką umiejętnością krytycznego myślenia oraz dobrą znajomością tematu badawczego i umiejętnością interpretowania uzyskanych wyników.

Powyższe stwierdzenie upoważnia mnie do przedłożenia Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie pracy doktorskiej pt.: „Ocena skuteczności atmosferycznej plazmy niskotemperaturowej przeciwko fitopatogennym grzybom” oraz o dopuszczenie jej Autorki Pani mgr inż. Darii Katarzyny Nowinski do publicznej obrony.