

Zabrze 06-08-2018

Katedra i Zakład Chemii

41-808, Zabrze,
ul. Henryka Jordana 19
www.sum.edu.pl

KIEROWNIK
KATEDRY
dr hab. n. med.
Krystyna Tyrpień –Golder
prof. nadzw. SUM
tel.: (+48 32) 275-51-88
fax: (+48 32) 275-51-88

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 275-51-88,
fax: (+48 32) 275-51-88,
rokchemm@sum.edu.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Sylwii Garbaczewskiej

p.t.: *Właściwości przeciwgrzybicze wybranych ekstraktów roślinnych, w tym z pozostałości roślinnej stanowiącej rolniczy materiał odpadowy, a skład chemiczny ekstraktów.*

Masowe stosowanie środków ochrony roślin przyczynia się do wielu niekorzystnych zjawisk takich jak wyniszczanie niektórych gatunków roślin, ich uodparnianie się na niektóre pestycydy, wymieranie pożytecznych pszczół, a także zanieczyszczenie środowiska naturalnego konsekwencją czego może być rozwój wielu schorzeń u ludzi i zwierząt. Próby ograniczenia chemizacji rolnictwa pojawiają się w wielu krajach, ale napotykają na opór niektórych wielkich koncernów chemicznych, które zaopatrują rynek w produkty zawierające te właśnie substancje aktywne, w tym środki grzybobójcze.

Wiele grzybów ograniczających uprawy oraz powstających w czasie przechowywania i transportu substancji spożywczych to mikroorganizmy patogenne, które m.in. będąc źródłem mikotoksyn mogą być przyczyną wielu schorzeń dla ludzi i zwierząt, w tym również chorób nowotworowych.

Stąd jak najbardziej uzasadniona jest próba wykorzystania pozostałości roślinnych i nieuprawnych gatunków roślin jako źródła metabolitów wtórnych o własnościach przeciwgrzybiczych.

Badania prowadzone w ramach recenzowanej pracy miały charakter wielokierunkowy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Garbaczewskiej ma typowy układ, obejmuje 178 stron, 44 tabele, 44 rysunki, 146 pozycji aktualnego piśmiennictwa, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz zgłoszenia patentowe i ostatnie publikacje

własne związane z przeprowadzonymi badaniami związane z niniejszą pracą.

Pierwsza część pracy doktorskiej obejmuje (35 stron), w której wyodrębniony został wstęp i część literaturowa, będące w zasadzie raczej częścią teoretyczną omawianej pracy doktorskiej. Autorka szczegółowo przedstawiła dane z piśmiennictwa związane z zastosowaniem ekologicznych sposobów ochrony roślin przed organizmami szkodliwymi, szczególnie otrzymywanych z niewykorzystywanej i licznej pozostałości roślinnej. Ta część pracy jest napisana przejrzysto i stanowi obszerne, usystematyzowane źródło wiedzy związanej z tematem.

Celem pracy było zbadanie możliwości wykorzystania pozostałości roślinnej, ich różnych odmian oraz wybranych roślin nieuprawnych pozyskanych z naturalnych siedlisk do wytwarzania fungicydów o odpowiednich właściwościach.

Cele cząstkowe pracy są przedstawione bardzo precyzyjnie. W ramach pracy Doktorantka przeanalizowała wpływ sposobów i warunków ekstrakcji na właściwości fungistatyczne otrzymywanych ekstraktów uzyskanych za pomocą maceracji wspomaganej ultradźwiękami oraz ekstrakcji w aparacie Soxhlet'a. W badaniach uwzględniła również wpływ zmiany stężenia ekstraktu na aktywność fungistatyczną i wyznaczała wartości IC_{50} (*IC-inhibition concentration*). Następnym realizowanym przez Autorkę celem była analiza składu chemicznego ekstraktów oraz oznaczenie stężeń (nie zawartości) substancji aktywnych, charakterystycznych dla wyselekcjonowanych materiałów o najlepszych właściwościach przeciwgrzybiczych, w tym przede wszystkim związków polifenolowych w otrzymanych ekstraktach. Kolejnym celem była próba identyfikacji substancji, które mogą wzmacniać lub osłabiać działanie substancji odpowiedzialnych za aktywność biologiczną danego ekstraktu. Bardzo ważnym celem tej pracy było praktyczne zastosowanie ekstraktu o najlepszych właściwościach przeciwgrzybiczych w badaniach pasiecznych,

