

Prof. dr hab. Halina Gabryś  
Zakład Biotechnologii Roślin  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

**Recenzja**  
**Rozprawy doktorskiej pani mgr Iwony Habiny**  
**p.t. „Badania organizacji i aktywności izolowanych błon fotosyntetycznych**  
**modyfikowanych nanocząstkami tlenków tytanu i wielościennymi nanorurkami**  
**węglowymi”**

wykonanej na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej  
Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie

Pojęcie nanotechnologii, które weszło do powszechnego użycia w okolicy przełomu wieków rozpała wyobraźnię nie tylko naukowców ale także dziennikarzy i polityków. Wobec mitów jakie w tej sytuacji nieuchronnie powstają, a z drugiej strony wobec fascynujących perspektyw jakie towarzyszą różnym zastosowaniom nanocząstek, wybór tematu pracy doktorskiej pani mgr Iwony Habiny uważam za bardzo trafny, zaś wyniki przeprowadzonych badań za wysoce użyteczne, nawet jeśli rozwiewają one niejako marzenia o natychmiastowym i łatwym użyciu badanych nanomateriałów do zwiększenia wydajności fotosyntezy, a w konsekwencji – produktywności roślin uprawnych.

**Formalny opis rozprawy**

Praca liczy 207 stron maszynopisu i posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, w sensie składających się na nią części, natomiast nietypowy pod względem ich wzajemnych proporcji. Część wstępna stanowi ponad 30% objętości pracy. Po prawidłowo skonstruowanym spisie treści i spisie stosowanych skrótów autorka zamieściła *Cel pracy*, jednostronicowe omówienie przesłanek, które skłoniły ją do podjęcia badań, sformułowanie celu badań i wykaz użytych metod<sup>1)</sup>. Dwa kolejne rozdziały zostały zatytułowane *Wprowadzenie* i *Metody badawcze*. Pierwszy z nich zawiera ogólne informacje na temat budowy błon biologicznych, układów fotosyntetycznych, a także właściwości użytych w doświadczeniach nanocząstek  $TiO_2$  i nanorurek węglowych oraz ich wpływu na organizmy roślinne. Drugi rozdział poświęcony został omówieniu zasad stosowanych metod badawczych. W kolejnym, dwudziestostronicowym rozdziale zawarto opis użytych materiałów i metod, z podaniem procedur izolacji materiału biologicznego i oznaczeń ilościowych, charakterystyką zastosowanych nanocząstek/nanorurek oraz szczegółową charakterystyką przeprowadzonych eksperymentów. Najwięcej miejsca (95 stron) zajmuje opis uzyskanych wyników, podzielony na podrozdziały według zastosowanych metod. Otrzymane wyniki skomentowała autorka w krótkim, dziesięciostronicowym rozdziale zatytułowanym *Podsumowanie* i ostatecznie podsumowała je w 2,5-stronicowych *Wnioskach*. Pracę zamyka spis cytowanej literatury liczący 95 pozycji.

**Ocena merytoryczna**

Autorka podjęła się ambitnego i pracochłonnego zadania polegającego na scharakteryzowaniu oddziaływań zachodzących na poziomie molekularnym pomiędzy nanostrukturami dwóch typów (cząstkami  $TiO_2$  i nanorurkami węglowymi) a elementami jednego z głównych kompleksów fotosyntetycznych – fotosystemu II. Jak można wnioskować z części wstępnej pracy, impuls do podjęcia takich badań stanowiły doniesienia

o korzystnym wpływie dodatku takich nanocząstek na wzrost i wydajność fotosyntetyczną roślin. Ustalenie jakiego typu oddziaływania mogą być odpowiedzialne za takie zmiany może mieć zatem istotne znaczenie nie tylko poznawcze ale także praktyczne. Muszę przyznać, że doniesienia literaturowe przytoczone przez autorkę w części wstępnej, wskazujące na pozytywny wpływ dwutlenku tytanu i nanorurek węglowych na wydajność fotosyntetyczną roślin, a zwłaszcza ich interpretacja, budzą moje wątpliwości. Zdaję sobie sprawę, że autorka pracy jest przede wszystkim fizykiem i może mieć trudności z oceną tych doniesień. Pomimo to proszę o krytyczne ustosunkowanie się, zwłaszcza do interpretacji zamieszczonych w cytowanych pracach <sup>2)</sup>.

