

Lublin, 09.06.2019

prof. dr hab. Magdalena Frąc
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Marii Wypij
pt. „Nanocząstki srebra wytworzone przez promieniowce. Charakterystyka oraz
aktywność antybakteryjna i antygrzybowa.”

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Marii Wypij została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod opieką promotora prof. dr hab. Hanny Dahm.

1. Ocena problematyki badawczej rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Magdaleny Wypij koncentruje się na badaniach z obszaru mikrobiologii i nanobiotechnologii, obejmując badania nad nanocząstkami srebra otrzymanymi z wykorzystaniem promieniowców wyizolowanych ze środowisk ekstremalnych. Celem przeprowadzonych badań było określenie zdolności promieniowców wyodrębnionych z gleby kwaśnej oraz osadów alkalicznych do syntezy nanocząstek srebra, ich charakterystyka oraz ocena aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybowej i cytotoksyczności.

Tematyka badań podjętych przez Panią mgr Magdalenę Wypij jest aktualna i interesująca zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Problem narastającej oporności bakterii na antybiotyki, związany z niewłaściwym ich stosowaniem i nadużywaniem, stanowi poważne zagrożenie i sprawia, że współczesna nauka stoi przed dużym wyzwaniem by przeciwdziałać zagrażającym patogenom. Dlatego też jednym z kluczowych zadań, stawianych naukowcom jest rozwiązanie problemu uodparniania się bakterii na antybiotyki, a jedną z obiecujących strategii eliminacji tego zagrożenia jest poszukiwanie nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych, które jednocześnie nie mają negatywnego wpływu na komórki eukariotyczne. Szybko rozwijająca się nanotechnologia, w tym biogeniczna synteza

nanocząstek srebra z wykorzystaniem mikroorganizmów, jest obiecującą strategią otrzymywania nowych materiałów o szerokim spektrum działania zarówno wobec bakterii, jak i grzybów niewrażliwych na stosowane antybiotyki i inne związki biologiczne aktywne. Pomimo tego, że na całym świecie prowadzone są badania zmierzające do rozwiązania problemu antybiotykooporności, to ten obszar badawczy wymaga wciąż gruntownych badań zarówno nad poszukiwaniem efektywnych producentów substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, ich szczegółową charakterystyką, jak również poznaniem mechanizmów biosyntezy nanocząstek, co umożliwiłoby osiągnięcie pełnej kontroli nad ich kształtem, wielkością i właściwościami. Dlatego tematyka badań rozprawy doktorskiej wpisuje się w aktualny i rozwijający się intensywnie obszar badawczy. Podkreślić należy również, że metody biologicznego pozyskania nanocząstek są bardziej przyjazne dla środowiska niż metody chemiczne i fizykochemiczne, dlatego należy je wspierać i rozwijać. Praca ma charakter poznawczy, wnosząc nowe dane o właściwościach szczepów promieniowców stanowi przesłankę do wyjaśnienia mechanizmu i syntezy bionanocząstek srebra, a także przedstawia wyniki badań dotyczące ich charakterystyki. Utylitarny charakter rozprawy dotyczy opracowania warunków syntezy nanocząstek srebra przez promieniowce, a także wykazanie ich działania przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii i grzybów, co potwierdza ich potencjał aplikacyjny.

W związku z powyższym, uważam podjęcie przez Panią mgr Magdalenę Wypij badań ukierunkowanych na tę problematykę za celowe i w pełni uzasadnione.

2. Formalna analiza rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Wypij została przygotowana, jako maszynopis książki, w sposób prawidłowy, typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych. Rozprawa posiada klasyczną strukturę, liczy 149 stron, a w tekst wkomponowano 24 tabele i 14 rysunków.

Rozprawie, złożonej z siedmiu rozdziałów, nadano strukturę obejmującą: **wstęp (I)**, złożony z 8 podrozdziałów, w którym na 27 stronach, Doktorantka nakreśliła problem antybiotykooporności oraz przedstawiła znaczenie mikroorganizmów i nanotechnologii jako obiecujących metod zmierzających do jego rozwiązania, **cel pracy (II)**, w którym Doktorantka przedstawiła założone cele podjętych badań, **material i metody (III)**, bardzo obszerny rozdział, złożony z 16 podrozdziałów, gdzie opisano pochodzenie materiału badawczego – szczepów promieniowców wykorzystanych w badaniach, oraz dokładnie

