

Autoreferat

Karol Fijałkowski

Rozprawa habilitacyjna

**Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na mikroorganizmy
oraz możliwości jego wykorzystania w procesach biotechnologicznych**

SPIS TREŚCI

1.	Habilitant	1
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	1
3.	Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
4.	Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)	2
4.1	Tytuł osiągnięcia naukowego	2
4.2	Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	2
4.3	Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	6
5.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	31

1. Habilitant

Imię i nazwisko: **Karol Fijałkowski**

Adres służbowy: al. Piastów 45
 71-311 Szczecin

Telefon: 91 449 6714

E-mail: karol.fijalkowski@zut.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2010 Doktor nauk rolniczych

Dziedzina Nauki rolnicze

Dyscyplina Zootechnika

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej

Tytuł pracy „Superantygenowe i leukocytotoksyczne czynniki wirulencji wytwarzane przez szczepy *Staphylococcus aureus* wyizolowane z mleka krów z objawami *mastitis*”

2004 Magister inżynier

Kierunek Biotechnologia

Specjalność Biotechnologia w produkcji zwierzęcej i ochronie środowiska

Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Immunologii i Mikrobiologii

Tytuł pracy „Kształtowanie się wskaźników odporności humoralnej u prosiąt noworodków i macior w okresie okołoporodowym, z uwzględnieniem białek ostrej fazy”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

03.2010 -	Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczne w Szczecinie	SZCZECIN,
DO TERAZ	Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt	POLSKA
	Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej	
	Adiunkt	
03.2009 -	Szczecińska Szkoła Wyższa Collegium Balticum	SZCZECIN,
09.2012	Lektor języka angielskiego	POLSKA
06.2007 -	University College Dublin	DUBLIN,
09.2007	School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine	IRLANDIA
	Research assistant	

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji po uzyskaniu stopnia doktora na temat:

**Analiza wpływu wirującego pola magnetycznego na mikroorganizmy
oraz możliwości jego wykorzystania w procesach biotechnologicznych**

4.2 Publikacje lub inne prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[H-1] Karol Fijałkowski, Paweł Nawrotek, Magdalena Struk, Marian Kordas, Rafał Rakoczy, 2013, The effects of rotating magnetic field on growth rate, cell metabolic activity and biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, Journal of Magnetism, 18(3), 289-296.

IF₂₀₁₃ – 0,318; 15 pkt. MNiSW₂₀₁₃

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie lub udział

w badaniach związanych z oznaczeniem badanych parametrów mikroorganizmów testowych), opracowaniu uzyskanych wyników oraz przeprowadzeniu analiz statystycznych, napisaniu i przygotowaniu manuskryptu (jako autor do korespondencji). Mój udział procentowy szacuję na 70%.

[H-2] Paweł Nawrotek, Karol Fijałkowski, Magdalena Struk, Rafał Rakoczy, Marian Kordas, 2014, Effects of 50 Hz rotating magnetic field on the viability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Electromagnetic Biology and Medicine*, 33(1), 29-34.

IF₂₀₁₄ – 1,194; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₄

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie lub udział w badaniach związanych z oznaczeniem badanych parametrów mikroorganizmów testowych), opracowaniu uzyskanych wyników, przeprowadzeniu analiz statystycznych oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

[H-3] Karol Fijałkowski, Paweł Nawrotek, Magdalena Struk, Marian Kordas, Rafał Rakoczy, 2015, Effects of rotating magnetic field exposure on the functional parameters of different species of bacteria, *Electromagnetic Biology and Medicine*, 34(1), 48-55.

IF₂₀₁₅ – 1,208; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie lub udział w badaniach związanych z oznaczeniem badanych parametrów mikroorganizmów testowych), opracowaniu uzyskanych wyników oraz przeprowadzeniu analiz statystycznych, napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

[H-4] Karol Fijałkowski, Dorota Peitler, Anna Żywicka, Rafał Rakoczy, 2016, The effect of rotating magnetic field on enterotoxins genes expression in *Staphylococcus aureus* strains, *Journal of Magnetism*, 21(1), 1-7.

IF₂₀₁₅ – 0,421; 15 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie testów Real-Time PCR) oraz opracowaniu uzyskanych

wyników, przeprowadzeniu analiz statystycznych, napisaniu i przygotowaniu manuskryptu (jako autor do korespondencji). Mój udział procentowy szacuję na 85%.

[H-5] Rafał Rakoczy, Maciej Konopacki, Karol Fijałkowski, 2016, The influence of a ferrofluid in the presence of an external rotating magnetic field on the growth rate and cell metabolic activity of a wine yeast strain, Biochemical Engineering Journal, 109, 43-50.

IF₂₀₁₅ – 2,463; 35 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy w opracowaniu koncepcji badań, udziale we wszystkich eksperymentach biologicznych (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie pomiarów szybkości wzrostu i aktywności metabolicznej drożdży), opracowaniu uzyskanych wyników oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

[H-6] Karol Fijałkowski, Anna Żywicka, Radosław Drozd, Agata Niemczyk, Adam Feliks Junka, Dorota Peitler, Marian Kordas, Maciej Konopacki, Patrycja Szymczyk, Mirosława El Fray, Rafał Rakoczy, 2015, Modification of bacterial cellulose through exposure to the rotating magnetic field, Carbohydrate Polymers, 133, 52-60.

IF₂₀₁₅ – 4,219; 40 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu eksperymentów, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, udział we wszystkich analizach badawczych), współudziale w przeprowadzeniu analiz uzyskanych wyników, napisaniu oraz przygotowaniu manuskryptu (jako autor do korespondencji), a także koordynacji prac zespołu jako kierownik projektu (Lider 5) w ramach realizacji którego powstała praca. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

[H-7] Karol Fijałkowski, Rafał Rakoczy, Anna Żywicka, Radosław Drozd, Beata Zielińska, Karolina Wenelska, Krzysztof Cendrowski, Dorota Peitler, Marian Kordas, Maciej Konopacki, Ewa Mijowska, 2016, Time dependent influence of rotating magnetic field on bacterial cellulose, International Journal of Polymer Science, 1, 2016.

IF₂₀₁₅ – 1,000; 25 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu eksperymentów, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie lub udział w badaniach związanych z analizowanymi parametrami celulozy), współudziale w przeprowadzeniu analiz uzyskanych wyników, napisaniu oraz przygotowaniu manuskryptu (jako autor do korespondencji), a także koordynacji prac zespołu jako kierownik projektu (Lider 5) w ramach realizacji którego powstała praca. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

[H-8] Karol Fijałkowski, Anna Żywicka, Radosław Drozd, Adam Junka, Dorota Peitler, Marian Kordas, Maciej Konopacki, Patrycja Szymczyk, Mirosława El Fray, Rafał Rakoczy, 2016, Increased yield and selected properties of bacterial cellulose exposed to different modes of rotating magnetic field, Engineering in Life Sciences, 2016, DOI: 10.1002/elsc.201500151.

IF₂₀₁₅ – 2,485; 25 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu eksperymentów, udziale we wszystkich eksperymentach (wybranie i przygotowanie mikroorganizmów, przygotowanie pożywek i reagentów testowych, zorganizowanie stanowiska badawczego, wykonanie lub udział w badaniach związanych z analizowanymi parametrami celulozy), współudziale w przeprowadzeniu analiz uzyskanych wyników, napisaniu oraz przygotowaniu manuskryptu (jako autor do korespondencji), a także koordynacji prac zespołu jako kierownik projektu (Lider 5) w ramach realizacji którego powstała praca. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

- ✓ Ogólna liczba punktów za jednolity cykl publikacji wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodny z rokiem ukazania się pracy wynosi 195 punktów;
- ✓ Sumaryczny Impact Factor (IF) za cykl publikacji zgodny z rokiem ukazania się pracy (w przypadku prac z 2016 roku uwzględniono IF za rok 2015) wynosi 13,308.

W przypadku wyżej wymienionych prac eksperymentalnych mam wiodący udział w badaniach, od koncepcji po opracowanie i opublikowanie wyników. Jestem koordynatorem badań prowadzonych we współpracy z kilkoma ośrodkami naukowymi, gdyż podjęte zadania wymagają wspólnego działania specjalistów z różnych dyscyplin. W prowadzonych przeze mnie badaniach udział biorą eksperci z różnych obszarów nauk inżynierskich i biologicznych, mający doświadczenie w dziedzinach związanych z inżynierią procesową, mikrobiologią, chemią i enzymologią, polimerami oraz nanotechnologią.

Nawiązana została współpraca wewnątrzinstytucjonalna na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt m.in. z Katedrą Genetyki i Hodowli Zwierząt oraz na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej z Zakładem Ciepłownictwa i Gospodarki Odpadami, Zakładem Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych, a także z Zakładem Nanotechnologii. Ponadto nawiązano współpracę z Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Centrum Zaawansowanych Technologii Wytwarzania Politechniki Wrocławskiej i Zakładem Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z uniwersytetem University College of Dublin w Irlandii.

Współpraca z ww. ośrodkami naukowymi obejmowała wspólne wykonywanie badań i analiz, wykorzystanie sprzętu oraz pomoc w interpretacji otrzymanych wyników, a także przygotowanie publikacji naukowych i zgłoszeń patentowych.

Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w załączniku nr 4.

Renata Fijałkowska

4.3 Omówienie celu naukowego w/w publikacji, jak również osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Problem naukowy, który został podjęty w ramach niniejszej rozprawy habilitacyjnej dotyczy przede wszystkim wpływu wirującego pola magnetycznego (WPM) na różne gatunki mikroorganizmów, a następnie wskazania możliwości wykorzystania uzyskanych wyników w prowadzeniu procesów biotechnologicznych. Badania związane z wpływem różnych rodzajów pól siłowych, w tym przede wszystkim pól magnetycznych (PM) na różnorodne parametry funkcjonalne oraz potencjał chorobotwórczy drobnoustrojów prowadzone są przez wielu naukowców na całym świecie. Na przestrzeni lat dowiedziono, że różne typy PM mogą wpływać na wiele procesów życiowych mikroorganizmów, jak również na ich potencjał wirulencji. Najczęściej analizowanymi parametrami drobnoustrojów poddawanych

oddziaływaniom PM są: szybkość wzrostu oraz zmiany w żywotności i w morfologii komórek (Grosman i wsp., 1992; Strašák i wsp., 2005; Gaafar i wsp., 2008; Bajpai i wsp., 2012). Zostało również udowodnione, że PM mogą wpływać na wiele funkcji biologicznych komórek innych organizmów, w tym m.in. na wydzielanie hormonów (Sun i wsp., 2010), aktywność enzymatyczną (Xie i wsp., 1997), żywotność (Davies, 1996), proliferację (Iwasaka i wsp., 2004), transport jonów (Galvanovskis i Sandblom, 1998), aktywność metaboliczną (Huang i wsp., 2006) lub syntezę i transkrypcję DNA (Phillips i wsp., 1992).

Dostępne dane literaturowe pozwalają zauważyć, że rezultaty badań, dotyczących oddziaływań różnych rodzajów PM na mikroorganizmy nie są jednoznaczne. Najczęściej obserwowanym efektem działania PM jest hamowanie wzrostu lub zmniejszenie żywotności eksponowanych mikroorganizmów (Strašák i wsp., 2002; Fojt i wsp., 2004; Strašák i wsp., 2005). Część autorów demonstrowała również brak wpływu (Kohn i wsp., 2000; Gao i wsp., 2005; László i Kutasi, 2010), a także pozytywny wpływ PM na badane mikroorganizmy (Babushkina i wsp., 2005; Justo i wsp., 2006; Cellini i wsp., 2008). Efekty biologiczne wywierane przez PM na komórki zależą w największym stopniu od rodzaju generowanego pola, a także od czasu ekspozycji oraz od rodzaju ekspozowanej komórki lub gatunku mikroorganizmu (Strašák i wsp., 2002; Fojt i wsp., 2004; Dunca i wsp., 2005). Dlatego założyć można, że w dużej mierze rozbieżności w uzyskiwanych przez różnych autorów wynikach badań związane są z różnicami między systemami generującymi PM, a tym samym z różnorodnością w generowanych polach oraz analizowanych gatunków mikroorganizmów lub szczepów w obrębie danego gatunku (Segatore i wsp., 2012).

