

Prof. dr hab. Maria Kowalik  
Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

## **Recenzja**

rozprawy doktorskiej mgr inż. Macieja Rdzanka

pt.: „**Wpływ wyciągów roślinnych na wzrost wybranych grzybów strzępkowych**”

### **1. Przedmiot recenzji**

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Rdzanka zatytułowana „Wpływ wyciągów roślinnych na wzrost wybranych grzybów strzępkowych”, wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Elżbiety Płaskowskiej i promotora pomocniczej dr inż. Elżbiety Gębarowskiej na Wydziale Przyrodniczo-Technologicznym Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

### **1. Podstawa wykonania recenzji**

Recenzję rozprawy doktorskiej mgr inż. Macieja Rdzanka wykonuję na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 27 czerwca 2023 roku, oznaczonej numerem PD000000.410081.2023. Stosowne pismo podpisał prof. dr hab. Cezary Kabała, przewodniczący Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo.

### **2. Zasadność podjęcia pracy**

W oparciu o literaturę przedmiotu, dyrektywy i rozporządzenia Unii Europejskiej dla Wspólnoty Europejskiej dotyczące ograniczania możliwości korzystania z syntetycznych pestycydów, wycofywania substancji czynnych i środków ochrony roślin oraz obowiązku prowadzenia integrowanej ochrony roślin w państwach członkowskich, zasadne staje się podejmowanie badań dotyczących stosowania nie chemicznych metod ochrony roślin. Niniejsza praca wpisuje się w nurt alternatywnych metod ochrony roślin, wykazuje bowiem możliwości wykorzystania substancji pochodzenia roślinnego jako biopestycydów, stąd biorąc pod uwagę przedstawione powyżej uwarunkowania, podjęcie tematu badawczego uważam za uzasadnione i ważne.

### **3. Ogólna charakterystyka tekstu rozprawy**

Rozprawa doktorska została przedstawiona jako wydruk w jednym tomie. Ogółem liczy 97 stron, w tym tekst właściwy (bez stron tytułowych, spisu treści, literatury i załączników) obejmuje 75 stron. Spis literatury zawiera 130 pozycji z lat 1969-2023, w większości anglojęzycznych i 3 strony internetowe www. Najstarsze 4 pozycje literatury to klucze mykologiczne. Praca składa się z siedmiu głównych numerowanych części, traktowanych jako rozdziały pierwszego rzędu oraz podrozdziałów drugiego i trzeciego rzędu w rozdziale trzecim, czwartym i piątym. Pod względem redakcyjnym i stylistycznym praca została przygotowana mało starannie. I tak rozdział 3.1. „Grzyby strzępkowe i ich znaczenie” został przypisany bez

numeracji rozdziałowi 3. „Przegląd literatury”, natomiast streszczenia w języku polskim i angielskim zostały zamieszczone w rozdziale 9. „Spis tabel i wykresów”. W rozdziale 4. „Materiał i metody badań” w tytułach podrozdziałów 4.1, 4.2 i 4.3 brakuje określenia „badanie lub ocena” aktywności, wpływu wybranych wyciągów (roślinnych, z psianki czarnej). Tytuły sformułowane przez Autora są tożsame z tytułami wyników badań. Mankamentem pracy są liczne błędy edytorskie i potknięcia stylistyczne oraz brak, bądź nadmiar znaków interpunkcyjnych, co utrudnia płynność czytania.

#### 4. Ocena szczegółowa

Tytuł pracy został niewłaściwie skomponowany, bowiem treść pracy obejmuje oprócz wpływu wyciągów roślinnych na grzyby strzępkowe, ich wpływ na bakterie, drożdże i ludzkie linie komórkowe.

We Wstępie (rozd.1) Autor odpowiednio wyjaśnił znaczenie problemu badawczego, wskazał przesłanki badań oraz zawarł informacje pozwalające na sformułowanie problemu badawczego.

W rozdziale 2. „Cel badań i hipotezy badawcze”, określone zostały następujące szczegółowe cele pracy:

- poznanie wpływu wyciągów roślinnych pozyskiwanych z powszechnie występujących chwastów, roślin inwazyjnych oraz ziół i roślin leczniczych na wzrost wybranych gatunków grzybów strzępkowych w warunkach *in vitro*,
- wyselekcjonowanie do dalszych badań najlepiej rokujących wyciągów, które mogą zostać wykorzystane w ochronie roślin, w przechowywaniu lub ograniczaniu występowania mikroorganizmów niebezpiecznych dla ludzi i zwierząt,
- dodatkowe zbadanie wpływu wyciągów z liści, owoców i korzeni psianki czarnej na grzyby i bakterie chorobotwórcze dla roślin, ludzi i zwierząt oraz [na] grzyby saprotroficzne o właściwościach alergizujących oraz mogących występować na przechowywanych płodach rolnych.

