

Olsztyn, 24. lipca 2026 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Miciński
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
e-mail: micinsk@uwm.edu.pl, tel. 6

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kot,

pod tytułem: „Ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno - grzybiczych”

wykonanej w Katedrze Hodowli i Żywienia Zwierząt, Instytutu Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Marcina Gołębiowskiego oraz Promotora pomocniczego dr inż. Aleksandry Kalińskiej.

1. Uzasadnienie celowości podjętych badań zawartych w rozprawie doktorskiej.

Współczesna produkcja bydła mlecznego stoi przed koniecznością pogodzenia wysokiej wydajności produkcyjnej z utrzymaniem dobrego stanu zdrowia i dobrostanu zwierząt. Jednocześnie narastająca oporność drobnoustrojów na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz ograniczona skuteczność konwencjonalnych metod leczenia zakażeń bakteryjnych i grzybiczych powodują, że poszukiwanie nowych strategii profilaktycznych i terapeutycznych stało się jednym z priorytetowych kierunków badań w medycynie weterynaryjnej. W tym kontekście szczególnego znaczenia nabierają badania nad nanomateriałami, których wielokierunkowe mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego mogą stanowić interesującą alternatywę lub uzupełnienie dotychczas stosowanych metod ograniczania zakażeń.

Doktorantka podjęła się realizacji badań dotyczących oceny *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w odniesieniu do patogenów odpowiedzialnych za mastitis oraz zakażenia bakteryjno-grzybicze związane z chorobami racic bydła mlecznego. Problematyka ta wpisuje się w aktualne kierunki badań z zakresu mikrobiologii weterynaryjnej, nanotechnologii oraz poszukiwania alternatywnych metod ograniczania stosowania antybiotyków w produkcji zwierzęcej. Mastitis oraz choroby racic stanowią najważniejsze problemy zdrowotne bydła mlecznego, generując znaczne straty ekonomiczne, pogorszenie dobrostanu zwierząt oraz zwiększone zużycie środków przeciwdrobnoustrojowych. Występuje zatem narastające zjawisko lekooporności drobnoustrojów stając się obecnie jednym z najistotniejszych wyzwań współczesnej medycyny i medycyny weterynaryjnej. W tym kontekście poszukiwanie nowych substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w tym nanomateriałów, należy uznać za w pełni uzasadnione.

Doktorantka zaktualizowała obecny stan wiedzy dotyczący etiologii mastitis oraz zakażeń prowadzących do zmian chorobowych racic, ograniczeń konwencjonalnych metod leczenia, a także możliwości wykorzystania nanotechnologii jako potencjalnej alternatywy dla klasycznej chemioterapii przeciwdrobnoustrojowej. Tak skonstruowane wprowadzenie pozwala czytelnikowi zrozumieć przesłanki, które doprowadziły do sformułowania celu badań. Chciałbym tu wyraźnie podkreślić, że podjęta tematyka badań ma nie tylko znaczenie poznawcze, lecz również wyraźny wymiar aplikacyjny. Uzyskanie nowych informacji dotyczących aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych nanomateriałów może w przyszłości przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod profilaktyki lub wspomagania terapii zakażeń występujących u bydła mlecznego, a także wpisuje się w światowe działania zmierzające do ograniczenia stosowania antybiotyków w produkcji zwierzęcej. W mojej ocenie Doktorantka w sposób przekonujący uzasadniła celowość podjętych badań.



Uważam zatem, że przedstawione w dysertacji szczegółowe cele dotyczące 4 przeprowadzonych doświadczeń są jak najbardziej aktualne i zostały sformułowane w sposób logiczny i obejmują najważniejsze aspekty niezbędne do oceny potencjału aplikacyjnego nanomateriałów, tj. określenie ich aktywności wobec różnych grup drobnoustrojów, porównanie działania pojedynczych nanocząstek i układów bimetalicznych, analizę bezpieczeństwa biologicznego oraz wskazanie najbardziej obiecujących struktur do dalszych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań obejmujący zarówno bakterie, jak i grzyby izolowane od zwierząt z naturalnie występującymi zakażeniami. Uwzględnienie rzadziej izolowanych, lecz klinicznie istotnych gatunków grzybów związanych z mastitis stanowi cenne uzupełnienie dostępnej wiedzy i zwiększa wartość poznawczą rozprawy.

2. Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Kot zawarta jest na 180 stronach. Pierwsze nienumerowane strony stanowią tytuł rozprawy i oświadczenia promotora i doktoranta. Numeracja zawiera się od 5 do 72 stron, w skład których wchodzi: 1 strona to spis treści, 12 stron streszczenia w języku polskim i angielskim, 1 strona wykazu stosowanych skrótów, 1 strona informująca o publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, 10 stron wstępu, 3 strony dotyczące hipotez badawczych, celu i zakresu pracy, oraz 10 stron opisujących materiał i metody. Syntetyczny opis wyników opublikowanych w 4 artykułach naukowych prac zajmuje 22 strony tekstu. Bibliografia zawiera 7 stron i dodatkowo jedna strona wprowadzająca do zbioru publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji. Doktorantka na kolejnych 108 nienumerowanych stronach zamieściła kopie 4 oryginalnych, opublikowanych w czasopiśmie wysoko punktowanym, prac naukowych stanowiących podstawę naukową rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia wszystkich współautorów zamieszczonych prac.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Kot w pełni spełnia wymogi przewidziane dla tego typu prac, charakteryzując się typowym układem przewidzianym dla dysertacji doktorskich, w której kolejność poszczególnych rozdziałów jak i podrozdziałów jest poprawna. Pod względem merytorycznym cała praca została przemyślana i napisana w sposób czytelny i przejrzysty. Doktorantka wykorzystała 100 pozycji najnowszej literatury, która w pełni dotyczy tematu rozprawy doktorskiej, nie licząc publikacji wchodzących w skład dysertacji doktorskiej. W swoich oświadczeniach współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej i zaznaczyli Jej wiodący udział w opracowaniu koncepcji i metodologii wykonywanych doświadczeń, planowaniu i realizacji badań, pozyskaniu i przygotowaniu materiału badawczego, analiz laboratoryjnych, interpretacji i walidacji danych, opracowaniu wyników oraz redagowaniu manuskryptu jak również krytycznej weryfikacji merytorycznej i redakcji językowej, podkreślając jednocześnie aktywny udział Doktorantki w procesie recenzyjnym. Udział ten jest wysoki mieszcząc się w przedziale od 57 do 84%. Doktorantka w 3 pracach jest pierwszym autorem, w jednej drugim autorem, a w 2 pracach pełni rolę „corresponding author” co świadczy o stopniowym wdrażaniu Doktorantki przez promotora do podejmowania działań w kierunku samodzielnej pracy naukowej.

Rozprawa doktorska, pt. „Ocena in vitro przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno – grzybiczych” opiera się na 4 opublikowanych i tematycznie spójnych następujących artykułach naukowych:

1. Kot M., Kalińska A., Jaworski S., Wierzbicki M., Smulski S., Gołębiowski M. 2023. In vitro studies of nanoparticles as a potentially new antimicrobial agent for the prevention and treatment of lameness and digital dermatitis in cattle. *International Journal of Molecular Sciences*. 24, 6146.
<https://doi.org/10.3390/ijms24076146>
2. Wierzbicki M., Kot M., Lange A., Kalińska A., Gołębiowski M., Jaworski S., 2024. Evaluation of the antimicrobial, cytotoxic and physical properties of selected nano-complexes in bovine udder inflammatory pathogen control. *Nanotechnology, Science and Applications*. 17: 77-94.
<https://doi.org/10.2147/NSA.S447810>

3. Kot M., Lange A., Jabłońska W., Kalińska A., Nasiłowska B., Skrzeczanowski W., Gołębiowski M. 2025. Nanoparticles as new antifungals in the prevention of bovine mycotic mastitis caused by *Candida spp.* and *Diutina spp.* – in vitro studies. *Molecules*. 30, 2086. <https://doi.org/10.3390/molecules30102086>
4. Kot M., Jabłońska W.M., Lange A., Kalińska A., Gołębiowski M. 2026. Nanomaterials in the management of fungal udder inflammation in cattle as an effective preventive strategy based on in vitro studies. *Biology* 15, 412. <https://doi.org/10.3390/biology15050412>

Należy podkreślić, że publikacje stanowiące rozprawę doktorską zostały opublikowane w latach 2023-2026, co oznacza „młodość” pracę badawczą z najnowszymi wynikami badań. Wymienione wyżej oryginalne prace naukowe Doktorantka opublikowała w czasopismach z tzw. listy JCR, której czasopisma posiadają wysoki współczynnik wpływu w postaci Impact Factor i są wysoko punktowane przez MNiSW. Do czasopism tych należą: *International Journal of Molecular Sciences* (MNiSW=140 pkt; IF=4,9), *Nanotechnology, Science and Applications* (MNiSW=200 pkt; IF=2,4), *Molecules* (MNiSW=140 pkt; IF=4,6), *Biology* (MNiSW=100 pkt; IF=3,5). A zatem łączna punktacja, liczona według listy MNiSW za rok wydania prac, wynosi 580 pkt, natomiast IF jest imponująco wysoki i wynosi 15,4. Dobór publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej nie budzący żadnych zastrzeżeń, merytorycznie związany z tematem dysertacji, celem i uzyskanymi wnioskami uznać należy za niezwykle trafny.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wiodącym tematem 4 publikacji, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, jest ocena in vitro przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno - grzybiczych. W tym celu Doktorantka doskonale zaplanowała, metodycznie dokładnie opisała i wykonała 4 tematycznie połączone doświadczenia naukowe.