scharakteryzowano metody prowadzonych badań. Następne części rozprawy to **wyniki (IV)**, część, w której Doktorantka kolejno prezentuje i omawia uzyskane wyniki badań, **dyskusja (V)**, w której uzyskane rezultaty Doktorantka odnosi do danych literaturowych, **wnioski (VI)** oraz **literatura (VII)**. Ponadto, na początku rozprawy znajdują się **streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim** oraz wykaz publikacji współautorskich Doktorantki. Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej jest precyzyjny i odpowiada jej treści.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Pierwszy rozdział rozprawy stanowi „Wstęp”, który jest jednocześnie gruntownym przeglądem literatury, w którym Doktorantka dokładnie przedstawiła zagadnienia związane z tematyką rozprawy, w tym problem narastającej niewrażliwości bakterii na współcześnie stosowane antybiotyki, oraz obiecującą możliwość wykorzystania promieniowców jako potencjalnego źródła nowych związków biologicznie czynnych o charakterze przeciwbakteryjnym i antygrzybowym. Doktorantka zaprezentowała ogólną charakterystykę promieniowców, omawiając ich systematykę, cykl życiowy, rolę w ekosystemach glebowych i znaczenie ich metabolitów w kontroli organizmów potencjalnie patogennych, a także szczegółowo scharakteryzowała promieniowce środowisk ekstremalnych, w tym acidofile, alkalofile i halofile. Kolejnym blokiem tematycznym wstępu jest podrozdział prezentujący znaczenie nanotechnologii. W podrozdziale tym omówione zostały pojęcia związane z tym obszarem nauki, metody wytwarzania nanostruktur oraz ich zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Następnie Doktorantka omówiła nanocząstki srebra, a także chemiczne i biologiczne metody ich syntezy oraz wpływ czynników fizykochemicznych na wytwarzanie nanocząstek srebra. W kolejnym podrozdziale Doktorantka przytoczyła dane literaturowe obejmujące właściwości przeciwbakteryjne nanocząstek srebra, omawiając wielowymiarową toksyczność nanosrebra wobec komórek bakteryjnych. Kolejny podrozdział został poświęcony omówieniu właściwości przeciwwgrzybowych, a w następnym omówiono współdziałanie antybiotyków z nanocząstkami srebra, podkreślając znaczenie ostatnich badań, w których udowodniono synergistyczne ich działanie wobec szeregu bakterii oraz patogenów grzybowych. W dwóch ostatnich podrozdziałach omówiono różne zastosowania nanocząstek srebra, a także omówiono ich cytotoksyczność. Przedstawione we wstępie omówienie problematyki związanej z tematem rozprawy, stanowi szczegółową i rozbudowaną część dysertacji, jest ciekawe i dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia przedstawione w pracy. Doktorantka w kolejnych rozdziałach precyzyjnie nakreśliła

problemy badawcze, związane z prowadzonymi eksperymentami, których rozwiązania się podjęła.

Cel badań wyznacza wyraźnie kierunek i został sformułowany poprawnie. Na podkreślenie zasługuje powiązanie badań użytkowych i poznawczych, obejmujących przeciwdrobnoustrojową aktywność wyselekcjonowanych szczepów promieniowców oraz ich synergistyczne działanie z antybiotykami, a także dostarczających wiedzy z zakresu badań podstawowych związanych z mechanizmem stabilizacji bionanocząstek srebra związanym z obecnością czynników opłaszczających pochodzenia naturalnego, w tym aminokwasów i białek.

Kolejny rozdział rozprawy „Materiał i metody” obejmuje opis materiału badawczego, w tym pochodzenie szczepów promieniowców użytych w badaniach oraz sposób ich izolacji i określenia zdolności do wytwarzania bionanocząstek srebra, prowadzenie eksperymentów oraz zastosowanych metod badawczych, które zostały omówione w kolejnych podrozdziałach. W rozdziale tym przedstawiono etapy prowadzonych badań oraz omówiono metody badań mikrobiologicznych, fizykochemicznych, biochemicznych i molekularnych. Doktorantka dość precyzyjnie opisała zastosowane metody i techniki badawcze, które posłużyły do realizacji poszczególnych etapów badań. Podkreślić należy odpowiedni dobór metod zapewniający przeprowadzenie kompleksowych badań, w wyniku których Doktorantka uzyskała szereg wyników odnoszących się do charakterystyki samych szczepów promieniowców, jak również bionanocząstek srebra syntetyzowanych z ich udziałem. Doktorantka dokonała zarówno oceny wizualnej, jak i analizy spektrofotometrycznej bionanocząstek srebra, a wybrane szczepy promieniowców zidentyfikowała na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA. Kolejne podrozdziały obejmują opisanie eksperymentów dotyczących wpływu czynników fizykochemicznych na proces biosyntezy nanocząstek srebra przez promieniowce, a także prezentację prac badawczych nad chemiczną syntezą nanocząstek srebra, jako obiektu kontrolnego/porównawczego dla otrzymanych bionanocząstek. Doktorantka opisała metodologię eksperymentów nad wpływem bionanocząstek srebra na formowanie biofilmu przez bakterie i grzyby, a także badania nad cytotoksycznością nanocząstek srebra. Doświadczenia zostały zaprojektowane logicznie, a opis metodyki świadczy o ich prawidłowym wykonaniu. W części dotyczącej metod badawczych Doktorantka opisała również metodykę badań prowadzonych z wykorzystaniem m.in. transmisyjnego mikroskopu elektronowego, potencjału zeta, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym, a