W trzecim celu szczegółowym błędne jest sformułowanie „dodatkowo zbadano”, ponieważ w celu pracy nie można zakładać, że któreś badanie jest dodatkowe.

Postawione hipotezy badawcze są jasno sformułowane, chociaż w hipotezie 3. o interakcji pomiędzy wyciągami roślinnymi a grzybami strzępkowymi Autor przedstawia hipotetyczne założenie, że oddziaływanie wyciągów roślinnych zależy od gatunku rośliny, jej fragmentów oraz użytego stężenia wyciągu, co w literaturze przedmiotu jest od dawna znane i udowodnione w naukach przyrodniczych.

W rozdziale 3. „Przegląd literatury” Doktorant słusznie koncentrował się na przedstawieniu i omówieniu współczesnych rozwiązań w tym zakresie. Rozdział ten jest zaprezentowany systematycznie z podziałem na wyodrębnione zagadnienia. Zawiera charakterystykę grzybów strzępkowych i ich znaczenie, z podkreśleniem różnorodności gatunkowej, pasożytniczego trybu życia, patogeniczności dla wielu upraw roślinnych, zdolności do wydzielania enzymów hydrolitycznych oraz chorobotwórczości dla ludzi. Autor podaje również charakterystykę roślinnych związków bioaktywnych o działaniu przeciugrzybicznym, antybakteryjnym, przeciwutleniającym i działającym immunomodulacyjnie. Omawia kilkanaście roślin wyróżniających się właściwościami przeciugrzybicznymi i przeciwbakteryjnymi, jak powszechnie stosowane zioła: rozmaryn lekarski *Rosmarinus officinalis* L., lebidotka pospolita *Origanum vulgare* L., majeranek *Origanum majorana* L., tymianki *Thymus* spp., mięta

pieprzowa *Mentha x piperita* L., bazylija pospolita *Ocimum basilicum* L., a także nie występujące lub rzadko występujące w polskich warunkach glebowo-klimatycznych, jak: lukrecja gładka *Glycyrrhiza glabra* L., eukaliptus gałkowy *Eucalyptus globulus* Labill., owies głuchy *Avena fatua* L., bylica pospolita *Artemisia vulgaris* L., nawłóć kanadyjska *Solidago canadensis* L., kolczurka klapowana *Echinocystis lobata* (Michx) Torr. et A. Gray, rdestowiec sachaliński *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt), topinambur (słonecznik bulwiasty) *Helianthus tuberosus* L., czystek szary *Cistus x incanus* L., hyzop lekarski *Hyssopus officinalis* L., przypołudnik kryształowy *Mesembryanthemum crystallinum* L., rzepik pospolity *Agrimonia eupatoria* L. i użyta w przeprowadzonych badaniach psianka czarna *Solanum nigrum* L. Przy omawianiu tych zagadnień zabrakło uporządkowania roślin według przyjętego klucza, np. alfabetycznie lub według systematyki botanicznej.

Bardzo cenne jest cytowanie najnowszej literatury w podrozdziale dotyczącym wykorzystania naturalnych substancji w ochronie roślin i podanie które związki naturalnie występujące w środowisku wykazują potencjał do zastosowania ich w rolnictwie w zwalczaniu chorób roślin.

Rozdział „Przegląd literatury” oceniam wysoko, ponieważ napisany jest w sposób logiczny, świadczący o dużej wiedzy teoretycznej Autora rozprawy doktorskiej w zakresie prowadzonych badań i umiejętności wykorzystania literatury.