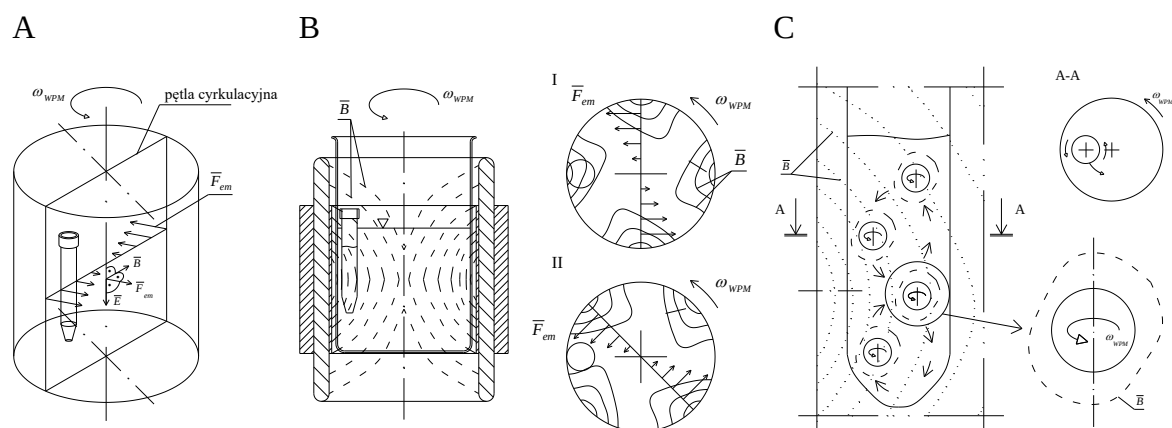
W kontekście omawianych prac badawczych można przyjąć, że PM jako przejaw pola elektromagnetycznego, to przestrzeń otaczająca magnes, w którym płynie prąd. Pole to, wywoływane jest przez poruszające się ładunki elektryczne i charakteryzuje się tym, że na znajdujące się w jego obszarze naładowane ciała i cząsteczki działa siła. Wielkością fizyczną używaną do opisu PM jest indukcja magnetyczna (B). Indukcja magnetyczna określa intensywność PM (im większa wartość indukcji magnetycznej, tym większa jest siła oddziaływania PM). W kontekście opisywanych prac badawczych, PM można podzielić na dwa główne typy: PM wywołane przez przepływ prądu stałego oraz PM wywołane przez przepływ prądu przemiennego. Pola magnetyczne wywołane przez przepływ prądu stałego nie zmieniają się w czasie, lub zmieniają się bardzo powoli. Pola takie nie mają również częstotliwości (wektor indukcji jest stały w czasie i przestrzeni). Przykładem PM wywołwanego przez przepływ prądu stałego może być statyczne pole magnetyczne (SPM). W przeciwieństwie do SPM, PM wywoływane przez przepływ prądu przemiennego zmieniają się wraz z jego

częstotliwością (f). Przykładem tego typu PM są: pulsujące pole magnetyczne (PPM), które jest zmienne w czasie, ale stałe w przestrzeni oraz wirujące pole magnetyczne (WPM), które jest stałe w czasie, lecz zmienne w przestrzeni. Wektor PPM pulsuje z częstotliwością prądu płynącego przez uzwojenie. Wirujące pole magnetyczne powstaje natomiast w obszarze superpozycji dwóch lub więcej PPM o identycznych częstotliwościach, lecz przestrzennie przemieszczonych w stosunku do siebie. Pole takie powstaje np. w stojanie w wyniku zasilenia uzwojeń i umożliwia powstanie ruchu obrotowego w silniku elektrycznym (Rakoczy, 2011).

Badania nad wpływem PM na organizmy żywe prowadzone są głównie z zastosowaniem SPM lub PPM, natomiast badania z wykorzystaniem WPM są znacznie ograniczone. Ze względu na odmienny charakter SPM, PPM i WPM, ich wpływ na organizmy żywe może być również nieporównywalny. Niemniej jednak należy zauważyć, że przeprowadzone dotychczas badania dotyczące wpływu PM na wzrost i aktywność mikroorganizmów, dostarczyły wielu ważnych, również pod względem aplikacyjnym, informacji na temat możliwości kontrolowania bioprocessów prowadzonych z wykorzystaniem mikroorganizmów. Zakłada się, że PM mogą znaleźć wiele zastosowań w różnych gałęziach biotechnologii, w tym szczególnie w medycynie, rolnictwie i przemyśle spożywczym (Dunca i wsp., 2005; Obermeier i wsp., 2009).

Wraz z intensywnym rozwojem biotechnologii ukazało się wiele prac natury doświadczalnej oraz teoretycznej, dotyczących zastosowania organizmów żywych w produkcji substancji potrzebnych człowiekowi. Zagadnienia związane z wytwarzaniem substancji z wykorzystaniem różnego typu mikroorganizmów należą obecnie do jednej z najbardziej dynamicznie rozwijającej się dziedziny badań stosowanych. Kluczowym zagadnieniem w bioprocessach realizowanych z użyciem mikroorganizmów jest uzyskanie odpowiedniej szybkości ich namnażania oraz utrzymanie ich odpowiedniej aktywności biologicznej. Determinuje to potrzebę poszukiwania i opracowywania nowych metod realizacji wielu procesów biotechnologicznych. Zapewnienie kontrolowanych i optymalnych warunków prowadzenia bioprocessów skutkuje uzyskaniem produktu o pożądanych właściwościach. Alternatywą do tradycyjnych metod kontroli i/lub intensyfikacji prowadzonych bioprocessów może być zastosowanie różnego typu PM. Prekursorem „magnetycznego wspomagania bioprocessów” był Rosensweig, który zaproponował koncepcję bioreaktora magnetycznego (Rosensweig, 1979). Pole magnetyczne było również stosowane w rozwiązaniach konstrukcyjnych wielu innowacyjnych bioreaktorów (Sada i wsp., 1981; Vangas i wsp., 1999; Gogate i wsp., 2000; Jiang i wsp., 2007).

Alternatywnym rozwiązaniem do zastosowania SPM i PPM w bioprocessach może być wykorzystanie WPM. Dzięki WPM możliwe jest wytworzenie oraz kontrolowanie warunków hydrodynamicznych sprzyjających hodowli mikroorganizmów. W płynie przewodzącym prąd elektryczny, poddanym oddziaływaniu zmiennego PM (przykładem takiego pola jest WPM) zachodzi interakcja, której efektem są siły elektromagnetyczne. Siły te (nazywane siłą Lorentza lub Laplace) są odpowiedzialne za wprawienie płynu przewodzącego w ruch obrotowy (Rakoczy, 2010). Wektor indukcji magnetycznej PM $\vec{B}$ obraca się w płaszczyźnie poziomej z prędkością kątową/pulsacją WPM. W płynie, prostopadle do linii PM, generuje się pole elektryczne $\vec{E}$. Natomiast prostopadle do linii sił pola elektrycznego wytwarzana jest siła Lorentza $\vec{F}$, która działa jako siła napędowa i siła wywołująca ruch w płynie (Rakoczy i Masiuk, 2010). Graficzna interpretacja oddziaływania WPM na płyn przewodzący prąd elektryczny została przedstawiona na rysunku 1A. Na rysunku 1B przedstawiono z kolei schemat obrazujący wpływ wytwarzanego PM na umieszczone w generatorze WPM próbki z hodowlami mikroorganizmów. Jak można zauważyć, próby poddawane są oddziaływaniu na zewnątrz przyłożone PM, które jak wspomniano powyżej wywołuje siłę napędzającą znajdujące się w medium hodowlanym cząsteczki w ruch obrotowy. Ruch medium w próbach poddanych oddziaływaniu WPM można wytłumaczyć w oparciu o *micro-level dynamo concept* (Hristov i Perez, 2011). W medium hodowlanym, pod wpływem WPM, generowane są prądy wirowe, pojawiające się w wyniku występowania w nim cząstek naładowanych elektrycznie. Obecność prądów wirowych może generować lokalne PM wokół tych jonów, które w połączeniu z zewnątrz przyłożonym PM, wywołują ruch obrotowy tych cząsteczek wokół własnej osi oraz ruchu płynu zgodnego z kierunkiem wirowania PM. Wirujące jony tworzą tzw. dynama odpowiedzialne za wywołanie efektu mikromieszania w inokulum (Mehedintu Berg, 1997; Anton-Leberre i wsp., 2010). Koncepcję mikromieszania w próbkach z medium hodowlanym zgodnie z *micro-level dynamo concept* przedstawiono graficznie na rysunku 1C. Takie mikroskopowe mieszanie może wpływać na procesy transportu pomiędzy komórkami a medium hodowlanym i zawartymi w nim składnikami odżywczymi (H-8).



Rysunek 1. Wpływ WPM na hodowle mikroorganizmów. (A) wpływ WPM na ciecz w naczyniu, w którym umieszczone są probówki z hodowlami bakteryjnymi; (B) wpływ WPM na probówki z hodowlami bakteryjnymi I i II - schemat przedstawiający zmiany w czasie rozkładu linii PM i siły elektromagnetycznej; (C) schemat przedstawiający proces mikromieszania w medium poddawanych oddziaływaniom WPM zgodny z *micro-level dynamo concept* [H-8].

Cel badawczy

Podstawowym celem publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i stanowiących podstawę o ubieganie się o stopień naukowy doktora habilitowanego, była analiza wpływu WPM na wybrane parametry życiowe oraz na potencjał patogenny wybranych mikroorganizmów, a także możliwości jego wykorzystania w procesach biotechnologicznych, poprzez oznaczenie: żywotności, wzrostu, komórkowej aktywności metabolicznej, zdolności do tworzenia biofilmu, ekspresji genów kodujących toksyny, a także wpływu na procesy biosyntezy celulozy bakteryjnej.

Szczegółowe cele

1. Analiza wpływu WPM o indukcji magnetycznej zmieniającej się w zakresie 22-34 mT i częstotliwości 1-50 Hz oraz stałym czasie ekspozycji wynoszącym 60 min na dynamikę wzrostu, komórkową aktywność metaboliczną oraz zdolność do tworzenia biofilmu przez *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*; (publikacja H-1).
2. Analiza wpływu WPM o stałej indukcji magnetycznej wynoszącej 30 mT i częstotliwości 50 Hz oraz różnym czasie ekspozycji ($t = 30-270$ min) na żywotność oraz komórkową aktywność metaboliczną *E. coli* i *S. aureus*, a także analiza efektu

poekspozycyjnego po 3,5 godzinach od zakończonej ekspozycji ($f = 50$ Hz, $B = 30$ mT, $t = 60$ min); (publikacja H-2).

3. Analiza wpływu WPM o indukcji magnetycznej zmieniającej się w zakresie 25-34 mT i częstotliwości 5-50 Hz oraz stałym czasie ekspozycji wynoszącym 60 min, na szybkość wzrostu, żywotność, komórkową aktywność metaboliczną oraz wytwarzanie biofilmu przez różne gatunki bakterii, a także analiza efektu poekspozycyjnego po 5 godzinach od zakończonej ekspozycji ($B = 34$ mT, $t = 60$ min); (publikacja H-3).
4. Analiza wpływu WPM o indukcji magnetycznej wynoszącej 34 mT i częstotliwości 50 Hz na ekspresję genów kodujących enterotoksyny u różnych szczepów *S. aureus* w zależności od długości ekspozycji ($t = 1-10$ h); (publikacja H-4).
5. Analiza wpływu WPM o indukcji magnetycznej wynoszącej 34 mT i częstotliwości 50 Hz oraz wzmocnionego obecnością ferrofluidu na szybkość wzrostu i komórkową aktywność metaboliczną szczepów *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystywanych w przemyśle winiarskim, w zależności od długości ekspozycji ($t = 1-7$ h); (publikacja H-5).
6. Analiza wpływu WPM o indukcji magnetycznej 34 mT i częstotliwości 50 Hz oraz czasie ekspozycji wynoszącym 3 dni na efektywność procesu, wybranych właściwości fizyko-chemicznych (m.in. wodochłonność, stopień krystaliczności, struktura ułożenia mikrofibryli) oraz liczby komórek *Gluconacetobacter xylinus* zdolnych do syntezy celulozy bakteryjnej; (publikacja H-6).
7. Analiza wpływu WPM o indukcji magnetycznej 34 mT i częstotliwości 50 Hz oraz czasie ekspozycji trwającej od 1 do 7 dni na wybrane właściwości fizyko-chemiczne (m.in. długość mikrofibryli, wielkość formowanych krystalitów, dynamika formowania sieci krystalicznej oraz stopień polimeryzacji) celulozy syntetyzowanej przez bakterie *G. xylinus*; (publikacja H-7).
8. Analiza wpływu różnych metod ekspozycji na WPM na efektywność procesu oraz wybranych właściwości fizyko-chemicznych (m.in. grubość mikrofibryli) celulozy syntetyzowanej przez bakterie *G. xylinus*; (publikacja H-8).

Material i metody badawcze

W przeprowadzonych pracach badawczych wykorzystano referencyjne szczepy mikroorganizmów należące do następujących gatunków: *S. aureus* (publikacje H-1, H-2, H-3), *E. coli* (publikacje H-1, H-2, H-3), *Acinetobacter baumannii* (publikacja H-3), *Pseudomonas*

aeruginosa (publikacja H-3), *Serratia marcescens* (publikacja H-3), *Streptococcus mutans* (publikacja H-3), *Cronobacter sakazakii* (publikacja H-3), *Klebsiella oxytoca* (publikacja H-3), *S. xylosus* (publikacja H-3), *S. cerevisiae* (publikacja H-4), *G. xylinus* (publikacje H-5, H-6, H-7).

Generator wirującego pola magnetycznego

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem samodzielnie skonstruowanych instalacji badawczych wyposażonych w generator WPM. Należy zaznaczyć, że pierwsza wersja prototypowego bioreaktora wspomaganego magnetycznie, wykorzystywana w części wykonywanych przeze mnie analiz, opracowana była do eksperymentów związanych z inżynierią procesową prowadzonych przez dr. hab. inż. Rafała Rakoczego prof. ZUT, z Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT w Szczecinie, z którym wspólnie zainicjowaliśmy nowy, międzywydziałowy kierunek badawczy na naszej uczelni, związany z zastosowaniem WPM do prowadzenia bioprocessów z wykorzystaniem różnych mikroorganizmów.

