



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Zakład Mikrobiologii

15-245 Białystok, ul. Konstantego Ciołkowskiego 1J

Tel. + 48 857 388 410, Fax +48 857 388 414

Prof. dr hab. Izabela Święcicka

Białystok, 4 kwietnia 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

Nanocząstki srebra i tlenku cynku pochodzenia grzybowego: biosynteza, aktywność przeciwdrobnoustrojowa i stymulatory wzrostu kukurydzy

Autor rozprawy: **mgr Joanna TRZCIŃSKA-WENCEL**

Promotor: **prof. dr hab. Patrycja GOLIŃSKA**

Promotor pomocniczy: **dr Magdalena WYPIJ**

Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Recenzję rozprawy doktorskiej przygotowanej przez Panią mgr Joannę Trzcińską-Wencel sporządziłam pod kątem spełniania 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 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).

Ocena formalna

Pani mgr Joanna Trzcińska-Wencel przygotowała rozprawę doktorską podczas kształcenia w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK). Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Patrycji Golińskiej, pełniącej rolę promotora oraz dr Magdaleny Wypij jako promotora pomocniczego.

Doktorat jest zbiorem sześciu publikacji, tj. (i) dwu rozdziałów w monografiach wydanych w 2023 r. i 2024 r. przez *CRC Press, Taylor and Francis Group*, (ii) dwu artykułów opublikowanych w 2023 r. w *Frontiers in Microbiology* i *Frontiers in Chemistry* oraz (iii) dwu artykułów będących w

recenzji w *Frontiers in Plant Sciences* i *Scientific Reports*. Zgodnie z Uchwałą nr 6/2022 w sprawie wytycznych, dotyczących przygotowywania rozpraw doktorskich w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauk biologicznych, na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu, dopuszcza się włączenie do zbioru publikacji stanowiących doktorat, prace będące w procesie recenzyjnym.

Zbiór publikacji stanowiących doktorat jest spójny tematycznie. Dwie publikacje stanowią rozdziały w monografiach. Pomimo, że zamieszczanie w doktoracie z zakresu nauk eksperymentalnych opracowań przeglądowych, w tym wypadku rozdziałów monografii, nie jest często notowane, to w recenzowanym doktoracie te pozycje są bardzo dobrym uzupełnieniem części eksperymentalnej. Pozostałe cztery publikacje to artykuły w czasopismach z listy JCR. Wszystkie czasopisma, w których już opublikowano prace stanowiące doktorat lub gdzie prace są w recenzji, mają zasięg międzynarodowy, znajdują się w *Wykazie Czasopism Naukowych i Recenzowanych Materiałów z Konferencji Międzynarodowych* (Komunikat Ministra Edukacji i Nauki z dnia 17 lipca 2023 r.) oraz są zaliczane do pierwszego kwartyła, co najlepiej świadczy o ich prestiżu.

Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty i ma charakter opracowania naukowego. Publikacje stanowiące doktorat zostały opatrzone obszernym *Wprowadzeniem* w języku polskim, podzielonym na logiczne i spójne rozdziały, tj. (i) *Wstęp*, gdzie dobrze uzasadniono konieczność podjęcia badań oraz przedstawiono problem naukowy, (ii) *Cel pracy i hipotezy badawcze* ze schematem przedstawiającym zrealizowane zadania badawcze i wskazaniem na publikacje z poszczególnymi wynikami, (iii) *Materiały i metody*, gdzie Doktorantka przedstawiła badania wstępne, spis materiału badawczego oraz zastosowane metody badawcze oraz (iv) *Omówienie wyników* obrazujące w sposób syntetyczny uzyskane wyniki z perspektywy postawionych celów badawczych. Doktorat został też opatrzony rozdziałem (v) *Podsumowanie i wnioski*, przedstawiającym najważniejsze konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Integralną częścią doktoratu są (vi) abstrakty w języku polskim i angielskim. Do Doktoratu dołączono też oświadczenia współautorów.

Publikacje wchodzące w skład doktoratu to prace zespołowe. We wszystkich publikacjach Pani mgr Joanna Trzcińska-Wencel jest pierwszym autorem, a w czterech autorem korespondencyjnym. Doktorantka swój udział w przygotowaniu poszczególnych publikacji ocenia na 60 - 80%, co zostało uwiarygodnione w deklaracjach współautorów. Na podstawie deklaracji Doktorantki, oświadczeń

współautorów oraz faktu pełnienia przez Doktorantkę funkcji autora korespondencyjnego w pracach eksperymentalnych, stwierdzam, że Pani mgr Joanna Trzcińska-Wencel miała znaczący udział we wszystkich etapach prowadzonych badań, tj. w tworzeniu koncepcji badawczych, przeprowadzeniu analiz, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptów.

Stwierdzam, że pod względem formalnym rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim opartym na cyklu publikacji.

