



Prof. dr hab. inż. Magdalena Parlińska-Wojtan

Zakład Materiałów Funkcjonalnych

**Recenzja poprawionej rozprawy doktorskiej mgr Kingi Hęclik**

**„Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu.  
Biosynteza, izolacja, identyfikacja i badania cytotoksyczności”**

Przedstawiona mi do recenzji poprawiona wersja rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Hęclik pt. „Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu. Biosynteza, izolacja, identyfikacja i badania cytotoksyczności”, została przygotowana w Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego pod opieką Promotorów Prof. dr hab. Anny Lankoff oraz dr hab. inż. Dariusza Pogockiego, Prof. UR. Po poprawie dostałam pracę wyłącznie w wersji elektronicznej i w związku z tym, aby sumiennie ją przeczytać, zanalizować i napisać recenzję, musiałam ją sama wydrukować.

Kandydatka podjęła ciekawą i aktualną tematykę badawczą, jaką jest tworzenie się w środowisku naturalnym, a dokładnie w pokładach torfu nanocząstek metali i ich wpływ na środowisko, a w szczególności na organizmy żywe. Głównym celem rozprawy doktorskiej była „biosynteza wybranych nanocząstek metali (miedzi, srebra i cyrkonu) w obecności kwasów humusowych, wraz z próbą wyjaśnienia mechanizmu ich tworzenia, analizą właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych oraz określenie stopnia toksyczności uzyskanych drobin.” Ponadto, po poprawie, manuskrypt rozprawy został uzupełniony o 3 hipotezy badawcze:

1. Kwasy humusowe zawarte w ekstraktach torfowych posiadają właściwości redukcyjne pozwalające na powstanie nanocząstek metali (miedzi, srebra i cyrkonu).
2. Otrzymane nanocząstki nie są jednorodne i stabilne.
3. Uzyskane nanocząstki wykazują cytotoksyczność – nie są bezpiecznie dla wybranych organizmów modelowych.

Jak Autorka pisze, „*celem pracy jest opracowanie metod syntezy, a później określenie mechanizmu powstawania nanocząstek w oparciu o obliczenia kwantowo-mechanistyczne i szczegółowa analiza właściwości fizyko-chemicznych otrzymanych nanocząstek.*” Kandydatka zaczęła opis uzyskanych wyników od opisów syntezy oraz prób charakteryzacji otrzymanych nanocząstek miedzi, srebra i cyrkonu metodami eksperymentalnymi oraz modelowaniem. Niestety, praca, nawet po poprawie, nadal zawiera niezliczone błędy merytoryczne, a większość wyników, w szczególności UV-Vis jest w ogóle niezinterpretowana.:

- Pierwszy, rzucający się w oczy błąd pozostał w tytule: „*Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu...*” – w pracy badane były nanocząstki srebra, miedzi i cyrkonu. Cyrkon na pewno nie należy do metali



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

szlachetnych, natomiast miedź jest półszlachetna. Sam tytuł pracy jest również zaskakujący: praca jest z dziedziny biologii, natomiast tytuł sugeruje coś zupełnie innego.

- Str. 46 Opisy metod wytworzenia nanocząstek są niekompletne, w żadnym nie są podane sole Ag, Cu i Zr użyte do wytworzenia nanocząstek. W pracy, w innych miejscach znalazłam informację, że użyto  $\text{AgNO}_3$  oraz  $\text{CuSO}_4$ , natomiast o tym, że został użyty azotan (V) cyrkonu czytelnik dowiaduje się z dyskusji na str. 171.
- Str. 51 „*Absorpcyjna spektroskopia UV-Vis jest wykorzystywana w nanotechnologii jako szybki test pomiarowy.*” – Absorpcyjna spektroskopia UV-Vis jest wykorzystywana jako szybki test pomiarowy, ale w chemii, a nie w nanotechnologii.
- Str. 52 Rys. 11: UV-Vis służy do zbadania własności optycznych materiałów, ewentualnie do określenia długości fali rezonansu plazmowego. Ale nie rozumiem, w jakim celu Autorka zamieszcza schemat powierzchniowego rezonansu plazmowego i jeszcze błędnie go opisuje („*powoduje powstanie różnoimiennego ładunku na jednej nanocząstce (po jej jednej stronie powstaje ładunek ujemny, a z drugiej dodatni)*” – bardzo duży skrót myślowy), skoro nie używała techniki SERS (zwykle stosowana w spektroskopii Ramana).
- Str. 53 paragraf „*Analiza rozkładu wielkości ziaren otrzymanych nanocząstek za pomocą metody NTA*” – technika NTA jest najbardziej miarodajna i wiarygodna dla stabilnych nanocząstek o kształcie sferycznym, a Autorka, dopóki nie zamieściła zdjęć SEM nie widziała jakich kształtów nanocząstki otrzymała. Dla płatków miedzi i ogólnie aglomeratów nanocząstek, technika NTA jest mało miarodajna.
- Str. 55 Nigdy nie słyszałam o „*aparacie SEM*” tak jak Autorka podpisała Rys. 1. „*Schemat budowy aparatu SEM*”. SEM jest skrótem od angielskiego scanning electron microscope i jak sama nazwa wskazuje jest mikroskopem. Mikroskop optyczny do obrazowania próbek biologicznych nigdzie w pracy nie został nazwany „*aparatem*”. Dla mnie taka pomyłka świadczy o tym, że Kandydatka nie miała styczności z mikroskopem SEM i po prostu zleciła wykonanie badań. Zdanie na str. 55: „*Zaś strukturę wewnętrzną możemy charakteryzować wykorzystując wiązkę ulegającą ugięciu emitującą sygnał dyfrakcji elektronowej.*” Dyfrakcję elektronową wykonuje się wyłącznie w mikroskopie transmisyjnym. Nigdy się nie spotkałam z dyfrakcją na SEM.
- Str. 59 paragraf „*Testy biologiczne*” zawiera dokładne opisy badanych organizmów, natomiast nie znalazłam w nim niestety opisu testów (MTT) stosowanych do badań (cyto)toksyczności.
- W ramach poprawy, Kandydatka zamieściła 3 zdjęcia SEM nanocząstek miedzi, srebra oraz cyrkonu otrzymanych z torfu HOLLAS M1. Badania biologiczne były prowadzone dla nanocząstek otrzymanych z torfów HOLLAS i STERLUX metodami M1, M2 i M3. Czyli, w pracy powinno znaleźć się 18 zdjęć, w związku z tym niestety nie wiadomo jaką morfologię miały inne otrzymane nanocząstki.