W pracy zanalizowano zachowanie układu modelowego, izolowanych błon tylakoidów *Nicotiana tabacum* wzbogaconych w fotosystem II, pod wpływem dodatku siedmiu różnych typów nanocząstek dwutlenku tytanu i dwóch typów nanorurek węglowych. Nanocząstki TiO<sub>2</sub> pochodziły z różnych źródeł, różniły się strukturą krystaliczną, a także zawartością domieszki żelaza; nanorurki były modyfikowane kwasem azotowym lub amoniakiem.

Do charakterystyki otrzymanych układów hybrydowych pani Habina wykorzystowała szeroką gamę technik: mikroskopię sił atomowych, spektrofluorymetrię w różnych wariantach, termoluminescencję, dynamiczne rozpraszanie światła i elektroforetyczną metodę pomiaru potencjału zeta. Wszystkie zastosowane techniki zostały szczegółowo opisane w obszernej części wstępnej, która stanowi dobre wprowadzenie dla czytelnika, który nie zetknął się praktycznie z konkretną metodą. Sądzę jednak, że bez szkody dla jasności wprowadzenia, a nawet z pożytkiem dla jego zwartości, można by pominąć niektóre bardzo podstawowe, podręcznikowe informacje i/lub omówienie tych aspektów metod, których nie używano w opisywanych doświadczeniach. Badania opisane w pracy są prawdziwie zaawansowane i czytelnikowi niewiele pomoże np. garść hasłowych informacji na temat ogólnej struktury błon biologicznych jeśli nie miał okazji zapoznać się z tą strukturą. Zamiast tego warto raczej mocniej zaakcentować odniesienia do przeprowadzonych doświadczeń.

Zastosowanie wielostronnego podejścia doświadczalnego pozwoliło na częściową weryfikację wyników otrzymanych jedną techniką przez porównanie ich z wynikami otrzymanymi kolejną metodą. Doktorantka użyła mikroskopii sił atomowych w trybie „tapping” do oceny przestrzennej organizacji badanych układów hybrydowych. Wyzaczyła rozmiary powstających struktur i stwierdziła, że w obecności BBY PSII nie tworzą się agregaty nanocząstek TiO<sub>2</sub>. Modyfikowane nanorurki węglowe równomiernie pokrywały się błonami tylakoidów. Ponieważ jednak pomiary efektywności transferu energii i liniowego transportu elektronów były wykonywane dla układów hybrydowych w zawiesinie, sprawdziła także ich organizację przestrzenną w tych warunkach, stosując metodę dynamicznego rozpraszania światła. Wyzaczyła również potencjał zeta czystych nanocząstek TiO<sub>2</sub>, BBY PSII i utworzonych z nich układów hybrydowych. Niektóre struktury zmierzone w układach hybrydowych okazały się być prawie dwukrotnie mniejsze w stosunku do czystych BBY PSII, co wskazuje na możliwość występowania silnych oddziaływań pomiędzy składnikami. Po oszacowaniu stanu powstających struktur hybrydowych doktorantka przystąpiła do badań efektywności transferu elektronów w tych układach. Wykonała pomiary efektu Kautsky'ego dla wszystkich wybranych nanocząstek i przedstawiła bardzo szczegółową analizę <sup>3)</sup> zmian parametrów uzyskanych z dopasowania krzywych Kautsky'ego w zależności od stosunku wagowego TiO<sub>2</sub> do chlorofilu w próbkach błon tylakoidów <sup>4)</sup>. Badane nanocząstki powodowały oscylacyjne zmiany wydajności liniowego transferu elektronów oraz frakcji otwartych centrów reakcji PSII z utlenionym plastochinonem QA. Wielkość i charakter zmian wydajności fotosyntetycznej, stabilizacja metastabilnych stanów związanych plastochinonów oraz wydajność transferu energii pomiędzy kompleksami antenowymi a centrum reakcji PSII zależały od struktury krystalograficznej nanocząstek TiO<sub>2</sub>, źródła ich pochodzenia oraz stopnia domieszkania żelazem. W badaniach szybkiej fluorescencji i termoluminescencji

autorka stwierdziła, że badane nanocząstki zmieniają równowagę termodynamiczną po obu stronach PSII, akceptorowej i donorowej, a w szczególnych przypadkach biorą także bezpośredni udział w utlenianiu zredukowanego plastochinonu. Większe domieszki żelaza powodowały osłabienie wpływu nanocząstek na transport elektronów.

