



prof. dr hab. Agnieszka Mrozik
Instytut Biologii, Biotechnologii
i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice, dnia 7 kwietnia, 2025 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani **mgr Joanny Trzcíńskiej-Wencel**

pt.: „**Nanocząstki srebra i tlenku cynku pochodzenia grzybowego: biosynteza, aktywność przeciwdrobnoustrojowa i stymulatory wzrostu kukurydzy**”

Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Pana dr hab. Dariusza Smolińskiego, prof. UMK z dnia 21.03.2025 roku w sprawie powierzenia mi obowiązków recenzenta pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Trzcíńskiej-Wencel. Recenzję sporządziłam pod kątem spełnienia wymogów dla doktoratów określonych w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Ocena formalna

Pani mgr Joanna Trzcínska-Wencel jest absolwentką Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych *Academia Scientiarum Thoruniensis* Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Kształcenie w Szkole doktorskiej zakończyła złożeniem pracy doktorskiej, wykonanej pod opieką promotora Pani prof. dr hab. Patrycji Golińskiej i promotora pomocniczego Pani dr Magdaleny Wypij z Katedry Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty i ma charakter bardzo profesjonalnie przygotowanego opracowania naukowego, podzielonego na logiczne i spójne rozdziały i podrozdziały. Najważniejszą część pracy stanowi zbiór powiązanych tematycznie 6 publikacji naukowych, w tym 2 rozdziałów przeglądowych w książkach, 2 opublikowanych artykułów eksperymentalnych w czasopismach *Frontiers in Microbiology* i *Frontiers in Chemistry* oraz 2 artykułów eksperymentalnych w trakcie recenzji w czasopismach *Frontiers in Plant Sciences* (ID manuskryptu: 1494741-R1) oraz *Scientific Reports* (ID manuskryptu: SREP-25-00106). Poza wykazem prac, w skład pracy doktorskiej wchodzi 45-stronicowe opracowanie naukowe w języku polskim, zawierające wstęp teoretyczny, cel pracy i hipotezy badawcze, materiały i metody, omówienie i dyskusję wyników badań, podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa.

Dodatkowo praca zawiera wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim oraz informacje o finansowaniu badań. Osobny załącznik do pracy stanowią oświadczenia Doktorantki i współautorów publikacji, opisujące merytoryczny wkład w powstanie każdego artykułu.

Cztery prace z listy publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2023 – 2024. Dwie z nich ukazały się w książkach zatytułowanych odpowiednio *Mycosynthesis of Nanomaterials: Perspectives and Challenges* i *Nanotechnology in Plant Health*, wydanych przez wydawnictwo CRC Press, Taylor and Francis Group, z punktacją 50 pkt MEiN każda. Dwie kolejne prace w czasopismach *Frontiers in Microbiology* i *Frontiers in Chemistry* mają również zasięg międzynarodowy ze współczynnikiem oddziaływania IF wynoszącym odpowiednio 4,02 i 3,58 i łączną punktacją 200 pkt MEiN. Choć omawiane wskaźniki nie osiągają bardzo wysokich wartości, to należy podkreślić, że czasopisma te klasyfikują się odpowiednio w pierwszym (Q1) i drugim (Q2) kwartylu czasopism publikujących prace z zakresu mikrobiologii i szeroko pojętej chemii. Dużym sukcesem Doktorantki i współautorów będzie przyjęcie do druku dwóch pozostałych artykułów w renomowanych czasopismach *Frontiers in Plant Science* (IF = 4,1, 100 pkt MEiN, Q1) i *Scientific Reports* (IF = 3,8, 140 pkt MEiN, Q1). Wszystkie publikacje są wieloautorskie i liczą od 3 do 7 autorów. Doktorantka jest pierwszą Autorką we wszystkich artykułach i autorem korespondencyjnym w 4 artykułach, 2 opublikowanych i 2 na etapie recenzji wydawniczej. Zgodnie z oświadczeniami Doktorantki i wszystkich współautorów prac, Jej rola była kluczowa w tworzeniu koncepcji badań, planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, analizie i opracowaniu wyników oraz w końcowym etapie przygotowania manuskryptów do druku. Wysoko oceniam umiejętność i skuteczność pozyskiwania funduszy przez Doktorantkę na realizację prezentowanych w artykułach zadań badawczych w ramach grantu Preludium 21 z Narodowego Centrum Badań oraz 3 grantów Grants4NCUStudents, Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB), Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Stwierdzam, że pod względem formalnym rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, składanym w podmiocie doktoryzującym w formie powiązanego tematycznie zbioru opublikowanych artykułów naukowych oraz wysłanych do czasopism i będących w trakcie procesu recenzyjnego.