#### Wyniki UV-Vis:

- Następnie, również w ramach poprawy Autorka zamieściła wyniki pomiarów UV-Vis w postaci widm, a nie tylko tabelki, których opis w paragrafie 5.3.2 zaczyna następującym stwierdzeniem: „Wykonanie analizy UV-Vis otrzymanych zawiesin nanocząstek pozwoliło na wstępne określenie ich morfologii (kolor zawiesiny nanocząstek)”? Co Autorka ma na myśli? Pod pojęciem morfologia rozumiemy zwyczajowo kształt i rozmiar nanocząstek. Jedynie w przypadku nanocząstek złota, jeśli są one sferyczne i mają mały rozrzut wielkości, po kolorze można określić zakresy ich rozmiarów.
- Str. 78 następnie Kandydatka pisze: „Nalożone widma UV-Vis otrzymanych nanocząstek miedzi, srebra i cyrkonu przedstawiono zbiorczo na poniższych rysunkach (Rys. 22-24)”. Ani w tekście, ani w podpisach pod rysunkami nie jest sprecyzowane dla jakich próbek były zbieranie widma. Co prawda w podpisie Rys. 22 jest informacja, że „wszystkie linie dotyczą tej samej próbki”, ale w takim razie po co 6 pomiarów a nie np. 3 i dlaczego np. dla próbki nanocząstek srebra czy cyrkonu, widma wyszły dla tej samej próbki różne, mierzone co 60 sek?
- Na str. 79 Doktorantka pisze: „Analizowano całą serię otrzymanych nanocząstek, a zarejestrowane widma nałożono na zbiorcze wykresy.” Co jest cała seria? Różne rozcieńczenia, czy różne metody przygotowania próbek, czy jeszcze coś innego?
- Dalej autorka pisze: „Na wykresach (Rys. 22-Rys. 24) można zaobserwować maksima absorpcji świadczące o występowaniu w analizowanym roztworze odpowiednio: miedzi, srebra i cyrkonu w formie obojętnych drobin dodatkowo opłaszczonych otoczką kwasów humusowych.” Po pierwsze co Autorka ma na myśli pod pojęciem „obojętna drobina”? Obojętna chemicznie, elektrycznie? Po drugie nanocząstek nie należy nazywać „drobiną”. Ponadto, z samych przedstawionych w rozprawie widm UV-Vis nie da się jednoznacznie stwierdzić, czy „kwasy opłaszczają nanocząstki”: 1). Z widm UV-Vis przedstawionych na Rys 22-24 widać, że w próbkach jest obecna organika, natomiast nie można jednoznacznie jej zidentyfikować. W tym celu należałoby wykonać pomiary spektroskopią FTIR, która umożliwiłaby nie tylko identyfikację chemiczną związków organicznych i potwierdzenie obecności kwasów humusowych na powierzchni nanocząstek, ale pozwoliła na identyfikację wiązania jakim kwasy są przyłączone do powierzchni nanocząstek. Natomiast, aby z widm UV-Vis jednoznacznie stwierdzić, że kwasy opłaszczają nanocząstki, należałoby wykonać pomiar widma czystych nanocząstek bez kwasów oraz tych z kwasami i je porównać.
- Na przełomie str. 79/80 Doktorantka pisze: „W przypadku roztworu zawierającego drobinę miedzi, maksima absorpcji są widoczne około 470 nm.” Po pierwsze prawidłowe sformułowanie brzmi: „maksimum absorpcji widoczne jest przy długości fali 470 nm”, a absorpcja piszemy przez p. Wartość 470 nm niezbyt zgadza się z podanymi w Tabeli 10 str. 80. Zresztą nie bardzo rozumiem, co oznacza sformułowanie „zakresy maksimów”. Jest coś takiego jak szerokość pików, natomiast maksimum jest to jedna wartość. Na widmie na Rys. 22, widoczne są 2 maksima: pierwsze przy ok 280



nm, a drugie przy 470 nm. Z literatury wynika, że nanocząstki metalicznej miedzi mają maksimum absorpcji przy długości fali 520-580 nm (<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2387-3>). W drugiej pracy, (<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.077>), autorzy wykazują, że jony  $\text{Cu}^+$  mają maksimum absorpcji przy długości fali 250 nm, kompleksy  $\text{O}-\text{Cu}-\text{O}$  i  $\text{Cu}-\text{O}-\text{Cu}$  przy 320-370 nm oraz 400-440 nm, rezonans plazmonowy od  $\text{Cu}$  występuje przy długości fali 520-580 nm, a przejścia d-d w jonach  $\text{Cu}^{2+}$  przy długościach fal 620-850 nm. W trzeciej pracy, (<https://doi.org/10.1063/1.5141680>) maksimum absorpcji od nanocząstek zawierających  $\text{Cu}$  jest przy długości fali ok. 300 nm, natomiast maksimum absorpcji pochodzące od  $\text{CuSO}_4$  jest przy długości fali ok. 800 nm. W kolejnej pracy (<https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab7b94>), charakterystyczne maksima absorpcji dla nanocząstek tlenku miedzi  $\text{CuO}$  obserwowane były przy długości fali 296 nm. Dla nanocząstek  $\text{Cu}_2\text{O}$  maksima absorpcji były obserwowane przy długości fal 506 and 522 nm (<https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00785>). Z przytoczonych danych literaturowych, wynika, że wartości podawane zarówno w tekście jak i w tabeli 10 nie wskazują jednoznacznie na obecność nanocząstek metalicznej miedzi, natomiast wg. danych literaturowych znalezionych przez recenzenta, nanocząstki otrzymane przez Doktorantkę to raczej tlenek miedzi. Niestety Autorka nie przytoczyła żadnych odnośników literaturowych, ani nie omówiła otrzymanych wyników, więc właściwie zarówno z widm na Rys 22 jak i z Tabeli 10 nie wiadomo, jakie nanocząstki są charakteryzowane. Kandydatka nie zdała sobie również trudu, aby zainteresować się od czego pochodzi pierwsze maksimum w tej, niezidentyfikowanej próbce (w podpisie pod rysunkiem, nie jest sprecyzowane którą metodą były otrzymane nanocząstki). Ponadto na str. 81. Autorka pisze o nanocząstkach miedzi następujące zdanie: „Analiza widma absorpcyjnego wskazywała na występowanie maksimum absorpcji w zakresie od ~290 nm do ~500 nm.” Niestety na tym kończy się interpretacja czy tłumaczenie otrzymanych wyników, bo nie jest napisane z czego wynika taki rozrzut w wartościach długościach fali.

- Str. 80 „Roztwory zawierające nanocząstki srebra charakteryzowały się maksimum absorpcji przy około 450 nm” (DOI 10.1007/s10854-015-2881-y) (pasma od 400 do 500 nm). W pracy pokazano, że nawet różne reduktory (glukoza, maltoza, sacharoza) nie powodowały znacznego przesunięcia maksimum absorpcji. W drugiej pracy (<https://doi.org/10.1007/s13204-015-0449-z>) autorzy zidentyfikowali maksimum absorpcji ok. 425 nm. Pokazali, że mają stabilne NPs (zawiesina nie sedymentowała), i że wraz ze wzrostem koncentracji NPs, rosła jedynie wartość absorbancji, nie zaobserwowali natomiast przesunięcia. W trzeciej pracy (<https://doi.org/10.3390/mi12091123>) maksimum absorpcji też jest ok. 425 nm, natomiast szerokość pików może być większa w zależności od użytego reduktora (pik się poszerza, gdy użyty był mocny reduktor  $\text{NaBH}_4$ ). Nie rozumiem skąd są wartości podane Tabeli 10, gdyż nie mają one nic wspólnego z widmem na Rys. 23. Autorka podaje odnośnik literaturowy Rashid et al. 2013, pisząc, że autorzy podają maksimum



