



Politechnika Łódzka

Instytut Surowców Naturalnych i Kosmetyków

Łódź, 29.04.2024

dr hab. inż. Beata Smolińska, prof. uczelni
Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Instytut Surowców Naturalnych i Kosmetyków
ul. Stefanowskiego 2/22
90-537 Łódź

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Kingi Hęćlik**

pt. „*Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu.*

Biosynteza, izolacja, identyfikacja i badania cytotoksyczności”

wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Lankoff

oraz dr hab. inż. Dariusza Pogockiego, prof. UR

1. Podstawa prawna opracowania recenzji

Recenzja została opracowana na podstawie Uchwały Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 22 lutego 2024 r., nr uchwały 212/02/2024, zgodnie z którą powołano mnie na Recenzenta pracy doktorskiej Pani mgr Kingi Hęćlik pt. „*Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu. Biosynteza, izolacja, identyfikacja i badania cytotoksyczności*”.

Ocena została wykonana w oparciu o Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) w nawiązaniu do art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018, poz. 1669 ze zm.).

2. Uzasadnienie podjęcia tematu

Nanotechnologia jest stosunkowo nową dziedziną nauki, polegającą na zastosowaniu cząstek, których przynajmniej jeden z wymiarów jest mniejszy niż 100 nm. Ze względu na właściwości fizyko-chemiczne nanomateriały znajdują zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, w medycynie, kosmetologii, rolnictwie, czy ochronie środowiska. Wzrost zastosowania nanocząstek sprzyja ich przedostawaniu się do środowiska, w którym ich oddziaływanie na organizmy żywe jest przedmiotem prowadzonych badań.

Ze względu na wzrastające wykorzystanie nanomateriałów, poszukiwane są metody ich syntezy, które będą nie tylko spełniały warunki opłacalności i powtarzalności, ale przed wszystkim ograniczą negatywny wpływ na środowisko. Alternatywę dla powszechnie stosowanych syntez chemicznych i fizycznych stanowią metody biologiczne, oparte na założeniach tzw. zielonej chemii. W metodach tych zastosowanie m.in. mikroorganizmów, glonów, czy roślin wyższych w redukcji jonów do elementarnych cząstek metali, eliminuje zarówno gromadzenie się niebezpiecznych mieszanin reakcyjnych w środowisku, jak i ogranicza ich osadzanie na powierzchni nowopowstałych nanocząstek, które determinuje możliwość ich wykorzystania.

Wśród naturalnych mediów, mogących znaleźć zastosowanie w syntezie nanocząstek metali na uwagę zasługują torfy, stanowiące źródło kwasów humusowych, fulwowych i humin. Powstająca w wyniku rozkładu pozostałości roślinnych i zwierzęcych materia organiczna wykazuje dużą zdolność do wiązania metali, w tym również metali ciężkich. Torfy stanowią zatem naturalny filtr, który zatrzymuje skompleksowane jony metali, uniemożliwiając im tym samym migrację do innych ekosystemów. Unieczynnione metale, charakteryzują się obniżoną toksycznością w stosunku do ich jonowych form i mogą zostać usunięte ze środowiska m.in. za pomocą roślin wyższych, w procesach fitoremediacji.

Tematyka badawcza podjęta przez Panią mgr Kingę Hęćlik w ramach pracy doktorskiej pt. „Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu. Biosynteza, izolacja, identyfikacja i badania cytotoksyczności” jest aktualna i dotyczy biosyntezy wybranych nanocząstek metali, tj. Cu, Ag i Zr w obecności kwasów humusowych obecnych w torfach. Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia mechanizmu tworzenia nanocząstek, a także oceniła otrzymane nanocząstki pod względem ich właściwości fizyko-chemicznych i oddziaływania na wybrane organizmy żywe i linie komórkowe człowieka. Podjęta tematyka badawcza ma charakter użyteczny i wpisuje się w dyscyplinę nauk ścisłych i przyrodniczych, dziedzinę nauk biologicznych.