W doświadczeniu pierwszym wykorzystano hydrokoloidy AgNPs, AuNPs, CuNPs, FeNPs i PtNPs, zakupione w firmie Nano-Tech Polska (Warszawa). Materiał biologiczny obejmował próbki tkanek, ropę, ropę z domieszka krwi oraz różnego rodzaju wymazy pobrane od bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, u których zdiagnozowano kulawizny. Z pobranego materiału biologicznego izolowano mikroorganizmy, które następnie poddawano ocenie przeżywalności patogenów w warunkach tlenowych i beztlenowych po zastosowaniu różnych stężeń badanych NPs.

W drugim doświadczeniu wykorzystano NPs hydrokoloidalne Ag, Au, Cu i Pt, zakupione również w firmie Nano-tech (Polska), natomiast FeNPs w formie proszku pozyskano w firmie 3D – nano (Kraków, Polska). Materiał badawczy stanowiły próbki mleka ćwiartkowego pochodzącego od krów z zapaleniem wymienia (LKS > 200 000/ml), które Doktorantka pobrała z gospodarstw w okresie od lipca 2021 r. do marca 2022 r. Z pobranego mleka izolowano mikroorganizmy do dalszych badań. Komórki nabłonka gruczołu mlekowego bydła BME - UV1 zostały zakupione w banku komórek Instytutu Zooprofilaktycznego Lombardii i Emilii - Romanii (Włochy), natomiast ludzkie komórki HMEC pozyskano od firmy Thermo Fisher Scientific. Wspomniane linie komórkowe następnie poddawane były testom cytotoksyczności z wykorzystaniem NPs.

W trzecim i czwartym doświadczeniu użyto hydrokoloidalne AgNPs, AuNPs, CuNPs i PtNPs zakupione od firmy Nano - Tech Polska, natomiast FeCNP's pokryte węglem w formie proszku pozyskano od firmy 3D - nano (Polska). Materiał badawczy w tym doświadczeniu również stanowiły próbki mleka ćwiartkowego pochodzącego od krów z zapaleniem wymienia (LKS>200 000/ml), pobrane z gospodarstw, które znajdowały się w województwach mazowieckim i podlaskim (P3) oraz od krów utrzymywanych w Rolniczej Stacji Doświadczalnej Wilanów - Obory w Polsce (województwo mazowieckie), stanowiącej integralną część Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (P4). Następnie z pobranego mleka izolowano mikroorganizmy do dalszych badań.

Śledząc metodykę dotyczącą wykonanych analiz laboratoryjnych należy podkreślić ich poprawność, mnogość, różnorodność i precyzyjność poczynając od określenia morfologii nanocząsteczek

oraz właściwości fizykochemicznych nanocząsteczek, a także izolacji mikroorganizmów z materiału biologicznego i ich identyfikacji. Dość ważnym elementem badań była identyfikacja wyhodowanych mikroorganizmów przy użyciu precyzyjnego aparatu MALDI – TOF MS (Bruker-Polska) oraz urządzenia VITEK 2 (bioMérieux – Polska), gdyż wykorzystanie tych aparatów pozwoliło na identyfikację patogenów, które wcześniej nie było łączone z chorobą. Aparatura ta jest obecnie szeroko stosowana w laboratoriach mikrobiologii klinicznej ze względu na swój duży potencjał diagnostyczny, wynikający z rozwoju spektrometrii mas z jonizacją/desorpcją laserową wspomaganą matrycą z analizą czasu przelotu. Wykorzystanie tej aparatury pozwala na uzyskanie bardziej dokładnych wyników aniżeli w przypadku standardowej identyfikacji mikrobiologicznej.

Każde z omawianych doświadczeń wymagało oddzielnych analiz statystycznych, które przeprowadzono przy użyciu aktualnego oprogramowania statystycznego STATGRAPHICS centurion XVII, wersja 17.2.05 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) przy użyciu analizy wariancji ANOVA i dobrze dobranych testów weryfikujących. W doświadczeniu 2, 3 i 4 wyniki badań cytotoksyczności NPs na linie komórkowe BME - UV1 i HMEC zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu wielowymiarowej analizy wariancji (ANOVA) z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 8 (wersja 9.2.0, San Diego, CA, USA). Różnice między grupami analizowano za pomocą testu Dunnetta (doświadczenie 2) i testu Tukey'a (doświadczenia: 3 i 4). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi. Różnice o wartości $p \leq 0,05$ uznano za statystycznie istotne.