absorpcji ok. 400 nm. W cytowanych przeze mnie pracach, autorzy jednoznacznie podali maksimum absorpcji przy wartości liczby falowej 425 nm dla nanocząstek srebra. Tłumaczenie Doktorantki że: „*Wszystkie próbki syntezowanych drobin wskazują na występowanie w nich aglomeratów nanocząstek, stąd trudność w jednoznacznej próbie dopasowania ich do danych literaturowych.*”, po pierwsze świadczy o niestabilności otrzymanych nanocząstek, a po drugie przesunięcia maksimów absorpcji związane z rozmiarem nanocząstek wynoszą kilkanaście nanometrów, a nie są w zakresie ponad 120 nm, jeśli popatrzeć na wartości podane w Tabeli 10. Doktorantka nie zadała sobie również trudu, żeby chociażby wspomnieć o podwójnych maksimach absorpcji występujących na widmie na Rys. 23 przy wartościach liczby falowej ok. 230 nm i 280 lub 300 nm. Zmiany wysokości i przesunięcia tychże maksimów podczas kilkukrotnych pomiarów tej samej próbki o 60 sek. nawet nie zastanowiły Autorki, więc nigdzie nie wspomniała o tym fakcie, nie mówiąc już o interpretacji. Te zmiany kształtu i wysokości widm świadczą o niestabilności badanych próbek nanocząstek. Str.81: „*Widma absorpcyjne w przypadku nanocząstek srebra miały mniejszy zakres występowania maksimów niż wykresy dla nanocząstek miedzi.*” Nie wiem co autorka miała na myśli.

- Str. 80 Autorka pisze: „... *zaś roztwory zawierające nanocząstki cyrkonowe – w okolicy 410 nm*” W trzech znalezionych przez mnie pracach, (10.1016/j.colsurfb.2021.111636) – maksima absorpcji były obserwowane dla  $ZrO_2$  przy wartościach liczby falowej 250 nm (większe) i 285 nm (szersze), zupełnie jak na Rys. 24. W drugiej pracy (10.1021/acsomega.9b03840) – maksimum absorpcji jest przy wartości liczby falowej 250-260 nm potwierdzając obecność  $ZrO_2$  NPs. W trzeciej pracy (<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131275>) – maksimum absorpcji przy wartości liczby falowej 275 nm potwierdza obecność  $ZrO_2$  nanocząstek o strukturze tetragonalnej. Niestety nie znalazłam prac dotyczących nanocząstek Zr, gdyż nanocząstki Zr natychmiast po syntezie się utleniają.

Jak widać z przeprowadzonych badań UV-Vis, otrzymane przez Autorkę nanocząstki cyrkonu są w rzeczywistości tlenkami Zr, zgodnie z przytoczoną przez mnie literaturą. Nanocząstki miedzi też raczej są tlenkami, ale niestety Autorka nie zadała sobie trudu zinterpretowania otrzymanych widm. Nigdzie w rozprawie Kandydatka o tym nie wspomina, tylko analizuje wpływ nanocząstek miedzi, srebra i cyrkonu.

Dopiero w dyskusji na str. 178, nagle Autorka opisuje toksyczność nanocząstek miedzi z otoczką tlenkową oraz nanocząstek Zr również z otoczką tlenkową. Powoduje to, że cała praca jest niespójna, chaotyczna i niestarannie napisana. Odnoszę wrażenie, że Autorka sama nie bardzo wie, co pisała w pierwszej wersji pracy, a następnie poprawiła niektóre fragmenty dyskusji nawet nie czytając całości.

Ponadto na str. 81. Autorka stwierdza „*Również obserwowana warstwa zawiesziny drobin w poszczególnych próbkach była różna. Spowodowane było to wysokością pH danej próbki oraz ilością odmytych kwasów huminowych w niej zawartych.*” A skąd to



wiadomo i co oznacza, że warstwa była różna? Kształt, wielkość, skład chemiczny nanocząstek był różny? Jakimi technikami zostało to zbadane?

- Str. 80 „Porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi można stwierdzić, że otrzymane drobiny nie są jednorodne.” Co Autorka ma na myśli pod pojęciem „otrzymane drobiny nie są jednorodne”? Czy „drobiny” czyli nanocząstki są niejednorodne chemicznie, rozmiarowo (mają duży rozrzut wielkości), czy np. różne kształty?
- Na str. 80 Kandydatka pisze: „Wpływ otoczki złożonej z cząsteczek kwasów humusowych jest znaczący i wpływa na stabilność nanocząstek. Drobiny wydzielone z roztworu macierzystego agregowały i sedymentowały znacznie szybciej niż pozostawione w mieszaninie reakcyjnej.” Jedną z hipotez pracy zakłada, że nanocząstki są niestabilne. W takim razie co oznacza po pierwsze „znaczący” wpływ kwasów humusowych? Po drugie czy obecność kwasów poprawiała stabilność nanocząstek, a jeśli tak jak to było badane? Po trzecie, jeśli nanocząstki sedymentowały w mieszaninie reakcyjnej, to znaczy, że nie były stabilne, co jest zgodne z hipotezą, to w takim razie jaki jest cel obecności tych kwasów humusowych?
- Ponadto nie bardzo rozumiem, dlaczego Doktorantka przed wykonaniem badań biologicznych nie odpłukała i odwirowała z mieszaniny reakcyjnej nanocząstek, a następnie nie zawiesiła ich w wodzie. Właściwe w większości publikacji jest taka procedura. A kwasy humusowe, jeśli są opłaszczane czyli sfunkcjonalizowane na powierzchni nanocząstek nie zostałyby usunięte pod wpływem wirowania i dodawania wody. Wtedy też może nanocząstki by mniej aglomerowały, a na pewno pomiary UV-Vis byłyby bardziej miarodajne, gdyż Autorka pozbyła by się większości niezidentyfikowanych związków organicznych.

#### **Badania NTA rozmiarów nanocząstek vs badania SEM:**

- Średnica hydrodynamiczna, o której Autorka pisze w każdym akapicie opisując wyniki pomiarów NTA niestety nigdzie nie została zdefiniowana.
- W ramach poprawy pracy, Doktorantka zamieściła 3 zdjęcia SEM (nie opisując od których próbek pochodzą – metoda syntezy), ale nie sprawdziła już, jak otrzymane rozmiary nanocząstek mają się do rozmiarów tychże nanocząstek wyznaczonych techniką NTA. I tutaj pozwolę sobie zamieścić stworzoną przez siebie na podstawie wyników tabelkę:

Tabela 1. Rozmiary nanocząstek otrzymane technikami NTA i SEM.

	NTA	SEM
<b>Cu</b>	40 – 170 nm	100 – 550 nm (płatki o średnicy i grubości ok. 10 nm)
<b>Ag</b>	15 – 70 nm	20 – 100 nm (sferyczne NPs)
<b>Zr</b>	20 – 260 nm	20 – 60 nm (sferyczne NPs)



Jak dla mnie, SEM jest techniką bardziej miarodajną, gdyż nanocząstki są rzeczywiście obrazowane, widać również ich kształt. Ani Doktorantki, ani dwóch Promotorów nie zastanowił fakt, że zarówno dla nanocząstek miedzi jak i dla nanocząstek srebra wartości rozmiarów uzyskane techniką NTA są niższe, niż obrazowaniem SEM. Właśnie to miałam na myśli, wspominając powyżej, że praca jest napisana niestarannie, a po poprawie Doktorantka jej nie przeczytała. Po prostu w ramach poprawy został dodany paragraf zawierający zdjęcia z badań SEM, natomiast jakiegokolwiek połączenie tych wyników z pozostałymi, przedstawionymi w pracy nie została wykonana. O ile spotkałam się już z przypadkami, że NTA daje zawyżone wyniki rozmiarów NPs, w stosunku do technik mikroskopowych, o tyle nie potrafię wytłumaczyć obserwowanej tutaj tendencji odwrotnej. Techniki mikroskopowe, w przypadku zaglomerowanych nanocząstek pozwalają zobrazować indywidualne NPs w w/w aglomeratach. Natomiast w technice NTA obrazowane są aglomeraty, z czego może wynikać zawyżona wartość rozmiaru NPs zmierzona tą techniką.