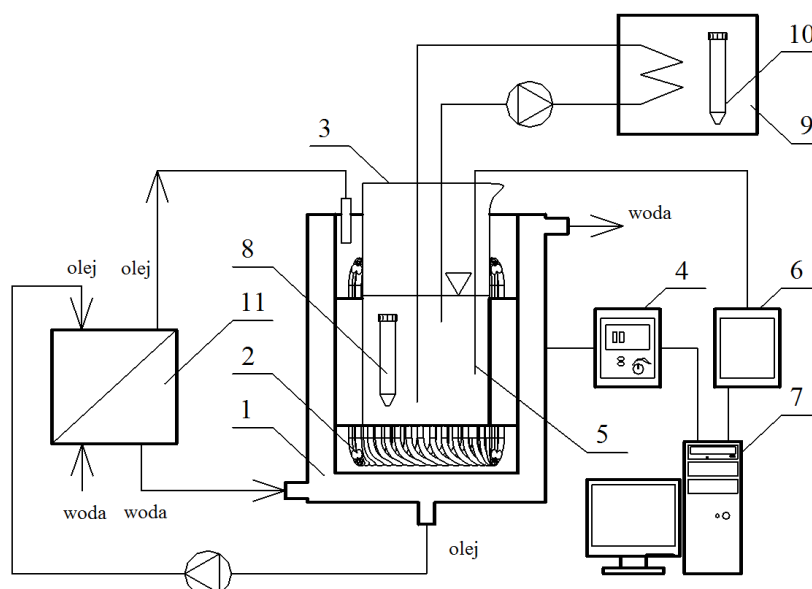
Przed rozpoczęciem eksperymentów biologicznych, w prototypowym bioreaktorze wprowadzono odpowiednie modyfikacje, umożliwiające pracę z mikroorganizmami, w których brałem czynny udział. Modyfikacje te dotyczyły m.in. wprowadzenia odpowiedniego systemu kontrolno-pomiarowego, systemu stabilizacji temperatury w celu utrzymania warunków optymalnych dla eksponowanych mikroorganizmów, systemu umożliwiającego stabilność pracy przy długotrwałej ekspozycji na WPM oraz wprowadzenie zabezpieczeń niwelujących drgania komory procesowej.

Obecnie wykonywane badania prowadzone są z wykorzystaniem nowych bioreaktorów wspomaganych WPM skonstruowanych w ramach kierowanego przeze mnie projektu Lider 5 Narodowego Centrum Badań i Rozwoju “Projekt, budowa i optymalizacja działania bioreaktora wspomaganego wirującym polem magnetycznym do produkcji celulozy bakteryjnej”.

Zarówno w pierwszej, jak i kolejnych wersjach bioreaktorów, urządzenia te składały się z generatora WPM zbudowanego ze stojanu trójfazowego uzyskanego z silnika elektrycznego oraz komory procesowej, w której w trakcie ekspozycji umieszczone były hodowle mikroorganizmów. Komora procesowa została umieszczona współosiowo w stosunku do generatora WPM i symetrycznie w stosunku do jego dolnych i górnych końców. Stojan generatora WPM zasilano 3-fazowym prądem przemiennym o częstotliwości 50 Hz. W celu zmiany częstotliwości prądu, a tym samym pulsacji PM zastosowano przemiennik częstotliwości.

Temperaturę inkubacji w czasie ekspozycji na WPM kontrolowano za pomocą systemu składającego się z termostatu, płaszcza chłodzącego oraz pompy obiegowej. System ten umożliwił uzyskanie stałego przepływu wody w płaszczu chłodzącym, a tym samym utrzymanie stałej, stabilnej temperatury w komorze procesowej. W celu lepszego zobrazowania przebiegu prowadzonych doświadczeń, schemat konfiguracji generatora WPM przedstawiono graficznie na rysunku 2.

W zależności od doświadczenia, mikroorganizmy inkubowane i ekspozowane były w probówkach o pojemnościach 15 lub 50 mL. Probówki umieszczono w generatorze w sposób, który umożliwiał jednorodne działanie PM w całej objętości hodowli bakteryjnej. W każdym doświadczeniu jako kontrole, wykorzystywano te same mikroorganizmy, inkubowane w tym samym czasie i w tych samych warunkach jak hodowle poddawane ekspozycji.



Rysunek 2. Instalacja generatora WPM wraz z układem kontrolnym: 1 – płaszcz chłodzący, 2 – generator WPM, 3 – komora procesowa, 4 – falownik, 5 – czujnik temperatury, 6 – system kontroli temperatury, 7 – komputer, 8 – probówka z hodowlą testową, 9 – łaźnia wodna (kontrola), 10 – probówka z hodowlą kontrolną, 11 – wymiennik ciepła.

Uzyskane wyniki badań

Kolejne etapy badań były następstwem wcześniej otrzymanych rezultatów, a poszczególne cele badawcze kształtowały się podczas analizy wyników przeprowadzanych doświadczeń. W zależności od celu badań i hipotezy badawczej w poszczególnych doświadczeniach

wykorzystywane były różne mikroorganizmy, zarówno bakterie jak i drożdże, w tym mikroorganizmy patogenne, jak i użyteczne człowiekowi. Doświadczenia początkowo dotyczyły podstawowych parametrów komórkowych związanych z żywotnością, wzrostem i aktywnością metaboliczną oraz zdolnością mikroorganizmów do tworzenia biofilmów, a następnie ewoluowały w kierunku bardziej złożonych mechanizmów związanych z ekspresją genów. Następnie w celu wykazania aplikacyjności WPM przeprowadzono badania z wykorzystaniem mikroorganizmów *S. cerevisiae* i *G. xylinus* charakteryzujących się potencjałem biotechnologicznym.

Prace zostały przeprowadzone etapowo. Poszczególne etapy obejmowały:

Etap 1. Analizę wpływu WPM na żywotność, szybkość wzrostu, aktywność metaboliczną i zdolność do wytwarzania biofilmu przez różne gatunki mikroorganizmów.

Etap 2. Analizę wpływu WPM na zmiany w ekspresji genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe u *S. aureus*.

Etap 3. Analizę wpływu WPM w obecności ferrofluidu na szybkość wzrostu i aktywność metaboliczną drożdży *S. cerevisiae*.

Etap 4. Analizę wpływu WPM na proces wytwarzania i właściwości celulozy bakteryjnej syntetyzowanej przez *G. xylinus*.

Etap 1

W początkowej fazie badań zdecydowano się na uwzględnienie w analizach dwóch gatunków bakterii: *S. aureus* i *E. coli*. Mikroorganizmy te można uznać za modelowe w badaniach o podobnej tematyce, gdyż większość eksperymentów związanych z analizami wpływu PM na mikroorganizmy wykonano właśnie uwzględniając te dwa gatunki (Kohno i wsp., 2000; Strašák i wsp., 2002; Justo i wsp., 2006; Gaafar i wsp., 2008; Obermeier i wsp., 2009). Wybrane mikroorganizmy charakteryzują się różnymi kształtami (kształt pałeczki w przypadku *E. coli*, kształt ziarniaka w przypadku *S. aureus*), odmienną strukturą i składem chemicznym ściany komórkowej (Gram-ujemna *E. coli* i Gram-dodatni *S. aureus*), które to cechy, według różnych autorów, mogą determinować obserwowany efekt ekspozycji na działanie PM (Strašák i wsp., 2005). Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, pozostałymi

czynnikami, od których w największym stopniu zależeć może obserwowany efekt działania PM na hodowle mikroorganizmów są: długość ekspozycji oraz parametry generowanego PM (Segatore i wsp., 2012). W przypadku WPM parametrami tymi są: częstotliwość i indukcja magnetyczna. Z tego powodu pierwsze badania rozpoczęto od przeanalizowania wpływu na hodowle mikroorganizmów WPM charakteryzującego się różną częstotliwością oraz różnymi wartościami indukcji magnetycznej (uzyskiwanymi przy określonej częstotliwości). Uzyskane wyniki wykazały intensyfikację wzrostu magnetycznie stymulowanych hodowli *E. coli* i *S. aureus* w porównaniu do nieeksponowanych hodowli kontrolnych wraz ze zwiększającą się częstotliwością i indukcją magnetyczną WPM (H-1).

W dalszej części eksperymentu, stwierdzono, że w przypadku *E. coli* stymulacja wzrostu bakterii występowała już w wyniku ekspozycji na WPM o najmniejszych wartościach PM jakie pozwalał uzyskać wykorzystywany generator ($f = 1$ Hz, $B = 22$ mT). Z kolei, w przypadku *S. aureus*, intensyfikację wzrostu obserwowano przy nieznacznie wyższych parametrach PM ($f = 5$ Hz, $B = 25$ mT). Podobne zależności stwierdzono w przypadku analizy wpływu WPM na zmiany w komórkowej aktywności metabolicznej badanych mikroorganizmów. Również w tym wypadku, WPM wpływało silniej na *E. coli* niż na *S. aureus* (H-1). Taka zależność, z jednej strony może wskazać na większą podatność na stymulacyjne działanie WPM względem *E. coli*. Jednakże z drugiej strony, może sugerować o większej oporności *S. aureus* na jego wpływ. Mittenzwey i wsp. (1996) wykazali bardzo wysoką oporność bakterii na PM, co wynikało z obecności wewnątrzkomórkowych systemów naprawczych oraz mechanizmów samoregulacji aktywnych w komórkach tych bakterii.

Pozytywne wyniki ukazujące stymulacyjny wpływ WPM na *S. aureus* i *E. coli* zachęciły do dalszego rozwijania zainicjowanego kierunku badań. Jak stwierdzili Dunca i wsp. (2005) charakter oddziaływania PM na bakterie może zależeć od czasu ekspozycji. Dlatego w kolejnym etapie przeanalizowano wpływ czasu ekspozycji hodowli *S. aureus* i *E. coli* na WPM posługując się tymi samymi badanymi parametrami, tj. szybkością wzrostu i komórkową aktywnością metaboliczną. Ustalono, że ekspozycja hodowli *E. coli* i *S. aureus* na WPM ($f = 50$ Hz, $B = 30$ mT) powoduje wyraźne zwiększenie szybkości ich wzrostu. Największe różnice obserwowane były w początkowych etapach ekspozycji, kiedy bakterie pozostawały w logarytmicznej fazie wzrostu. Stwierdzono również, że w wyniku przejścia z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu różnice w ilości komórek kontrolnych i eksponowanych zmniejszają się, co było szczególnie charakterystyczne dla *E. coli*. Uzyskane wyniki szybkości wzrostu mikroorganizmów korespondowały z wynikami uzyskanymi dla aktywności metabolicznej (H-2).

W przeprowadzonych badaniach uwzględniono również analizę tzw. efektu poekspozycyjnego. W tym celu bakterie w pierwszym etapie poddawane były ekspozycji na WPM przez 60 min ($f = 50$ Hz, $B = 30$ mT), a następnie inkubowane były w standardowych warunkach (bez ekspozycji na WPM) przez dalsze 3,5 godziny. W badaniach tych stwierdzono, że zwiększona dynamika wzrostu spowodowana wpływem WPM utrzymywała się tylko przez pierwszy okres hodowli (do 1 h), a następnie, w wyniku dalszej inkubacji szybkość wzrostu mikroorganizmów ulegała zrównaniu do poziomu obserwowanego w hodowlach kontrolnych (H-2).

W kolejnym etapie badań postanowiono przeanalizować, czy obserwowany stymulujący wpływ ekspozycji na WPM jest charakterystyczny dla większej liczby gatunków bakterii. Wykorzystując wyniki z wcześniejszych analiz, postanowiono zastosować ekspozycję trwającą jedną godzinę, przy jednoczesnym zachowaniu różnych wartości WPM ($f = 5-50$ Hz, $B = 25-34$ mT). Przeanalizowano 9 różnych gatunków bakterii, w tym *S. aureus*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *S. mutans*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca* i *S. xylosus*. Podobnie jak we wcześniejszych analizach, w badaniach uwzględniono również efekt poekspozycyjny ($f = 50$ Hz mT, $B = 34$, $t_{WPM} = 60$ min, $t_{inkubacji} = 300$ min). Udowodniono, że wraz ze wzrostem częstotliwości i indukcji magnetycznej, WPM wywierało stymulujący wpływ na szybkość wzrostu hodowli *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. mutans*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca* i *S. xylosus*. Stwierdzono również, że WPM nie powodowało zmian w szybkości wzrostu, ani nie zmieniałło aktywności metabolicznej *A. baumannii* i *P. aeruginosa* (H-3).

W oparciu o wyniki uzyskane w eksperymencie pokazującym trwałość efektu ekspozycji, w którym WPM ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT) zostało wyłączone po 60 minutach, natomiast inkubację mikroorganizmów kontynuowano przez kolejne 300 minut, stwierdzono wyraźne spowolnienie tempa wzrostu *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. mutans*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca* i *S. xylosus*, w porównaniu do wyników uzyskanych po 60 minutach ekspozycji.

Największy wpływ na aktywność metaboliczną bakterii uwzględnionych w doświadczeniu wywierało WPM o najwyższych parametrach ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT). Stwierdzono również, że gatunkami w przypadku których aktywność metaboliczna podlegała największym zmianom były: *S. aureus*, *E. coli*, *K. oxytoca* i *S. xylosus*, natomiast *S. marcescens* i *C. sakazakii* cechowały się mniejszą wrażliwością. W przypadku *S. mutans* wzrost aktywności metabolicznej zaobserwowano tylko w wyniku działania WPM o największych wartościach. Podobnie jak w przypadku analizy szybkości wzrostu, *P. aeruginosa* i *A. baumannii* okazały się niewrażliwe na ekspozycję na WPM. W wyniku dalszej analizy uzyskanych wyników ustalono, że większy wpływ na szybkość wzrostu i aktywność metaboliczną osiągnięty został

w hodowlach bakterii o kształcie pałeczek (*E. coli*, *S. marcescens*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca*) w porównaniu z komórkami o kształcie ziarniaków (*S. aureus*, *S. xylosus* and *S. mutans*), (H-3). Zależność taką zauważyli już wcześniej Strašák i wsp. (2005) i Hu i wsp. (2009), którzy stwierdzili większy wpływ PM na hodowle *E. coli*, czyli bakterii o komórkach w kształcie pałeczki. Słabszy efekt stymulacji PM obserwowany był natomiast w przypadku *S. aureus* o komórkach o kształcie sferycznym.