W pierwszej pracy pt.: „In vitro studies of nanoparticles as a potentially new antimicrobial agent for the prevention and treatment of lameness and digital dermatitis in cattle” (tłumaczenie: „Badania in vitro nanocząsteczek jako potencjalnie nowego środka przeciwdrobnoustrojowego w zapobieganiu i leczeniu kulawizny i zapalenia skóry palców u bydła”) Doktorantka dokonała oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej Ag, Au, Cu, Pt, Fe/FeC NPs oraz wybranych nanokompleksów wobec patogenów izolowanych od bydła ze zdiagnozowanym *mastitis* i kulawiznami. Należy wyraźnie zaznaczyć, że jest to dość wartościowy etap badań, który dotyczy kompleksowego podejścia dotyczącego zarówno charakterystyki fizykochemicznej wykorzystanych nanocząstek, jak również oceny ich aktywności biologicznej wobec mikroorganizmów izolowanych bezpośrednio z materiału biologicznego pochodzącego od chorych zwierząt. Zastosowanie technik TEM oraz analizy potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej metodą DLS pozwoliło na właściwą charakterystykę badanych nanomateriałów, co jest istotne z uwagi na fakt, że właściwości fizykochemiczne nanocząstek w znacznym stopniu determinują ich aktywność biologiczną. Uzyskane wyniki potwierdziły zróżnicowanie analizowanych nanomateriałów pod względem wielkości, tendencji do agregacji oraz właściwości powierzchniowych.

Wyniki jakie Doktorantka uzyskiwała w tych badaniach wnoszą istotny wkład w poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania chorób racic u bydła, w szczególności kulawizn. W pracy oceniono właściwości przeciwdrobnoustrojowe NPs wobec mikroorganizmów wyizolowanych z materiału biologicznego pochodzącego od krów z objawami kulawizn, takich jak *Sphingomonas paucimobilis*, *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum gallinifaecis* oraz *Actinomyces odontolyticus*. Istotnym i ważnym elementem tych badań jest to, że drobnoustroje te nie były wcześniej jednoznacznie wiązane z kulawiznami, co rozszerza aktualny stan wiedzy na temat etiologii tej choroby. Uzyskane wyniki wykazały, że właściwości biobójcze NPs są zależne od ich rodzaju oraz stężenia. Najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazały AgNPs oraz CuNPs, które znacząco redukowały przeżywalność badanych patogenów nawet przy stosunkowo niskich stężeniach. PtNPs oraz FeNPs wykazywały bardzo ograniczoną aktywność, a w niektórych przypadkach obserwowano nawet wzrost przeżywalności bakterii, co wyklucza ich zastosowanie terapeutyczne w analizowanym zakresie. Szczególnie istotnym wynikiem było potwierdzenie efektu synergii pomiędzy NPs. Nanokompleksy, zwłaszcza AgCuNPs, wykazywały wyraźnie silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe niż pojedyncze NPs, prowadząc do niemal całkowitej redukcji przeżywalności patogenów nawet przy niższych stężeniach.

Z badań opublikowanych w pierwszej omawianej w dysertacji pracy wynika potrzeba ich kontynuowania, a ponieważ interpretacja wyników oparta została głównie na modelu in vitro istnieje konieczność bezpośredniego przeniesienia uzyskanych efektów na warunki kliniczne, co wymaga dalszych

badan, szczególnie obejmujacych ocenę bezpieczenstwa stosowania oraz skuteczności w warunkach in vivo. Za takim działaniem przemawia również fakt, że wykazane zróżnicowanie wrażliwości poszczególnych drobnoustrojów potwierdza złożony, wieloczynnikowy charakter kulawizn.

W drugiej publikacji pt.: „Evaluation of the antimicrobial, cytotoxic and physical properties of selected nano-complexes in bovine udder inflammatory pathogen control” (tłumaczenie: „Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych, cytotoksycznych i fizycznych wybranych nanokompleksów w zwalczaniu patogenów zapalnych wymienia bydła”) Doktorantka wykonała kompleksową ocenę właściwości przeciwdrobnoustrojowych, cytotoksycznych i fizykochemicznych wybranych NPs oraz nanokompleksów wobec patogenów izolowanych z mleka pochodzącego od krów ze zdiagnozowanym mastitis. Zakres badań obejmował: analizę przeżywalności drobnoustrojów izolowanych z mleka po działaniu Ag, Au, Cu, Fe, Pt NPs i wybranych kompleksów powstałych poprzez połączenie dwóch rodzajów NPs w stosunku 1:1, hodowlę komórek BME - UV1 i HMEC oraz ocenę żywotności komórek BME - UV1 i HMEC po traktowaniu nanocząstkami. Żywotność komórek przeprowadzano metodą analizy aktywności metabolicznej z wykorzystaniem testu PrestoBlue HS (Thermo Fisher Scientific). Badanie wykonano w trzech niezależnych eksperymentach, każdy w trzech powtórzeniach.