Jednorodność strukturalna układów hybrydowych BBY PSII z  $\text{TiO}_2$  nie znajdowała odzwierciedlenia w ich działaniu na fotosystem II. Dlatego autorka pracy konkluduje, że dobór odpowiednich stężeń podukładów musi być każdorazowo weryfikowany eksperymentalnie dla określonych warunków. Wpływ lokalnych oddziaływań na wydajność liniowego transportu elektronów w obrębie PSII wykazały także eksperymenty z zastosowaniem modyfikowanych nanorurek.

Analiza rozprawy wykazuje, że doktorantka w sposób profesjonalny posługuje się m.in. technikami izolacji błon biologicznych, mikroskopii sił atomowych oraz szeregiem metod stosowanych do badań fotosyntetycznego transportu elektronów. Moje przekonanie, że pani Habina jest eksperymentatorem o dużym doświadczeniu jest także poparte jej współautorstwem w dwóch oryginalnych publikacjach eksperymentalnych.

#### *Problemy do dyskusji / uwagi krytyczne*

<sup>1)</sup> Precyzyjna definicja celu jest kluczowym elementem każdej pracy badawczej, m.in dlatego, że pozwala zrozumieć i ocenić prawidłowość zastosowanej strategii doświadczalnej. Dlatego proszę doktorantkę o precyzyjne i prawidłowe sformułowanie tego celu, ponieważ jego obecna forma, w każdym razie ta którą zamieszczono w odpowiednim rozdziale, pozostawia wiele do życzenia. Badanie jest raczej środkiem do celu a nie celem, zaś składnia drugiej części zdania określającego cel pracy utrudnia zrozumienie jakie korelacje stara się ustalić autorka.

<sup>2)</sup> Na rycinie 1.13 widnieje schemat wskazujący na tworzenie się cząsteczek amoniaku z azotu atmosferycznego w PS II szpinaku dotowanego  $\text{TiO}_2$ . Pomijając błąd widoczny na rysunku –  $\text{NH}_3$  z pewnością nie może powstać w reakcji wodoru cząsteczkowego z wodą – proszę o ustosunkowanie się do koncepcji wiązania azotu atmosferycznego w sąsiedztwie kompleksu białkowego OEC wchodzącego w skład kompleksu PSII. Przy okazji proponuję unikać terminów „fiksacja azotu” oraz „fotofiksacja azotu”, ponieważ kojarzą się one z mechanizmami obronnymi w psychologii i z problemami rozwojowymi i brzmia komicznie w zastosowaniu do wiązania azotu atmosferycznego.

<sup>3)</sup> Sposób przedstawienia tej analizy budzi moje największe wątpliwości. Nie negując zasadności dokładnej analizy poszczególnych etapów fotosyntetycznego transportu elektronów oczekiwałam próby scalenia tych informacji w jeden ciąg pozwalający ocenić perspektywę osiągnięcia jednoznacznego i powtarzalnego wpływu na transport elektronów w fotosyntezie jednego wybranego typu nanocząstek np. A-11 lub A-11S. Dla układów hybrydowych zawierających te właśnie cząstki zaobserwowano jednoznaczne odchylenia wartości wyznaczanych parametrów od kontroli w określonych obszarach stosunku  $\text{TiO}_2$  do Chl. Drobiazgowe rozważanie odchylen pojedynczych punktów wydaje mi się niezasadne ponieważ trudno im przypisać znaczenie biologiczne; ponadto w doświadczeniach tego typu nie można wykluczyć popełnienia przypadkowych grubych błędów. Z ilu powtórzeń liczono średnią wartość parametru? Czy były to powtórzenia techniczne czy biologiczne?

Nie znalazłam również informacji z ilu izolacji pochodziły używane do badań próbki błon tylakoidów. Jeśli opisywane oddziaływania z nanocząstkami są tak wrażliwe na ich postać krystaliczną jak pokazano, można domniemywać że mogą zmieniać się także dla różnych

próbek (błon), nawet jeśli izolowano je w taki sam sposób z identycznie hodowanego materiału roślinnego i mających taką samą zawartość chlorofilu. W pracy powinny zostać podane warunki hodowli tytoniu, ze szczególnym uwzględnieniem natężenia oświetlenia i jego jednorodności. Są to informacje niezbędne dla kogoś kto zechce powtórzyć opisane doświadczenia.