W badaniach uwzględniono również wpływ WPM na zdolność bakterii do wytwarzania biofilmu. Założono, że zwiększona pod wpływem WPM aktywność metaboliczna może przejawiać się również zwiększoną syntezą substancji wytwarzanych przez bakterie, w tym m.in. substancji zaangażowanych w wytwarzanie biofilmu. Stwierdzono, że 1-godz. ekspozycja na WPM ($f = 1$ Hz, $B = 22$ mT oraz $f = 5$ Hz, $B = 25$ mT) nie powodowała istotnych zmian związanych z ilością wytwarzanego biofilmu przez *S. aureus* i *E. coli*. Natomiast wyższe wartości WPM ($f = 25$ Hz, $B = 29$ mT oraz $f = 50$ Hz, $B = 34$ mT) wpływały stymulująco na ilość tworzącej się warstwy komórek tych gatunków bakterii (H-1). Podobne rezultaty zostały uzyskane również dla innych gatunków mikroorganizmów, w tym *S. marcescens*, *S. mutans*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca* i *S. xylosus*. Ustalono również, że gatunkami, które wykazywały największą podatność na WPM pod względem wytwarzanego biofilmu były *E. coli*, *C. sakazakii*, *S. marcescens* i *K. oxytoca*. Przy czym, w tym wypadku to nie WPM o najwyższych parametrach ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT), ale o wartościach wynoszących $f = 25$ Hz, $B = 29$ mT okazały się mieć największy wpływ na ilość wytwarzanego biofilmu. W związku z tym, wykazano, że w przeciwieństwie do dynamiki wzrostu i aktywności metabolicznej, obserwowany efekt WPM na wytwarzanie biofilmu nie był zależny proporcjonalnie od częstotliwości i indukcji magnetycznej. Zmniejszenie ilości tworzonego biofilmu w wyniku ekspozycji na WPM odnotowano tylko w przypadku hodowli *A. baumannii* i *P. aeruginosa* (H-3).

Etap 2

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w pierwszych trzech eksperymentach, które wykazały pozytywny wpływ WPM na badane parametry u większości analizowanych gatunków bakterii, w kolejnym etapie badań postanowiono przeanalizować czy ekspozycja na tego typu PM może wpływać na potencjał patogeny mikroorganizmów. Do badań wytypowano czynniki wirulencji (toksyny), których indukcja podlega regulacji bodźcami środowiskowymi. W przeprowadzonym eksperymencie analizie poddano wpływ WPM na zmiany w ekspresji

genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe u *S. aureus*. Wybór tego zagadnienia badawczego związany był także z drugim, ważnym dla mnie kierunkiem badawczym, który dotyczy bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz koncentruje się na analizach czynników wirulencji wytwarzanych przez te bakterie, w tym w szczególności produkowanych przez nie toksyn.

Ponadto, na podstawie przeglądu literatury patentowej, stwierdzono, że WPM może być stosowane w różnych urządzeniach do przetwarzania żywności. Tak więc, można założyć, że podczas przetwarzania surowców spożywczych może dochodzić do ekspozycji na tego typu PM. Jako przykłady można wymienić tu następujące wynalazki: “Food processing apparatus including magnetic drive” w tłumaczeniu na język polski „Urządzenie do przetwarzania żywności z napędem magnetycznym” (CA 2505561 A1), “Magnetic drive for food processing apparatus” w tłumaczeniu na język polski “Napęd magnetyczny dla urządzeń przetwórstwa spożywczego” (US 20100214867 A1) czy “Apparatus for processing of foodstuffs with magnetic drive” w tłumaczeniu na język polski „Urządzenie do obróbki surowców spożywczych z napędem magnetycznym” (DE 60317091 D1). Dlatego można przypuszczać, że bakterie występujące w żywności (jako zanieczyszczenia lub występujące naturalnie), podczas jej przetwarzania z wykorzystaniem magnetycznie wspomaganych urządzeń mogą również podlegać ekspozycji na PM.

W tym kontekście podkreślić należy, że bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, w tym przede wszystkim gatunek *S. aureus* zaliczane są do dominujących mikroorganizmów powodujących zatrucia pokarmowe. Schorzenie to wynika ze spożywania pokarmów zawierających jedną (lub więcej) enterotoksyn (SE). Do tzw. klasycznych enterotoksyn zalicza się 5 różnych toksyn: SEA, SEB, SEC, SED, SEE (Argudín i wsp., 2010). Wykazano również, że geny kodujące enterotoksyny, charakterystyczne dla *S. aureus*, mogą być również obecne u innych gatunków gronkowców, w tym gatunków wywołujących zatrucia pokarmowe (Batista et al., 2013; Podkowik et al., 2016).

Potwierdzone zostało, że ekspresja genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe w największej mierze zależy od czynników środowiskowych, a także od fazy wzrostu i gęstości hodowli oraz od szczepu bakterii (Schelin i wsp., 2011). Dlatego badania w ramach etapu 2 przeprowadzone zostały z wykorzystaniem różnych szczepów *S. aureus*, których hodowle prowadzone były przez różny czas, pozwalający osiągnąć kolejne fazy wzrostu ekspozowanych mikroorganizmów.

Dotychczas przeprowadzone doświadczenia pokazały, że maksymalna produkcja enterotoksyn B, C i D osiągana jest podczas przejścia z logarytmicznej do stacjonarnej fazy

wzrostu. Zostało również potwierdzone, że poza enterotoksyną A, produkcja enterotoksyn B, C, D i E jest regulowana przez zależny od czynników środowiskowych główny system regulatorowy (*agr*, accessory gene regulator), (Derzelle i wsp., 2009). W badaniach własnych, stwierdzono, że ekspozycja na WPM powodowała zmiany w ekspresji wszystkich enterotoksyn gronkowcowych uwzględnionych w doświadczeniu. W środkowej części fazy logarytmicznego wzrostu stwierdzono widoczny wzrost w poziomie ekspresji genów podlegających regulacji przez system *agr* (*seb*, *sec*, *sed* i *see*). Pośród badanych genów, największy wzrost ekspresji w porównaniu do nieeksponowanych kontroli odnotowano dla genu *seb*. Stwierdzono również, że dalsza ekspozycja, do końcowej fazy logarytmicznego wzrostu powodowała obniżenie się poziomu ekspresji tego genu. Ekspresja genu *sec*, *sed* i *see* pozostawała natomiast na zwiększonym poziomie w porównaniu do kontroli. Następnie, w wyniku dalszej ekspozycji, do czasu osiągnięcia stacjonarnej fazy wzrostu, ekspresja tych genów zmniejszyła się poniżej poziomu odnotowywanego dla kontroli. Ponadto stwierdzono, że ekspresja genu *sea* pozostawała na niższym poziomie w porównaniu do kontroli, bez względu na fazę wzrostu bakterii (H-4). Wyniki uzyskane w badaniach własnych częściowo odzwierciedlają rezultaty wcześniejszych prac, w których analizowano różne czynniki wpływające na zmiany w ekspresji genów kodujących enterotoksyny. Jako przykład, wykazano, że w wyniku modyfikacji składu pożywki, ekspresja genu enterotoksyny SEC, która jak wspomniano wcześniej regulowana jest przez system *agr*, była hamowana (Tremaine i wsp., 1993), natomiast w przypadku genu *sea*, który nie podlega regulacji przez system *agr* nie zmieniała się (Even i wsp., 2009).

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono także stymulujący wpływ WPM na szybkość wzrostu *S. aureus*. Dodatkowo wykazano, że obserwowany efekt ekspozycji na WPM nie zależał od szczepu *S. aureus* (H-4).

Etap 3

Uzyskane wyniki, które wykazały stymulujący wpływ WPM wobec większości uwzględnionych w eksperymentach gatunków bakterii zachęciły do wykonania pierwszych doświadczeń mających na celu wykazanie wartości aplikacyjnej WPM. W badaniach tych, postanowiono przeanalizować czy odnotowana we wcześniejszych eksperymentach stymulacja wzrostu i aktywności metabolicznej prokariotycznych bakterii w wyniku ekspozycji na WPM, będzie obserwowana również u eukariotycznych drożdży. Ponieważ ustalono, że parametry takie jak szybkość wzrostu hodowli drobnoustrojów, czy ich aktywność metaboliczna wzrastają wraz z intensywnością PM, w doświadczeniu postanowiono wzmocnić oddziaływanie

generowanego WPM poprzez zastosowanie ferrofluidu. W tym celu ferrofluidem wypełniona została komora procesowa, która otoczona została cewką elektryczną generatora WPM. W komorze z ferrofluidem umieszczono probówki z hodowlami drożdży.

Ferrofluid, inaczej nazywany również cieczą magnetyczną lub ferrocieczą, to substancja o właściwościach możliwie zbliżonych do cieczy, silnie reagująca na oddziaływania magnetyczne. W badaniach założono, że zastosowanie ferrofluidu może zintensyfikować stymulacyjny wpływ wywierany na komórki drożdży. Badania wykazały jednak, że w przeciwieństwie do bakterii, WPM powodowało zmniejszenie szybkości wzrostu drożdży oraz ich aktywności metabolicznej. Ponadto zaobserwowano, że w przypadku drożdży oddziaływania WPM były zależne szczepowo (H-5).

Do tej pory przeprowadzonych zostało kilka różnych eksperymentów, w których analizowano proliferację drożdży w odpowiedzi na działanie PM. Mehedintu i Berg (1997) wykazali, że liczba komórek drożdży zmniejszyła się pod wpływem PM o indukcji magnetycznej równej $B = 0,2$ mT i zwiększyła się w przypadku kiedy indukcja wynosiła $B = 0,5$ mT. Fiedler i Grobner (1995) badali wpływ PPM ($f = 50$ Hz, $B = 0,28-12$ mT) na szybkość proliferacji drożdży. Maksymalny wzrost biomasy zaobserwowali przy indukcji magnetycznej wynoszącej $B = 0,5$ mT. Wyniki opublikowane przez Novak i wsp. (2007) potwierdziły, że PM ($f = 50$ Hz) zmniejsza liczbę komórek drożdży w wyniku ekspozycji na PM o indukcji $B = 5,2-10$ mT. Ruiz-Gomez i wsp. (2007) zademonstrował, że PPM ($f = 50$ Hz $B = 0,35$ i $2,45$ mT) nie wpływało na szybkość proliferacji drożdży. Z kolei Gülbandilar (2005) wykazał, że PPM ($f = 15$ Hz, $B = 1,1$ mT) zmniejsza szybkość wzrostu hodowli drożdży. Stwierdzono również zwiększenie wydajności produkcji etanolu przez *S. cerevisiae* w wyniku ekspozycji na PM (Motta i wsp., 2004).

Jak pokazują powyższe przykłady, w badaniach, w których wykazano stymulujące oddziaływania PM na hodowle drożdży wykorzystywano inny rodzaj PM, charakteryzującego się również niższymi parametrami, w porównaniu do PM wykorzystywanego w badaniach własnych ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT). Może to tłumaczyć dlaczego obserwowany w badaniach własnych efekt miał charakter inhibitujący. Obecnie prowadzone są prace badawcze mające na celu zweryfikowanie tej hipotezy, a także prace, które mają na celu przeanalizowanie możliwości zastosowania WPM o ustalonej częstotliwości i indukcji magnetycznej do zintensyfikowania fermentacji alkoholowej prowadzonej przez szczepy *S. cerevisiae*.

Etap 4

W kontekście wykazania aplikacyjności WPM w biotechnologii, aktualnie prowadzone przeze mnie badania dotyczą przede wszystkim wykorzystania tego rodzaju PM do prowadzenia bioprocessów związanych z produkcją celulozy bakteryjnej (CB). Ten kierunek badawczy związany jest przede wszystkim z realizacją badań w ramach projektu Lider 5, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju „Projekt, budowa i optymalizacja działania bioreaktora wspomagane wirującym polem magnetycznym do produkcji celulozy bakteryjnej”, którym kieruję od 2015 roku.

Celuloza jest składnikiem budulcowym ściany komórkowej roślin wyższych, ale może być również produkowana przez niektóre glony, grzyby i bakterie. Celuloza bakteryjna może być wytwarzana przez wiele różnych bakterii, jednakże tylko *G. xylinus* (obecnie *Komagataeibacter xylinus*) jest gatunkiem, który produkuje duże ilości celulozy i tylko ta bakteria jest zdolna produkować celulozę w ilościach przemysłowych (Lin i wsp., 2013).

Ze względu na wyjątkowo częstą zmianę nazewnictwa tej bakterii oraz fakt, że prace, które stanowią część niniejszego referatu, powstawały kiedy bakteria ta sklasyfikowana była do gatunku *G. xylinus* (taką też nazwę stosowano w naszych pracach) przyjęto, że w dalszej części opisu zachowamy właśnie tę nazwę gatunkową.

W porównaniu do innych naturalnych lub syntetycznych makrocząsteczek, CB jest unikatowa pod wieloma względami. Substancja ta charakteryzuje się unikalną nanostrukturą, wysoką czystością i krystalicznością, dużą pojemnością do gromadzenia i zatrzymywania wody, doskonałą biodegradowalnością i biogodnością. Dzięki takim właściwościom celuloza syntetyzowana przez bakterie znalazła szereg zastosowań m.in. w medycynie (biomateriały opatrunkowe), przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym, a także w przemyśle papierniczym, chemicznym i ochronie środowiska (Lin i wsp., 2013). Jednak mimo tak wielu zalet oraz możliwości zastosowania, wysokie koszty produkcji oraz mało wydajny proces produkcji są największymi przeszkodami w szerokim zastosowaniu CB (Lin i wsp., 2013; Huang i wsp., 2014). Uzasadnione są tym samym prace badawcze mające na celu poprawę wydajności produkcji oraz właściwości CB.