3. Ocena formalna rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska liczy 200 stron. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 10 rozdziałów głównych, tj. wprowadzenie, cel pracy, hipotezy badawcze, metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz literaturę, spis rysunków i tabel. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. W mojej ocenie brakuje wydzielonego rozdziału zawierającego syntetyczną prezentację wniosków płynących z przeprowadzonych badań.

Pierwszy rozdział pracy, zapisany na 44 stronach, stanowi wprowadzenie, w którym Doktorantka przedstawiła najważniejsze informacje dotyczące nanomateriałów wraz z charakterystyką biologicznych metod otrzymywania nanocząstek metali. Ten rozdział pracy obejmuje również tabelaryczne zestawienie danych literaturowych dotyczących zastosowania bakterii, grzybów oraz roślin wyższych w syntezie nanocząstek metali. Kolejne treści rozdziału dotyczą możliwości wykorzystania torfu w procesach firotemediacji. *W tej części pracy Doktorantka krótko scharakteryzowała techniki procesów oczyszczania środowiska z udziałem roślin wyższych, brakuje jednak wskazania, które z technik mogą znaleźć zastosowanie przy usuwaniu lub unieczynnieniu metali przy udziale torfu?* Wprowadzenie obejmuje również fizyko-chemiczną charakterystykę Cu, Ag i Zr, które zostały wykorzystane w analizach laboratoryjnych, a także prezentację zastosowania nanocząstek i ich wpływu na środowisko przyrodnicze.

Kolejne rozdziały pracy stanowią cel, wraz z celami szczegółowymi oraz hipotezy badawcze, w których Doktorantka precyzyjnie określiła przedmiot i zakres podjętych badań. W części metodycznej, obejmującej 23 strony, Pani mgr Kinga Hęclik przedstawiła procedury oznaczenia zawartości kwasów humusowych w torfach wybranych do badań oraz eksperymenty otrzymywania nanocząstek Cu, Ag i Zr w ekstraktach torfów. Doktorantka nie przedstawiła w tej części pracy informacji, jakiego rodzaju sole metali zostały użyte do syntezy nanocząstek. Informacja ta zawarta jest w dalszych częściach pracy – wynikach oraz dyskusji. Brakuje również omówienia modyfikacji metody Tiurina do oznaczenia kwasów humusowych, którą wprowadziła Doktorantka. W tym samym rozdziale zawarty został opis analiz fizyko-chemicznych, którym poddano otrzymane nanocząstki. W mojej opinii nie było konieczności omawiania podstaw teoretycznych metod zastosowanych w pracy, tj. woltaperometrii cyklicznej, spektroskopii UV-Vis, metody NTA (Nanoparticle Tracking System), czy zasady działania mikroskopu skaningowo-elektronowego (SEM). Dalsza część rozdziału zatytułowanego „Metodyka” obejmuje opis testów biologicznych, prowadzonych na

dwóch gatunkach roślin wyższych, organizmie wodnym oraz dwóch ludzkich liniach komórkowych. Dobór narzędzi analitycznych jest właściwy do realizacji celu pracy.

W następnym, najbardziej rozbudowanym rozdziale, obejmującym 90 stron dysertacji, Doktorantka przedstawiła wyniki otrzymanych analiz. Rezultaty zostały pogrupowane w podrozdziałach obejmujących kolejno: analizy torfów pod kątem zawartości kwasów humusowych, metody syntezy Cu, Ag i Zr, badania właściwości fizyko-chemicznych otrzymanych nanocząstek oraz wyniki przeprowadzonych testów biologicznych. Sposób prezentacji wyników jest typowy dla prac doświadczalnych i obejmuje zarówno tabele, wykresy, jak również fotografie z przeprowadzonych eksperymentów. Na podkreślenie zasługuje umiejętność Pani mgr Kingi Hęclik doboru narzędzi statystycznych do oceny otrzymanych rezultatów i interpretacji uzyskanych danych.

