



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



Kraków 27.11.2015

**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR IWONY HABINY
„Badania organizacji i aktywności izolowanych błon fotosyntetycznych
modyfikowanych nanocząstkami tlenków tytanu i wielościennymi
nanorurkami węglowymi”**

W ciągu ostatnich 20 lat można było zaobserwować szybki rozwój technologii opartych na zastosowaniu nanomateriałów, w wyniku czego są coraz częściej obecne w naszych miejscach pracy, domach oraz w otaczającym nas środowisku. Badania, rozwój oraz komercjalizacja zdecydowanie wyprzedziły gromadzenie podstawowych wiadomości i opracowanie odpowiednich procedur pozwalających na charakteryzowanie i testowanie substancji pod kątem oceny ich wpływu na organizmy, dlatego zagadnienie wpływu nanocząstek na żywą materię stanowi jedną z najbardziej aktualnych tematów badawczych. Badania oddziaływań nanocząstek z materią biologiczną, począwszy od wpływu na pojedyncze komórki, a kończąc na wpływie na ludzkie zdrowie są podstawą prężnie rozwijającej się nauki, nanotoksykologii. Prace badawcze tego typu na granicy, fizyki, chemii i biologii są niezwykle trudne. Wymagają znajomości zarówno procesów fizycznych zachodzących w układach jak i złożonych procesów biologicznych, a prowadzenie prac eksperymentalnych, przestrzegania rygorystycznych procedur. Dlatego też znaczna część prac polega na badaniu oddziaływań różnych nanocząstek z hodowanymi komórkami lub izolowanymi organellami.

Praca doktorska Pani mgr. Iwony Habiny dotyczy określenia wpływu nanocząstek ditlenku tytanu i wielościennych nanorurek węglowych na aktywność fotosyntetyczną izolowanych błon tylakoidów wzbogaconych w fotosystem II (BBY PSII). Została zrealizowana na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Květoslavy Burdy. Wprawdzie jestem z wykształcenia fizykiem, absolwentem tego samego Wydziału, ale przez większość swojej kariery naukowej zajmowałem się fizykochemią powierzchni i układów zdyspergowanych. Dlatego tytuł pracy, „Badania organizacji i aktywności izolowanych błon

fotosyntetycznych modyfikowanych nanocząstkami tlenków tytanu i wielościennymi nanorurkami węglowymi”, wzbudził moje wątpliwości o jakie tlenki tytanu chodzi. Lektura pracy pozwoliła je rozwiać, chodzi o nanocząstki z najbardziej trwałego ditlenku tytanu – tlenku tytanu(IV). Celem pracy, sformułowanym na jej wstępie, było określenie, poprzez badania *in vitro*, wpływu wybranych nanocząstek TiO_2 o różnych rozmiarach, formach krystalicznych i stopniu domieszkowania żelazem, jak również funkcjonalizowanych nanorurek węglowych na organizację struktur hybrydowych błon z fotosystemem II i ich aktywność fotochemiczną. Doktorantka podjęła próbę znalezienia korelacji pomiędzy rodzajem nanocząstek i wielkością tworzonych struktur a wydajnością transferu elektronów i przekazem energii w fotosystemie. Dla realizacji postawionego celu doktorantka użyła zestawu komplementarnych technik badawczych: mikroskopii siła atomowych (AFM), pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (rozkład wielkości nanocząstek i potencjał zeta), stacjonarnej i czasowo rozdzielczej spektroskopii fluorescencyjnej oraz badania termoluminescencji.

Praca doktorska mgr Iwony Halbiny liczy 207 stron. Posiada układ klasyczny, tzn., podzielona jest na wprowadzenie, w którym doktorantka podaje podstawowe wiadomości dotyczące elementów badanego układu, część doświadczalną, w której skrótowo przedstawia stosowane metody badawcze, materiał doświadczalny, sposoby przygotowania próbek oraz metodyki pomiarowe oraz część poświęconą badaniom własnym, w której przedstawia wyniki otrzymane przy zastosowaniu użytych technik. Pracę kończy podsumowanie osiągniętych wyników, zestawienie wyciągniętych na ich podstawie wniosków oraz spis literatury liczący 95 pozycji.