- Zastanawiające jest, dlaczego ani dla nanocząstek Ag, ani dla Cu NPs ani dla Zr NPs nie ma żadnego związku pomiędzy stężeniem reduktora, czyli kwasów, a rozmiarem nanocząstek. Słupki mają zupełnie losowe wartości i bardzo duży rozrzut wielkości o kilkunastu nanometrach do ponad 200 nm. Autorka nie zastanowiła się nad tym faktem, dlaczego otrzymała takie wyniki pomiarów i czy rzeczywiście mierzyła nanocząstki czy jakieś aglomeraty powstałe w wyniku procesu syntezy.

#### **Obrazowanie SEM:**

- Str. 98 Autorka pisze: „*W przypadku większości syntez nanocząstek w ekstraktach naturalnych trudno jest mówić o selektywności rozmiarów czy kształtów otrzymywanych drobin (Kisala et al. 2017).*” Co to jest selektywność rozmiarów i kształtów nanocząstek? Nanocząstki metali mają konkretny kształt i rozmiar, który widać na obrazach mikroskopowych SEM lub TEM. Nie mam pojęcia co Autorka miała w tym zdaniu na myśli.
- Str. 98 i 99: nigdy w żadnej publikacji naukowej nie spotkałam się z podawaniem powierzchni nanocząstek albo rozkładem empirycznym tych wielkości powierzchni. Nie wiem też jaki był cel podawania takiej informacji, tym bardziej, że Doktorantka właściwie niewiele napisała na temat morfologii nanocząstek widocznych na zdjęciach na Rys. 45-47, co wniosłoby więcej informacji do pracy.

#### **Modelowanie:**

- Obliczenia przedstawione w rozprawie – dotyczą połączenia jonów metali podczas reakcji syntezy z kwasami. Jak Autorka pisze na str. 107: „... liczba ewentualnych miejsc, które oddziałują z jonem metalu wynosi 2 (Rys. 58). Ułatwia to proces tworzenia prawdopodobnych struktur nanocząstek – opierając się bowiem tylko i wyłącznie na rysunkach (...) można sądzić, że hipotetycznych miejsc, do których może przyłączyć się jon metalu jest bardzo dużo. Zaznaczone na rysunkach (...) miejsca reaktywne pozwalają na zredukowanie liczby możliwych postaci cząsteczek kwasów



*koordynujących jon metalu.*” Nanocząstka metalu, z definicji, składa się wyłącznie z atomów metalu (czyli zredukowanych jonów, które były dostarczone do roztworu w postaci soli), które są ułożone w sposób uporządkowany np. tworząc strukturę regularną lub heksagonalną (nanocząstka o strukturze krystalicznej) lub nieuporządkowany (nanocząstka o strukturze amorficznej). Tak więc jeśli dobrze rozumiem powyższe zdanie, to Autorka uważa, że kwasy humusowe, zawierające jon danego metalu w swojej strukturze, aglomerują tworząc nanocząstki. Niestety, aglomerat kwasów z jonem metalu w strukturze nie jest nanocząstką, tylko cząstką składającą się z kwasów z jonem metalu. Nie wiem również co Autorka miała na myśli używając sformułowania, że „cząsteczki kwasów koordynują jon metalu”. W pracy poszukiwany jest reduktor, który zredukuje jon metalu z soli do atomów, które następnie połączą się w nanocząstki. Ponadto, mechanizm tworzenia nanocząstek nigdzie nie został wyjaśniony, również w dyskusji. Na Rys. 59-68 niestety Autorka nie opisała który kolor odpowiada jakim atomom, co również utrudnia ich analizę.

- Kolejna uwaga dotycząca modelu przedstawionego w pracy. Str. 107: Autorka pisze: „*Modelowanie kwantowo-mechaniczne zostało wykorzystane także do przedstawienia potencjalnego wyglądu poszczególnych drobin zawierających atomy miedzi, srebra i cyrkonu.*” Nie spotkałam się ze sformułowaniem „drobina”. Nie wiadomo czy Autorka tak nazywa nanocząstki? Dalej Autorka pisze: „*...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.*” Co to jest za struktura? Jak pisałam powyżej nanocząstki mają rozmiar od kilku do kilkuset nanometrów i składają się z atomów metalu lub metalu i tlenu, w przypadku tlenków, ułożonych w konkretny i uporządkowany sposób. Autorka w pracy zamieściła zdjęcia nanocząstek, Rys. 46, 48 i 50 wraz z rozmiarami rzędu kilkunastu nanometrów. Nie jest niemożliwe, a wręcz jest bardzo prawdopodobne, że nanocząstki widoczne na w/w rysunkach są „opłaszczone”, czy raczej naukowo ujmując sfunkcjonalizowane kwasami pochodzącymi z torfów. Cząsteczki kwasu będą dołączone do atomów znajdujących się na powierzchni nanocząstek. Nieco dokładniejsza analiza widm UV-Vis i pomiary FTIR pozwoliłaby na wykazanie tego faktu. Nie mam pojęcia jaki sens miało modelowanie przeprowadzone w § 5.3.6.2. O ile jeszcze modelowanie struktury kwasów miało sens, o tyle Autorka, a także Autorzy obliczeń powinni się zdecydować, czy badają cytotoksyczność nanocząstek metali zsyntezowanych i zobrazowanych na Rys. 46, 48 i 50, czy też badają cytotoksyczność „drobin” zbudowanych z kwasu z wbudowanymi atomami metali. Dodam, że takie „drobiny” nie połączą się, aby stworzyć nanocząstki.

#### **Wyniki badań biologicznych:**

- Str. 129 „*Spośród 3 rodzajów nanocząstek, nanocząstki srebra wywołały najmniejszy wzrost potencjału antyoksydacyjnego Pieprzycy, natomiast nanocząstki cyrkonu wywołały najwyższy wzrost potencjału antyoksydacyjnego Pieprzycy. (...) W przypadku nanocząstek miedzi, najniższy wzrost potencjału antyoksydacyjnego wywołały*



nanocząstki otrzymane za pomocą metody M1 z torfu HOLLAS, a najwyższy wzrost potencjału antyoksydacyjnego wywołały nanocząstki otrzymane za pomocą metody M3 z torfu STERLUX. (...) W przypadku nanocząstek srebra, najniższy wzrost potencjału antyoksydacyjnego wywołały nanocząstki otrzymane za pomocą metody M3 z torfu STERLUX, a najwyższy wzrost potencjału antyoksydacyjnego wywołały nanocząstki otrzymane za pomocą metody M2 z torfu STERLUX.” Mamy tutaj kolejny przykład, że niestety Autorka nawet nie próbuje wyjaśnić, dlaczego są widoczne statystyczne istotne różnice między poszczególnymi rodzajami nanocząstek. Wystarczyłoby jedno, dwa zdania wyjaśnienia np. obecność kwasów fulwowych czy pH nanocząstek otrzymanych daną metodą. Właśnie dlatego rozdział zatytułowany Dyskusja, w tej pracy, w moim mniemaniu, nie zawiera dyskusji wyników.