4) Stosunek [mg  $\text{TiO}_2$  : mg  $\text{Chl}_{\text{BBY PSI}}$ ] to stosunek wagowy, który nie powinien być nazywany stężeniem. Nawiasem mówiąc, może warto byłoby przeliczyć te stosunki wagowe na molowe, chociażby w przybliżeniu, ponieważ oddziaływanie substancji zależy od liczby cząsteczek, które mogą się ze sobą zetknąć a nie od liczby mg substancji.

5) Podczas obrony proszę autorkę o rozwinięcie myśli zawartej w ostatnim zdaniu rozdziału *Wnioski*: „Zmienność badanych zależności, która przeszkadza w badaniu mechanizmów występujących w naturalnych układach może okazać się pomocna we wpływniu na sztucznie zaprojektowane układy.”

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Praca ma jasny układ i jest ogólnie przyjazna dla czytelnika. Na uznanie zasługuje staranna strona graficzna, właściwy dobór, dobra jakość i ogólnie prawidłowy opis ilustracji i tabel. W tekście można jednak znaleźć sformułowania nieprecyzyjne, nielogiczne, żargon laboratoryjny i anglicyzmy. Ważniejsze z nich zostały wymienione poniżej.

#### *Pozostałe uwagi merytoryczne i edytorskie*

##### *Spis użytych w tekście skrótów*

Spis zawiera drobne błędy/niejednoznaczności i jest niekompletny. Centrum reakcji PSII to P680; skrót PC ma w pracy dwa znaczenia: plastocyjanina i fosfatydylocholina; nie wyjaśniono skrótu BBY; kilka skrótów w tabeli 1.1 nie zostało wyjaśnione ani w spisie ani w tekście.

##### *Wprowadzenie*

Na str.15. można przeczytać, że „Dzięki obecności wyspecjalizowanych białek, tzw. flipaz błony biologiczne są asymetryczne.” Powodów asymetryczności błon biologicznych jest chyba więcej....

str.16.: „Błony biologiczne spełniają wiele ważnych funkcji. Są to m.in.: (i) transport jonów, wody, dużych molekuł (np. białka) poprzez błonę ....” Czy transport można istotnie uznać za funkcję błony? Dlaczego został wymieniony transport tylko dużych a pominięty transport małych cząsteczek?

str.17. „Na uwagę zasługuje fakt, że tylko w tych fotosystemach typu II, w których pojawia się kompleks manganowy (...) możliwe staje się pobieranie elektronów z wody, gdyż tylko one posiadają odpowiednio duży potencjał redoks...” – To stwierdzenie mogłoby sugerować, że do rozkładu wody wystarcza obecność fotoukładu zawierającego kompleks manganowy (jednego) podczas gdy kluczowe jest współdziałanie PSII i PSI.

Na rys. 1.3. brak oznaczeń a, b i c, do których odwołano się w podpisie (podobnie na rys. 2.16).

str.18. W ostatnim akapicie podrozdziału pt. *Przestrzenna organizacja błony tylakoidów* autorka stwierdza, że upakowanie błon tylakoidów w grana pozwala na przekazywanie energii wzbudzenia wzdłuż i w poprzek błony, co „pozwała na wstępną adaptację układu do

warunków oświetlenia”. W tym miejscu powinien zostać użyty termin „aklimacja” ponieważ autorka ma na myśli, jak rozumiem, zmiany szybkie, nie wymagające zmian ekspresji genów.  
str.19. Stwierdzenie: „...kompleks cytochromu b6/f rozłożony jest równomiernie w obydwu typach błon” (tzn. w lamellach gran i stromy ) jest niezgodne z Rys.1.4.b, do którego się odnosi.

str.20. „Obecność dodatkowych kompleksów antenowych (...) zwiększa efektywność jej wykorzystania przez kompleksy PSII i PSI.” – chyba raczej umożliwia, ponieważ bez absorpcji światła przez kompleksy antenowe trudno byłoby mówić o efektywnej fotosyntezie.

str.21. PSII zlokalizowany jest w tylakoidach gran a nie w granach tylakoidów.

#### *Metody badawcze*

str.57. „...Q<sub>A</sub> ulega redukcji i nie jest w stanie przyjąć kolejnego elektronu dopóki nie przekazuje go na następnego akceptor elektronu..” (logika!)

str.59. w opisie parametrów charakteryzujących fluorescencję kilkakrotnie podano niekompletne definicje stosunku, np. „qP – stosunek otwartych centrów reakcji.” (do czego?)  
Brak definicji F<sub>m</sub>.

str.62. Co oznacza pojęcie „światło aktywne” ?