Analizując uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań należy zwrócić uwagę, że z materiału biologicznego wyizolowała 10 mikroorganizmów: *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus sciuri*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter koseri*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* oraz *Prototheca* sp. Przeprowadzona charakterystyka fizykochemiczna wykazała, że badane nanocząstki charakteryzowały się głównie sferyczną morfologią, różniły się wielkością, potencjałem zeta oraz skłonnością do aglomeracji. Największą stabilność dyspersji wykazywały AgNPs i FeNPs, natomiast kompleksy AgCuNPs i AuCuNPs cechowały się potencjałem zeta bliższym wartości 0, co wskazuje na mniejszą stabilność koloidalną. Jednocześnie AgNPs odznaczały się najmniejszą średnicą hydrodynamiczną, podczas gdy CuNPs wykazywały największą tendencję do tworzenia aglomeratów. Na uwagę zasługuje również przeprowadzona ocena cytotoksyczności wobec linii komórkowych BME-UV1 i HMEC. Wyniki wykazały, że większość analizowanych nanocząstek charakteryzowała się niską cytotoksycznością w badanym zakresie stężeń, natomiast większą toksyczność wykazywały CuNPs oraz kompleksy zawierające miedź. Uzyskane rezultaty zwiększają wartość aplikacyjną badań, ponieważ pozwalają jednocześnie ocenić skuteczność przeciwdrobnoustrojową oraz bezpieczeństwo potencjalnego zastosowania badanych nanomateriałów. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały zróżnicowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych nanocząstek. Najwyższą skutecznością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą charakteryzowały się AgNPs, nieco słabszą CuNPs, natomiast AuNPs wykazywały umiarkowaną aktywność. Z kolei FeNPs i PtNPs nie wykazywały istotnego działania biobójczego, dlatego zasadnie wyłączono je z dalszych etapów badań. Jednocześnie wykazano wyraźne różnice we wrażliwości poszczególnych gatunków drobnoustrojów na działanie nanocząstek, co potwierdza konieczność indywidualnej oceny ich potencjału przeciwdrobnoustrojowego. Za szczególnie cenny rezultat należy uznać wykazanie przewagi nanokompleksów AgCuNPs, AgAuNPs oraz AuCuNPs nad pojedynczymi nanocząstkami. Doktorantka wykazała, że kompleks AgCuNPs osiągał najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową, potwierdzając hipotezę o synergistycznym oddziaływaniu nanocząstek metali. Szczególnie wysoka aktywność kompleksów zawierających srebro i miedź stanowi ważną obserwację z punktu widzenia dalszego projektowania nanomateriałów o zwiększonej skuteczności biologicznej.

W kolejnej 3 oryginalnej pracy twórczej pt.: „Nanoparticles as new antifungals in the prevention of bovine mycotic mastitis caused by *Candida spp.* and *Diutina spp.* – in vitro studies” (tłumaczenie: „Nanocząsteczki jako nowe leki przeciwgrzybicze w profilaktyce grzybiczego zapalenia gruczołu mlekowego u bydła wywołanego przez *Candida spp.* i *Diutina spp.* – badania in vitro”) Doktorantka koncentrowała się na grzybiczym mastitis wywoływanym przez *Candida spp.* i *Diutina spp.* Zakres pracy obejmował izolację i identyfikację grzybów z mleka krów z subklinicznym mastitis, ocenę właściwości fizykochemicznych NPs, analizę przeżywalności szczepów po ekspozycji na nanomateriały oraz wrażliwości na standardowe leki przeciwgrzybicze. Doktorantka wyizolowała i zidentyfikowała

następujące grzyby: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Diutina rugosa* var. *rugosa*, *Diutina catemulata*, *Diutina rugosa*. Przed oceną aktywności przeciwgrzybiczej przeprowadziła szczegółową charakterystykę fizykochemiczną nanocząstek. Wszystkie badane nanocząstki miały zasadniczo sferyczną morfologię, z wyjątkiem CuNPs, dla których obserwowano nieregularności mogące świadczyć o zanieczyszczeniach lub specyfice procesu syntezy. Analiza potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej wykazała zróżnicowaną stabilność koloidalną poszczególnych układów – najwyższą stabilnością charakteryzowały się AgNPs oraz kompleks AgPtNPs, natomiast CuNPs i FeCNPs wykazywały największą skłonność do aglomeracji.

Analiza aktywności przeciwgrzybiczej wykazała wyraźne różnice pomiędzy badanymi nanocząstkami. Najwyższą skutecznością wobec izolatów *Candida* spp. i *Diutina* spp. charakteryzowały się AgNPs, które utrzymywały wysoką aktywność w całym zakresie badanych stężeń. CuNPs wykazywały nieco słabsze, lecz nadal wysokie działanie przeciwgrzybicze, natomiast AuNPs były skuteczne głównie w wyższych stężeniach, a przy niższych obserwowano nawet zjawisko hormezy. Najniższą aktywność wykazywały FeCNPs i PtNPs, dlatego zostały wykluczone z dalszych badań nad nanokompleksami. Wyniki potwierdziły, że skuteczność przeciwgrzybicza nanocząstek zależy zarówno od rodzaju zastosowanego metalu, jak i jego stężenia.

Należy podkreślić, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę w tej części badań mają istotne znaczenie aplikacyjne, gdyż wskazują kompleks AgCuNPs jako najbardziej obiecujący układ do dalszych badań nad alternatywnymi metodami zwalczania grzybiczego mastitis bydła. Ocena wrażliwości wyizolowanych grzybów na standardowe leki przeciwgrzybicze wykazała zróżnicowaną podatność poszczególnych gatunków. Najwyższą skuteczność wykazywały preparaty zawierające kaspofunginę (KCA) oraz flucytozynę (FY), natomiast najmniejszą aktywność odnotowano dla flukonazolu, wobec którego część izolatów była niewrażliwa. Wyniki te potwierdzają narastający problem zróżnicowanej lekowrażliwości patogenów wywołujących grzybicze mastitis oraz uzasadniają poszukiwanie alternatywnych metod terapii, w tym z wykorzystaniem nanocząstek i ich kompleksów.