W części wstępnej doktorantka przedstawia budowę, właściwości i modele błon biologicznych oraz budowę i rolę fotosystemu typu II w procesie fotosyntezy tlenowej. Następnie przechodzi do omówienia właściwości fizyko- i fotochemicznych TiO_2 i przedstawia krótki przegląd stanu wiedzy odnośnie oddziaływania nanocząstek ditlenku tytanu na organizmy roślinne. W podobny sposób zorganizowane są podrozdziały dotyczące nanorurkom węglowym. Sposób opracowania tej części pracy wskazuje, że doktorantka dobrze orientuje się w literaturze przedmiotu i potrafi przekazać w zwartej formie podstawowe wiadomości dotyczące swojej tematyki badawczej. Zauważyłem tylko kilka drobnych nieścisłości:

- przestawione litery (RC zamiast CR) na rysunku 1.10;
- różne wartości dla przerwy energetycznej dla anatazu i rutylu w tekście i w tabeli 1.3;

- samoorganizacja DPPC wokół CNT środowisku wodnym następuje raczej na skutek efektu hydrofobowego a nie oddziaływań van der Waalsa jak to zostało opisane na str. 39;

W części dotyczącej omówieniu metod badawczych nie mogę zgodzić z opisem oddziaływań dyspersyjnych pomiędzy sondą AFM i powierzchnią. Ze względu na skończony rozmiar tipu (10 – 50 nm) nie jest właściwe opisywanie tych oddziaływań poprzez potencjał typu Lennarda-Jonesa (lub po jego zsumowaniu po cząsteczkach powierzchni), a raczej jako oddziaływanie sfery z powierzchnią, np. wzorem Hamakera $V(r) = -\frac{Aa}{6D}$ (podobnie powinien zostać użyty zamiast wzoru 2.4.7). Po za tym: dwukrotnie pojawia się rysunek 2.9 (w tym drugim brak odnośnika); występuje błąd w jednostce energii w opisie rysunku 2.8; czy dla wielkości qP lepszym tłumaczeniem nazwy nie będzie ułamek otwartych centrów; równanie Stokes'a-Einstein'a dotyczy nie tylko cząstek sferycznych; w teorii Rayleigha rozkład kątowy światła rozproszonego $(1 + \cos^2 \theta)$; grubość dyfuzyjnej części podwójnej warstwy elektrycznej zależy od rodzaju i stężenia jonów w roztworze i jest określona długością Debye'a; na str. 75 - przenikalność nie przewodność dielektryczna.

Część dysertacji opisująca wyniki badań własnych doktorantki rozpoczyna rozdział, w którym autorka badała wpływ sposobu przygotowania sztucznych błon biologicznych, dwuwarst lipidowych, na możliwość określenia ich struktury za pomocą AFM po przeniesieniu na powierzchnię. Jak domyślam się prace te były przeprowadzone w celu dobrania najkorzystniejszych warunków pomiarowych. W przypadku badania izolowanych błon fotosyntetycznych BBY PSII nałożonych na powierzchni miki lub na warstwie napyłonego złota doktorantka stwierdziła dość równomierne pokrycie powierzchni warstwami o grubości na ok. 12 nm na micy i ok 3 nm na złocie przy czym sama powierzchnia błon była niejednorodna. Czy jest znana przyczyna tej różnicy grubości?

Pomiary AFM dla układów hybrydowych przeprowadzone zostały tylko na złocie jako, że na powierzchni miki nanocząstki TiO_2 miały tendencje do agregowania i nierównomiernego rozkładu. (Czy powodem była większa gładkość miki, słabsza adhezja i możliwość przemieszczania cząstek za pomocą sondy AFM ?) Pomiary te wykazały, że nałożenie błony fotosyntetycznej na warstwę nanocząstek nie powoduje ich agregacji, z czego można wnosić o ich wbudowywaniu się w strukturę błony.

Główna część badań eksperymentalnych mgr Habiny dotyczyła aktywności fotosyntetycznej błon BBY PSII modyfikowanych nanocząstkami TiO_2 . Jako narzędzie

miarowe wybrała indukowaną fluorescencję – efekt Kautsky’ego. Mierzone widma intensywności fluorescencji były opisywane za pomocą trzech składowych procesów, dwóch szybkich związanych z redukcją centrów chinonowych i jednego wolnego interpretowanego jako związane z transferem elektronów w obrębie fotosystemu. Doktorantka wyznaczyła amplitudy i stałe czasowe dla wszystkich składowych w zależności od stosunku stężenia nanocząstek do stężenia chlorofilu zawartego w BBY PSII. Dla wszystkich badanych układów brak jest wyraźnego trendu, jedynie w dla pewnych zakresów stężeń obserwowane były istotne różnice w stosunku do parametrów dla BBY PSII niemodyfikowanego nanocząstkami, zwłaszcza dla składowej wolnej, które doktorantka interpretowała jako wpływ fotoaktywnego TiO_2 na transfer elektronów. Podobne wyniki otrzymała dla widm ekscytacyjnych, Brak zaznaczonych błędów na rysunkach 4.36 – 4.49 nie pozwala stwierdzić w jakich przedziałach stężenia nanocząstek różnice w stosunku do kontroli są statystycznie istotne.