W ramach badań związanych z realizowanym projektem opublikowane zostały trzy prace badawcze. W pierwszych badaniach analizowano wpływ 3-dniowej ekspozycji hodowli *G. xylinus* na WPM ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT) na wybrane parametry związane z procesem biosyntezy CB. W badaniach tych analizowano uzysk mokrej i suchej CB, jej wodochłonność, stopień krystaliczności, strukturę ułożenia mikrofibrili oraz liczbę komórek zdolnych do

syntezy tego biopolimeru (H-6). W drugiej pracy analizie poddano wpływ WPM ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT) na wybrane parametry CB w zależności od długości ekspozycji i czasu jej biosyntezy (1-7 dni). Analizowano ilość mokrej i suchej CB, jej wodorochłonność, stopień krystaliczności, wielkość formowanych krystalitów, strukturę mikrofibryli oraz stopień polimeryzacji. Ocenie poddano również dynamikę tworzenia się sieci krystalicznej podczas procesu biosyntezy celulozy (H-7). W kolejnej pracy przebadano wpływ różnych sposobów ekspozycji hodowli *G. xylinus* na WPM ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT) na wybrane parametry związane z procesem biosyntezy CB. Analizowano ekspozycję ciągłą przez 6 dni; ekspozycję poprzedzoną 3-dniową preinkubacją bez oddziaływania WPM; ekspozycję 3-dniową na WPM, a następnie dalszą inkubację w warunkach bez oddziaływania WPM. Analizie poddano m.in. ilość produkowanej celulozy, a także morfologię jej mikrofibryli, a także stopień polimeryzacji oraz krystaliczności.

Wykazano, że ekspozycja hodowli *G. xylinus* na WPM ($f = 50$ Hz, $B = 34$ mT) wpływała przede wszystkim na zmiany w mikrostrukturze celulozy. W wyniku zastosowanej ekspozycji na WPM, uzyskana CB cechowała się luźniejszym ułożeniem fibryli w porównaniu do celulozy uzyskanej z hodowli nieekspozowanych (H-6, H-7, H-8). Zaobserwowano także, że zastosowanie WPM podczas syntezy CB powoduje formowanie się dłuższych fibryli (H-7). Obserwowane zmiany w morfologii celulozy wpływały na jej właściwości wodne, w tym przede wszystkim na zdolność do pochłaniania i utrzymania wody (H-6, H-7). Największą pojemnością wodną charakteryzowały się próby celulozy 3-dniowej. W tym wypadku celuloza modyfikowana magnetycznie charakteryzowała się do 26% większą zdolnością do pochłaniania wody w porównaniu do celulozy otrzymanej bez wpływu WPM. Stwierdzono także, że magnetycznie modyfikowana CB syntetyzowana przez 7 dni, chociaż charakteryzowała się mniejszą pojemnością wodną niż celuloza 3-dniowa, to jednak zachowywała swoje polepszone właściwości wodne w porównaniu do celulozy uzyskanej z nieekspozowanych hodowli. Powyższe obserwacje wynikały z luźniejszego ułożenia fibryli, charakterystycznego dla młodszej oraz magnetycznie modyfikowanej celulozy (H-7).

Łańcuchy celulozowe, które formują podstawowe jednostki tworzące włókna fibryli są wydzielane na powierzchnię komórki bakteryjnej do medium hodowlanego. Włókna te agregują i tworzą mikrofibryle. Powoduje to wzrost gęstości celulozy wraz z czasem jej syntezy (Tang i wsp., 2010). Otrzymane wyniki korespondowały z rezultatami badań uzyskanymi przez Gretz i wsp. (1989), którzy wykazali, że CB modyfikowana magnetycznie charakteryzowała się m.in. mniejszą gęstością oraz większą zdolnością do pochłaniania wody, w porównaniu do celulozy uzyskanej w hodowlach niepoddawanych działaniu PM. Nasze obserwacje były

również zgodne z rezultatami opisanymi przez by Al-Shamary i wsp. (2013), którzy stwierdzili, że gęstość CB zwiększała się w trakcie hodowli, podczas gdy jej pojemność wodna spada.

W badaniach własnych wykazano także, że magnetycznie modyfikowana CB uwalniała pochłoniętą wodę wolniej i pod wpływem wyższej temperatury w porównaniu do celulozy uzyskanej w warunkach kontrolnych (H-7). Zdolność do pochłaniania wody zależy przede wszystkim od ilości i wielkości porów na powierzchni celulozy. Luźny układ fibryli i duży rozmiar porów zwiększają pojemność wodną CB (Dahman, 2010). Ściśle ułożone fibryle bardziej efektywnie wiążą cząsteczki wody na skutek silniejszych oddziaływań wiązań wodorowych, w porównaniu z fibrylami ułożonymi w sposób luźny (Guo i Catchmark, 2012). Ponadto wykazano, że retencja wody zwiększa się wraz ze wzrostem powierzchni całkowitej celulozy, dzięki m.in. dłuższym fibrylą (Mohite i Patil, 2014).

Celuloza produkowana przez *G. xylinus* zawiera ponad 90% wody. Woda znajduje się wewnątrz porów CB i jest związana z włóknami celulozowymi za pośrednictwem wiązań wodorowych (Gelin i wsp., 2007). Pojemność wodna i szybkość uwalniania wody mają bezpośredni związek z ułożeniem fibryli w celulozie i uważane są za jedne z najważniejszych cech materiałów przeznaczonego do zastosowań biomedycznych, np. do produkcji opatrunków. Utrzymanie odpowiedniej wilgotności środowiska rany jest niezbędne do prawidłowego procesu gojenia. Dlatego uważa się, że opatrunki na bazie CB są obecnie jednymi z najbardziej obiecujących materiałów w leczeniu ran przewlekłych i obficie wydzielających (Keshk, 2014). Mając na uwadze powyższe informacje oraz opisane powyżej właściwości magnetycznie modyfikowanej CB, uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie do opracowania wysokochłonnych opatrunków, dedykowanych do leczenia ran charakteryzujących się szczególnie dużym wysiękiem. Mikrostruktura CB determinuje także przydatność tego materiału do wykorzystania jako nośnika do immobilizacji np. różnych substancji o aktywności przeciwbakteryjnej lub przeciwwgrzybiczej (Wu i Lia, 2008; Ton i wsp., 2010). Opatrunki na bazie celulozy mogą być nasycone wodnymi roztworami środków antyseptycznych (Moritz i wsp., 2014). W tym kontekście można założyć, że wyższe uwodnienie magnetycznie modyfikowanej CB może umożliwić bardziej efektywne uwalnianie antyseptyku z włókien celulozowych, zapewniając wyższy poziom zwalczania drobnoustrojów obecnych w ranie (Wilhelms i wsp., 2007).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zmiany w intensywności widm uzyskanych techniką spektroskopii fourierowskiej (ATR-FTIR) w regionie od 900 cm^{-1} do 1150 cm^{-1} (widma 2D), charakteryzowały się zwiększoną dynamiką w przypadku prób CB uzyskanych w hodowlach eksponowanych na WPM. Może to świadczyć, o zwiększonym

natężeniu zmian w strukturze cząsteczkowej celulozy i może mieć wpływ na szybkość krystalizacji jej fibryli. Ponadto, na podstawie wyników uzyskanych technikami ATR-FTIR i dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD) stwierdzono, że WPM nie pogarsza właściwości fizyko-chemicznych CB w porównaniu do celulozy uzyskanej z nieekspozowanych hodowli kontrolnych (H-7).

W dalszych etapach badań, na podstawie uzyskiwanych wyników, w instalacji wykorzystywanego generatora WPM zastosowano modyfikacje, które pozwoliły uzyskać parametry PM bardziej korzystne pod kątem procesu biosyntezy CB. W badaniach uwzględniono różne sposoby ekspozycji, w tym 3-dniową ekspozycję na WPM poprzedzoną 3-dniową preinkubacją w warunkach bez oddziaływania WPM, 3-dniową ekspozycją na WPM, a następnie dalszą 3-dniową inkubację w warunkach bez oddziaływania WPM oraz ekspozycję ciągłą przez 6 dni. Stwierdzono, że wpływ WPM na proces biosyntezy CB zależał od długości i czasu ekspozycji w trakcie prowadzonej hodowli. Wykazano, że zastosowanie WPM pozwoliło na zwiększenie ilości uzyskiwanej CB. Niezależnie od sposobu ekspozycji, wszystkie próby magnetycznie modyfikowanej celulozy zachowywały luźniejszy sposób ułożenia fibryli. Ponadto wykazano, że w celu uzyskania wysokiej wydajności biosyntezy celulozy, efektywna może być ekspozycja na WPM trwająca połowę czasu całego procesu jej produkcji. Najkorzystniejsze warunki ekspozycji na WPM pod względem ilości uzyskiwanej CB stwierdzono w eksperymencie, w którym hodowle *G. xylinus* prowadzone były przez 3 dni bez ekspozycji na WPM, a następnie przez kolejne 3 dni w warunkach ciągłej ekspozycji. Ten sposób ekspozycji umożliwił także uzyskanie celulozy o najbardziej korzystnych właściwościach związanych z wodochłonnością oraz zdolnością do utrzymania wody. Dodatkowym efektem skrócenia czasu ekspozycji przy zachowaniu wysokiej wydajności produkcji BC było zmniejszenie zużycia energii, związanego z pracą generatora WPM (H-8).

Podobnie jak to wykazano we wcześniejszych eksperymentach, stwierdzono, że WPM, pomimo wpływu na proces biosyntezy CB, nie powodowało istotnych zmian w jej właściwościach fizycznych i chemicznych wykazanych na podstawie analizy FTIR-ATR oraz stopnia polimeryzacji. Należy zauważyć, że modyfikacje mające na celu zwiększenie wydajności produkcji CB powodują często deprecjację jej najważniejszych właściwości materiałowych (H-8). W związku z tym, brak negatywnego wpływu zastosowania WPM na właściwości celulozy przy jednoczesnym zwiększeniu jej ilości jest kolejną istotną obserwacją wynikającą z przeprowadzonych badań.

Podsumowanie uzyskanych wyników badań

Przestawiony powyżej cykl publikacji, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, dotyczy wpływu wirującego pola magnetycznego (WPM) na różne gatunki mikroorganizmów, a następnie wskazania możliwości wykorzystania uzyskanych wyników do prowadzenia procesów biotechnologicznych:

- wykazano, że ekspozycja hodowli bakteryjnych na WPM miała charakter stymulujący wzrost, aktywność metaboliczną oraz zdolność do tworzenia biofilmu przez różne, ale nie wszystkie gatunki bakterii:
 - stymulujący charakter ekspozycji na WPM stwierdzono dla: *S. aureus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. mutans*, *C. sakazakii*, *K. oxytoca* i *S. xylosus*.
 - supresorowy charakter ekspozycji na WPM stwierdzono dla *A. baumannii* i *P. aeruginosa*;
- wykazano, że Gram-ujemne pałeczki, np. *E. coli* były bardziej podatne na oddziaływanie WPM w porównaniu do Gram-dodatnich ziarniaków, np. *S. aureus* (powyższymi zależnościami nie podlegały *P. aeruginosa* i *A. baumannii*);
- wykazano, że stymulujący wpływ ekspozycji na WPM na szybkość wzrostu i aktywność metaboliczną bakterii zwiększał się wraz ze wzrostem częstotliwości i indukcji magnetycznej generowanego PM;
- wykazano, że WPM, w zależności od czasu ekspozycji, ale niezależnie od szczepu bakteryjnego wpływało stymulująco, a następnie hamowało ekspresję genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe u *S. aureus*;
- wykazano, że ekspozycja drożdży *S. cerevisiae* na WPM wzmocniona efektem wywieranym przez obecność ferrofluidu wpływała supresorowo na szybkość wzrostu i aktywność metaboliczną tych mikroorganizmów;
- wykazano, że zastosowanie WPM pozwoliło na zwiększenie ilości celulozy produkowanej przez *G. xylinus*;
- wykazano, że magnetycznie modyfikowana celuloza charakteryzowała się mniejszą gęstością mikrofibryli oraz większą pojemnością wodną w porównaniu do celulozy otrzymanej w standardowych warunkach;
- wykazano, że WPM wpływało na dynamikę formowania się sieci krystalicznej celulozy;

- wykazano, że ekspozycja na WPM nie pogarszała właściwości fizyko-chemicznych celulozy, wykazanych na podstawie analiz ATR-FTIR, XRD oraz stopnia polimeryzacji.

Uzyskane w poszczególnych etapach badań wyniki pozwalają stwierdzić, że WPM cechuje się wysokim potencjałem aplikacyjnym, w szczególności w zakresie kontrolowania wzrostu i aktywności metabolicznej mikroorganizmów. Uzyskane wyniki pozwalają także przypuszczać, że WPM nie zwiększa patogenności drobnoustrojów, przynajmniej w aspekcie wytwarzania czynników wirulencji, których ekspresja podlega regulacji środowiskowej.

Jak wykazano w przeprowadzonych badaniach, WPM może zostać z powodzeniem wykorzystane do intensyfikacji bioprosesów związanych z wytwarzaniem np. takich produktów o wysokiej wartości dodanej, jak celuloza bakteryjna. Ustalono również, że kluczowymi czynnikami prowadzącymi do uzyskania pożądanego efektu oddziaływania WPM są: dobór odpowiednich warunków stymulacji magnetycznej (przede wszystkim czasu ekspozycji oraz częstotliwości i indukcji PM), a także dobór odpowiedniego gatunku drobnoustroju.