W rozdziale 4. „Materiał i metody badań” Autor podaje, że badania, których wyniki zawarł w recenzowanej pracy, prowadził w latach 2013-2017 samodzielnie, bądź we współpracy w Zakładzie Fitopatologii i Mykologii, w Zakładzie Biogeochemii i Mikrobiologii Środowiskowej, w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy, w Katedrze Biostruktury i Fizjologii Zwierząt UP we Wrocławiu oraz we współpracy z Zakładem Herbologii i Technik Uprawy Roli we Wrocławiu ING-PIB w Puławach. W rozdziale tym Doktorant przedstawił materiał źródłowy i przyjętą metodykę badań. Autor obszernie objaśnił metody analiz, którymi posłużył się do realizacji wyznaczonych celów pracy. Szczegółowo, wręcz drobiazgowo, opisał metodykę dotyczącą przygotowania materiału roślinnego i ekstraktów do badań. Część mykologiczną obejmującą izolację i identyfikację grzybów: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* i *Penicillium chrysogenum* oparł na metodach standardowych, powszechnie stosowanych w fitopatologii i mykologii. Badania aktywności przeciwrzybiczej wyciągów z chwastów segetalnych, roślin inwazyjnych przeciwko *S. sclerotiorum* i pozostałym grzybom strzępkowym Doktorant wykonał metodą zatrutego podłoża, a wyniki badań wyraził jako współczynnik zahamowania wzrostu radialnego grzybni H [%] i współczynnik tempa wzrostu radialnego grzybni T. Niestety, we wzorze na określenie tempa wzrostu, w objaśnieniach zabrakło wyrazu „tempa”. Przy ocenie aktywności przeciwbakteryjnej ekstraktów metanolowych z psianki czarnej, Autor przetestował szerokie spektrum drobnoustrojów, w tym ziarniaki Gram-dodatnie: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus ureus*, *S. pseudintermedius*, *Streptococcus canis*, *S. agalactiae*, pałeczki Gram-dodatnie: *Bacillus cereus*, pałeczki Gram-ujemne: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* oraz patogeny: *Pectobacterium carotovora*, *P. atrosepticum*, *Erwinia chrysanthemi*, *Candida albicans* i *C. parapsilosis*, stosując metodę dyfuzji krążkowej i obliczając procentowe zahamowanie wzrostu bakterii. Przy ocenie aktywności biologicznej badanych ekstraktów wykorzystano pięć ludzkich linii komórkowych, stanowiących model do oceny cytotoksyczności i aktywności przeciwnowotworowej *in vitro*.

Jest to niewątpliwie nowatorskie zastosowanie metod i narzędzi badawczych, jednak w biofarmacji i toksykologii wyeliminowano pojęcie „kultury komórkowe”, a stosuje się pojęcie „linie komórkowe” i „hodowle komórkowe”

Rozdział „Materiał i metody badań” jest zredagowany zbyt detalicznie, ponieważ Autor obszernie objaśnia metody analiz, podając liczne szczegóły, a z cytowanej literatury wynika, że są to w większości metody standardowe, stosowane w jednostkach naukowych UP we Wrocławiu. Jednak zaprezentowane opisy i późniejsza interpretacja świadczą o umiejętności współdziałania w zakładzie macierzystym, we współpracujących zakładach i katedrach, a także ułatwią osobom kontynuującym badania odtworzenie eksperymentów, bez korzystania z dodatkowych źródeł.

W najobszerniejszym rozdziale 5. „Wyniki badań”, Autor na 25 stronach przedstawia wyniki badań własnych. Rozdział ten jest podzielony na sześć podrozdziałów w których omówiono kolejno:

- wpływ wybranych wyciągów na wzrost *S. sclerotiorum*,
- wpływ wyciągów na wybrane grzyby strzępkowe, ocena metodą zatrutego podłoża,
- wpływ wyciągów z psianki czarnej na wybrane grzyby strzępkowe,
- wpływ wyciągów z psianki czarnej na wybrane bakterie i drożdże,
- analizę chemiczną związków psianki czarnej i ocenę cytotoksyczności.

Uzyskane wyniki Autor rozprawy zawarł w 20. tabelach i na 6. rycinach. Materiał graficzny w pracy doktorskiej jest przejrzysty, dobrze zaprojektowany i opisany. W tekście wyników Autor komentuje dane zawarte w tabelach, często stosując schemat powtórzeń.

W treści informacji nad wpływem wyciągów roślinnych na wzrost *S. sclerotiorum* (rozd. 5.1) Autor porównał oddziaływanie wyciągów z dziewięciu roślin zielnych i jednego grzyba jadalnego na wzrost patogena, podając współczynniki tempa i zahamowania wzrostu grzybni, a na wykresie wyznaczył dynamikę wzrostu grzybni w zależności od zastosowanych wyciągów. Wyniki zawarte w tym rozdziale wskazują na możliwość praktycznego zastosowania wyciągów z owsa głuchego do ograniczania wzrostu *S. sclerotiorum*, a zarazem eliminację z dalszych badań rdestowca sachalińskiego i słonecznika bulwiastego.