Publikacja 4 pt.: „Nanomaterials in the management of fungal udder inflammation in cattle as an effective preventive strategy based on in vitro studies” (tłumaczenie: „Nanomateriały w leczeniu grzybiczego zapalenia wymienia u bydła jako skuteczna strategia profilaktyczna w oparciu o badania in vitro) stanowi rozwinięcie badań nad grzybiczym mastitis i dotyczy rzadziej izolowanych, ale klinicznie istotnych gatunków grzybów związanych z zapaleniem wymienia bydła. Zakres podjętych badań obejmował izolację i identyfikację siedmiu gatunków grzybów z mleka krów z subklinicznym mastitis, ocenę wpływu Ag, Au, Cu, FeC, Pt NPs oraz kompleksów AgCu, AgAu i AuCu na ich przeżywalność, a także ocenę wrażliwości na osiem standardowych preparatów przeciwgrzybiczych. Wyniki identyfikacji patogenów wykazały, że wyizolowane szczepy to: *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces pararugosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida mucoides*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida hoffmannii*, *Kluyveromyces marxianus*. Przeprowadzona charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek potwierdziła ich prawidłową, głównie sferyczną morfologię, oraz zróżnicowane właściwości powierzchniowe i tendencję do tworzenia aglomeratów zależną od rodzaju nanomateriału. Jedynie w przypadku CuNPs obserwowano obecność zanieczyszczeń, jednak ogólna charakterystyka badanych układów nie wykazała istotnych nieprawidłowości mogących ograniczać ich zastosowanie w dalszych analizach biologicznych.

Ocena aktywności przeciwgrzybiczej pojedynczych nanocząstek wykazała zróżnicowaną skuteczność zależną zarówno od rodzaju nanomateriału, jak i gatunku badanego grzyba. Najwyższą aktywność wykazywały AgNPs i CuNPs, które znacząco ograniczały przeżywalność większości analizowanych izolatów, choć obserwowano różnice wrażliwości pomiędzy poszczególnymi gatunkami. AuNPs charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością, skuteczną głównie wobec wybranych szczepów przy wyższych stężeniach, natomiast FeCNPs i PtNPs wykazywały ograniczone działanie przeciwgrzybicze. Uzyskane wyniki potwierdziły, że skuteczność nanocząstek wobec grzybów izolowanych z mleka krów z mastitis jest zależna od specyfiki badanego patogenu oraz właściwości zastosowanego nanomateriału. W badaniach oceniono aktywność przeciwgrzybiczą pojedynczych nanocząstek (Ag, Au, Cu, FeC i Pt) wobec grzybów wyizolowanych z mleka pochodzącego od krów z



mastitis. Najwyższą skuteczność wykazywały AgNPs oraz CuNPs, które znacząco ograniczały przeżywalność większości analizowanych szczepów, szczególnie *Pichia kudriavzevii*, *Candida mucoides* oraz *Wickerhamomyces anomalus*. AuNPs charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością, natomiast FeNPs wykazywały ograniczone działanie przeciwgrzybicze. Najłagodniejszy efekt obserwowano dla PtNPs, które nie powodowały istotnego zahamowania wzrostu większości badanych mikroorganizmów.

W przeprowadzonych testach dyfuzyjno-krążkowych wykazano zróżnicowaną wrażliwość analizowanych grzybów na zastosowane substancje przeciwgrzybicze. Największą aktywność wykazywały ketokonazol (KCA10) oraz klotrimazol (CTM10), szczególnie wobec *Wickerhamomyces pararugosa*, dla którego uzyskano największe strefy zahamowania wzrostu. Wysoką skuteczność KCA10 obserwowano również wobec *Wickerhamomyces anomalus* oraz *Candida mucoides*. Najmniejszą aktywność wykazywały flukonazol (FCN10) oraz amfoterycyna B (AMB20), a jednym z najbardziej opornych szczepów była *Pichia kudriavzevii*. Uzyskane wyniki potwierdziły, że skuteczność preparatów przeciwgrzybiczych jest zależna od gatunku patogenu, co ma istotne znaczenie przy doborze odpowiedniej strategii terapeutycznej w przypadku grzybiczych zakażeń wymienia.

