



**UNIwersYTET W BIAŁYSTOKU**  
**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, 2 sierpnia 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt.**

**Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane nanocząstki metaliczne  
oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową**

**Autor rozprawy: mgr OLIWIA METRYKA**

**Promotor: prof. dr hab. AGNIESZKA MROZIK**

**Promotor pomocniczy: dr DANIEK WASILKOWSKI**

***Podstawa prawna sporządzenia recenzji***

Recenzję rozprawy doktorskiej autorstwa Pani Oliwi Metryki sporządziłam pod kątem spełnienia wymogów dla doktoratów określonych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742).

***Ocena formalna***

Pani Oliwia Metryka przygotowała rozprawę doktorską będąc doktorantką w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Śląskiego (U.Ś.). Przedstawiona do oceny rozprawa została wykonana na Wydziale Nauk Przyrodniczych U.Ś., gdzie też pracuje Pani prof. Agnieszka Mroziak oraz dr Daniel Wasilkowski, pełniący odpowiednio funkcje promotora oraz promotora pomocniczego. Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty. Doktorat jest kompilacją trzech artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2021-2023 oraz tekstu w języku polskim, który ma charakter opracowania naukowego, podzielonego na logiczne i spójne rozdziały, tj. (i) wprowadzenie, gdzie przedstawiono problem naukowy oraz bardzo dobrze uzasadniono konieczność podjęcia badań, (ii) cel badań wraz z hipotezami badawczymi oraz zrealizowanymi zadaniami badawczymi, (iii) materiały i metody, gdzie szczegółowo omówiono zasto-

sowane techniki badawcze, pomimo ich opisu także w artykułach naukowych oraz (iv) wyniki i dyskusja, prezentujące skrótowo otrzymane rezultaty badań. Dodatkowo doktorat został opatrzony (v) wnioskami oraz (vi) streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Artykuły, stanowiące podstawę doktoratu, to spójny tematycznie cykl publikacji, a tytuł doktoratu bardzo dobrze oddaje zakres tematyczny poszczególnych prac. Artykuły opublikowano w czasopiśmie z listy JCR, tj. *International Journal of Molecular Sciences* (dwie prace) z platformy MDPI oraz *Journal of Hazardous Materials* (jedna praca), wydawanym przez wydawnictwo Elsevier. Oba czasopisma mają zasięg międzynarodowy ze współczynnikiem oddziaływania IF<sub>2023</sub> (ang. IF, *impact factor*) wynoszącym odpowiednio 5,6 oraz 14,2. Czasopisma znajdują się także w ministerialnym *Wykazie Czasopism Naukowych i Recenzowanych Materiałów z Konferencji Międzynarodowych* (Komunikat Ministra Edukacji i Nauki z dnia 17 lipca 2023 r.) z punktacją odpowiednio 140 i 200. Pomimo toczącej się dyskusji nad profilem platformy MDPI, oba artykuły stanowiące podstawę recenzowanego doktoratu a opublikowane w *Int. J. Mol. Sci.* mają bardzo wysoką wartość naukową. Natomiast czasopismo *J. Hazard. Mater.*, które zostało powołane w 1975 r., jest uznawane za wiodące w naukach o środowisku. Publikacja pracy w tym czasopiśmie jest ogromnym i niepodważalnym osiągnięciem Doktorantki oraz całego zespołu współautorów. Publikacje wchodzące w skład doktoratu są pracami zespołowymi. Zespół autorski artykułów w *Int. J. Mol. Sci.* to Doktorantka oraz Promotorzy w postępowaniu doktorskim. Natomiast w przypadku pracy w *J. Hazard. Mater.* do tego samego zespołu dołączyła Pani prof. Małgorzata Adamczyk-Habrajska z Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych U.Ś. Dla doktoratów będących zbiorem publikacji wieloautorskich, ważna jest ocena udziału Doktoranta w przygotowanie poszczególnych prac. Wnikliwa analiza załączonych do doktoratu *Oświadczeń Współautorów* pozwala na stwierdzenie, iż Pani Oliwia Metryka miała znaczący udział zarówno we wszystkich etapach prowadzonych badań, tj. w opracowaniu koncepcji badawczych, przeprowadzeniu analiz, interpretacji wyników, jak i w przygotowaniu manuskryptów wszystkich publikacji. Należy też podkreślić, iż Pani Oliwia we wszystkich artykułach jest pierwszym autorem, oraz wraz z Promotor, autorem korespondencyjnym, co jednoznacznie wskazuje na Jej znaczący udział w powstaniu prac stanowiących doktorat. *Oświadczenia Współautorów* dołączone do doktoratu są zgodne z deklaracjami dotyczącymi zakresu prac autorów złożonymi w publikacjach.