Analizę istotności różnic pomiędzy wzrostem grzybni na pożywkach z dodatkiem wyciągów i na pożywkach kontrolnych Doktorant przeprowadził stosując analizy wariancji w teście Dunetta. W tabeli 3. brakuje uporządkowania roślin (w ujęciu alfabetycznym) i wyjaśnienia, które fragmenty roślin były wykorzystane do sporządzania wyciągów.

Przy ocenie wpływu wyciągów (rozd. 5.2) z czystka szarego, hyzopu lekarskiego, owsa głuchego, przypołudnika kryształowego, rzepiku pospolitego, (w czterech różnych dawkach) na wzrost jedenastu gatunków grzybów strzępkowych (określonych jako patogeny) i sześciu gatunków grzybów alergizujących oraz patogena pieczarki, Autor udokumentował badania, podając współczynniki tempa wzrostu i zahamowania wzrostu kolonii w sposób schematyczny, co umożliwi porównanie wielu wartości pomiędzy badanymi wyciągami roślinnymi a grzybami strzępkowymi. Jako najbardziej skuteczne, wykazujące największy efekt fungistatyczny wobec *A. alternata*, *F. culmorum*, *Ch. globosom* i *A. flavus*, wyróżnił wyciągi z hyzopu lekarskiego, owsa głuchego, psianki czarnej i rzepiku pospolitego. Niestety również w zamieszczonych tabelach, gatunki grzybów nie zostały zapisane w sposób uporządkowany, nawet w obrębie rodzaju, co utrudnia interpretację wyników.

W podrozdziale 5.3.1. Autor zamieścił wyniki badań nad wpływem wyciągów z części nadziemnych, korzeni i owoców psianki czarnej *S. nigrum* na tempo wzrostu osiemnastu

gatunków grzybów strzępkowych, według wcześniej przyjętej metodyki, co pozwoliło na stwierdzenie, że wyciągi z psianki czarnej wykazują właściwości fungistatyczne w stosunku do gatunków patogenicznych: *B. sorokiniana*, *R. solani* i *S. sclerotiorum*. Efekt fungistatyczny Autor udokumentował także w odniesieniu do patogena pieczarki *T. aggressivum*. Otrzymane wyniki Doktorant klarownie zilustrował graficznie, ukazując różnice pomiędzy poszczególnymi gatunkami, a także w obrębie rodzaju *Fusarium* (ryc. 2,3,4).

W podrozdziale 5.3.2 Autor oceniając działanie przeciwdrobnoustrojowe wyciągów z części nadziemnych i korzeni psianki czarnej, wykazał, które wyciągi są najskuteczniejsze w hamowaniu szczepów: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pectobacterium*, *Erwinia* i *Candida*. Otrzymane wyniki stref zahamowania wzrostu szczepów w badaniach metodą krążkowo-dyfuzyjną, porównał z kontrolą referencyjną – tetracykliną i amfoterycyną B. W dalszych badaniach Autor określił wartości MIC<sub>90</sub> (minimalne stężenie powodujące 90% zahamowanie wzrostu) i MCB (minimalne stężenie bakteriobójcze) dla kombinacji szczepów i wyciągów z psianki czarnej. Przy interpretacji wyników Autor jednoznacznie wykazał, że wyciągi z części nadziemnych i korzeni psianki czarnej nie wykazały działania hamującego wobec *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* oraz *Candida* spp., natomiast ekstrakty metanolowe z części nadziemnych wyróżniały się wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec różnych szczepów bakterii, niż ekstrakty z korzeni.

Podsumowaniem tych badań jest analiza chemiczna związków psianki czarnej i ocena cytotoksyczności (rozdz. 5.3.3). Autor przedstawił dane dotyczące zawartości flawonoidów w 28 próbkach metanolowych ekstraktów psianki czarnej oraz określił profil alkaloidów steroidowych tych wyciągów. Podczas testów aktywności biologicznej Autor ocenił wpływ ekstraktów na żywotność hodowli komórkowych, wskazując na bardzo zróżnicowany wzrost żywotności w obrębie pięciu linii hodowlanych.

Zawarte w pierwszych dwóch podrozdziałach wyniki badań posiadają charakter aplikacyjny; mogą być wykorzystane praktycznie w przechowalnictwie, pieczarkarniach, na niewielkich obszarach upraw rolniczych. Trudno jednak wnioskować na podstawie przeprowadzonych badań i analiz o ewentualnym zastosowaniu ekstraktów z psianki czarnej w naukach medycznych.