Reasumując, uważam że rozprawa doktorska jako całość odznacza się oryginalnością, bowiem jest efektem przeprowadzonych wielu różnorodnych badań naukowych, które mgr inż. Magdalena Kot przeprowadziła pod kierunkiem Promotora Pana prof. Marcina Gołębiewskiego oraz promotora pomocniczego dr inż. Aleksandry Kalińskiej. Wnioski końcowe rozprawy doktorskiej przedstawione przez Doktorantkę są konkretne i adekwatne do przeprowadzonych badań naukowych ściśle związanych z tematem rozprawy, jak też przedstawionymi hipotezami badawczymi oraz celami, stanowiąc istotny wkład w poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania chorób racic u bydła, w szczególności kulawizn. W pracy wyizolowano z materiału biologicznego pochodzącego od krów z objawami kulawizn, drobnoustroje, które wcześniej nie były jednoznacznie wiązane z kulawiznami, co poszerza aktualny stan wiedzy na temat chorób kończyn u bydła. Uzyskane wyniki wykazały, że właściwości biobójcze NPs są zależne od ich rodzaju oraz stężenia. Szczególnie istotnym wynikiem było potwierdzenie efektu synergii pomiędzy NPs. Nanokompleksy, zwłaszcza AgCuNPs, wykazywały wyraźnie silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe niż pojedyncze NPs, prowadząc do niemal całkowitej redukcji przeżywalności patogenów nawet przy niższych stężeniach. Jednocześnie wykazano zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych drobnoustrojów, co potwierdza złożony, wieloczynnikowy charakter kulawizn. Ważnym elementem badań jest to, że koncentrowały się one na ocenie potencjału NPs jako alternatywy dla antybiotyków w kontroli mastitis u bydła mlecznego. Szczególnie istotne było potwierdzenie, że nanokompleksy, w tym przede wszystkim AgCuNPs, wykazują znacznie wyższą skuteczność niż pojedyncze NPs, co potwierdza efekt synergii oraz wykazanie, że przy niskich stężeniach NPs nie wykazują istotnej toksyczności, co ma kluczowe znaczenie dla ich potencjalnego zastosowania w praktyce. Uzyskane wyniki wskazują, że NPs, szczególnie w formie kompleksów, mogą stanowić skuteczną alternatywę dla antybiotyków w leczeniu mastitis. Jednakże ich zastosowanie w praktyce wymaga dalszych badań, zwłaszcza w warunkach *in vivo*. Uzyskane wyniki dotyczące oceny właściwości przeciwgrzybiczych NPs wobec patogenów izolowanych z mleka krów z subklinicznym mastitis świadczą, że AgNPs, CuNPs oraz AuNPs wykazują istotną aktywność przeciwgrzybiczą, przy czym ich skuteczność jest zależna od stężenia oraz gatunku mikroorganizmu a kluczowe znaczenie ma efekt synergii. Nanokompleksy, szczególnie AgCuNPs, wykazywały znacznie wyższą skuteczność niż pojedyncze NPs. Jednocześnie dowiedziono, że PtNPs i FeNPs wykazują ograniczoną aktywność przeciwgrzybiczą, jednak w porównaniu z działaniem tych kompleksów wobec bakterii to grzyby są bardziej wrażliwe na ich działanie. Wyniki wskazują, że NPs mogą stanowić skuteczną alternatywę dla klasycznych leków przeciwgrzybiczych, zwłaszcza w przypadku szczepów opornych.

Badania, które koncentrowały się na rzadziej identyfikowanych patogenach grzybiczych związanych z mastitis wskazały, że nanokompleksy wykazują najwyższą aktywność przeciwgrzybiczą, przy czym najbardziej skuteczny jest AgCuNPs, a następnie AgAuNPs oraz AuCuNPs. Wśród pojedynczych NPs najwyższą skuteczność wykazywały AgNPs i CuNPs, natomiast AuNPs miały umiarkowaną aktywność, z kolei FeNPs i PtNPs niską. Wykazano również istotne różnice w wrażliwości

poszczególnych gatunków. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazały, że NPs mogą być skutecznym narzędziem w kontroli grzybiczego mastitis, jednak ich zastosowanie wymaga dalszych badań w warunkach *in vivo*.

Uwagi recenzenta

Wywiązując się z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka kwestii, które można wyjaśnić bądź też uwzględnić w przyszłych badaniach naukowych:

- Interpretacja wyników oparta została głównie na modelu *in vitro*, dlatego możliwość bezpośredniego przeniesienia uzyskanych efektów na warunki kliniczne wymaga dalszych badań, szczególnie obejmujących ocenę bezpieczeństwa stosowania oraz skuteczności w warunkach *in vivo*.
- W przyszłych badaniach można pogłębić analizę mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowany efekt biobójczy oraz synergistyczne działanie kompleksów nanocząstek.
- W kontekście wskazywania nanocząstek jako alternatywy dla konwencjonalnych środków przeciwdrobnoustrojowych pojawia się pytanie, czy zastosowanie nanomateriałów może wpływać na rozwój tolerancji mikroorganizmów?
- Wyniki podane przez Doktorantkę wskazują na zwiększoną skuteczność kompleksów; czy może wystąpić między nimi jakiś rodzaj interakcji?
- Przy ocenie części pracy związanej z *mastitis* pojawiają się pytania: czy nanocząstki przechodzą do mleka, czy zmieniają jego właściwości, czy mogą być usuwane podczas procesu przetwarzania mleka?
- I kolejne pytanie z tego zakresu: w doświadczeniu 2 Doktorantka wspomina o cytotoksyczności i podaje, że największą aktywność wykazały AgNPs i CuNPs. Czy nie istnieje obawa toksycznego oddziaływania na komórki nabłonka gruczołu mlekowego lub też potencjalnego wpływu na inne komórki.
- W pracy Doktorantka opisując przeżywalność niektórych szczepów wykazała, że wynosiło ono powyżej 100, pisząc, cytując: „przeżywalność wynosiła 119%” i w innym miejscu „wzrastała do 148,8% wraz ze spadkiem stężenia” – jest to dosyć interesujące zjawisko, czy mogłaby Doktorantka to wyjaśnić?

