dr Jolanta Mirosława Cieśla

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
e-mail: j.ciesla@ipan.lublin.pl
tel. 81 744 50 61 wew. 192

Charakterystyka fizykochemicznych właściwości wybranych koloidów asocjacyjnych oraz biokoloidów z wykorzystaniem technik rozpraszania światła laserowego

Autoreferat w języku polskim

- Załącznik Nr 2a
do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

Lublin 2018

1. Imię i nazwisko: **Jolanta Mirosława Cieśla**

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

2004 **Tytuł zawodowy magistra chemii**
Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Tytuł pracy magisterskiej: *Teoretyczny opis procesu micelizacji i adsorpcji surfaktantów gemini*
Promotor: dr hab. Jolanta Narkiewicz-Michałek, prof. UMCS

2009 **Stopień naukowy doktora nauk rolniczych**
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Zakres stosowalności nowego typu elektrod jonoselektywnych do oznaczania aktywności potasu w glebie*
Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Józefaciuk

2009 **Studia podyplomowe – Zarządzanie badaniami naukowymi i pracami rozwojowymi w jednostkach naukowych**
Wydział Filozofii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II w Lublinie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2004-2006 **Młodszy chemik**, Centrum Doskonałości AGROPHYSICS, **Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN (IA PAN)** w Lublinie

2007-2008 **Młodszy chemik**, Zakład Metrologii i Modelowania Procesów Agrofizycznych, **IA PAN** w Lublinie

2008-2009 **Asystent**, Zakład Metrologii i Modelowania Procesów Agrofizycznych, **IA PAN** w Lublinie

2009-2011 **Adiunkt**, Zakład Metrologii i Modelowania Procesów Agrofizycznych, **IA PAN** w Lublinie

2012-2016 **Adiunkt**, Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego, **IA PAN** w Lublinie

2017- **Adiunkt**, Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, **IA PAN** w Lublinie

4. Osiągnięcie naukowe (zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

4 a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Charakterystyka fizykochemicznych właściwości wybranych koloidów asocjacyjnych oraz biokoloidów z wykorzystaniem technik rozpraszania światła laserowego.

Osiągnięcie naukowe stanowi **monotematyczny cykl 7 oryginalnych prac naukowych** o sumarycznej **wartości wskaźnika IF wynoszącej 19,621** (zgodnie z rokiem ukazania się publikacji), **łącznej liczbie 200 punktów MNiSW**, zgodnie z ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych ogłoszonym w roku ukazania się publikacji (195 punktów wg $MNiSW_{2016}$) i **liczbie 36 cytowań** (27 bez autocytowań).

4 b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

H1. Cieśla J.*, Bieganowski A., Narkiewicz-Michałek J., Szymula M., **2013**. *Use of a Dynamic Light Scattering Technique for SDS/Water/Pentanol Studies*, Journal of Dispersion Science and Technology, 34(4), 566-574.

*IF_{2013} = **0,705**; punktacja $MNiSW_{2013}$ = **15** ($MNiSW_{2016}$ = 15); liczba cytowań (WoS) = **9** (7)*

H2. Cieśla J.*, Koczańska M., Narkiewicz-Michałek J., Szymula M., Bieganowski A., **2016.** *The physicochemical properties of CTAB solutions in the presence of alpha-tocopherol*, Journal of Molecular Liquids, 222, 463–470.

*IF_{2016} = **3,648**; punktacja $MNiSW_{2016}$ = **30** ($MNiSW_{2016}$ = 30); liczba cytowań (WoS) = **3** (1)*

H3. Cieśla J.*, Koczańska M., Narkiewicz-Michałek J., Szymula M., Bieganowski A., **2017.** *Alpha-tocopherol in CTAB/NaCl systems — The light scattering studies*, Journal of Molecular Liquids, 233, 15–22.

*IF_{2016} = **3,648**; punktacja $MNiSW_{2016}$ = **30** ($MNiSW_{2016}$ = 30); liczba cytowań (WoS) = **1** (0)*

H4. Cieśla J.*, Koczańska M., Narkiewicz-Michałek J., Szymula M., Bieganowski A., **2017.** *Effect of α-tocopherol on the properties of microemulsions stabilized by the ionic surfactants*, Journal of Molecular Liquids, 236, 117–123.

*IF_{2016} = **3,648**; punktacja $MNiSW_{2016}$ = **30** ($MNiSW_{2016}$ = 30); liczba cytowań (WoS) = **1** (1)*

H5. Cieśla J.*, Bieganowski A., Janczarek M., Urbanik – Sypniewska T., **2011.** *Determination of the electrokinetic potential of Rhizobium leguminosarum bv trifolii Rt24.2 using Laser Doppler Velocimetry - A methodological study*, Journal of Microbiological Methods, 85, 199 -205.