poprzedzone badaniami toksykologicznymi, sprowadzającymi się do wyznaczenia dawek ID₅₀ i MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*). W części eksperymentalnej Autorka opisuje warunki i metody wzbogacania ekstraktów w substancje grzybobójcze, wyizolowane z pozostałości roślinnej stanowiącej rolniczy materiał odpadowy: z pestek (jabłek i wiśni), łupin (cebuli i orzecha włoskiego), liści (czosnku, chrzanu i dębu) oraz z popularnie występujących roślin w naszym kraju (żołędzi) i chwastów (wrotycza i glistnika jaskółcze ziele). Wybrany materiał Doktorantka ekstrahowała za pomocą chloroformu, octanu etylu, acetonu i alkoholu metylowego w aparacie Soxhlet'a i równolegle poddawała maceracji wspomaganej ultradźwiękami. Podając zestawienie wydajności ekstrakcji matryc biologicznych w procentach Doktorantka (tabela 2) chyba zapomniała pomnożyć uzyskane wartości przez 100.

Aktywność fungistatyczną otrzymanych ekstraktów oceniała w testach *in vitro* poprzez określenie inhibicji wzrostu testowanych grzybów : *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora cactorum* (lub *Phytophthora infestans*) i *Fusarium culmorum* oraz otorbielaka pszczelego - *Ascosphaera apis*.

Na podstawie uzyskanych danych Doktorantka wyciąga wniosek o zróżnicowanej aktywności przeciwgrzybiczej danego materiału względem testowanych patogenów i niejednakowej wrażliwości danego patogenu na ekstrakty z różnych odmian materiałów roślinnych. Stwierdza również, że aktywność ta zależy od sposobu wzbogacania ekstraktu i tylko nieznacznie zmienia się po rozcieńczeniu, bardziej w przypadku ekstraktu uzyskanego za pomocą octanu etylu. Jak pisze Pani mgr Garbaczewska najlepszymi właściwościami przeciwgrzybiczymi wykazały się ekstrakty z zielonych łupin orzecha włoskiego otrzymane na drodze maceracji. Na uwagę zasługiwały również ekstrakty z łupiny cebuli zwyczajnej otrzymane w aparacie Soxhlet'a i ekstrakty z jaskółczego ziela uzyskane w/w stosowanymi technikami ekstrakcji.

W tym miejscu nasuwa się pytanie, pomimo, że Autorka pisze o wykorzystaniu ekstrakcji w układzie ciecz/ciało stałe, czy spotkała jakieś dane z piśmiennictwa na temat zastosowania ekstrakcji do fazy stałej SPE (Solid Phase Extraction) z wykorzystaniem zwykłych kolumniek SPE z różnymi wypełnieniami do wzbogacania ekstraktów w związki o charakterze grzybobójczym z materiału roślinnego?

Oceniając wzbogacone ekstrakty Doktorantka stwierdza, że najwyższą aktywnością fungistatyczną charakteryzowały się ekstrakty chloroformowe, natomiast nieco niższą uzyskane za pomocą octanu etylu.

Do oceny aktywności przeciwgrzybiczej ekstraktów otrzymanych z różnych odmian orzecha włoskiego przeciwko grzybom chorobotwórczym roślin i pszczoł Autorka porównała wartości stężeń roztworów acetonowych tych ekstraktów zapewniające 50 % zahamowanie wzrostu grzybów. Najlepszymi właściwościami przeciwgrzybiczymi charakteryzowały się ekstrakty odmiany Koszycki; a najslabszymi ekstrakty odmiany Lake. Z kolei *A. apis* jest najbardziej podatny na działanie wszystkich badanych ekstraktów.

W rozdziale 7.1. Pani mgr Garbaczewska pisze o trudnościach z odparowaniem acetonu i metanolu z ekstraktów, a używa do powyższych badań ekstraktów acetonowych, podczas gdy jak wiadomo aceton posiada najniższą temperaturę wrzenia z zastosowanych w badaniach rozpuszczalników. Jak można wyjaśnić trudności związane z wyznaczeniem odzysku?