Ważną częścią pracy jest dyskusja, która zajmuje 13 stron maszynopisu. Treści tej części zostały przedstawiona w kolejności chronologicznej do zaprezentowanych we wcześniejszym rozdziale wyników. Doktorantka we właściwy sposób odniosła się do otrzymanych wyników, wskazując na ich podobieństwa do danych literaturowych oraz omawiając rozbieżności. W mojej opinii w dyskusji pojawiają się pewne sformułowania, które wymagają doprecyzowania, np. „dostrajanie wartości pH”, „zgrubna korelacja”, „zielona synteza nanocząstek”, „granica między uruchamianiem mechanizmów obronnych rośliny a jej obumarciem jest bardzo cienka”. *Końcowa część dyskusji, dotycząca toksyczności otrzymanych nanocząstek wymaga wyjaśnienia, jakiego rodzaju nanocząstki Doktorantka otrzymała w ramach pracy? Czy były to nanocząstki metaliczne, czy nanocząstki tlenków metali? Czy na podstawie danych literaturowych można wskazać podobieństwa/różnice w toksyczności metalicznych nanocząstek i ich form tlenkowych?* Końcową część pracy stanowi jeden rozdział zatytułowany „Podsumowanie i wnioski”. W mojej ocenie takie połączenie utrudnia merytoryczną ocenę konkluzji.

Rozdział „Literatura” obejmuje 402 pozycje, głównie anglojęzyczne publikacje naukowe, związane tematycznie z treścią dysertacji. Około 30% literatury stanowią doniesienia naukowe datowane na lata 2014-2022. Dobór literatury jest trafny i uzasadniany. Na końcu pracy umieszczono przydatny wykaz tabel i rysunków. Nieco trudności dostarczają czytelnikowi skróty zawarte w całym tekście, które nie są wyjaśnione przy pierwszym ich użyciu (np. str. 38 „NP-ZrO₂” – wyjaśniony na stronie 43). Dobrym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie w pracy wykazu zastosowanych skrótów.

Praca napisana jest poprawnie pod kątem językowym, jednak pojawiają się błędy interpunkcyjne. Błędne jest również stosowanie wielkiej litery do zapisu gatunków roślin czy organizmu wodnego. Błędy te nie mają wpływu na ocenę merytoryczną pracy i nie pomniejszają jej wartości naukowej.

Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, odpowiedni dla prac o charakterze empirycznym.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska obejmowała syntezę nanocząstek Cu, Ag i Zr z zastosowaniem kwasów humusowych, wyekstrahowanych z dwóch torfów – torfu kwaśnego HOLLAS oraz torfu odkwaszonego STERLUX. W części badawczej Doktorantka przeprowadziła analizy zawartości kwasów humusowych w ww. torfach, wskazując na jedną z metod ekstrakcji, jako skuteczniejszą w wydzieleniu ww. związków. Wydzielone kwasy humusowe stanowiły czynnik redukujący jony metali do ich form nanocząsteczkowych. Pani mgr Kinga Hęclik zaproponowała 3 metody syntezy nanocząstek Cu, Ag i Zr, różniące się temperaturą prowadzenia procesu, mającą za zadanie odwzorowanie warunków panujących na torfowiskach (metoda 1), również podczas intensywnego nasłonecznienia (metoda 2) oraz metodę laboratoryjną, umożliwiającą ekstrakcję kwasów z największą efektywnością (metoda 3). Na podkreślenie zasługuje fakt, że opracowana metoda syntezy nanocząstek metalicznych w ekstraktach torfowych została objęta ochroną patentową (Pat.238644). W tym miejscu nasunęły mi się pytania. *Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie Doktorantka dokonała wyboru torfów do prowadzenia eksperymentów? Jakiego rodzaju torfowiska (odczyn) są najczęściej spotykane w środowisku? Proszę o porównanie efektywności otrzymywania nanocząstek Cu, Ag i Zr zastosowanymi metodami.*