Ocena merytoryczna

Badania ostatnich lat wskazują na ogromny potencjał mikroorganizmów i różnych grup roślin do biosyntezy nanocząstek metalicznych (NPs), takich jak Ag, Au, Fe, Ti, TiO₂ czy ZnO. Duża różnorodność gatunków, proste metody hodowli oraz szybki wzrost predysponują te organizmy do

szerokiego zastosowania w biologicznej produkcji NPs. Spośród wszystkich nanostruktur, największy sukces komercyjny osiągnęły Ag-NPs. Te tzw. „srebrne drobiny” stały się poszukiwanym produktem konsumpcyjnym o coraz powszechniejszym zastosowaniu w medycynie, farmacji, kosmetyce, rolnictwie i wielu artykułach codziennego użycia. Podobnie ZnO-NPs znajdują coraz szersze zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu oraz w rolnictwie. Dane literaturowe wskazują, że Ag-NPs i ZnO-NPs mogą korzystnie wpływać na kiełkowanie, wzrost, przebieg fotosyntezy i wybrane procesy metaboliczne u różnych gatunków roślin. Użycie odpowiednich dawek tych NPs może przyczynić się do poprawy plonowania roślin poprzez stymulowanie ich wzrostu w kolejnych fazach rozwoju. Dlatego tak ważne są opracowanie i promocja przyjaznych ekologicznie i bezpiecznych dla środowiska procedur syntezy NPs, stanowiących alternatywę dla kosztownych i skomplikowanych metod fizykochemicznych. W ostatnich latach w dziedzinie nanotechnologii rośnie zainteresowanie związane z wykorzystaniem NPs w rolnictwie oraz w usuwaniu toksycznych zanieczyszczeń z gleby na drodze mikrobiologicznej remediacji i fitoremediacji. Wiele rozważanych rozwiązań pozostaje na razie na etapie badań i testów laboratoryjnych, ale trzeba mieć świadomość, że systematyczne i niekontrolowane wprowadzanie NPs do różnych ekosystemów może stanowić w przyszłości poważne zagrożenie dla środowiska i zdrowia człowieka. Ze względu na unikatowe właściwości NPs produkowanych przez organizmy żywe i nieocenioną ich rolę w ochronie upraw rolniczych, tematykę badawczą przedłożonej do recenzji pracy uważam za bardzo interesującą, nowatorską, aktualną i ważną w aspekcie zarówno badań podstawowych, jak i aplikacyjnych.

Pracę rozpoczyna Wstęp, będący zwięzłym, ale treściwym wprowadzeniem do tematyki rozprawy. Tę część pracy można podzielić na dwa wątki tematyczne. W pierwszym Doktorantka przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy na temat biologicznej syntezy nanocząstek przez grzyby pleśniowe, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji nanocząstek metalicznych Ag-NPs i ZnO-NPs przez grzyby mikroskopowe z rodzaju *Fusarium*. Drugi wątek tematyczny dotyczy możliwości wykorzystania nanostruktur w rolnictwie do skutecznej kontroli patogenów roślin uprawnych, czy do wykorzystania ich jako nawozów i biostymulatorów wzrostu roślin. Autorka zdaje sobie sprawę z trudności badania interakcji NPs-rośliny i wskazuje ryzyko toksycznego ich działania na środowisko i inne organizmy, niebędące bezpośrednim celem ich działania. Dopełnieniem przedstawionych zagadnień na temat syntezy NPs przez różne rodzaje grzybów mikroskopowych oraz toksyczności NPs dla roślin są szczegółowe informacje zawarte w artykułach przeglądowych P1 i P2.

Głównym celem pracy doktorskiej była biosynteza Ag-NPs i ZnO-NPs z wykorzystaniem szczepów grzybowych z rodzaju *Fusarium* oraz oznaczenie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i stymulującej wzrost kukurydzy (*Zea mays*), jednorocznej rośliny uprawnej z rodziny wiechlinowatych. Wysoko oceniam wybór wykorzystywanych w badaniach grzybów