*IF_{2011} = **2,086**; punktacja $MNiSW_{2011}$ = **25** ($MNiSW_{2016}$ = 20); liczba cytowań (WoS) = **19** (15)*

H6. Cieśla J., Kopycińska M., Łukowska M., Bieganowski A., Janczarek M.*, **2016.** *Surface Properties of Wild-Type Rhizobium leguminosarum bv trifolii Strain 24.2 and Its Derivatives with Different Extracellular Polysaccharide Content*, PLOS ONE, 11(10), e0165080.

*IF_{2016} = **2,806**; punktacja $MNiSW_{2016}$ = **35** ($MNiSW_{2016}$ = 35); liczba cytowań (WoS) = **3** (3)*

H7. Cieśla J.*, Stępień-Pyśniak D., Nawrocka A., Łukowska M., Hauschild T., Wernicki A., Bieganowski A. **2018.** *Surface properties of Enterococcus faecalis cells isolated from chicken hearts determine their low ability to form biofilms*. Biofouling. 34, 149-161.

*IF_{2016} = **3,080**; punktacja $MNiSW_{2016}$ = **35** ($MNiSW_{2016}$ = 35); liczba cytowań (WoS) = **0** (0)*

*autor korespondencyjny; liczba cytowań podana w nawiasie nie uwzględnia autocytowań.

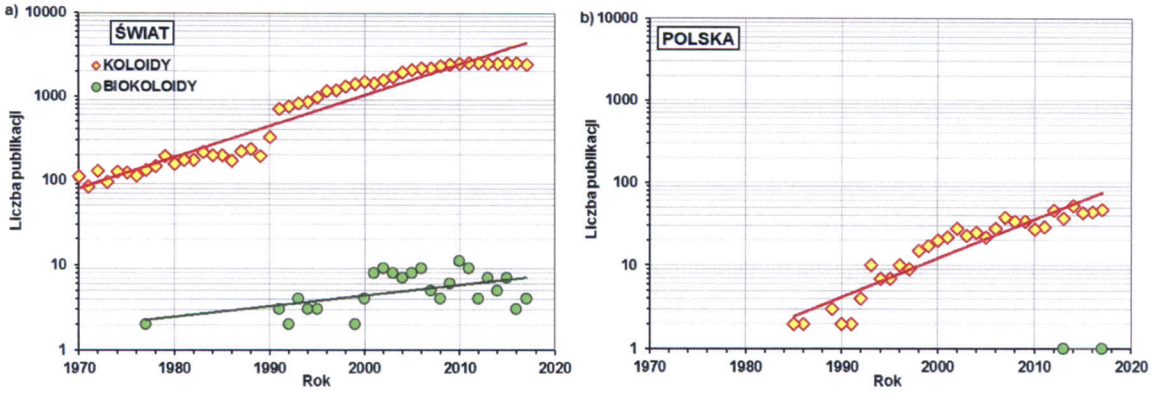
Ze względu na szeroki zakres analiz wykonanych w celu interpretacji właściwości fizykochemicznych badanych koloidów i biokoloidów prace będące podstawą prezentowanego osiągnięcia naukowego są wieloautorskie a nawet interdyscyplinarne. Motywem przewodnim wszystkich prac są właściwości fizykochemiczne układów koloidalnych charakteryzowane głównie przy użyciu technik rozpraszania światła laserowego. Technikami tymi posługuje się habilitantka i jej udział w powstaniu niniejszych artykułów naukowych wynosił od 45 do 85%. Indywidualny wkład habilitantki oraz oświadczenia wszystkich współautorów, określające wkład każdego z nich w powstanie wyżej wymienionych publikacji, przedstawiono odpowiednio w **Załączniku Nr 3** (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki) **pkt. IB** oraz **Załączniku Nr 5** (Oświadczenia współautorów publikacji).

Finansowanie:
Badania naukowe, których rezultaty stanowiły podstawę jednotematycznego cyklu publikacji, prowadzono w ramach działalności statutowej Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie, za wyjątkiem publikacji **H1**, do której odczynniki zakupiono z projektu NN310777440, kierowanego przez jednego ze współautorów (A. Bieganowski, IA PAN w Lublinie) oraz publikacji **H6**, finansowanej w ramach projektu naukowego NCN (OPUS-4) DEC-2012/07/B/NZ1/00099, kierowanego przez dr hab. M. Janczarek (UMCS Lublin), w którym jedno z zadań było realizowane przez habilitantkę.