W kolejnym etapie badań Doktorantka przeprowadziła analizy fizyko-chemiczne otrzymanych nanostruktur. Zastosowanie voltamperometrii cyklicznej posłużyło Pani mgr Kinge Hęclik do wstępnego określenia morfologii i rozmiaru nanocząstek. Jednak z uwagi na niejednorodność zawiesin oraz zachodzące zjawisko agregacji określenie ww. parametrów było utrudnione. Doktorantka przeprowadziła badania dotyczące analizy stężeń i średnicy hydrodynamicznej otrzymanych nanocząstek za pomocą metody NTA, podczas których wykazała, że zarówno średnica, jak również ilości otrzymanych nanocząstek były zależne od rodzaju torfu zastosowanego do ekstrakcji kwasów humusowych, ilości kwasów humusowych, rodzaju nanocząstek, a także zastosowanej

metody syntezy. *Z uwagi na brak jednoznacznie wyodrębnionych wniosków, proszę o wypunktowanie najważniejszych konkluzji płynących z tego fragmentu badań.*

Jednym z narzędzi umożliwiających obrazowanie struktur nanocząstek jest mikroskopia skaningowo-elektronowa. W pracy Doktorantka poddała ocenie kształt i wielkość uzyskanych nanocząstek Cu, Ag i Zr. W pracy zamieszczono wyniki dla nanocząstek syntetyzowanych z udziałem kwasów humusowych torfu kwaśnego, otrzymanego jedną z metod. *Czy na podstawie analiz NTA oraz SEM otrzymanych dla syntezy nanocząstek z torfu kwaśnego można uznać, że analizy NTA będą wystarczające do określenia kształtu nanocząstek otrzymanych z torfu odkwaszonego?*

Kolejna część analityczna obejmowała zastosowanie narzędzi modelowania kwantowo-mechanicznego do wyznaczenia stabilnej konformacji cząsteczek kwasów humusowych i fulwowych oraz określenie potencjalnego miejsca przyłączenia się kationów Cu, Ag i Zr. Ta część pracy została zilustrowana licznymi rysunkami, zawierającymi potencjalne struktury otrzymanych nanocząstek Cu, Ag i Zr. Doktorantka zawarła w części wyników stwierdzenie „na rysunkach zaprezentowano (...) konformacje drobin opłaszczone cząsteczkami kwasów humusowych. Przedstawione struktury składają się z centralnie osadzonego atomu metalu (Cu, Ag, Zr) oraz cząsteczek kwasów fulwowych i huminowych koordynujących nanocząstki metalu” (str. 99). *Bardzo proszę o wyjaśnienie, co Doktorantka rozumie przez pojęcie „drobin opłaszczonych kwasami humusowymi”.*

Istotną częścią pracy były testy biologiczne, przeprowadzone na organizmach żywych oraz ludzkich liniach komórkowych. Doktorantka poddała ocenie wpływ otrzymanych nanocząstek na wzrost i potencjał antyoksydacyjny dwóch gatunków roślin wyższych, tj. pieprzycy siewnej (*Lepidium sativum* L.) oraz komonicy błotnej (*Lotus uliginosus* Schkuhr). Ponadto wykonała test przeżywalności organizmu wodnego – słonaczka (*Artemia salina*) w środowisku nanocząstek metali. Testy biologiczne obejmowały również ocenę cytotoksyczności otrzymanych nanocząstek metali w stosunku do ludzkich linii komórkowych - nowotworowych komórek nabłonka płuc A545 oraz nowotworowych komórek nabłonka szyjki macicy HeLa. *Na jakich założeniach oparto wybór powyższych organizmów oraz ludzkich linii komórkowych w badaniach cytotoksyczności?* Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że otrzymane nanocząstki wykazały działanie toksyczne w stosunku do roślin. Wzrost pieprzycy siewnej był ograniczony lub zahamowany po ekspozycji nasion na nanocząstki Cu oraz Ag. Pani mgr Kinga Hęćlik stwierdziła, że zastosowane do