mikroskopowych, ponieważ jako nieodłączny, ściśle związany z fitocenozą komponent ekosystemu są one niezwykle cennym źródłem wielu enzymów i metabolitów. Z drugiej jednak strony stanowią niełatwy obiekt badawczy. Dla osiągnięcia głównego celu pracy, Autorka sformułowała kilka zadań szczegółowych obejmujących: (1) selekcję szczepów najwydajniej produkujących Ag-NPs i ZnO-NPs, (2) ocenę właściwości fizykochemicznych i przeciwdrobnoustrojowych NPs, (3) zbadanie wpływu NPs na tworzenie biofilmów bakteryjnych, (4) ocenę wpływu NPs na kiełkowanie zarodników i rozwój grzybní fitopatogenów i (5) optymalizację warunków przedsiewnego traktowania ziarniaków kukurydzy. W przypadku wielowątkowości badań dobrą praktyką jest zaprojektowanie graficznego planu badawczego z uwzględnieniem wszystkich etapów badań i prowadzonych analiz, co w niniejszej rozprawie znalazło odzwierciedlenie. Taki szczegółowy schemat dokładnie wprowadza czytelnika w wielokierunkowy zakres prowadzonych prac i ułatwia śledzenie przebiegu kolejnych serii eksperymentów. Ogólny cel pracy i zadania służące jego realizacji można uznać za bardzo ambitne i z sukcesem konsekwentnie etapowo realizowane. Realizacja tych zadań pozwoliła w końcowym efekcie na weryfikację słuszności przyjętej hipotezy głównej i hipotez szczegółowych.

Do realizacji postawionego celu Doktorantka wykorzystała szeroki wachlarz metod stosowanych w mikrobiologii, biochemii, genetyce oraz fizykochemii ciała stałego. Bardzo dokładnie opisała warunki selekcji, hodowli grzybów oraz biosyntezy NPs, a także wszystkie zastosowane metody służące do charakterystyki właściwości NPs, oceny ich aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej oraz przedsiewnego traktowania ziarniaków kukurydzy i wzrostu kilkudniowych siewek roślin. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie w badaniach zaawansowanych procedur analitycznych, tj. dyfrakcji proszkowej promieniowania rentgenowskiego (XRD,) spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), pomiaru dynamicznego rozpraszania światła (DLS), pomiarów potencjału zeta oraz analizy śledzenia nanocząstek (NTA), wymagających odpowiedniej wiedzy i dużego doświadczenia. Doceniam podjęcie się tego wyzwania, bowiem zarówno procedury badawcze, jak i analiza wyników nie są łatwe. Zwykle wymagają one pomocy wysoko wykwalifikowanych osób w obsłudze aparatury i analizie wyników. Całą metodologię pracy uważam za bardzo dobrze przygotowaną i dokładnie wyjaśnioną w publikacjach P3 – P6. Wszystkie wyniki zostały poddane analizie statystycznej, obejmującej jednoczynnikową analizę ANOVA, post-hoc test Tukey'a, analizę głównych składowych (PCA) i hierarchiczną analizę skupień (HCA), co dało możliwość przeprowadzenia syntetycznej i wszechstronnej oceny wyników.

Umiejętne zaplanowanie badań i konsekwentne ich realizowanie dostarczyło szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. W rozdziale „Omówienie wyników badań” Doktorantka zestawiała je w logiczny i bardzo przejrzysty sposób,

konfrontując je równolegle z wynikami innych autorów. Sposób przedstawienia i dyskusji wyników w pracach eksperymentalnych P3 – P6 wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i dobrą znajomość literatury światowej, dotyczącej prezentowanych zagadnień. Rozdział ten ukazuje Doktorantkę jako krytycznego obserwatora, zdającego sobie sprawę z wielu problemów metodycznych oraz trudności w interpretacji wyników, towarzyszących badaniom mikroorganizmów.

W oparciu o przeprowadzone eksperymenty i analizy Autorka pracy sformułowała 8 wniosków, z których kilka jest podsumowaniem otrzymanych wyników (np. wnioski 4, 6, 7 i 8). W moim odczuciu brakuje syntetycznych, jednozdaniowych wniosków, które uogólniłyby najważniejsze osiągnięcia pracy i zweryfikowały słuszność przyjętych hipotez badawczych.

W mojej ocenie praca została przygotowana w sposób bardzo staranny, z dużą dbałością o szczegóły i czyta się ją z przyjemnością. Nieliczne sformułowania stylistyczne, nadużycia interpunkcyjne i drobne usterki w cytacjach to jedyne niedociągnięcia w edycji pracy.