4 c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

4c_1. WPROWADZENIE

Fizykochemiczne właściwości układów koloidalnych cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem naukowców, zarówno ze względów poznawczych, jak też możliwości praktycznego wykorzystania wyników badań, m.in. w farmacji, przemyśle kosmetycznym, technologii żywności, rolnictwie i ochronie środowiska. Według danych zawartych w bazie Web of Science [1] w 2017 r. opublikowano na świecie ponad 2400 artykułów dotyczących koloidów, z czego około 50 było polskiego autorstwa lub współautorstwa (Rys. 1). Obok pojęcia „*koloid*" (gr. *kólla* – klej i *eídos* – postać), wprowadzonego przez Grahama w 1861 roku [2], funkcjonuje określenie „*biokoloid*", obejmujące koloidy izolowane z tkanek roślin lub zwierząt oraz organizmy, których wielkość nie przekracza kilkudziesięciu mikrometrów (m.in. wirusy i bakterie) [3, 4]). Zakres wielkości cząstek zdyspergowanych w układach biokoloidalnych jest zatem szerszy niż w przypadku koloidów, dla których wg UPAC zawiera się on w przedziale od 1 nm do 1 μm [5]. Na świecie termin „*biokoloid*" pojawia się zwykle w kilku publikacjach rocznie, natomiast w Polsce są to pojedyncze prace (Rys. 1) [1, 6]. Dane te jednak nie świadczą o małym zainteresowaniu, np. badaniami właściwości powierzchniowych komórek bakteryjnych zawieszonych w cieczy. Wskazują jedynie, iż pojęcie dotykające pogranicza dwóch dziedzin nie jest jeszcze powszechnie stosowane w pracach interdyscyplinarnych, publikowanych w czasopismach chemicznych lub biologicznych.



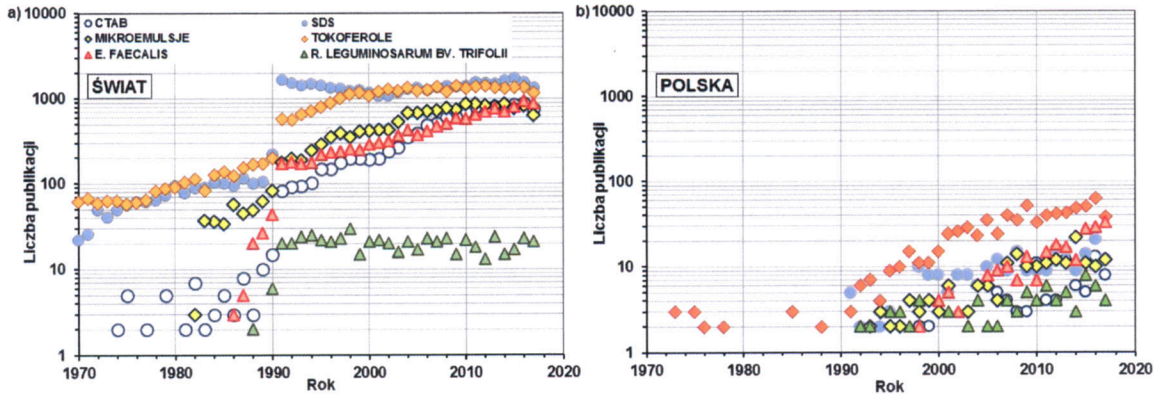
Rys. 1. Liczba prac naukowych, dotyczących koloidów i biokoloidów, publikowana rocznie **a)** na świecie i **b)** w Polsce w latach 1970 - 2017 (wg. WoS [1]).