także metodologię oznaczania minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bójczonego nanocząstek srebra oraz antybiotyków wobec bakterii i grzybów. Zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod badawczych świadczy o dużych kompetencjach analitycznych Doktorantki i jest podstawą do podkreślenia umiejętności Doktorantki do stosowania interdyscyplinarnego podejścia i wielowymiarowych analiz w celu rozwiązania konkretnego problemu badawczego. Doktorantka dzięki zastosowanemu warsztatowi badawczemu mogła przeanalizować obszerny materiał doświadczalny, a następnie mogła dokonać właściwej interpretacji i dyskusji wyników.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka opisała w sposób bardzo syntetyczny wyniki badań uzyskane w ramach prowadzonych eksperymentów, a znaczną część tego rozdziału stanowi dokumentacja wyników w postaci tabelarycznej i graficznej. W tej części pracy Doktorantka omówiła uzyskane wyniki, przedstawiając kolejno wyniki badań nad zdolnością szczepów promieniowców do syntezy nanocząstek srebra, ze wskazaniem najlepszych ich producentów, środowisk izolacji i molekularnej identyfikacji mikroorganizmów. Doktorantka wykazała spadek intensywności wytwarzania nanocząstek srebra wraz z obniżeniem wartości pH i wzrost wraz ze wzrostem temperatury oraz z obniżeniem stężenia azotanu srebra dodawanego do lizatu komórkowego. Ponadto, określono wielkość nanocząstek przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego, wykazując, że poza małą wielkością, biologiczne nanocząstki srebra charakteryzowały się kształtem sferycznym i polidispersyjnością, w przeciwieństwie do nanocząstek chemicznych, które były monodispersyjne i posiadały kształt kulisty. Kolejny aspekt rozprawy dotyczył charakterystyki biomolekuł białkowych na powierzchni nanocząstek srebra uzyskanych od wybranego szczepu promieniowca, sugerując, że mechanizm powstawania nanocząstek związany jest z jednym typem białka, które tworzy specyficzne nanokompleksy z nanocząstkami srebra, co należy uznać za cenny wynik prowadzonych badań, będący jednocześnie wyznacznikiem dalszych eksperymentów z tego obszaru. Badania nad aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową wykazały na ogół silniejsze działanie wobec grzybów niż bakterii, a także istotnym z punktu widzenia aplikacyjnego rezultatem jest wykazanie, że niektóre bionanocząstki miały silniejsze właściwości antybakteryjne i antygrzybowe niż antybiotyki. Wyniki stanowią część pracy, w której Doktorantka prawidłowo omówiła efekty badań. W ramach przeprowadzonych badań wykazała, że badane szczepy promieniowców wykazujące zdolność do syntezy nanocząstek srebra pochodziły zarówno z kwaśnej gleby leśnej, jak również osadów jeziora i zbocza krateru. Nanocząstki srebra wytworzone przez promieniowce charakteryzowały się

właściwościami hamującymi i bójczymi wobec wybranych bakterii i grzybów, a także wykazywały synergistyczne działanie z antybiotykami, wskazując ich działanie przeciwdrobnoustrojowe. Uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje na temat charakterystyki szczepów promieniowców syntetyzujących nanocząstki srebra oraz wpływu czynników fizykochemicznych na ich biosyntezę i potwierdzają ich właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybowe. Obszerny materiał badawczy zaowocował dużą ilością wyników, które omówiono i przedstawiono na licznych rysunkach oraz zestawiono w tabelach na 51 stronach rozprawy. Mankamentem jest brak lub w przypadku niektórych testów bardzo pobieżna analiza statystyczna uzyskanych wyników.