W ramach badań Doktorantka próbowała określić skład chemiczny ekstraktów. Analiza GC-MS ekstraktów z zielonych łupin orzecha włoskiego była przeprowadzana w oparciu o bazę widm NIST'05. Jednak wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników budzi moje zastrzeżenia. Podobnie wyniki analizy LC-MS ekstraktów nawet wysokorozdzielczej HRMS, w przypadku braku wzorców, nie dają 100 % pewności co do obecności analizowanych związków.

Za wyjątkiem wyników oznaczenia juglonu, kwercetyny, sangwinaryny, chelerytryny, pozostałe zidentyfikowane i oznaczone połączenia w próbce można przyjąć, że mogą być obecne jedynie z określonym prawdopodobieństwem.

W umiejętnie przeprowadzonej dyskusji Autorka zwraca uwagę na fakt, że głównym składnikiem badanych ekstraktów był juglon, a właściwości przeciwgrzybicze ekstraktów z zielonych łupin orzecha są wypadkową działania juglonu i związków fenolowych, które mogą zarówno osłabiać, jak i wzmacniać aktywność przeciwgrzybiczą.

Ostatnim etapem badań było porównanie aktywności wzbogaconych ekstraktów z syntetycznymi fungicydami wobec patogenów roślinnych. Z badań tych Doktorantka wnioskuje, że porównanie to wypadło na korzyść syntetycznych środków grzybobójczych i choć częściowe ich zastąpienie poprzez ekstrakty roślinne mogłoby być korzystne w trosce o ochronę środowiska i poprawę jakości upraw.

Przystępując do oceny całości stwierdzam, że praca stanowi wartościowy materiał naukowy o charakterze aplikacyjnym. Autorka wykazała głęboką znajomość zagadnienia związaną z składnikami fungicydów i ich działaniem w stosunku do wybranych grzybów.

Analizując wyniki przeprowadzonych badań, Doktorantka wyciągnęła wiele interesujących wniosków z punktu widzenia praktycznego zastosowania wyizolowanych ekstraktów. Między innymi porównując właściwości wytypowanych materiałów i ich głównych składników stwierdziła, że właściwości przeciwgrzybicze badanych ekstraktów są wypadkową synergistycznego, antagonistycznego i addytywnego działania wszystkich jego składników.

W sposób rzetelny Doktorantka przeprowadziła liczne czasochłonne eksperymenty, wyniki których zostały starannie opracowane. Uzyskane dane są należycie udokumentowane, jakkolwiek na chromatogramach brakuje oznaczeń osi i bardziej szczegółowego opisu pod nimi.

W części analitycznej, która jest słabszym punktem pracy doktorskiej wykorzystane są wykresy kalibracyjne, autorka zwykle posługuje się terminem „krzywe kalibracyjne”, podczas gdy wykorzystuje ich prostoliniowy zakres zależności stężenie- odpowiedź detektora.

Uwagi szczegółowe, które nieco wpływają na obniżenie poziomu naukowego pracy, mogą jednak być uwzględnione przy opracowywaniu pracy do druku, są następujące:

- W wielu przypadkach słowa: zawartości i ilości powinny być zastąpione stężeniem.
- Proces oddzielania substancji ciekłej od stałej w procesie przygotowywania ekstraktów nazywamy sączeniem, a nie „przecedzaniem”, a otrzymany wyciąg „przesączem”.
- Doktorantka nie wspomina o przyjętym poziomie istotności statystycznej.
- Przed przygotowaniem pracy do druku proponowałabym Doktorantce poprawę mniej istotnych niedociągnięć edycyjnych (naniesionych w egzemplarzu pracy) takich jak: brakujące czy niepotrzebne przecinki, zapomniane litery czy pozostawiane samogłoski na końcu wierszy.

Stwierdzam, że zamieszczone w recenzji uwagi zasadniczo nie negują wartości bardzo pracowitej pracy doktorskiej, która spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z czym mam przyjemność przedłożyć Wysockiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Garbaczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
K. Tyrpień-Golder
dr hab. n. med. Krystyna Tyrpień-Golder
prof. nadzwyczajny SUM