Niezwykle interesującym, a przy tym trudnym do scharakteryzowania typem układu koloidalnego jest dyspersja ciecz/ciecz. Do zapewnienia jej kinetycznej stabilności konieczne jest zastosowanie substancji powierzchniowo czynnych (surfaktantów) o właściwościach emulgujących. Ich obecność w obszarze międzyfazowym, oddzielającym niemieszające się wzajemnie ciecze, redukuje napięcie międzyfazowe, przez co stabilizuje układ i zapobiega procesowi koalescencji, prowadzącemu do jego rozwarstwienia. Opracowanie odpowiedniego składu dyspersji ciecz/ciecz oraz sposobu jej otrzymywania pozwala uzyskiwać nano- lub mikroemulsje. Oba typy układów charakteryzują się wysokim rozdrobnieniem cząstek fazy zdyspergowanej (średnica nieprzekraczająca kilkuset nm), ale tylko mikroemulsje są termodynamicznie trwałe [7]. Samoagregacja amfifilowych cząsteczek surfaktantów w roztworach prowadzi do powstawania mono- lub wielowarstwowych struktur micelarnych, które bywają traktowane jako modele błon biologicznych [8, 9]. Małe wymiary cząstek zdyspergowanych w układach micelarnych oraz nano- i mikroemulsyjnych umożliwiają rozpatrywanie powyższych układów, jako potencjalnych nośników, transportujących różne substancje (np. odżywcze lub lecznicze) przez błony biologiczne. Pod takim kątem prowadzone są badania solubilizacji i biochemicznej aktywności substancji biologicznie czynnych w roztworach micelarnych [9]. Do modelowych surfaktantów, stosowanych w tego typu badaniach należą dodecylosiarczan sodu (SDS) oraz bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) [8, 9]. Prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się na procesie solubilizacji α-tokoferolu, jako biologicznie czynnej substancji hydrofobowej [10-12].

Komórki bakteryjne w zestawieniu z micelami lub mikroemulsjami wydają się być obiektami o zdecydowanie odmiennych właściwościach. Jednakże w bardzo dużym uproszczeniu można je traktować jako pęcherzyki utworzone przez białkowo-lipidową błonę cytoplazmatyczną, która otacza cytozol. U bakterii Gram-ujemnych nad błoną cytoplazmatyczną znajduje się przestrzeń peryplazmatyczna złożona z peptydogikanu (mureiny), wyżej zaś błona zewnętrzna zbudowana z białek, fosfolipidów oraz lipopolisacharydu (LPS). Warstwa LPS jest wyeksponowana na zewnątrz komórki. W przypadku bakterii Gram-dodatnich, zewnętrzna błona nie występuje, a warstwę graniczną z otoczeniem stanowi peptydoglikan połączony z innymi wielocukrowymi polimerami – kwasami

tejchojowymi lub tejchuronowymi. Przez tę warstwę mogą również przechodzić kwasy lipotejchojowe, zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej, a w przypadku patogennych bakterii obecne są tam również różnego rodzaju białka [13]. Interakcje pomiędzy komórkami zdyspergowanymi w cieczy mogą prowadzić do powstawania dużych aglomeratów, które z czasem ulegają sedymentacji. Jednak fizykochemiczne właściwości otoczek komórkowych są istotne nie tylko ze względu na możliwość samoagregacji komórek, ale również ich zdolność do przylegania do różnego rodzaju powierzchni (np. tkanek roślinnych lub zwierzęcych czy też narzędzi medycznych) i tworzenia warstewki, tzw. biofilmu [14-17]. Ze względu na specyfikę materiału badawczego charakterystykę fizykochemicznych właściwości biokoloidów wykonywałam we współpracy z naukowcami posiadającymi wyspecjalizowaną wiedzę, umiejętności i biegłość w posługiwaniu się technikami mikrobiologicznymi. W ramach mojego osiągnięcia naukowo-badawczego przedkładam wyłącznie te publikacje o charakterze interdyscyplinarnym, w których powstaniu mój wkład był dominujący. Dotyczą one badań fizykochemicznych powierzchniowych właściwości komórek bakteryjnych.

Na Rysunku 2 zestawiłam dane dotyczące liczby prac naukowych, jakie pojawiły się na przestrzeni niemal 5 ostatnich dekad i odnosiły się do surfaktantów (CTAB i SDS), układów koloidalnych (mikroemulsje), substancji bioaktywnych (tokoferole) oraz mikroorganizmów (*E. faecalis* i *R. leguminosarum* bv *trifolii*). Badaniami tych układów zajmowałam się przez ostatnich osiem lat. Liczba publikacji dotyczących powyższej tematyki powstających w naszych ośrodkach naukowych na przestrzeni ostatniego dwudziestolecia, systematycznie wzrasta, podczas gdy globalnie widoczna jest już stabilizacja. Szeroki zakres obszarów tematycznych i koncepcji badań podejmowanych przez naukowców w odniesieniu do wybranych przeze mnie obiektów, skutkuje corocznie ogromną ilością doniesień literaturowych.



Rys. 2. Liczba artykułów naukowych dotyczących modelowych surfaktantów (SDS i CTAB), mikroemulsji, witaminy E (tokoferole) oraz przykładowych Gram-dodatnich (*E. faecalis*) i Gram-ujemnych (*R. legumninosarum* bv *trifolii*) bakterii, publikowana **a)** na świecie i **b)** w Polsce w latach 1970 – 2017 (wg. WoS [1]).