#### *Materiał badawczy i przebieg pomiarów*

str.82. Tytuł podrozdziału *Protokoły pomiarowe* nie odpowiada jego zawartości.

#### *Terminologia i język rozprawy*

W kilku przypadkach należałoby poprawić styl/składnię:

str.11. „Prowadzone badania były ...zorientowane na sprawdzenie ... działania nanocząstek na wzrost ... odnosząc się do aktywności aparatu fotosyntetycznego”

„W tego typu eksperymentach nie ma jednak możliwości kontrolowania ilościowego stosunku nanocząstek do badanego materiału, a tym bardziej znalezienia relacji stosowanych stężeń względem układów fotosyntetycznych.”

„...znalezienie korelacji między wydajnością liniowego transferu elektronów i przekazem energii a wielkością formowanych struktur.”

str.14. „Zarówno skład lipidowy błony od strony zewnętrznej i wewnętrznej komórki różni się, jak i orientacja białek membranowych jest ściśle określona.”

str. 30. „Podejmowane są badania w kierunku ulepszenia aktywności fotokatalitycznej TiO<sub>2</sub> w dwóch kategoriach:...”

„Zwiększenie krawędzi (?) absorpcji TiO<sub>2</sub> z 380 nm do wyższych długości fali w zakresie 400 – 650 nm w porównaniu z czystym TiO<sub>2</sub> zostało pokazane m.in. w [32-33].”

str.32. „...wiązanie TiO<sub>2</sub> miało mały efekt na konformację...”

str. 33. „...zasugerowano, że zwiększenie wzrostu szpinaku jest związane..” (szybszy wzrost?)

„...szkodliwe działanie TiO<sub>2</sub>, (...) uważane jest zwykle za niskie...”

str.44. „...pozycjonowanie w subnanometrowej rozdzielczości...”

„...które często dzielone są ze względu na naturę oddziaływań występujących w poszczególnych przypadkach...”

str.71. „... funkcja korelacji posiada eksponencjalny zanik...” - chyba jednak zanika eksponencjalnie...

„Między innymi dla mniejszych cząstek funkcja ta szybciej opada oraz próbki o większym stopniu monodispersji charakteryzuje bardziej strome zbocze funkcji.”

str.76. „Krzywa DLVO ma charakterystyczny kształt, w którym wyróżnić można barierę energetyczną, której wysokość wskazuje na to, jak bardzo stabilny stanowi koloid ...”  
(krzywa?)

str.187. „Obrazy próbek BBY PSII zmierzonych na micy i powierzchni napyłonej złotem, otrzymane przy użyciu mikroskopu sił atomowych charakteryzowały się ich jednorodnym rozmieszczeniem PSII na obu powierzchniach.”

Ponadto w tekście pracy znaleziono sporą liczbę tzw. literówek i innych drobnych błędów.

Proponuję także rozważenie zamiany następujących terminów na polskie lub/i mniej żargonowe odpowiedniki: generowanie – wytwarzanie; białka membranowe - białka błonowe; molekuly – cząsteczki; energia ekscytacji – energia wzbudzenia; w kierunku wertykalnym – w poprzek błony; zaakceptowanie ładunku – przyjęcie ładunku; komponenty – składniki; pik – szczyt lub maksimum; surfaktant – substancja powierzchniowo czynna; tip, tipa – ostrze, ostrza; energia ekscytacji – energia wzbudzenia; donowanie elektronów – przekazywanie elektronów.

### **Podsumowanie**

Powyższe uwagi krytyczne nie zmieniają mojej ogólnej opinii o przedstawionej mi do oceny pracy. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Iwony Habiny jest oryginalnym i cennym osiągnięciem doktorantki, które dostarcza szeregu nowych, ważnych informacji o oddziaływaniach nanocząstek z błonami biologicznymi wzbogaconymi w fotosystem II, kompleks białkowo-barwnikowy o kluczowym znaczeniu dla wydajności fotosyntetycznej roślin. Rozprawa świadczy o dojrzałości naukowej autorki, jej rzetelności i konsekwencji w prowadzeniu pracy badawczej. Świadczy także, że doktorantka umiejętnie planuje i prowadzi skomplikowane technicznie doświadczenia, analizuje wyniki i poddaje je krytycznej dyskusji.

**W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie o dopuszczenie mgr Iwony Habiny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Malina Gabryś*

Kraków, 28 listopada 2015