Widma termoluminescencji układów hybrydowych fotosystem BBY PSII - nanocząstki były charakteryzowane przez dopasowanie dwu składowych Gaussowskich rozkładu widma luminescencji od temperatury. Doktorantka porównała dla obu składowych zależność parametrów rozkładu od stosunku stężenia TiO_2 do chlorofilu w BBY PSII dla wszystkich badanych układów. Podobnie jak w przypadku efektu Kautsky’ego brak jest ewidentnej zależności a istotne odstępstwa można zaobserwować jedynie w pewnych przedziałach stężeń.

Następny rozdział dotyczy charakterystyki wielkości i potencjałów zeta nanocząstek i zawiesiny BBY PSII. Korzystnym byłoby umieszczenie tego rozdziału przed omówieniem wyników AFM. Umożliwiłoby to ich porównanie i interpretację. Pomiar rozkładów wielkości i potencjałów zeta dla układów hybrydowych sugerują wbudowywanie się nanocząstek w strukturę błony fotosyntetycznej. Niewątpliwie intrygującym wynikiem jest obserwowana frakcjonacja dla układów modyfikowanych nanocząstkami RD5. Obserwowane niskie potencjały zeta wynikały zapewne z wysokiej sumarycznej siły jonowej buforów.

Cykl badań dotyczących wpływu nanorurek węglowych na efekt Kautsky’ego wykazał jego brak, niezależnie czy były one modyfikowane grupami karboksylowymi czy aminowymi.

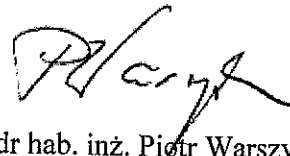
W części dotyczącej badań własnych znalazłem jedynie nieliczne nieściśle sformułowania, na przykład:

- str. 91 – przyrząd do tworzenia planarnych monowarstw substancji amfifilowych na granicy woda-powietrze nazywa się waga Langmuira, a sama technika przenoszenia warstw na podłoże stałe nosi nazwę Langmuira-Blogett (lub Langmuir-Schaffera w zależności od sposobu nanoszenia warstw);

- str. 99 – stwierdzenie, że „obecność struktur wystających ponad powierzchnie błony świadczy o tym, że na zewnątrz eksponowana jest strona donorowa PSII jest zbyt kategorię i wymagałoby potwierdzenia;
- str. 108-110 – które nanocząstki TiO_2 były obrazowane ?;
- na jakim poziomie była niepewność dla parametrów składowych widma fluorescencji;
- czy na wykresach dotyczących stałych czasowych szybkich składowych nie można było jako jednostki użyć milisekund;
- str. 174 – nie jest uprawnione stwierdzenie, że największą wartość $|\zeta|$ obserwowano dla nanocząstek A11 i RD5 biorąc pod uwagę odchylenia standardowe.

Pomimo zauważonych nieścisłości moja ocena pracy mgr Iwony Habiny jest pozytywna. Doktorantka zmierzyła się ze skomplikowanym zagadnieniem, wykazała się znajomością przedmiotu, zaplanowała i przeprowadziła niezbędne eksperymenty przy pomocy komplementarnych metod badawczych oraz podjęła próbę interpretacji otrzymanych wyników. W tym miejscu zgadzam się z jednym zdaniem końcowych rozprawy, że „wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy pokazują, jak trudno jest znaleźć jednoznaczną odpowiedź dla mechanizmu oddziaływań nanostruktur na PSII w izolowanych, dobrze zdefiniowanych układach”. Jednakowoż uważam otrzymane wyniki za wartościowe przyczyniające się do rozszerzenia naszej wiedzy. Uwagi krytyczne zawarte w recenzji mają pomóc przy dalszym planowaniu doświadczeń, opracowaniu wyników i przedstawieniu ich w formie publikacji.

Uważam, że praca Pani mgr Iwony Habiny spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego..



Prof. dr hab. inż. Piotr Warszyński