- Str. 151 Rys. 110 oraz str. 159 Rys. 122: w podpisach obydwu rysunków Autorka pisze, że przedstawia wykresy korelacji między przeżywalnością słonaczka (Rys. 110) lub aktywnością metaboliczną (Rys. 122) a stężeniem nanocząstek. Zastanawiające jest więc, dlaczego w dalszej części podpisów pod rysunkami Autorka pisze, że użyła tylko jednego rozcieńczenia (R1 Cu NPs dla słonaczka i R2 Cu NPs dla komórek)? Stąd też zastanawia wniosek ze str. 159: „Analiza statystyczna nie wykazała istotnej korelacji między aktywnością metaboliczną komórek A549, a stężeniem nanocząstek miedzi (współczynnik korelacji = 0,10,  $p > 0,05$ ) oraz między aktywnością metaboliczną komórek A549, a średnicą hydrodynamiczną nanocząstek miedzi (współczynnik korelacji = 0,05,  $p > 0,05$ ) (Rys. 122).” – jeśli użyte było tylko jedno stężenie R2?
- Powyższa uwaga dotyczy również Rys. 124 str. 160, Rys. 126 str. 161, Rys. 128 str. 162, Rys. 130 str. 163, Rys. 132 str. 164.

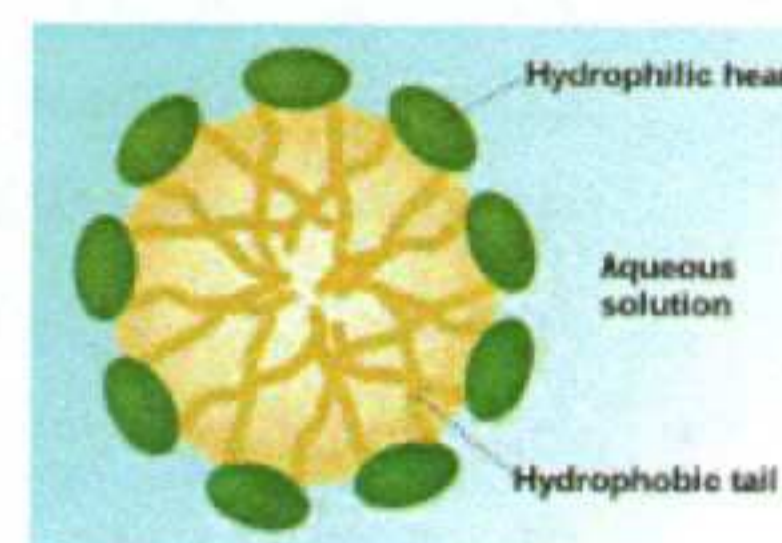
#### Dyskusja:

- Str. 169 „Uzyskane wyniki wykazały, że zmiany pH mieszaniny reakcyjnej na poszczególnych etapach syntezy wpływały istotnie na czas, rozmiar i kształt tworzących się drobin.” Niestety nie wiem, którymi technikami badawczymi zastosowanymi w pracy Autorka wykazała wpływ pH na zmianę kształtu nanocząstek, gdyż poza jedną wzmianką o tym, że nanocząstki miedzi mają kształt płatków, żadna analiza nie została zrobiona.
- Str. 169. Zadanie „Wartość wykładnika pH mieszaniny reakcyjnej próbek z cyrkonem wynosiła maksymalnie 1, zaś w przypadku próbek zawierających srebro dochodziła nawet do 9 jednostek” – gdzie jest tabelka / wykres w wynikach potwierdzający to stwierdzenie?
- Str. 169 Autorka pisze: „Zakładając iż tworzenie trwałych miceli nanocząstka metalu-kwas humusowy (lub metal-kwas humusowy) jest czynnikiem sprzyjającym agregacji drobin metalicznych...”. Zwykle celem każdej syntezy jest otrzymanie niezagregowanych nanocząstek. Tak też założyłam czytając zdanie na str. 80: „Wpływ otoczki złożonej z cząsteczek kwasów humusowych jest znaczący i wpływa na stabilność nanocząstek.”, tym bardziej, że w wielu miejscach autorka pisze, że kwasy humusowe oplaszczają nanocząstki, co sugeruje, że je stabilizują. Natomiast w dyskusji Autorka



przeczy temu stwierdzeniu, pisząc, że kwas humusowy jest czynnikiem sprzyjającym agregacji. Na str. 169 w dyskusji, Autorka nagle pisze, że „...Zakładając iż tworzenie trwałych miceli nanocząstka metalu-kwas humusowy (lub metal-kwas humusowy)”. To w końcu Autorka badała cytotoksyczność niestabilnych nanocząstek, nanocząstek opłaszczonych kwasami czy miceli nanocząstka metalu-kwas humusowy? Trzeba w tym miejscu podkreślić, że opłaszczenie bynajmniej nie jest tym samym co micela. Jaka jest różnica między micelami nanocząstka metalu-kwas humusowy a micelami metal-kwas humusowy? Definicji miceli mówi, że:

Micela – grupa cząsteczek surfaktantu albo jonów w roztworze, zorganizowanych najczęściej w kulistą formę. W zależności od rozpuszczalnika, ich hydrofilowe lub hydrofobowe części znajdują się w zewnętrznej lub wewnętrznej części miceli. Ich tworzeniu towarzyszy m.in. zmiana napięcia powierzchniowego, ciśnienia osmotycznego, czy przewodnictwa elektrycznego.



Wyróżnia się:

micela normalne – w wodzie na zewnątrz cząsteczek znajduje się część hydrofilowa, micela odwrotne – w rozpuszczalnikach organicznych na zewnątrz znajduje się część hydrofobowa.

Autorka w rozprawie nigdzie w wynikach nie wspomina o micelach, nigdzie też nie udowodniła, że otrzymała takie struktury. Skąd więc takie stwierdzenie w dyskusji?

- Str. 170 „Z powodu zachodzącego zjawiska agregacji, otrzymane nanocząstki sedymentowały, tworząc zwartą warstwę na dnie naczynia reakcyjnego. Sedymentacja nanocząstek związana była z ich wzmożoną agregacją.” Powtarzające się zdania, które dobitnie dowodzą niestabilności otrzymanych nanocząstek. A tak na marginesie, we wspomnianym na str. 168 patencie Pat. 238644, Autorzy nic nie wspominają o niestabilności nanocząstek. Wręcz przeciwnie możemy przeczytać: „Uznaje się ją za zakończoną w momencie, gdy na dnie naczynia reakcyjnego widoczny jest puszysty osad unoszący się w roztworze do połowy jego objętości. Roztwór reakcyjny ma zmienioną barwę - nanocząstki srebra po zakończeniu syntezy mają kolor niebiesko-szary, cały roztwór reakcyjny składa się z dwóch faz: osadu unoszącego się przy dnie naczynia oraz klarownej, bezbarwnej cieczy. Nanocząstki srebra syntezowane sposobem zgodnym z wynalazkiem zachowują swoją stabilność i właściwości tylko w roztworze wodnym, w którym muszą być przechowywane do czasu ich wykorzystania.”, że nanocząstki zachowują swoją stabilność w roztworze wodnym, mimo obecności „puszystego” osadu. Natomiast po zgłoszeniu patentowym, Autorka w doktoracie w wielu miejscach pisze, włączając w to tezę nr 2, że otrzymane nanocząstki są nie stabilne. To w końcu są stabilne nanocząstki czy nie są? To teza nr 2 doktoratu jest nieprawdziwa, czy pozostałe wyniki doktoratu są błędne, a nanocząstki są stabilne, czy też w patencie są nieprawdziwe sformułowania?
- Str. 170 w dyskusji Autorka pisze, że „Powstałe drobiny metaliczne były amorficzne, wytworzyły aglomeraty co w konsekwencji utrudniało ich zobrazowanie”. Czy