Najważniejsze osiągnięcia

Koncepcja badań oraz szeroki wachlarz metod badawczych umożliwiły uzyskanie cennych wyników, które poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat biologicznej syntezy NPs przez grzyby z rodzaju *Fusarium* i oferują możliwości wykorzystania ich do stymulacji wzrostu kukurydzy. Do najważniejszych osiągnięć dysertacji należą:

1. Wyselekcjonowanie z kolekcji grzybów Katedry Mikrobiologii szczepów *Fusarium culmorum* JTW1 i *Fusarium solani* IOR 825, zdolnych do wydajnej syntezy Ag-NPs i ZnO-NPs.
2. Scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych otrzymanych NPs, tj. rozmiarów, kształtu, struktury, stabilności i właściwości powierzchniowych.
3. Potwierdzenie wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej Ag-NPs i łączonego działania Ag-NPs z antybiotykami względem wybranych bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*) i Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*), hamowania procesu tworzenia biofilmów bakteryjnych (przez *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*) oraz wysokiej aktywności wobec grzybowych patogenów roślin (*Botrytis cinerea*, *Phoma lingam* i *Sclerotinia sclerotiorum*).
4. Udokumentowanie aktywności ZnO-NPs względem wybranych bakterii patogennych dla roślin (*Pseudomonas syringae*, *Xantomonas campestris* i *Agrobacterium tumefaciens*) oraz aktywności przeciwgrzybowej względem niektórych grzybów fitopatogennych (*S. sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* i testowanych gatunków *Fusarium*).

5. Wykazanie, że niskie stężenie Ag-NPs i ZnO-NPs ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$) można bezpiecznie zastosować do kontroli patogenów roślin na powierzchni ziarniaków kukurydzy na etapie ich kiełkowania oraz jako stymulatory wzrostu roślin w późniejszych etapach rozwoju.

W trakcie czytania i analizy pracy nasunęły mi się pewne pytania, które chciałabym zadać Doktorantce podczas obrony rozprawy doktorskiej:

1. Jaka była wydajność syntezy Ag-NPs i ZnO-NPs różnymi metodami przez wyselekcjonowane szczepy grzybów? Czy była porównywalna, czy różniła się znacząco w zależności od szczepu i metody syntezy?
2. Czy otrzymane NPs wykazywały tendencję do tworzenia agregatów/aglomeratów? Jest to ważna właściwość NPs, szczególnie podczas pomiarów DLS.
3. Na str. 33 autoreferatu znajduje się informacja, że w poszczególnych organach kukurydzy rozwijającej się z ziarniaków traktowanych Ag-NPs nie stwierdzono akumulacji jonów srebra (P5). Czy mogłaby Pani wyjaśnić, jaki był tego powód?
4. Który rodzaj NPs zarekomendowałaby Pani do praktycznego wykorzystania w praktyce agrotechnicznej do ochrony roślin przed patogenami? W jakiej postaci można je zastosować jako stymulatory wzrostu roślin w kolejnych etapach rozwoju?
5. Czy istnieje możliwość wykorzystania otrzymanych NPs do innych celów w mikrobiologii środowiskowej?

Ocena końcowa pracy

Uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie oryginalne i cenne osiągnięcie naukowe Doktorantki w zakresie mikrobiologii i biotechnologii środowiskowej. Doktorantka zaprezentowała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne w zakresie badanych zagadnień i przeprowadziła wieloaspektowe, czasochłonne eksperymenty wymagające doświadczenia z zakresu stosowanych metod tradycyjnych, molekularnych i statystycznych. Wykazała, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe, posiada odpowiedni warsztat badawczy oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Uważam, że rozprawa zawiera elementy nowości, które nie tylko wzbogacają i pogłębiają dotychczasową wiedzę o przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybowym działaniu zsyntetyzowanych drogą biologiczną Ag-NPs i ZnO-NPs, ale także mogą stanowić podstawę do opracowania nowych stymulatorów wzrostu roślin uprawnych w praktyce agrotechnicznej.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel pt. „Nanocząstki srebra i tlenku cynku pochodzenia grzybowego: biosynteza, aktywność



przeciwdrobnoustrojowa i stymulatory wzrostu kukurydzy” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Stanowi ona cenny wkład w rozwój nowoczesnych metod biologicznych do ochrony roślin uprawnych przed infekcjami grzybowymi. Przedłożona przez Doktorantkę praca świadczy o Jej naukowej dojrzałości, praktycznej znajomości metod badawczych oraz obszernej wiedzy teoretycznej związanej z podjętymi zagadnieniami. Dodatkowo należy podkreślić, że uzyskane w pracy wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale również aplikacyjną. Na tej podstawie mam zaszczyt złożyć wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na nowatorski charakter pracy doktorskiej, aktualność podjętej problematyki badawczej, szerokie spektrum metodologiczne oraz cenne wyniki o istotnym wpływie na rozwój dyscypliny nauki biologiczne, przedkładam oddzielny wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel, zgodnie z regulaminem obowiązującym w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Agnieszka Krowiec