Należy zaznaczyć, że przeprowadzone analizy wpływu WPM na mikroorganizmy charakteryzują się wysokim stopniem innowacyjności. Dlatego w celu pełnego wykorzystania potencjału WPM, konieczne jest wykonanie dalszych badań z uwzględnieniem większej liczby gatunków drobnoustrojów, jak również analizowanych parametrów komórkowych oraz parametrów związanych z ekspozycją na PM. Wyniki uzyskane w takich badaniach przełożyć się mogą na obniżenie kosztów uzyskania produktów przemysłowych czy leczniczych na skutek stymulacji metabolizmu oraz wzrostu tych drobnoustrojów; dalsze badania nad WPM prowadzone mogą być także pod kątem doboru takich warunków ekspozycji, które będą hamować lub zakłócać wzrost i procesy metaboliczne drobnoustrojów patogennych.

Badania takie są obecnie realizowane zarówno przeze mnie, jak i przez poszczególnych członków współpracującego ze mną zespołu badawczego.

Cytowana literatura

1. Al-Shamary E.E., Al-Darwash A.K. 2013. Influence of fermentation condition and alkali treatment on the porosity and thickness of bacterial cellulose membranes. The Online Journal of Science and Technology, 3, 194-203.

2. Anton-Leberre V., Haanappel E., Marsaud N., Trouilh L., Benbadis L., Boucherie H., Massou S., Francois J.M. 2010. Exposure to high static or pulsed magnetic fields does not affect cellular processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectromagnetics*, 31, 28-38.
3. Argudín M.A., Mendoza M.C., Rosario-Rodicio M. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
4. Babushkina I.V., Borodulin V.B., Shmetkova N.A. Morrison V.V., Usanov A.D., Skripal A.V., Usanov D.A. 2005. The influence of alternating magnetic field on *Escherichia coli* bacterial cells. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 39, 398-400.
5. Bajpai I., Saha N., Basu B. 2012. Moderate intensity static magnetic field has bactericidal effect on *E. coli* and *S. epidermidis* on sintered hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 100, 1206-1217.
6. Batista J.E.C., Ferreira E.L., de Oliveira Nascimento D.C., Ventura R.F., de Oliveira W.L.M., Leal N.C., Lima-Filho J.V. 2013. Antimicrobial resistance and detection of the *mecA* gene besides enterotoxin-encoding genes among coagulase-negative Staphylococci isolated from clam meat of *Anomalocardia brasiliana*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 1044-1049.
7. Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Di Giulio M., Robuffo I., Trubiani O., Marigiò M.A. 2008. Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 29, 302-311.
8. Dahman Y. 2009. Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 5105-5122.
9. Davies M.S. 1996. Effects of 60 Hz electromagnetic fields on early growth in three plant species and a replication of previous results. *Bioelectromagnetics*, 17, 154-161.
10. Derzelle S., Dilasser F., Duquenne M., Deperrois V. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiology*, 26, 896-904.
11. Dunca S., Creanga D.E., Ailiesei O., Nimitan E. 2005. Microorganisms growth with magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289, 445-447.
12. Even S., Charlier C., Nouaille S., Ben Zakour N.L., Cretenet M., Cousin F.J., Gautier M., Coccagn-Bousquet M., Loubiere P., Le Loir Y. 2009. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4459-4472.
13. Fiedler U., Grobner U., Berg H. 1995. Electrostimulation of yeast proliferation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38, 423-425.
14. Fojt L., Strašák L., Vetterl V., Šmarda J. 2004. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry*, 63, 337-341.
15. Gaafar E.S.A., Hanafy M.S., Tohamy E.Y., Ibrahim M.H. 2008. The effect of electromagnetic field on protein molecular structure of *E. coli* and its pathogenesis *Romanian Journal of Biophysics*, 18, 145-169.
16. Galvanovskis J., Sandblom J. 1998. Periodic forcing of intracellular calcium oscillators. Theoretical studies of the effects of low frequency fields on the magnitude of oscillations. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 46, 161-174.

17. Gao W., Liu Y., Zhou J., Pan H. 2010. Effects of a strong static magnetic field on bacterium *Shewanella oneidensis*: an assessment by using whole genome microarray. *Bioelectromagnetics*, 26, 558-263.
18. Gelin K., Bodin A., Gatenholm P., Mihranyan A., Edwards K., Stromme M. 2007. Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. *Polymer*, 48, 7623-7631.
19. Gogate P.R., Beenackers A.A.C.M., Pandit A.B. 2000. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 109-144.
20. Gretz M.R., Folsom D.B., Brown Jr.R.M. 1989. Cellulose biogenesis in bacteria and higher plants is disrupted by magnetic fields. *Naturwissenschaften*, 76, 380-383.
21. Grosman Z., Kolář M., Tesaříková E. 1992. Effects of static magnetic field on some pathogenic microorganism. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis Medicae*, 134, 7-9.
22. Gülbandır E. 2005. Effects of pulsating electromagnetic field on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of the Dumlupınar University (Turkey)*, 9, 55-64.
23. Guo J., Catchmark J.M. 2012. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1026-1037.
24. Hristov J., Perez V.H. 2011. Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields. *International Review of Chemical Engineering*, 3, 3-20.
25. Hu X., Qiu Z., Wang Y., She Z., Qian G., Ren Z. 2009. Effect of ultra-strong static magnetic field on bacteria: application of fourier-transform infrared spectroscopy combined with cluster analysis and deconvolution. *Bioelectromagnetics*, 30, 500-507.
26. Huang H.M., Lee S.Y., Yao W.C., Lin C.T., Yeh C.Y. 2006. Static magnetic fields up-regulate osteoblast maturity by affecting local differentiation factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 447, 201-208.
27. Huang Y., Zhu C., Yang J., Nie Y., Chen C., Sun D. 2013. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*, 21, 1-30.
28. Iwasaka M., Ikehata M., Miyakoshi J., Ueno S. 2004. Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. *Bioelectrochemistry*, 65, 59-68.
29. Jiang Y., Guo Ch., Liu H. 2007. Magnetically rotational reactor for absorbing benzene emissions by ionic liquids. *China Particology*, 5, 130-133.
30. Justo O.R., Perez V.H., Alvarez D.C., Alegre R.M. 2006. Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134, 155-163.
31. Keshk S. 2014. Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 4, 2-10.
32. Khan S.A., Rashmi P. 2010. Algal biorefinery: a road towards energy independence and sustainable future. *International Review of Chemical Engineering*, 2, 63-68.
33. Kohno M., Yamazaki M., Kimura I., Wada M. 2000. Effect of static magnetic fields on bacteria: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Pathophysiology*, 7, 143-148.
34. László J., Kutasi J. 2010. Static magnetic field exposure fails to affect the viability of different bacteria strains. *Bioelectromagnetics*, 31, 220-225.

-
35. Mehedintu M., Berg H. 1997. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 67-70.
 36. Mittenzwey R., Süßmuth R., Mei W. 1996. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria – the question of a co-stressing factor. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40, 21-27.
 37. Mohite B.V., Patil S.V. 2014. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. *Carbohydrate Polymers*, 106, 132-141.
 38. Moritz S., Wiegand C., Wesarg F., Hessler N., Müller F., Kralisch D., Hipler U.C. Fischer D. 2014. Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 471, 45-55.
 39. Motta M.A., Muniz J.B.F., Schuler A., da Motta M. 2004. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. *Biotechnology Progress*, 20, 393-396.
 - Lin S.P., Calvar I.L., Catchmark J.M., Liu J.R., Demirci A., Cheng K. 2013. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, 20, 2191-2219.
 40. Novak J., Strasak L., Fojt L., Slaninová I., Vetterl V. 2007. Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 70, 115-121.
 41. Obermeier A., Matl F.D., Friess W., Stemberger A. 2009. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* induced by low-frequency electric and electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 30, 270-279.
 42. Phillips J.L., Haggren W., Thomas W.J., Ishida-Jones T., Adey W.R. 1992. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1132, 140-144.
 43. Podkowik M., Bystron J., Bania J. 2012. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of *Staphylococci* from ready-to-eat food. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 91-93.
 44. Rakoczy R. 2010. Enhancement of solid dissolution process under the influence of rotating magnetic field. *Chemical Engineering and Processing*, 49, 42-50.
 45. Rakoczy R. 2011. Analiza teoretyczno-doświadczalna wpływu wirującego pola magnetycznego na wybrane operacje i procesy inżynierii chemicznej. Wydawnictwo Uczelniane ZUT w Szczecinie. ISBN 978-83-7663-074-8.
 46. Rakoczy R., Masiuk S. 2010. Influence of transverse rotating magnetic field on enhancement of solid dissolution process. *Journal AIChE*, 56, 1416-1433.
 47. Rosensweig R.E. 1979. Fluidization: hydrodynamics stabilization with a magnetic field. *Science*, 204, 57-60.
 48. Ruiz-Gomez M.J., Prieto-Barcia M.I., Ristori-Bogajo E., Martinez-Morillo M. 2004. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 64, 151-155.
 49. Sada E., Katoh S., Shiozawa M., Fukui T. 1981. Performance of fluidized-bed reactors utilizing magnetic-fields. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 2561-2567.
 50. Schelin J., Wallin-Carlquist N., Thorup Cohn M., Lindqvist R., Barker G.C., Rådström P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2, 580-592.

-
51. Segatore B., Setacci D., Bennato F., Cardigno R., Amicosante G., Iorio R. 2012. Evaluations of the effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on growth and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Microbiology, 2012, Article ID 587293.
 52. Spitzer K.H. 1999. Application of rotating magnetic fields in Czochralski crystal growth. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 38, 39-58.
 53. Strašák L., Vetterl V., Fojt L. 2005. Effects of 50 Hz magnetic fields on the viability of different bacterial strains. Electromagnetic Biology and Medicine, 24, 293-300.
 54. Strašák L., Vetterl V., Šmarda J. 2002. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. Bioelectrochemistry, 55, 161-164.
 55. Sun W., Tan Q., Pan Y., Fu Y., Sun H., Chiang H. 2010. Effects of 50-Hz magnetic field exposure on hormone secretion and apoptosis-related gene expression in human first trimester villous trophoblasts in vitro. Bioelectromagnetics, 31, 566-572.
 56. Tang W., Shiru J., Jia Y., Yang H. 2010. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, 125-131.
 57. Ton N.M.N., Nguyen M.D., Pham T.T.H., Le V.V.M. 2010. Influence of initial pH and sulfur dioxide content in must on wine fermentation by immobilized yeast in bacterial cellulose. International Food Research Journal, 17, 743-749.
 58. Tremaine M.T., Brockman D.K., Betley M.J. 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). Infection and Immunity, 61, 356-359.
 59. Vangas J., Viesturs U., Fort I. 1999. Mixing intensity studies in a pilot plant stirred bioreactor with an electromagnetic drive. Biochemical Engineering Journal, 3, 25-33.
 60. Wilhelms T., Schulze D., Alupei I.C., Rohrer C., Abel M., Wiegand C., Hippler U.C. 2007. Release of polyhexamethylene biguanidine hydrochloride (PHMB) from a hydrobalanced cellulose wound dressing with PHMB. Poster presented at 17th Conference of the European Wound Management Association Glasgow/UK 2-4 May 2007.
 61. Wu S.C., Lia J.K. 2008. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 3, 103-108.
 62. Xie T.D., Chen Y.D., Marszalek P., Tsong T.Y. 1997. Fluctuation-driven directional flow in biochemical cycle: further study of electric activation of Na, K pumps. Biophysical Journal, 72, 2496-2502.

David Fijałkowski

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukową rozpocząłem w październiku 2002 roku w Katedrze Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej w Szczecinie, prowadząc badania w ramach pracy dyplomowej realizowanej na studiach magisterskich pt.: „Kształtowanie się wskaźników odporności humoralnej u prosiąt noworodków i macior w okresie okołoporodowym, z uwzględnieniem białek ostrej fazy”. Praca została wykonana pod kierunkiem Pana prof. Antoniego Furowicza. Po obronie pracy magisterskiej, z dniem 1 października 2005 r., rozpocząłem naukę na studiach doktoranckich. Badania w ramach wykonywanej pracy doktorskiej wykonywałem w Katedrze Immunologii i Mikrobiologii WBiHZ AR w Szczecinie (potem Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie), które ukończyłem obroną pracy doktorskiej z wyróżnieniem w 2010 r. Praca doktorska pt.: „Superantygenowe i leukocytotoksyczne czynniki wirulencji wytwarzane przez szczepy *Staphylococcus aureus* wyizolowane z mleka krów z objawami *mastitis*”, wykonywana była pod kierunkiem Pani dr hab. Danuty Czernomysy-Furowicz, prof. ZUT. W trakcie studiów doktoranckich odbyłem staż na uniwersytecie University College of Dublin, w Dublinie, w Irlandii. Podczas pobytu stażowego zdałem egzaminy potwierdzające znajomość języka angielskiego, IAELTS oraz FCE. W trakcie studiów doktoranckich byłem również stypendystą w ramach projektu „Inwestycja w wiedzę motorem rozwoju innowacyjności w regionie”, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego i Budżetu Państwa Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki oraz projektu "Budowa potencjału naukowego regionu w obszarach kluczowych dla jego rozwoju", współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego. Część badań prowadzonych w ramach realizowanej pracy doktorskiej wykonane zostały w ramach grantu promotorskiego, pod tym samym tytułem co wykonywana praca doktorska. W latach 2009-2012 pracowałem jako lektor języka angielskiego w Szczecińskiej Szkole Wyższej Collegium Balticum.