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Kandydatka wie, co oznacza struktura amorficzna i jak wykazać eksperymentalnie, że nanocząstka ma strukturę amorficzną? Jeśli atomy w nanocząstce są ułożone w sposób nieuporządkowany, to wtedy ma ona strukturę amorficzną, a jeśli w sposób uporządkowany to wtedy ma strukturę krystaliczną np. regularną albo heksagonalną. Można to stwierdzić wyłącznie wykonując pomiar XRD wysuszonego roztworu lub dyfrakcję elektronową w trybie TEM lub obrazując nanocząstki w rozdzielczości atomowej w TEM. W pracy Kandydatka nie używała w/w technik, więc nie wiem, na jakiej podstawie twierdzi, że nanocząstki mają strukturę amorficzną.

- Str. 170 „Sygnały wskazujące na obecność srebra w badanych roztworach występowały w zakresie długości fali ok. 312 nm.” Na stronie 80 Autorka pisze: „Roztwory zawierające nanocząstki srebra charakteryzowały się maksimum absorpcji przy około 450 nm”, nie wspomnę już o wartościach dla Ag NPs podanych w literaturze, które nie odpowiadają ani 450 ani 312 nm.
- Str. 170 „Otrzymane nanocząstki miedzi, srebra i cyrkonu zostały scharakteryzowane fizyko-chemicznie z wykorzystaniem współczesnych metod instrumentalnych, stosowanych powszechnie w analizie nanocząstek” – może sformułowanie będzie dobitne, ale to zdanie zakrawa na fałsz, w dobie postępu technologicznego, gdy do dyspozycji mamy techniki obrazowania takie jak SEM, TEM, analizę chemiczną EDS, dyfrakcję elektronową i rentgenowską, spektroskopię FTIR, dostępne na Uniwersytecie Rzeszowskim, czy nawet XPS, nie wspomnę już o technikach synchrotronowych.
- Str. 171 „Niestety, niedostatek doniesień literaturowych dotyczących możliwości tworzenia nanocząstek metalicznych w torfie utrudnia porównanie zastosowanej w pracy doktorskiej syntezy” – takie stwierdzenie Autorki i stan rzeczy, wręcz obliuguje do wykonania bardzo starannej charakteryzacji morfologicznej i chemicznej otrzymanych materiałów, co niestety, w mojej opinii nie miało miejsca.
- Dopiero na str. 171 Czytelnik dowiaduje się, że do syntezy nanocząstek cyrkonu użyto azotan (V) cyrkonu. Informacja ta powinna była się znaleźć w opisie syntezy.
- Str. 172 „Różne środowiska reakcyjne (torfy HOLLAS i STERLUX) oraz różne metody syntezy nanocząstek spowodowały otrzymanie drobin o niejednorodnych kształtach i formach.” Niestety nigdzie w wynikach nie było to przedstawione, więc nie wiem skąd takie stwierdzenie.
- Str. 174 „Spośród trzech rodzajów nanocząstek, najbardziej toksycznymi nanocząstkami wobec siewek Pieprzycy okazały się nanocząstki srebra, natomiast najmniej toksycznymi nanocząstkami cyrkonu. Jak wiadomo, toksyczność nanocząstek może być uzależniona od wielu czynników, takich jak m. inn. rodzaj nanocząstek, ich średnica, kształt, ładunek powierzchniowy oraz stężenie.” Nie wiem, jak można porównywać toksyczność nanocząstek metalu (Ag) z nanocząstkami tlenku ( $ZrO_2$ ) i nanocząstkami o innym kształcie (płatki miedzi) i wyciągać miarodajne wyniki.
- Str. 176 „Granica między uruchamianiem mechanizmów obronnych rośliny a jej obumarciem jest bardzo cienka”. Takich nic niewnoszących naukowo stwierdzeń jest wiele w rozprawie. Dyskusja otrzymanych wyników zwykle zawiera porównanie



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

otrzymanych wyników z literaturą oraz wyjaśnienie ewentualnych różnic czy rozbieżności. To jest kolokwializm, na który nie ma miejsca w pracy naukowej.

- Str. 176 „Najbardziej toksyczne okazały się być nanocząstki srebra, zaś najmniej nanocząstki cyrkonu. Spowodowane jest to obecnością samego metalu i jego toksycznymi właściwościami.” – niewątpliwie tak, gdyż z analizy widm UV-Vis przeprowadzonej przez Recenzentkę, wynika, że nanocząstki cyrkonu są w rzeczywistości tlenkami Zr. Ale Autorka nie dyskutuje tego faktu. Dopiero na str. 178 Autorka pisze jedno lakoniczne zdanie w całym manuskrypcie, sugerujące że jednak otrzymane przez Nią nanocząstki cyrkonu są tlenkami: „*Nieco inaczej wygląda sytuacja nanocząstek cyrkonowych pokrytych, obojętną chemicznie, nierozpuszczalną w wodzie warstwą tlenkową ZrO<sub>2</sub>. Doniesienia literaturowe pokazują jednak, że ZrO<sub>2</sub> może być toksyczny dla komórek i organów (Arefian et al. 2015; Karthiga et al. 2019; Sidjui et al. 2018; Sun et al. 2020; Yang et al. 2019; Ye i Shi 2018)*”. – niestety jest to na tyle niejasno sformułowane, że nie wiem czy to stwierdzenie odnosi się do nanocząstek zsyntezowanych przez Autorkę, czy też do cytowanych odnośników literaturowych.
- Str. 177 „Powodem toksyczności było pH roztworów badanych. Optymalne warunki do rozwoju artemii to odczyn pH 8 i więcej, zaś w ekstraktach pH wynosiło 4-5.” – jeśli słonaczki są tak wrażliwe na wartości pH, to jaką mamy pewność, że to nanocząstki spowodowały śmiertelność populacji po 45 godzinach, a nie pH roztworu? Dlaczego Doktorantka nie używała, jak już pisałam powyżej, roztworów nanocząstek po płukaniu i oczyszczaniu?
- Str. 178 „Wydaje się, iż nanocząstki miedziowe otrzymane w ekstraktach torfowych powinny działać na komórki w podobny sposób, zwłaszcza że pokryte tlenkiem (CuO) nanocząstki miedziowe, stosunkowo łatwo wydzielające kationy Cu<sup>2+</sup>.” – skąd nagle w dyskusji Autorka, pisząc na stronie 80, że zsyntezowała nanocząstki miedzi twierdzi, że mają one otoczkę tlenkową? Nigdzie w pracy nie ma żadnej informacji na ten temat.