Ocena merytoryczna

Współcześnie obserwujemy bardzo dynamiczny rozwój nanotechnologii, a nanocząstki i nanomateriały odgrywają coraz większą rolę w różnorodnych gałęziach przemysłu, medycynie, farmacji oraz w naszym życiu codziennym. Liczba przedsięwzięć dotyczących chemicznej syntezy i wykorzystywania nanocząstek dynamicznie rośnie. Tymczasem Pani mgr Joanna Trzcińska-Wencel w swojej pracy doktorskiej skupiła się na biosyntezie nanocząstek z udziałem grzybów oraz zastosowaniem tak otrzymanych nanocząstek w procesie promowania wzrostu roślin.

Wprowadzenie w języku polskim jest bardzo dobrym uzasadnieniem dla podjętego tematu badawczego oraz przeprowadzonych analiz. Pomimo, że wymogi prawne dotyczące doktoratów będących zbiorem publikacji nie określają konieczności przygotowania opracowania w języku polskim, to Doktorantka temu rozdziałowi nadała szczególną rangę, przedstawiając (podrozdział *Omówienie wyników*) w sposób syntetyczny uzyskane wyniki w świetle postawionych celów, co jest bardzo cenne i świadczy o problemowym podejściu Doktorantki do prowadzonych badań i Jej dojrzałości naukowej. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością aktualnego piśmiennictwa w przedmiocie badań.

Pani mgr Joanna Trzcińska-Wencel postawiła ambitny cel badań, tj. biosyntezę nanocząstek srebra (AgNPs) i tlenku cynku (ZnONPs) z zastosowaniem grzybów *Fusarium* spp. oraz oznaczenie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i stymulującej wzrost kukurydzy. Doktorantka wyznaczyła też cztery cele szczegółowe, tj. (i) biosynteza nanocząstek srebra i tlenku cynku, (ii) ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych i fizykochemicznych zsyntetyzowanych nanocząstek, (iii) zbadanie wpływu wyselekcjonowanych nanocząstek na mikroorganizmy, formowanie biofilmów, kiełkowanie zarodników i rozwój grzybní fitopatogenów oraz (iv) zoptymalizowanie warunków przedsięwzięcia traktowania ziarniaków kukurydzy nanocząstkami celem uzyskania najlepszego efektu stymulującego

wzrost rośliny. Cele zostały zrealizowane, a wyniki poszczególnych etapów badań zaprezentowano w oddzielnych artykułach. Otrzymane wyniki badań zostały bardzo dobrze udokumentowane w postaci tabel, wykresów, rycin oraz wysokiej jakości mikrofotografii. Wykonanie tak wielu eksperymentów wymagało ogromnego zaangażowania, pasji oraz laboratoryjnych umiejętności Doktorantki.

Układ eksperymentów jest logiczny i spójny, i przebiegał od syntezy nanocząstek poprzez ich wnikliwą charakterystykę i ocenę właściwości antydrobnoustrojowych, a skończywszy na badaniach nanocząstek jako promotorów wzrostu roślin. Do analiz właściwości fizykochemicznych nanocząstek Doktorantka zastosowała innowacyjne techniki z pogranicza biologii i chemii, jak dyfrakcja proszkowa promieniowania rentgenowskiego, spektroskopia w podczerwieni, mikroskopia elektronowa, pomiar potencjału Zeta, dynamiczne rozpraszanie światła. Natomiast aktywności przeciwdrobnoustrojowe nanocząstek oznaczyła raczej tradycyjnymi technikami (ale właściwie dobranymi), jak MIC, MBC, MFC, tworzenie biofilmu oraz analiza hamowania tworzenia grzybni metodą dyfuzji w agarze i z zastosowaniem metodyki „poisoned food”. Metody biochemiczne i wskaźniki wzrostu roślin zastosowano w analizie oddziaływanie nanocząstek na wzrost siewek kukurydzy. Większość uzyskanych wyników porównano statystycznie, wybierając odpowiednie testy, jak analiza jednoczynnikowa ANOVA, post-hoc test Tukey’a, analiza głównych składowych (PCA), hierarchiczna analiza skupień (HCA).

Doktorantka z sukcesem przeprowadziła biosyntezę nanocząstek srebra i cynku z udziałem grzybów *Fusarium* spp., uzyskując nanocząstki o specyficznych właściwościach z racji obecności na ich powierzchni wielu molekuł organicznych. Udział *Fusarium* spp. w syntezie nanocząstek było już opisany w literaturze, niemniej biosynteza wykonana przez Doktorantkę jest znaczącym wkładem w rozwój tzw. „zielonej syntezy”. Nanocząstki srebra o mniejszej wielkości wykazywały wyższą aktywność antybakteryjną, co już dowiedziono dla nanocząstek uzyskanych w syntezie chemicznej. Aktywność antybakteryjną wzrastała w wyniku połączenia nanocząstek srebra z antybiotykami, tj. ze streptomycyną, ampicyliną i kanamycyną. Efekt synergistycznego działania nanocząstek i antybiotyków Doktorantka tłumaczy (i) tworzeniem wiązań nanocząstka-antybiotyk lub (ii) sukcesywnym działaniem nanocząstek i antybiotyku na bakterie. Jednak nie wskazano, który mechanizm dominował w przypadku badanych nanocząstek. W przypadku nanocząstek cynku stwierdzono działanie bójcze względem najczęściej notowanych bakterii fitopatogennych. Zmienność