Kolejny rozdział Dyskusja jest bardzo dobrze napisaną częścią całego opracowania i charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym. W tej części rozprawy Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych rezultatów odnosząc się do wyników dostępnych w publikacjach naukowych innych badaczy, co świadczy o bardzo dobrym rozpoznaniu podjętej problematyki badawczej. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się dobrą i wyważoną interpretacją uzyskanych wyników. Merytoryczną część rozprawy kończą wnioski. W tej części Doktorantka podsumowuje wyniki badań formułując 11 wniosków. Na końcu pracy znajduje się literatura, obejmująca 285 pozycji, w większości z ostatnich 10 lat, co potwierdza aktualność podjętej tematyki badawczej.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się pewne sugestie i uwagi, które w tym miejscu chciałabym przytoczyć:

- W podrozdziale „Pochodzenie materiału badawczego” Doktorantka opisała materiał badawczy w postaci szczepów izolowanych z różnych środowisk bez szczegółowego omówienia wybranych lokalizacji. Bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie informacji o miejscach izolacji promieniowców wraz z podaniem terminów (pór roku), kiedy izolowano promieniowce. Dodatkowo proszę o wyjaśnienie czym kierowała się Doktorantka podczas wyboru tych właśnie miejsc do izolacji promieniowców, oraz proszę o informację czy prowadzone były tam wcześniejsze badania nad pozyskaniem promieniowców o wysokich uzdolnieniach do produkcji metabolitów aktywnych biologicznie.
- W opisie eksperymentów m.in. nad wpływem czynników fizykochemicznych na proces biosyntezy nanocząstek srebra przez promieniowce nie podano informacji o liczbie

zastosowanych powtórzeń. Proszę o uzupełnienie tej informacji podczas obrony rozprawy doktorskiej.

- Ważnym elementem planowanych badań jest postawienie hipotezy badawczej, która jest weryfikowana w czasie prowadzonych prac eksperymentalnych. Bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie hipotezy badawczej, która była weryfikowana podczas prowadzonych badań, ponieważ w treści pracy, nie została ona zamieszczona.
- Z naukowego punktu widzenia ważnym elementem badań byłoby określenie, aktywności antybakteryjnej i antygrzybowej bionanocząstek srebra syntetyzowanych przez promieniowce, również wobec bakterii i grzybów będących patogenami roślinnymi. Bardzo proszę o informację czy prowadziła Pani takie badania, albo czy znane są Pani wyniki badań literaturowych nad wykorzystaniem bionanocząstek w ochronie roślin. Potencjał aplikacyjny nanomateriałów nie ogranicza się jedynie do zastosowań medycznych, a trwają również prace nad wykorzystaniem nanocząstek w nawozach stosowanych w rolnictwie. Bardzo proszę o Pani opinię na temat możliwości zastosowania opracowanych przez Panią bionanocząstek srebra syntetyzowanych przez promieniowce w praktyce rolniczej, medycznej czy innej. Proszę również o omówienie głównych zalet opracowanych bionanocząstek srebra syntetyzowanych z udziałem promieniowców oraz zagrożeń związanych z ich stosowaniem.
- W treści pracy znalazły się drobne błędy edytorskie i stylistyczne, które zostały zaznaczone w tekście.

Przedstawione uwagi mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na mój pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej.

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dotyczącego zdolności promieniowców wyizolowanych ze środowisk ekstremalnych do syntezy nanocząstek srebra wraz z ich kompleksową charakterystyką, zbadaniem właściwości antybakteryjnych, przeciwgrzybowych i cytotoksycznych.

Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, opanowała obszerny warsztat

badawczy, a także wykazała się zdolnością do omówienia, opracowania, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Dysertacja doktorska Pani mgr Magdaleny Wypij jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nanobiotechnologii, w szczególności w zakresie biogenicznej syntezy nanocząstek srebra przez promieniowce. Recenzowaną rozprawę oceniam pozytywnie podkreślając, że wskazane uwagi i sugestie nie wpływają istotnie na jej wartość merytoryczną.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Wypij spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę aktualność podjętej problematyki, potwierdzoną opublikowanymi częściowo wynikami przedstawionymi w dysertacji w uznanych międzynarodowych czasopismach naukowych oraz uwzględniając kompleksowość bardzo dobrze zaplanowanych badań, w których wykorzystano szereg nowoczesnych technik analitycznych, a także dużą wartość poznawczą i praktyczną uzyskanych wyników badań stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej odpowiednią nagrodą.

Magdalena Frąć
prof. dr hab. Magdalena Frąć

Lublin, 09.06.2019