Praca zawiera również rażące podstawowe błędy, wskazujące na kompletny brak znajomości technik pomiarowych i ich zastosowania. Opisy zasad pomiarowych technik są lakoniczne i nie zawierają właściwie w ogóle zasady ich działania:

- Str. 78 pierwsze zdanie §5.3.2: „Wykonanie analizy UV-Vis otrzymanych zawiesin nanocząstek pozwoliło na wstępne określenie ich morfologii (kolor zawiesiny nanocząstek) i rozmiaru (widmo absorpcji).” – żadna metoda spektroskopowa, w tym UV-Vis, nie umożliwia na określenie morfologii jakiegokolwiek materiału. Morfologia może być określona wyłącznie techniką pozwalającą na zobrazowanie materiału np. mikroskopią optyczną czy elektronową w zależności od rodzaju i rozmiarów materiału. Spektroskopia służy do identyfikacji chemicznej materiału. Ponadto w opisie techniki UV-Vis na str. 51 Autorka pisze o wiązaniu węgiel-metal w nanocząstce. Nanocząstki składają wyłącznie z atomów metali, ewentualnie nanocząstki tlenkowe składają się z



atomów metalu i atomów tlenu. Natomiast nie wiem, gdzie w nanocząstkach Ag, Cu i Zr są wiązania metalu z węglem.

- Str. 178 „*Kwasy humusowe umożliwiające tworzenie się drobin metali tworzą otoczkę, która opłaszczając nanocząstkę umożliwia przechodzenie ich przez błonę komórkową, co jest przyczyną śmierci apoptycznej badanych komórek.*” – jaki test był użyty do stwierdzenia apoptozy komórek? W tekście rozprawy znalazłam tylko wzmiankę o wykorzystanym teście MTT, który umożliwia tylko badanie aktywności metabolicznej komórek, nie pozwala na stwierdzenie rodzaju mechanizmu śmierci komórek. Rodzaj śmierci komórkowej można zbadać np. techniką cytometrii przepływowej.
- Str. 179 „*Niewielkie rozmiary nanostruktur, ich reaktywność chemiczna, zdolność do tworzenia agregatów, wysoki stosunek powierzchni do objętości, dyfuzyjność, wytrzymałość mechaniczna czy dyslokacja atomów umożliwiają nanocząstkom wywieranie wpływu na środowisko i jego elementy żywe.*” – co Autorka rozumie pod zjawiskiem dyslokacja atomów, które zgodnie z tekstem występuje w nanocząstkach?

#### Wnioski:

- Str. 180 „*Fizyko-chemia procesu powstawania nanocząstek w torfie wskazuje na to, że jest on procesem selektywnym, prowadzącym do akumulacji i uwięzienia w złożu toksycznych metali ciężkich, a pozostawieniu kationów lekkich metali troficznych w obiegu naturalnym*” – jest to teoretyczna dyskusja nie poparta danymi eksperymentalnymi UV-Vis czy SEM.
- Str. 180 „*Rozmiary, kształty i formy tworzących się nanocząstek są zróżnicowane.*” – na podstawie, których wyników badań, został wysnuty taki wniosek?
- Str. 180 Fragment dotyczący testów i następujące zdanie: „*Analiza odpowiedzi biologicznej zastosowanych organizmów modelowych na obecność otrzymanych nanocząstek metali (miedzi, srebra i cyrkonu) wskazuje na pilną potrzebę opracowania norm określających „bezpieczne dawki” nanocząstek, na jakie może być narażone środowisko i człowiek.*” – zgadzam się, że jeśli Autorka starannie by scharakteryzowała otrzymane nanocząstki, aby być pewną, że pracuje z nanocząstkami metalicznymi, a nie porównuje metali z tlenkami, ponadto miałyby one te same kształty i byłyby stabilne to niewątpliwie można by było opracować w/w normy. Są to raczej, niż wnioski.

Punkty, które wypisałam powyżej nie są zwyczajnymi przeoczeniami czy drobnymi błędami, tylko są to braki w interpretacji otrzymanych wyników, które uniemożliwiają dopuszczenie rozprawy do obrony publicznej. Rozprawa sprawia wrażenie bardzo powierzchownej, wyniki praktycznie nie zostały zanalizowane (UV-Vis), a ich opisy są lakoniczne (SEM, UV-Vis).

Kolejnym błędem, tym razem w części biologicznej, jest wyciąganie wniosków dotyczących porównania wpływu poszczególnych nanocząstek (Ag, Cu i Zr), w różnych stężeniach na organizmy żywe. Po pierwsze nanocząstki mają różne kształty i rozmiary (Ag i Zr są sferyczne, a Cu ma kształt płatków), więc ich (cyto)toksyczność, nawet przy tym samym stężeniu, będzie różna. Ponadto Autorka porównuje (cyto)toksyczność nanocząstek



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

metalicznych (Ag) z tlenkowymi (CuO i ZrO<sub>2</sub>). Najgorsza jest analiza (cyto)toksyczności w funkcji stężeń. Autorka określa uzyskane stężenia wyjściowe nanocząstek w mieszaninach reakcyjnych techniką NTA, a następnie, mimo, że są one różne, po prostu tak samo je rozcieńcza. Nawet sama o tym pisze w dyskusji: str. 171: „Dalsza analiza wykazała, że spośród trzech rodzajów nanocząstek, najwyższe ich stężenie stwierdzono w przypadku nanocząstek srebra, a najniższe w przypadku nanocząstek miedzi. Stężenie nanocząstek cyrkonu było ~5 razy mniejsze niż stężenie nanocząstek srebra, a stężenie nanocząstek miedzi było ~10 razy mniejsze niż stężenie nanocząstek srebra.” W takim razie, jak można wnioskować, że jedne nanocząstki były bardziej toksyczne niż drugie, jak miały różne stężenia, kształty i były tlenkowe a nie metaliczne?

Kontynuując, nigdzie w wynikach nie ma odniesienia do faktu, że nanocząstki srebra są metaliczne, natomiast nanocząstki miedzi i cyrkonu to tlenki tych metali, co wynika ze spektrów UV-Vis. Widać to też z Rys. 71 i 72 na str. 114. Autorka pisze: „Rozcieńczone zawiesiny nanocząstek miedzi i cyrkonu nie miały istotnego wpływu na kiełkowanie nasion i rozwój Pieprzycy. Postulować można w tym przypadku o występowaniu hormezy, czyli działania pobudzającego roślinę do wzmożonej walki z toksykantem np. poprzez zwiększoną produkcję antyoksydantów (witaminy C).” Wspomniany przez Autorkę mechanizm hormezy nie jest jedynym wytłumaczeniem braku istotnego wpływu rozcieńczonych zwiesin nanocząstek miedzi i cyrkonu, dodatkowo może być wytłumaczeniem fakt, że nanocząstki tlenkowe są mniej toksyczne od nanocząstek metalicznych. Ale niepoprawna charakteryzacja nanocząstek techniką UV-Vis nie pozwoliła Autorce nawet zastanowić się nad takim wnioskiem. Kuriozalne jest zatem, dlaczego w dyskusji na str. 178, Autorka pisze o warstwie tlenków na nanocząstkach Cu i Zr. Skąd nagle Doktorantka pozyskała taką informację?