nawodnienia roztwory, zawierające otrzymane we wcześniejszym etapie prac badawczych nanocząstki, uniemożliwiły kiełkowanie nasion *Lepidium sativum* L. i ich rozwój. *W tym miejscu należałoby rozważyć, czy nie było zasadne przeprowadzenie sterylizacji nasion przed wykonaniem doświadczeń dotyczących oceny kiełkowania?* Korzystniejsze wyniki otrzymano przy ocenie wpływu nanocząstek metali na wzrost komonicy błotnej. W tym przypadku Doktorantka stwierdziła, że wzrost rośliny był uzależniony od rodzaju i stężenia nanocząstek stosowanych w eksperymencie. Potwierdzeniem wcześniejszych obserwacji dotyczących negatywnego wpływu nanocząstek Cu, Ag i Zr na wzrost roślin wyższych były testy całkowitej aktywności antyoksydacyjnej roślin, wykonanej metodą DPPH. Obserwowany przez Doktorantkę wzrost aktywności antyoksydacyjnej nawet przy niskich stężeniach nanocząstek stanowił uruchomienie mechanizmów obronnych roślin podczas ekspozycji na niekorzystne warunki środowiskowe. *Proszę Doktorantkę o określenie czynników jakie warunkują aktywację systemu antyoksydacyjnego roślin? Jakiego rodzaju związki mogą być metabolizowane przez roślinę jako odpowiedź na niekorzystne warunki środowiskowe? Czy zastosowana w pracy metoda oznaczenia całkowitej aktywności antyoksydacyjnej jest najwłaściwszym narzędziem do wyznaczenia stresu oksydacyjnego?*

W dalszym etapie oceny toksyczności otrzymanych nanocząstek Cu, Ag i Zr, Pani mgr Kinga Hęćlik przeprowadziła test przeżywalności słonaczka, na podstawie którego wykazała, że na przeżywalność tego organizmu wodnego wpływ miały zarówno rodzaj torfu oraz metalu użytych do syntezy nanocząstek, jak również sama metoda syntezy. Nanocząstki Ag zostały wskazane jako te, które odznaczały się największym wpływem na przeżywalność słonaczka. Kolejne badania dotyczące cytotoksyczności zostały przeprowadzone na ludzkich liniach komórkowych (A545 oraz HeLa), z zastosowaniem testu MTT aktywności metabolicznej komórki. Doktorantka wykazała istotną toksyczność badanych nanocząstek po krótkim czasie ekspozycji, wynoszącym 24h i 48h. Na podstawie powyższych badań Pani mgr Kinga Hęćlik wykazała, że otrzymane przez nią nanocząstki Cu, Ag i Zr mogą oddziaływać toksycznie w stosunku do organizmów żywych, natomiast istnieje potencjał wykorzystania powyższych badań do wyznaczenia stężeń nanocząstek w środowisku, które nie wpłyną negatywnie na ekosystemy. *Proszę o sprecyzowanie konkluzji płynących z tej części pracy. Czy na podstawie przeprowadzonych analiz można dokonać porównania, które z otrzymanych nanocząstek charakteryzują się najwyższą toksycznością w stosunku do organizmów modelowych?*

W ramach podsumowania, chciałabym zapytać Doktorantkę o potencjalny sposób wykorzystania torfów w fitoremediacji, pod kątem przeprowadzenia metali (w tym metali ciężkich) w mniej toksyczne formy i ich neutralizacji w środowisku. Czy na podstawie badań własnych oraz danych literaturowych istnieje możliwość usuwania, czy unieruchamiania metali ciężkich z udziałem torfów i roślin wyższych?

5. Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kingi Hęćlik stanowi opracowanie wnoszące istotny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w obrębie dyscypliny nauki biologiczne. Doktorantka wykazała umiejętność planowania i realizacji badań naukowych, a także prezentacji i interpretacji uzyskanych wyników. Na podkreślenie zasługuje fakt, że podjęta tematyka badawcza jest nowatorska i została zrealizowana w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2017/07/N/NZ9/02137) pod tym samym tytułem jak praca doktorska.

Podsumowując, stwierdzam, że **rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Hęćlik stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**, dotyczącego tworzenia i agregacji nanocząstek Cu, Ag i Zr w ekstraktach torfu oraz ocenę parametrów fizykochemicznych otrzymanych nanocząstek i ich potencjalnej cytotoksyczności w stosunku do organizmów żywych, **i spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) w nawiązaniu do art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669, z późn. zm.), stanowiąc podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Kingi Hęćlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Beata Smolińska, prof. uczelni