Od 2010 roku zatrudniony jestem na stanowisku adiunkta w Katedrze Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej WBiHZ ZUT w Szczecinie. Od 2012 roku prace badawcze wykonuję w Centrum Dydaktyczno-Badawczym Nanotechnologii ZUT w Szczecinie.

W 2012 roku, w celu poszerzenia umiejętności zawodowych oraz kompetencji z zakresu mikrobiologii, rozpocząłem specjalizację z zakresu mikrobiologii, która prowadzona jest przez Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.

Osiągnięcia naukowe w ramach prac naukowo-badawczych związanych z prototypowymi instalacjami bioreaktorów wspomaganych WPM

Obecnie głównym wątkiem mojej tematyki badawczej są badania związane są z analizą wpływu WPM na mikroorganizmy oraz możliwościami jego wykorzystania w procesach biotechnologicznych. Aktualnie związane są one przede wszystkim z produkcją CB i mają na celu zoptymalizowanie jej produkcji, jak i polepszenie jej cech jakościowych poprzez wykorzystanie zaprojektowanej i zbudowanej wspólnie z interdyscyplinarnym zespołem naukowym pilotażowej instalacji z prototypowym generatorem WPM. Badania prowadzone są w ramach projektu Lider 5, finansowanego przez NCBR. Poza publikacjami, wymiernym efektem prowadzonych prac badawczych są również zgłoszenia patentowe dotyczące konstruowanej aparatury badawczej, w tym głównie bioreaktorów wspomaganych magnetyczne oraz poszczególnych podzespołów niezbędnych do ich poprawnego działania, a także sposobów jej wykorzystania w procesach biotechnologicznych. W sumie, w ramach prowadzonych prac w zakresie tematyki badawczej związanej z WPM przygotowano i wysłano do Urzędu Patentowego 14 krajowych zgłoszeń patentowych oraz jedno zgłoszenie patentowe europejskie.

W ramach wykonywanych analiz projektowanych i konstruowanych aparatów opublikowano również pracę dotyczące nowych sposobów mieszania cieczy w bioreaktorach przy zastosowaniu innowacyjnych mieszadeł oraz różnorodnych cząstek o właściwościach magnetycznych [A-1].

Wykaz najważniejszych osiągnięć z zakresu badań i analiz związanych z prototypowymi instalacjami bioreaktorów wspomaganych WPM

Publikacje

[A-1] Maciej Konopacki, Marian Kordas, Karol Fijałkowski, Rafał Rakoczy, 2015, Computational Fluid Dynamics and experimental studies of a new mixing element in a static mixer as a heat exchanger, Chemical and Process Engineering, 36 (1), 59-72.

IF₂₀₁₄ – 0,519; 15 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Wybrane zgłoszenia patentowe krajowe

1. Karol Fijałkowski, Rafał Rakoczy, Mirosława El Fray, Anna Żywicka, Dorota Petlier, Radosław Drozd, Maciej Konopacki, Marian Kordas. Magnetycznie wspomagana biosynteza celulozy bakteryjnej. Zgłoszenie patentowe P.416817; 2016
2. Rafał Rakoczy, Marian Kordas, Karol Fijałkowski, Maciej Konopacki, Anna Żywicka, Dorota Peitler. Dwukomorowy reaktor do magnetycznego wspomagania procesów chemicznych i układ z tym reaktorem. Zgłoszenie patentowe P.412174; 2015.
3. Rafał Rakoczy, Marian Kordas, Karol Fijałkowski, Maciej Konopacki, Radosław Drozd, Anna Żywicka, Dorota Peitler, Radosław Drozd, Rafał Niesyn, Mariusz Chyla. Wspomagany magnetycznie reaktor przepływowy. Zgłoszenie patentowe P.413072; 2015.
4. Rafał Rakoczy, Marian Kordas, Karol Fijałkowski, Maciej Konopacki, Anna Żywicka, Dorota Peitler, Radosław Drozd. Wspomagany magnetycznie bioreaktor. Zgłoszenie patentowe P.414512; 2015.
5. Rafał Rakoczy, Marian Kordas, Karol Fijałkowski, Maciej Konopacki, Anna Żywicka, Dorota Peitler, Radosław Drozd. Wspomagany magnetycznie reaktor wielofazowy. Zgłoszenie patentowe P.414877; 2015.

Zgłoszenia patentowe europejskie

1. Rafał Rakoczy, Marian Kordas, Maciej Konopacki, Karol Fijałkowski, Anna Żywicka, Dorota Peitler. Dual-chamber reactor for magnetic assisting of chemical processes and the systems of this reactor. Zgłoszenie patentowe EP 15461536; 2015.

Osiągnięcia naukowe związane z wykorzystaniem CB jako nośnika do immobilizacji mikroorganizmów

Aktualnie prowadzone przeze mnie badania dotyczą przede wszystkim udoskonalania metod produkcji CB, ale także poszukiwania nowych zastosowań dla tego biomateriału. W związku z tą tematyką badawczą powstały prace, których celem było przeanalizowanie

możliwości wykorzystania CB jako naturalnego nośnika polimerowego do immobilizacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [A-2] oraz drożdży *S. cerevisiae* [A-3].

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że CB charakteryzuje się dużym potencjałem aplikacyjnym jako nośnik do immobilizacji analizowanych mikroorganizmów. Stwierdzono, że liczba unieruchamianych bakterii i drożdży zależała od formy zastosowanej CB, sposobu i długości jej wytwarzania i zastosowanej metody immobilizacji. Udowodniono, że CB wykazywała ochronne właściwości względem immobilizowanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, związanymi z obecnością soku żołądkowego oraz soli żółciowych. Ustalono, że metoda unieruchomienia, która polegała na jednoczesnym inkubowaniu bakterii *G. xylinus* (produkujących celulozę) oraz *Lactobacillus* spp. pozwoliła na prawie całkowitą ochronę immobilizowanych bakterii przed szkodliwym działaniem niekorzystnych warunków środowiskowych. Stwierdzono również, że ten sposób immobilizacji charakteryzował się najwyższą wydajnością w odniesieniu do ilości immobilizowanych mikroorganizmów. W przypadku drożdży, wykazano, że najkorzystniejszymi właściwościami pod względem liczby immobilizowanych komórek charakteryzuje się celuloza mokra syntetyzowana przez 3 dni. Stwierdzono również, że immobilizowane drożdże, bez względu na formę użytej celulozy, produkowały większą ilość alkoholu w porównaniu do komórek wolnych.

W najbliższym czasie planuje się przeanalizować możliwości wykorzystania jako nośnika do immobilizacji celulozy modyfikowanej magnetycznie, która jak opisano powyżej cechuje się właściwościami korzystnymi pod względem zastosowania do tego typu aplikacji.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń przygotowano również dwa zgłoszenia patentowe, dotyczące opracowanych innowacyjnych metod immobilizacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* z użyciem CB jako nośnika, które obecnie są rozpatrywane w Urzędzie Patentowym RP.

Wykaz najważniejszych osiągnięć z zakresu badań CB jako nośnika do immobilizacji mikroorganizmów:

Publikacje

[A-2] Karol Fijałkowski, Dorota Peitler, Rafał Rakoczy, Anna Żywicka, 2016, Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated

gastric juices and bile salt solution. LWT - Food Science and Technology, 68, 322-328.

IF₂₀₁₅ – 2,711; 35 pkt. MNiSW₂₀₁₅

[A-3] Anna Żywicka, Dorota Peitler, Rafał Rakoczy, Adam Feliks Junka, Karol Fijałkowski, 2016, Wet and dry forms of bacterial cellulose synthesized by different strains of *Gluconacetobacter xylinus* as carriers for yeast immobilization. Applied Biochemistry and Biotechnology, DOI: 10.1007/s12010-016-2134-4.

IF₂₀₁₅ – 1,606; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₅

Zgłoszenia patentowe krajowe

1. Karol Fijałkowski, Dorota Petlier, Anna Żywicka, Rafał Rakoczy, Sposób immobilizacji mikroorganizmów na i/lub w celulozie bakteryjnej. Zgłoszenie patentowe nr P.415670; 2016.
2. Karol Fijałkowski, Dorota Petlier, Anna Żywicka, Rafał Rakoczy. Sposób wytwarzania celulozy bakteryjnej z immobilizownymi mikroorganizmami. Zgłoszenie patentowe nr P.415673; 2016.

Osiągnięcia naukowe związane z identyfikacją i charakterystyką bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych od zwierząt

Poza analizami wpływu WPM na mikroorganizmy, prowadzę badania związane z bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* izolowanymi od zwierząt, a w szczególności z gatunkiem *S. aureus* oraz produkowanymi przez niego czynnikami wirulencji.

W sumie w ramach tej tematyki badawczej opublikowanych zostało 7 oryginalnych prac twórczych z listy JCR oraz 5 publikacji spoza listy JCR, a także 5 prac przeglądowych, w tym 1 z listy JCR. Większość ww. prac opublikowanych zostało po uzyskaniu stopnia doktora i wynikały one z kontynuacji badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej oraz realizacji grantu promotorskiego.

Poniżej przedstawiono cele i wyniki najważniejszych prac opublikowanych w ramach tej tematyki badawczej:

Celem pierwszej pracy była ocena wpływu podania autoszczepionki na wybrane właściwości *S. aureus* izolowane od krów z *mastitis*. Stwierdzono, że szczepy *S. aureus* mogą podlegać zmianą fenotypowym w trakcie terapii z użyciem autoszczepionki oraz wykazano konieczność wykorzystywania odpowiednich metod diagnostycznych do oceny skuteczności wdrożonej metody terapii [A-4].

Celem kolejnych badań była ocena wpływu wydzielniczych czynników wirulencji wytwarzanych przez szczepy *S. aureus* na ekspresję genów kodujących IL-2 oraz IL-12, a także sekrecję IFN- γ i TNF- α przez krowie leukocyty w hodowlach *in vitro*. W badaniach stwierdzono, że za stymulację produkcji analizowanych cytokin odpowiadały przede wszystkim wydzielnicze czynniki wirulencji o charakterze superantygenowym i w mniejszym stopniu leukocytotoksycznym [A-5].

Następne badania dotyczyły identyfikacji oraz analizy gronkowców izolowanych z nosów zdrowych koni. Analizie poddano również profil antybiotykoodporności wyizolowanych mikroorganizmów. Wykazano skuteczność metody PCR-RFLP genu *gap* w identyfikacji gatunkowej gronkowców. Wśród izolowanych gatunków nie stwierdzono obecności szczepów *S. aureus*, natomiast udowodniono, że wszystkie izolowane gatunki należały do grupy gronkowców koagulazo-ujemnych, w tym metycylinoopornych [A-6].

W kolejnej pracy analizowano wpływ sekrecyjnych czynników wirulencji o charakterze superantygenowym oraz leukocytotoksycznym, uzyskanych z hodowli *S. aureus* na właściwości krowich leukocytów polimorfonuklearnych w hodowlach *in vitro*. Wykazano, zależności między efektywnością fagocytozy przeprowadzanej przez neutrofile, a produkcją czynników wirulencji wytwarzanych przez szczepy *S. aureus* [A-7].

Celem kolejnych badań była analiza profilu genów kodujących enterotoksyny gronkowcowe oraz pokrewieństwa genetycznego i aktywności biologicznej wydzielniczych czynników wirulencji wytwarzanych przez szczepy *S. aureus* izolowane z mleka krów z objawami *mastitis*. Wykazano ważną rolę jaką mogą pełnić czynniki wirulencji o charakterze superantygenowym oraz leukocytotoksycznym w zapoczątkowywaniu i przebiegu *mastitis* na tle *S. aureus* u krów. Stwierdzono także, że gronkowce izolowane w ciągu krótkiego czasu z jednego stada należały do jednego typu klonalnego oraz, że posiadały ten sam zestaw genów kodujących enterotoksyny [A-8].

W kolejnych badaniach analizowano i porównywano geny kodujące toksyny o charakterze superantygenów u *S. aureus* i *S. xylosus* izolowanych z tych samych prób mleka pobranych od krów z objawami *mastitis*. Wykazano, że wszystkie analizowane szczepy *S. aureus* posiadały ten sam zestaw genów kodujących toksyny oraz zgodnie z wykonaną analizą PFGE należały do jednego typu klonalnego. W przeciwieństwie do *S. aureus*, szczepy *S. xylosus* były różne pod względem analizowanych genów. Stwierdzono także, że liczba różnych genów kodujących toksyny była większa w przypadku *S. xylosus* w porównaniu do *S. aureus*, przy czym wszystkie geny wykryte u gronkowców złośliwych zidentyfikowane zostały również u *S. xylosus*. Uzyskane rezultaty potwierdziły możliwość horyzontalnego transferu genów kodujących czynniki wirulencji między badanymi gatunkami [A-9].

W związku z powyższą tematyką badań, przeanalizowano również, a następnie opublikowałem w bazie GenBank nowe sekwencje genu 16S rRNA bakterii reprezentujących różne gatunki gronkowców, zidentyfikowane na podstawie analizy PCR-RFLP genu *gap*. Ponadto, jako współautor zamieściłem w bazie GenBank sekwencje genu 16S rRNA izolatów bakterii niezidentyfikowanych na podstawie polimorfizmu genu *gap*, z których przynajmniej 2 mogą stanowić nowe gatunki lub podgatunki gronkowców (badania związane z ustaleniem gatunków są obecnie wykonywane).

Wykaz najważniejszych osiągnięć z zakresu badań związanych z identyfikacją i charakterystyką bakterii z rodzaju *Staphylococcus* izolowanych od zwierząt

Publikacje

[A-4] Paweł Nawrotek, Danuta Czernomysy-Furowicz, Jacek Borkowski, Karol Fijałkowski, Anna Pobucewicz, 2012, The effect of auto-vaccination therapy on the phenotypic variation of one clonal type of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis, Veterinary Microbiology, 155, 434-437.