Nigdzie w poprawionej wersji pracy, w której Autorka zamieściła już zdjęcia SEM pokazujące morfologię nanocząstek, nie ma żadnego komentarza dotyczącego faktu, że nanocząstki tlenku miedzi, mają formę płatków o średnicy kilkuset nanometrów, natomiast nanocząstki srebra i tlenku cyrkonu są sferyczne. W dyskusji nie ma słowa na temat faktu, że w związku z różnym kształtem nanocząstki miedzi mogą mieć inną cytotoxycznosc niż np. nanocząstki miedzi o sferycznym kształcie. Z tego też względu uważam, że porównywanie sferycznych NPs srebra i cyrkonu z płatkami miedzi nie pozwala jednoznacznie określić przyczyn różnic w cytotoxycznosci. Poza tym Autorka, ponieważ nie wykonała rzetelnej interpretacji wyników pomiarów UV-Vis, nie wzięła pod uwagę faktu, że porównuje nanocząstki metaliczne (Ag) z nanocząstkami tlenków CuO i ZrO<sub>2</sub>.

Większość powyższych uwag dotyczy nanocząstek, niemniej jednak, jeśli Kandydatka swoją rozprawę zatytułowała „*Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu...*” to czytelnik oczekuje, że w pracy nanocząstki zostaną scharakteryzowane, a przede wszystkim zobrazowane. Niestety w pracy została pokazana morfologia tylko 3 z 18 badanych nanocząstek. Nie wiadomo, czy pozostałe są sferyczne, czy mają bardziej nieregularne kształty. Metody syntezy, które opracowała Kandydatka, są nowe, zaliczają się na pewno do metod tzw. „zielonej syntezy”, i imitują warunki w prawdziwym torfowisku. Sama



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

teza pracy, że w torfowisku w wyniku interakcji jonów metali z kwasami zawartymi w torfie jest jak najbardziej poprawna, tylko rozprawa doktorska miała posłużyć do udowodnienia jej.

Poniższą uwagę z poprzedniej recenzji pozostawiam, gdyż jednoznacznym dowodem, że zsyntezowane roztwory zawierają nanocząstki jest obrazowanie TEM, a nie SEM, ze względu na rozdzielczość tego ostatniego oraz fakt, że nanocząstek w bryle organiki, którą Pani musiała rozbijać w moździerz przed przeprowadzeniem obserwacji po prostu nie widać. Nanocząstki należało po syntezie odpłukać, odwirować i oczyścić, a następnie nanieść na siateczkę TEM. Nie bardzo rozumiem, dlaczego nie skorzystała Pani z możliwości analizy TEM wraz dyfrakcją elektronową pozwalającą na jednoznaczną identyfikację struktury krystalicznej nanocząstek i rozróżnienie między metalem a tlenkiem, które są dostępne na Uniwersytecie Rzeszowskim, a która to technika pozwoliłaby na jednoznaczne udowodnienie istnienia nanocząstek. Ponadto, wniosłaby do doktoratu dodatkowe informacje dotyczące morfologii otrzymanych nanocząstek.

Dorobek naukowy Kandydatki ciężko jest mi ocenić, ponieważ w rozprawie nie został zamieszczony ani życiorys, ani spis publikacji Pani Hęćlik. Po własnych poszukiwaniach w serwisie Scopus, znalazłam, że Pani Hęćlik jest współautorką 5 publikacji oraz patentu, ale w żadnej nie jest pierwszym autorem. Szkoda, że kandydatka nie wykorzystała szansy jaką jest okres realizacji pracy doktorskiej do zdobycia umiejętności pisania publikacji. Tak więc dorobek naukowy Kandydatki oceniam raczej jako skromny, tym bardziej, że w roku 2012 Kandydatka była kierownikiem projektu Preludium (Formation and Aggregation of Nobel Metals Nanoparticles in Extracts of Peats. Biosynthesis, isolation, determination and cytotoxicity study 2012/07/N/NZ9/02137), co oznacza, że doktorat robiła ok. 12 lat. Przez ten okres, myślę, że kandydatka miała wystarczająco dużo czasu, aby starannie scharakteryzować otrzymane nanocząstki między innymi techniką UV-Vis oraz techniką TEM, która jest dostępna na Uniwersytecie Rzeszowskim, a także aby wnikliwie zinterpretować i opisać otrzymane wyniki.

Na koniec chciałabym podkreślić, że pomysł syntezy nanocząstek metali szlachetnych w torfie sam w sobie i motywację pracy oceniam bardzo wysoko, jako naprawdę bardzo interesujące, natomiast charakteryzacja zsyntezowanych nanocząstek jest wykonana niechlujnie, a wybrane techniki są kompletnie nieadekwatne, za co winę ponoszą Promotorzy rozprawy. Należało zastosować, oprócz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), także transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) wraz z dyfrakcją elektronową, która umożliwiłaby jednoznaczną interpretację struktury krystalicznej otrzymanych nanocząstek. EDS też byłby pomocny. Ponadto spektroskopia FTIR, pozwoliłaby wykazać opłaszczenie (sfunkcjonalizowanie) metalicznych/tlenkowych nanocząstek cząsteczkami kwasów z możliwością identyfikacji wiązania, poprzez które te kwasy są połączone z powierzchnią nanocząstki. Szkoda, gdyż praca ta mogła być bardzo ciekawa, odkrywcza i mogły z niej powstać wartościowe publikacje. Zresztą najlepiej o tym świadczy uzyskanie przez Kandydatkę finansowanie w ramach grantu Preludium.



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Kuriozalne jest zatem dla mnie sformułowanie celu pracy: „*biosynteza wybranych nanocząstek metali (miedzi, srebra i cyrkonu) w obecności kwasów humusowych, wraz z próbą wyjaśnienia mechanizmu ich tworzenia, analizą właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych oraz określeniem stopnia toksyczności uzyskanych drobin*”, który poza ostatnią częścią, właściwie dotyczy zagadnień chemicznych i fizycznych. W związku z tak sformułowaniem przez samą Kandydatkę celem, moje wątpliwości, co do poziomu naukowego pracy w części dotyczącej chemii / nanotechnologii / fizyki pozostają nierozwiane. Wydaje mi się również, że interpretacja otrzymanych wyników i przegląd literatury należą do obowiązków Doktorantki, z pomocą Promotorów, a nie do recenzenta. Wnioski z badań biologicznych w zakresie (cyto)toksyczności nanocząstek dla Pieprzycy Siewnej, Komornicy błotnej, Słonaczka i ludzkich linii komórkowych również budzą wątpliwości, w szczególności, że rozcieńczenia R0, R1, R2 i R3 dla poszczególnych rodzajów nanocząstek są różne, więc nie można miarodajnie porównać otrzymanych wyników. Ponadto, w przypadku miedzi i cyrkonu, ponieważ Autorka nie zinterpretowała poprawnie otrzymanych wyników badań UV-Vis, badania biologiczne są prowadzone na tlenkach Ci i Zr, więc cała dyskusja tej części wyników jest błędna, bo dotyczy metali, a nie tlenków. Natomiast wyniki związane z porównywaniem wpływu nanocząstek srebra, miedzi i cyrkonu są kompletnie niemiarodajne, gdyż Autorka nie bada nanocząstek miedzi i cyrkonu, tylko tlenku miedzi i tlenku cyrkonu, a jak wspominałam powyżej wpływ otoczki tlenkowej ma zasadniczy wpływ na cytotoxycznosc.

Z wyżej wymienionych przyczyn uważam że przedstawiona mi do recenzji rozprawa nie spełnia wymogów stawianym rozprawom doktorskim i z tego względu, nie dopuszczam jej do obrony publicznej.

Prof. Magdalena Parlińska-Wojtan