Przedstawione powyżej zapytania nie wpływają w żaden sposób na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej, a wynikają jedynie z potrzeby wyjaśnienia pewnych istotnych kwestii poruszanych przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej.

Wniosek końcowy

W konkluzji końcowej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kot pt.: „Ocena *in vitro* przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce mastitis oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno - grzybiczych” stwierdzam, że praca wnosi wiele wartościowych i nowych treści w aspekcie zdrowia wymienia i kończyn u bydła mlecznego, mających istotne znaczenie dla praktyki hodowlanej. Uwzględniając szeroki i aplikacyjny zakres prowadzonych badań przedstawiona rozprawa stanowi mocną podstawę do ubiegania się Kandydatki o stopień naukowy doktora. Podkreślając wysoką wartość naukową opublikowanych prac, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Doktorantka dowiodła wysokiej umiejętności prowadzenia badań na wysokim poziomie, uzyskiwania cennych wyników, poprawnej interpretacji i wnioskowania i publikowania prac w czasopiśmie z bardzo wysokim współczynnikiem naukometrycznym. Na taki wynik finalny rozprawy doktorskiej bez wątpienia wpływ miały także osobiste cechy Doktorantki: jej niezwykła aktywność, pracowitość i sumienność. Łącząc wszystkie te pozytywne aspekty w całość stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi mocne i ważne osiągnięcie naukowe, które nie powstałoby bez ścisłej opieki naukowej i wsparcia Promotora i Promotora pomocniczego.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Kot w 100% spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742) oraz §9 Regulaminu przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora Szkoły Głównej Gospodarstwa

Wiejskiego w Warszawie wprowadzonego Uchwałą Nr 89 – 2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 roku. W związku z powyższym przedstawiam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Kot do publicznej obrony.

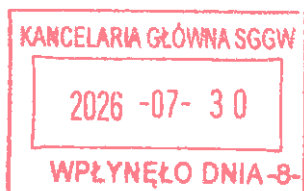
Wraz z tym stwierdzeniem, składam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy ze względu na szeroki panel badanych mikroorganizmów, porównanie wielu typów nanocząsteczek, uwzględnienie kompleksów NPs, odniesienie się w badaniach do problemu lekooporności oraz aplikacyjny charakter badań.

Olsejczak 24. lipca 2026

Miński

Olsztyn, 24.07.2026r.

Prof. dr hab. inż. Jan Miciński
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
e-mail: micinsk@uwm.edu.pl, tel. 6



Sz. P.
Dr hab. inż. Maciej Kamaszewski, prof. SGGW
Przewodniczący RDZiR
SGGW w Warszawie

Szanowny Pan Przewodniczący,

Uprzejmie informuję, że w odpowiedzi na otrzymane pismo BON.5100.26.2026 z dnia 16.06.2026r dotyczące decyzji RDZiR SGGW w Warszawie w sprawie powołania mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Kot, pt. „Ocena in vitro przeciwdrobnoustrojowych właściwości nanomateriałów w profilaktyce *mastitis* oraz kulawizn na tle zakażeń bakteryjno-grzybiczych”, przesyłam recenzję w 2 egzemplarzach.

Pragnę jednocześnie dodać, że recenzję przesłałem także w wersji „skan” w formie pdf na adres e-mail: bon@sggw.edu.pl.

Serdecznie pozdrawiam i łączę ukłony.

Z wyrazami szacunku.

102.117 29.07.2026 02 POLECONA

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI

w Olsztynie

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

Katedra Hodowli Owiec i Kóz

10-719 Olsztyn, ul. Oczipowskiego 5

tel. 89 523 38 06, tel./fax 89 524 51 05

PRIORITY

BON

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2026-07-30
WPŁYNEŁO DNIA-8-

PRIORITY

R

(00)759007734640208563



Poczta Polska

Opłata pobrana _____ zł _____ gr

2025

OPŁATA POBRANA
TAXE PERÇUE - POLOGNE
Umowa z Poczta Polska S.A.
ID 518459/W

Sr. P.

mgr Renata Chiełk

✓ Biuro Obsługi Nauki

SGGW w Warszawie

ul. Nowoursynowska 166

02-787 Warszawa