**Stwierdzam, że pod względem formalnym rozprawa doktorska Pani Oliwii Metryki spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim opartym na cyklu publikacji.**

## *Ocena merytoryczna*

Niewątpliwie XXI wiek to era nanotechnologii. Jak słusznie zauważa Doktorantka, nanotechnologie i nanomateriały coraz częściej towarzyszą nam w życiu codziennym, ale też w medycynie i farmacji oraz różnorodnych gałęziach przemysłu. W konsekwencji obserwuje się dynamiczny wzrost zainteresowania nanomateriałami, a w budżetach wielu krajów środki finansowe pozyskane z tytułu produkcji nanomateriałów stanowią coraz większy udział. Jednakże, równocześnie ogromne ilości nanocząstek są uwalniane i akumulowane w środowisku naturalnym, co zwiększa ryzyko toksycznego działania na organizmy żywe. Tymczasem, podczas gdy liczba badań dotyczących syntezy i wykorzystywania nanocząstek dynamicznie rośnie, tak raporty dotyczące oddziaływania nanocząstek na organizmy (w szczególności organizmy nie docelowe) pojawiają się znacznie rzadziej. Z tego względu analizy podjęte przez Doktorantkę, a mające na celu zbadanie oddziaływania nanocząstek na bakterie, są niezwykle cenne zarówno z punktu widzenia badań podstawowym, jak i aplikacyjnym.

Celem pracy w ramach recenzowanego doktoratu była ocena procesów związanych z indukcją stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii poddawanych działaniu czterech nanocząstek metalicznych. Badania prowadzono w odniesieniu do trzech gatunków mikroorganizmów modelowych, reprezentujących bakterie Gram-ujemne (*Escherichia coli*) i Gram-dodatnie (*Bacillus cereus* i *Staphylococcus epidermidis*), a uznawanych generalnie za mikroorganizmy niechorobotwórcze lub oportunistyczne. Wybór mikroorganizmów do badań należy uznać za optymalny, głównie z racji (i) różnic morfologicznych bakterii klasyfikowanych do powyższych gatunków (bakterie cylindryczne *versus* kuliste; gruba ściana komórkowa *versus* cienka; obecność błony zewnętrznej *versus* jej brak) oraz (ii) tworzenia endospor w niesprzyjających warunkach przez *B. cereus*. Badania wykonano w trzech etapach, stosując innowacyjne techniki badawcze z zakresu biologii molekularnej, biofizyki i mikrobiologii, co pozwoliło na otrzymanie wyników, znacząco podnoszących naszą wiedzę na temat oddziaływania nanocząstek na mikroorganizmy. Wyniki poszczególnych etapów badań zaprezentowano w oddzielnych artykułach.

Artykuł pt. „Insight into the antibacterial activity of selected nanoparticles and alternations with the antioxidant defence system in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*” (*Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 11811) stanowi pierwszą pracę w recenzowanym doktoracie. W ramach wykonanych analiz wyznaczono podstawowe wskaźniki toksykologiczne nanocząstek oraz parametry

charakteryzujące funkcjonowanie układu antyoksydacyjnego bakterii. Między innymi potwierdzono antybakteryjne działanie wszystkich analizowanych nanocząstek, a wyższy efekt cytotoksyczny wykazano dla nanocząstek metali niż odpowiadających im tlenków metali. Doktorantka to zjawisko słusznie wyjaśnia szybszym uwalnianiem jonów metali z powierzchni nanocząstek zawierających jedynie pojedyncze pierwiastki niż z powierzchni tlenków. Natomiast różnice w poziomie efektu cytotoksycznego jednego rodzaju nanocząstek w odniesieniu do różnych bakterii, Doktorantka tłumaczy m.in. dysproporcją w grubości ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. To wyjaśnienie wydaje się być logiczne, jednak analizując aspekt oddziaływania nanocząstek na bakterie, nie można pomijać obecności błony zewnętrznej (LPS) na komórkach bakterii Gram-ujemnych, np. *E. coli*. Podczas obrony chciałabym zapytać Doktorantkę jakie znaczenie dla poziomu efektu cytotoksycznego nanocząstek może mieć błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych? W odniesieniu do pierwszej publikacji, interesująco przedstawiają się wyniki dotyczące zmian w poziomie rodzajów reaktywnych form tlenu oraz działania systemów antyoksydacyjnych w komórkach bakteryjnych. Trudno nie zgodzić się z Doktorantką, iż różnice w działaniu systemów antyoksydacyjnych wskazują na istnienie odmiennych mechanizmów ochronnych i adaptacyjnych w komórkach *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis* na stres wywołany poszczególnymi nanocząstkami.