Dyskusja (rozdz. 6) dotyczy zarówno porównania wyników badań własnych, jak i ich odnoszenia do rezultatów badań innych autorów. Dyskusja jest bardzo dobrze napisanym rozdziałem. Doktorant prowadzi ją umiejętnie, krytycznie ocenia poszczególne etapy, odwołując się do prac innych autorów. Jest to logiczny wywód, w którym pojawiają się argumenty za i przeciw postawionym hipotezom i celom badań. Argumenty są rzeczowe i obiektywne, a na podkreślenie zasługuje umiejętne wykorzystanie najnowszych pozycji literatury z wysoko punktowanych czasopism.

Wyniki badań podsumowuje jedenaście wniosków (rozdz.7. Wnioski), spośród których większość ma charakter skondensowanego przedstawienia wyników (wniosek 1,2,5,6,8,9). Niezrozumiałe jest wnioskowanie (wniosek 9) dotyczące *Dickeya chrysanthemi*, ponieważ ten organizm był wymieniany w metodyce badań i wynikach jako *Erwinia chrysanthemi*.

W spisie Literatury (rozdz. 8) znalazły się liczne błędy redakcyjne, jak: niewłaściwy zapis pozycji literatury (poz. 47,60,64), umieszczenie przecinka po nazwisku autora (poz. 1,2,4,5...122,129), brak skrótów lub niewłaściwie zastosowane skróty czasopism (poz.12,30,38 i inne), wstawki typu „co jest imieniem?” (poz. 106), powtórzenia w numeracji literatury (poz. 68=69), nie stosowanie zapisu kursywą nazw łacińskich roślin, grzybów, *in vitro* (poz.

28,39,59,63,65 i inne), brak w spisie literatury m.in. pozycji Powers-Fletcher i in. 2016, Rathod 2022, Peng i in. 2021, Ji i in.2019, różnice w zapisie roku wydania np. Watanabe 2002 czy 2010).

## 5. Podsumowanie

W podsumowaniu niniejszej recenzji pracy doktorskiej pana mgr inż. Macieja Rdzanka, do głównych uchybień zaliczam:

- źle skomponowany tytuł pracy,
- zamieszczenie fragmentów pracy w rozdziałach nie korespondujących tytułem z treścią fragmentu,
- nieadekwatne tytuły podrozdziałów dotyczących materiału i metod badań,
- nieuporządkowanie w tabelach nazw gatunkowych grzybów i roślin,
- błędy edytorskie, stylistyczne i gramatyczne.

Powyższe uwagi złożyły się na ocenę mało starannie przygotowanych niektórych rozdziałów manuskryptu.

Do walorów pracy zaliczam:

- wykorzystanie rozległego materiału badawczego,
- podjęcie się ważnego, z punktu widzenia praktycznego, tematu badawczego,
- oryginalne rozwiązanie problemu wskazujące na różnorodne możliwości zastosowania wyciągów roślinnych w ochronie roślin,
- uzyskanie wyników, które stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie i wprowadzenia ich do praktyki rolniczej i ogrodniczej.

Po przeanalizowaniu treści dysertacji proszę Autora o wyjaśnienie dlaczego do badań szczegółowych wytypował psiankę czarną *Solanum nigrum* oraz o ustosunkowanie się do pojęcia „drożdże” używanego w pracy i podanie obowiązującego nazewnictwa w systematyce organizmów. Proszę także o wyjaśnienie dlaczego *Trichoderma aggressivum*, grzyb strzępkowy, alergizujący, patogen pieczarki został wydzielony w zestawieniach jako odrębny.

Mimo wskazanych uchybień uważam, że praca doktorska pana mgr inż. Macieja Rdzanka jest poprawna, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu z dyscypliny rolnictwo. Jej realizacja była okazją do poszerzenia wiedzy i umiejętności przez Doktoranta. Odpowiednie zaprojektowanie eksperymentów i przeprowadzenie interpretacji wyników wskazują, że Doktorant posiada wystarczający zasób wiedzy i jest dobrze przygotowany do prowadzenia badań naukowych.

**Moja opinia dotycząca pracy doktorskiej pana mgr inż. Macieja Rdzanka pt. „Wpływ wyciągów roślinnych na wzrost wybranych grzybów strzępkowych” jest jednoznacznie pozytywna. Praca spełnia wymogi jakie rozprawom doktorskim stawia Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. 2017, poz. 1789). W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie pana mgr inż. Macieja Rdzanka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kozierów, 24.08.2023r.

  
Maria Kowalik