w aktywności nanocząstek Doktorantka wyjaśnia zróżnicowanymi parametrami fizycznymi i chemicznymi wynikającymi z właściwości *Fusarium* spp. zastosowanych w biosyntezie. W związku ze stwierdzeniem, cytuję „*AgNPs opłaszczane związkami pochodzącymi z ekstraktów grzybowych, mogą być nierozpoznawane przez mikroorganizmy i skutecznie omijać wykształcone przez nie mechanizmy oporności, co przyczynia się do zwiększonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej AgNPs* (Wprowadzenie, str. 29), podczas obrony proszę Doktorantkę o przybliżenie mechanizmów opornością bakterii i grzybów względem nanocząstek.

Wśród otrzymanych danych bardzo interesujące są wyniki wskazujące na ograniczenie tworzenia biofilmów oraz zmniejszenie ich hydrolitycznej aktywności pod wpływem nanocząstek srebra. Biofilmy bakteryjne stanowią duży problem m.in. w medycynie, przemyśle spożywczym, wodociągach, czy kanalizacjach. Tym strukturom bakteryjnym przypisuje się zwiększoną oporność na antybiotyki oraz na szereg czynników fizycznych i chemicznych. Dlatego też wykazanie negatywnego oddziaływania nanocząstek srebra na biofilmy, w szczególności na te tworzone przez bakterie chorobotwórcze, jak *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, może otwierać nowe drogi likwidacji biofilmów.

W trakcie badań wykazano też negatywne oddziaływanie nanocząsteczek srebra oraz cynku wobec zarodników i grzybnii grzybów patogennych dla roślin. Te obserwacje zainspirowały Doktorantkę do zastosowania nanocząstek srebra oraz nanocząstek cynku do dezynfekcji powierzchniowej ziarniaków kukurydzy i tym samym ochrony tych roślin przed patogenami grzybowymi. Zainteresowanie Doktorantki nanocząstkami cynku w kontekście stymulacji wzrostu roślin jest w pełni uzasadnione, uwzględniając rolę cynku we wzroście i rozwoju roślin oraz w odporności na stres. Eksperymenty przeprowadzono z zastosowaniem różnych dawek nanocząstek srebra. Po 7 i 14 dniach wzrostu siewek z dezynfekowanych ziarniaków, oceniono ich parametry biochemiczne i parametry wzrostu. Nanocząstki srebra w niskich stężeniach skutecznie eliminują wzrost patogenów i stymulują wzrost roślin, a w wysokich zapobiegają wzrostowi patogenów, ale równocześnie przyczyniają się do nadmiernej syntezy reaktywnych form tlenu. Natomiast w przypadku nanocząstek cynku podobne efekty stymulujące na wzrost roślin Doktorantka zanotowała przy obu zastosowanych stężeniach nanocząstek (32 i 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Doktorantka sugeruje, że nanocząstki cynku poprawiają wzrost roślin poprzez utrzymanie aktywności enzymów

przeciwutleniających na poziomie umożliwiającym zachowanie równowagi oksydoredukcyjnej. Wielopoziomowe eksperymenty mające na celu zobrazowanie stymulującej roli nanocząstek srebra oraz cynku na wzrost roślin dowodzą dojrzałości naukowej Doktorantki oraz umiejętności łączenia badań z zakresu bakteriologii, mykologii, fizjologii roślin, czy chemię.

Doktorat jest bardzo dobrze przygotowany pod względem estetycznym i napisany poprawnym językiem. W tym zakresie jedynie zwracam uwagę na brak wyszczególnienia publikacji w spisie treści, co ułatwiłoby znajdowanie poszczególnych prac w bardzo obszernej dysertacji. Po drugie na stronie 25 dysertacji Doktorantka przedstawiła hipotezę główną oraz hipotezy szczegółowe. Natomiast w dalszej części rozprawy nie znajduję odniesienia do postawionych hipotez. Zatem podczas obrony proszę o wskazanie, które hipotezy szczegółowe zostały zweryfikowane pozytywnie.

Podsumowując, wyniki badań zaprezentowane w recenzowanej rozprawie doktorskiej są cenne z punktu widzenia badań podstawowym i znacząco wpływają na rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Mają też znaczenie w rozwoju takich dyscyplin naukowych, jak nauki chemiczne, czy rolnictwo i ogrodnictwo. Badania podjęte przez Doktorantkę są też cenne z punktu widzenia badań aplikacyjnych.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Na tej podstawie składam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Joanny Trzcińskiej-Wencel do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