IF₂₀₁₂ – 3,127; 40 pkt. MNiSW₂₀₁₂

[A-5] Karol Fijałkowski, Danuta Czernomysy-Furowicz, Paweł Nawrotek, Jolanta Karakulska, 2012, Influence of *S. aureus* exosecretions on cytokine profile in bovine

leukocyte cultures *in vitro*, Research in Veterinary Science, 93, 1179-1184.

IF₂₀₁₂ – 1,774; 35 pkt. MNiSW₂₀₁₂

[A-6] Jolanta Karakulska, Karol Fijałkowski, Paweł Nawrotek, Anna Pobucewicz, Filip Poszumski, Danuta Czernomysy-Furowicz, 2012, Identification and methicillin resistance of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from nasal cavity of healthy horses, Journal of Microbiology, 50(3), 444-451.

IF₂₀₁₂ – 1,276; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₂

[A-7] Karol Fijałkowski, Danuta Czernomysy-Furowicz, Jane Irwin, Paweł Nawrotek, Anna Pobucewicz, 2012. Secretory virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates obtained from mastitic bovine milk – effect on bovine polymorphonuclear neutrophils, Research in Veterinary Science, 93(1), 82-87.

IF₂₀₁₂ – 1,774; 35 pkt. MNiSW₂₀₁₂

[A-8] Karol Fijałkowski, Helena Masiuk, Danuta Czernomysy-Furowicz, Jolanta Karakulska, Paweł Nawrotek, Aleksandra Paszkowska, Magdalena Struk, Stefania Giedrys-Kalemba, 2013, Superantigen gene profiles, genetic relatedness and biological activity of exosecretions of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from milk of cows with clinical mastitis, Microbiology and Immunology, 57, 674-683.

IF₂₀₁₃ – 1,306; 15 pkt. MNiSW₂₀₁₃

[A-9] Karol Fijałkowski, Magdalena Struk, Jolanta Karakulska, Aleksandra Paszkowska, Stefanian Giedrys-Kalemba, Helena Masiuk, Danuta Czernomysy-Furowicz, Paweł Nawrotek, 2014, Comparative analysis of superantigen genes in *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* isolates collected from a single mammary quarter of cows with mastitis, Journal of Microbiology, 52(5), 366-372.

IF₂₀₁₄ – 1,439; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₄

Osiągnięcia naukowe związane z poszukiwaniem syntetycznych i naturalnych substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej

W ramach kolejnych zagadnień badawczych, brałem udział (jako wykonawca) w grancie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki dotyczącym opracowania biodegradowalnych kopolimerów amfifilowych zawierających naturalnie bioaktywne składniki jako nowoczesne preparaty o aktywności przeciwdrobnoustrojowej do zastosowań medycznych. Głównym zadaniem, wg projektu, było opracowanie nowych, biodegradowalnych polimerów, które w swojej budowie będą zawierały sekwencje wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową i dodatkowo będą przydatne do formowania systemów, z których można będzie uwalniać specyficzne substancje bioaktywne (witaminy, peptydy antybakteryjne itp.). Powierzone mi zadania związane były z częścią mikrobiologiczną projektu i dotyczyły przede wszystkim wykonywania analiz związanych z oddziaływaniami opracowanych materiałów z mikroorganizmami. Projekt realizowany był w ramach współpracy z Zakładem Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych ZUT w Szczecinie.

W ramach podobnej tematyki badawczej, brałem również udział w projekcie związanym z analizą właściwości antybakteryjnych nowych pochodnych 2-(2-formylo-4-nitrofenoksy)alkanianów alkali. W przeprowadzanych badaniach zajmowałem się oceną właściwości bakteriobójczych i bakteriostatycznych nowo zsyntetyzowanych substancji [A-10]. Projekt realizowany był w ramach współpracy z Zakładem Syntezy Organicznej i Technologii Leków ZUT w Szczecinie.

W ramach nawiązanej współpracy międzynarodowej, brałem również udział w badaniach, które miały na celu przeanalizowanie wpływ koncentratu białka serwatki bydlęcej częściowo strawionej z użyciem lipazy w celu uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych na wzrost, żywotność oraz zdolność do adhezji do hydroksyapatytu bakterii *S. mutans* [A-11]. Badania prowadzone były w trakcie staży w School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, University College Dublin w Dublinie w Irlandii, w trakcie których byłem wykonawcą grantu Enterprise Ireland “An investigation of the composition and anti-microbial properties of ImmunoSAL”.

Wykaz najważniejszych osiągnięć z zakresu badań związanych z poszukiwaniem syntetycznych i naturalnych substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Publikacje

[A-10] Agata Goszczyńska, Halina Kwiecień, Karol Fijałkowski, 2015, Synthesis and antibacterial activity of Schiff bases and amines derived from alkyl 2-(2-formyl-4-nitrophenoxy)alkanoates, Medicinal Chemistry Research, 24(9), 3561-3577.

IF₂₀₁₅ – 1,436; 20 pkt. MNiSW₂₀₁₅

[A-11] Paul Morrissey, Mike Folan, Karol Fijałkowski, Alan Baird, Jane Irwin, 2012, Inhibition of *Streptococcus mutans* binding to hydroxylapatite using partially digested whey protein concentrate and individual whey proteins, Journal of Functional Foods, 4, 559-567.

IF₂₀₁₂ – 2,632; 25 pkt. MNiSW₂₀₁₂

Patenty krajowe

1. Agata Wrześniewska, Halina Kwiecień, Magdalena Dziecioł, Karol Fijałkowski, 2015, Zasada Schiffa i sposób jej wytwarzania. PL 221669 (data przyznania 02.06.2015).
2. Agata Wrześniewska, Halina Kwiecień, Małgorzata Dziecioł, Karol Fijałkowski, Aminoester pochodna estru kwasu 2-(formylofenoksy)alkanowego oraz sposób jego wytwarzania. Decyzja o udzieleniu patentu nr DP.P.404511.auci (325/16) z dnia 21.03.2016.

Osiągnięcia naukowe związane z poszukiwaniem i analizą mikroorganizmów o dużym potencjale biotechnologicznym

Jako opiekun Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów w latach 2012-2015 kierowałem projektami naukowymi zaplanowanymi do realizacji w ramach działalności Koła, które dotyczyły m.in. poszukiwania mikroorganizmów o dużym potencjale biotechnologicznym. Badania te związane były z izolacją, identyfikacją i optymalizacją

warunków hodowlanych drobnoustrojów, a w szczególności bakterii z rodzaju *Streptomyces* wytwarzających substancje o aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej oraz produkujących barwniki i enzymy. W zakresie projektu przeprowadzana była również szczegółowa charakterystyka tych substancji, uwzględniająca badania toksyczności, cytotoksyczności i analizy chemiczne. Dodatkowo, realizowane były badania dotyczące oceny potencjału biotechnologicznego bakterii z rodzaju *Streptomyces*, wyizolowanych z gleby skażonej substancjami ropopochodnymi, w bioremediacji terenów skażonych.

Wykaz najważniejszych osiągnięć z zakresu badań związanych z poszukiwaniem i analizą mikroorganizmów o dużym potencjale biotechnologicznym

1. Rezultaty badań prezentowane były na kilkunastu międzynarodowych i krajowych studenckich konferencjach naukowych. W sumie prezentowane prace badawcze nagrodzone zostały 7 pierwszymi, 5 drugimi oraz 3 trzecimi miejscami.
2. Za działalność naukową w ramach pracy ze studentami, zostałem wyróżniony w kategorii „Opiekun roku 2012” w ogólnopolskim konkursie Studenckiego Ruchu Naukowego „StRuNa” dla autorów i promotorów najlepszych projektów naukowych realizowanych przez studentów i doktorantów, za wspieranie Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Podsumowanie

Za opisane powyżej osiągnięcia naukowe zostałam dwukrotnie uhonorowana nagrodami indywidualnymi III stopnia Rektora Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, a także Zachodniopomorskim Noblem za badania mikrobiologiczne i molekularne poszerzające wiedzę na temat mechanizmów interakcji bakterii chorobotwórczych i układu immunologicznego zwierząt. Otrzymałam także stypendium MNiSW dla wybitnego młodego naukowca na lata 2015-2017.

Moje doświadczenia naukowe znalazły również uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym, o czym mogą świadczyć zaproszenia do sporządzania recenzji publikacji w takich prestiżowych czasopismach, jak: *Journal of Visualized Experiments*, *International Journal of Biological Macromolecules*, *Food and Chemical Toxicology*, *Applied Microbiology*, *Chemical Papers*, *Journal of Dairy Science*, *Veterinary Record*, *Journal of Microbiological Methods*, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.

Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 43 publikacje, z czego 6 przypada na okres przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, a 37 po jego uzyskaniu. Ponadto, jestem współautorem 2 patentów krajowych i 17 zgłoszeń patentowych, w tym 16 krajowych i 1 europejskiego.

Na dotychczasowy dorobek składa się:

- 35 oryginalnych prac twórczych, w tym 21 w czasopismach z listy JCR oraz 15 spoza listy JCR,
- 7 artykułów przeglądowych, w tym 1 w czasopiśmie z listy JCR,
- 29 doniesień i komunikatów na konferencyjnych krajowych i zagranicznych,
- 2 przyznane patenty krajowe,
- 16 krajowych zgłoszeń patentowych (wysłanych do Urzędu Patentowego),
- 1 europejskie zgłoszenie patentowe (wysłane do Urzędu Patentowego).

Wartość bibliometryczna dorobku publikacyjnego

- suma punktów za publikacje, wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy – 604,
- sumaryczny IF zgodny z rokiem ukazania się prac (w przypadku prac z 2016 roku uwzględniono IF za rok 2015) – 33,826,
- Liczba cytowań publikacji
 - ✓ według bazy Web of Science (bez autocytowań) – 17,
 - ✓ według bazy Google Scholar (bez autocytowań) – 48,
 - ✓ według bazy Scopus (bez autocytowań) – 24,
- Indeks Hirscha
 - ✓ według bazy Web of Science – 3,
 - ✓ według bazy Google Scholar – 5,
 - ✓ według bazy Scopus – 3.

Tabela 1. Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na oryginalne prace twórcze oraz artykuły przeglądowe

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	IF ^{a)}	Suma pkt. wg MNiSW ^{b)}
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR <u>wchodzące</u> w skład osiągnięcia naukowego	8	13,308	195
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR <u>niewchodzące</u> w skład osiągnięcia naukowego	13	20,232	320
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	15	-	42
Ogółem oryginalne prace twórcze	36	33,540	557
Artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach z listy JCR	1	0,286	15
Artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	6	-	32
Ogółem publikacje przeglądowe	7	0,286	47
Ogółem publikacje naukowe	43	33,826	604

^{a)} sumaryczny IF z roku ukazania się pracy (w przypadku prac z 2016 roku podano IF za rok 2015);

^{b)} liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy.

Tabela 2. Zestawienie liczbowe czasopism w których opublikowano prace naukowe

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	IF ^{a)}	Punkty wg MNiSW ^{b)}
1	Journal of Magnetism*	2	0,739	30
2	Biochemical Engineering Journal*	1	2,463	35
3	International Journal of Polymer Science*	1	1,000	25
4	LWT - Food Science and Technology	1	2,711	35
5	Carbohydrate Polymers*	1	4,219	40
6	Medicinal Chemistry Research	1	1,436	20
7	Postępy mikrobiologii	2	0,286	21
8	Acta Scientiarum Polonorum. Seria: Zootechnica	4	-	20
9	Electromagnetic Biology and Medicine*	2	2,402	40
10	Chemical and Process Engineering	1	0,653	15
11	Journal of Microbiology	2	2,715	40
12	Technical Transactions Chemistry	1	-	6
13	Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences	1	0,242	20
14	African Journal of Microbiology Research	1	-	-
15	Microbiology and Immunology	1	1,306	15
16	Research in Veterinary Science	2	3,548	70
17	Veterinary Microbiology	1	3,127	40
18	Journal of Functional Foods	1	2,632	25
19	Journal of Animal and Veterinary Advances	1	0,390	20
20	Advances in Agricultural Sciences	14	-	42
21	Engineering in Life Science*	1	2,485	25
22	Applied Biochemistry and Biotechnology	1	1,606	20
Razem		43	33,826	604

* czasopisma w których opublikowano prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę o ubieganie się o stopień naukowy doktora habilitowanego;

^{a)} sumaryczny IF z roku ukazania się pracy (w przypadku prac z 2016 roku podano IF za rok 2015);

^{b)} suma punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy.

Tabela 3. Zestawienie publikacji naukowych z podziałem na oryginalne prace twórcze oraz artykuły przeglądowe opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z listy JCR	-	21	21
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	3	12	15
Ogółem oryginalne prace twórcze	3	34	36
Artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach z listy JCR	-	1	1
Artykuły przeglądowe opublikowane w czasopismach spoza listy JCR	3	3	
Ogółem artykuły przeglądowe	3	4	7
Ogółem publikacje naukowe	6	37	43

Tabela 4. Zestawienie liczbowe patentów oraz zgłoszeń patentowych

Uzyskane patenty krajowe	2
Zgłoszenia patentowe krajowe	16
Zgłoszenia patentowe europejskie	1

Zgłoszone rekordy sekwencji nukleotydowych w bazie NCBI

JQ268899; JQ268900; JQ268901; JQ268902; JQ268903; JQ268904; JQ268905; JQ268906; JQ268907;
JQ268908; JQ268909

David Fijałkowski