W drugiej publikacji, pt. "Evaluation of the effects of Ag, Cu, ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the expression level of oxidative stress-related genes and the activity of antioxidant enzymes in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*" (*Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 4966), Doktorantka skupia się na profilach transkrypcyjnych i antyoksydacyjnych komórek bakterii w obecności nanocząstek. Ten etap badań Doktorantka określa jako nowatorskie i trudno jest nie zgodzić się z taką oceną, gdyż rzeczywiście niewiele jest prac łączących oddziaływanie nanocząstek na ekspresję genów. Generalnie w obecności nanocząstek stwierdzono obniżenie ekspresji badanych genów w przypadku *E. coli* i *S. epidermidis* oraz zwiększenie ekspresji w komórkach *B. cereus*. W komórkach *B. cereus* i *S. epidermidis* największą pozytywną korelację pomiędzy ekspresją genów a obecnością nanocząstek wykazano dla dwutlenku tytanu, a w komórkach *E. coli* dla tlenku cynku. Dodatkowo zanotowano zmienną aktywność podstawowych enzymów antyoksydacyjnych. Wykonanie eksperymentów w tej części doktoratu wymagało ogromnego zaangażowania oraz wielu laboratoryjnych umiejętności Doktorantki, szczególnie przy analizach RT-qPCR. Jest to metodą niezwykle kapryśną, gdzie powtarzalność wyników jest ściśle uzależniona od doświadczenia i umiejętności laboratoryjnych eksperymentatora. Przy tej części pracy pojawia się pytania, czy podczas analiz sprawdzano tworzenie endo-

spor przez *B. cereus* w układzie reakcyjnym? Sporulacja mogła znacząco wpływać na otrzymane wyniki badań.

“Undesirable consequences of the metallic nanoparticles action on the properties and functioning of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis* membranes” (*J. Hazard. Mater.*, 2023, 446, 130728), to trzeci artykuł w cyklu publikacji stanowiących recenzowaną rozprawę doktorską. Wyniki zaprezentowane w niniejszej publikacji, a dotyczące zmian w strukturze i właściwościach błony komórkowej oraz w metabolizmie oddechowym bakterii w obecności nanocząstek, są bardzo dobrym dopełnieniem rezultatów badań przedstawionych we wcześniejszych publikacjach wchodzących w skład recenzowanego doktoratu. Wykazano zmienne oraz unikatowe mechanizmy aktywności nanocząstek względem błon komórkowych bakterii, będące w korelacji z poziomem ATP, aktywnością ATP-az oraz profilem kwasów tłuszczowych. Zmiany w błonach komórkowych bakterii wywołane nanocząstkami są uzależnione od typu zastosowanych nanocząstek i ich stężenia, gatunku bakterii zastosowanych jako mikroorganizmy modelowe. W tej pracy przedstawiono czytelne fotografie bakterii poddane działaniu nanocząstek. Szczególną interesująca i krytyczna jest dyskusja otrzymanych wyników.

W badaniach zaprezentowanych w poszczególnych publikacjach zastosowano logiczny i spójny schemat eksperymentów, a wyniki przeprowadzonych analiz bardzo dobrze udokumentowano. Duże znaczenie dla mojej pozytywnej oceny doktoratu ma też zastosowanie wieloaspektowej analizy statystycznej, co skutkowało wyłonieniem danych istotnie statystycznych oraz dało podstawy do wysunięcia prawidłowych wniosków. Doktorat jest bardzo dobrze przygotowany pod względem estetycznym i napisany poprawnym językiem. Moja jedyna uwaga w tym zakresie dotyczy braku spisu stosowanych skrótów. Niemniej, ta subiektywna opinia nie przeszkadza mi stwierdzić, iż generalnie forma prezentacji rozprawy doktorskiej jest bardzo dobra, a schematy układów eksperymentalnych, zarówno w tekście w języku polskim jak i w publikacjach są wręcz wzorowe.

Na koniec recenzji chciałam ustosunkować się do hipotez badawczych. Na stronie 9 doktoratu, w rozdziale 1.2. Cel pracy doktorskiej, Doktorantka pisze „W pracy zweryfikowano następujące hipotezy badawcze ...” i wymienia cztery hipotezy. Natomiast w dalszej części dysertacji nie znajduję odniesienia się Doktorantki do zaproponowanych hipotez. Zatem podczas obrony chciałabym poprosić Doktorantkę o wskazanie, które hipotezy zostały zweryfikowane pozytywnie, a dla których nie uzyskano po-

twierdzających danych. Ponadto, hipoteza Nr 4 „NPs oddziałują z osłonami zewnętrznymi bakterii i powodują zmiany morfologiczne komórek” wydaje się być zbyt oczywista oraz została już wcześniej pozytywnie zweryfikowana.

### ***Wniosek końcowy***

Wyniki badań zaprezentowane w recenzowanej rozprawie doktorskiej stanowią ogromny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne, a w szczególności służą poznaniu mechanizmów reakcji organizmów na nanomateriały. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej. W trakcie prowadzenia badań Doktorantka przeprowadziła eksperymenty, które pozwoliły na rozwiązanie postawionego problemu badawczego. Badania mają charakter nowatorski zarówno z poziomu badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Oliwi Metryki spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742). Na tej podstawie składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego, o dopuszczenie mgr Oliwi Metryki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Mając na uwadze nowatorski charakter przeprowadzonych badań, opublikowanie wyników w prestiżowych periodykach naukowych oraz wpływ badań zaprezentowanych w doktoracie na rozwój dyscypliny nauki biologiczne, przedkładam wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą, zgodnie z regulaminem obowiązującym w Uniwersytecie Śląskim.