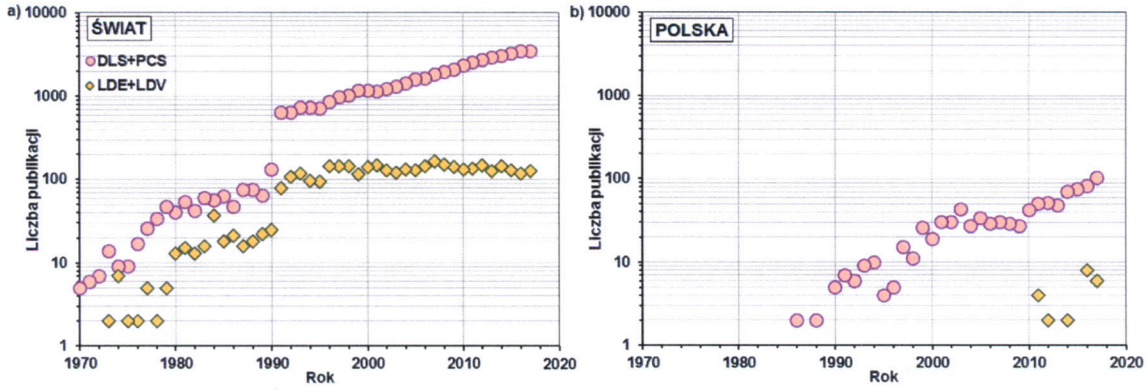
Cechą wspólną koloidów i biokoloidów jest rozpraszanie światła przez cząstki fazy zdyspergowanej, dające się zaobserwować jako tzw. efekt Tyndalla [18]. Analiza zmian intensywności rozpraszanego światła laserowego w czasie pozwala m.in. na wyznaczanie współczynnika dyfuzji

cząstek koloidalnych, a w powiązaniu z równaniem Stokesa – Einsteina – na określenie wielkości (np. średnicy) cząstek. Technika ta leży u podstaw metody Dynamicznego Rozpraszania Światła (ang. *Dynamic Light Scattering (DLS)*), znanego także pod nazwą Korelacyjnej Spektroskopii Fotonów (ang. *Photon Correlation Spectroscopy (PCS)*) [19-21].

Ze względu na fakt, iż takie biokoloidy jak bakterie posiadają własny aparat ruchu i zmiana ich położenia w ośrodku dyspergującym nie jest spowodowana jedynie ruchami Browna, metody DLS raczej nie stosuje się do wyznaczania wielkości ich cząstek (tj. komórek). W przypadku koloidów pomiar wielkości cząstek jest pomocny np. w ocenie stabilności układów (m.in. koagulacja, flokulacja, koalescencja i sedymentacja), ich klasyfikacji (np. rozróżnienie: emulsje i nanoemulsje) i badaniu takich procesów, jak solubilizacja substancji trudno rozpuszczalnych. Metoda DLS dostarcza, zatem, informacji istotnych dla opisu morfologicznych właściwości układów koloidalnych [18].

Analiza zmian intensywności światła laserowego rozpraszanego przez cząstki koloidalne poddawane działaniu pola elektrycznego pozwala na wyznaczenie ich ruchliwości elektroforetycznej oraz potencjału elektrokinetycznego. Stosowana jest w tym celu metoda Laserowej Dopplerowskiej Elektroforezy (ang. *Laser Doppler Electrophoresis (LDE)* lub *Laser Doppler Velocimetry (LDV)*) w powiązaniu z analizą fazową światła rozpraszanego [18, 19, 22]. Potencjał elektrokinetyczny charakteryzuje podwójną warstwę elektryczną, która otacza cząstkę zdyspergowaną w cieczy. Jego wartość zależy m.in. od powierzchniowego ładunku elektrycznego cząstki (rzutującego na jej ruch w polu elektrycznym), składu jakościowego (np. obecność jonów o różnej wartościowości), pH i siły jonowej ośrodka dyspergującego oraz temperatury [22]. Dla układów typu ciecz/ciecz należących do koloidów asocjacyjnych, jak również dla biokoloidów, ze względu na możliwość przechodzenia cząsteczek fazy dyspergującej częściowo do wnętrza cząstek fazy zdyspergowanej, zdefiniowanie położenia tzw. płaszczyzny poślizgu, dla której wyznaczany jest potencjał elektrokinetyczny, jest problematyczne [22]. W przypadku takich obiektów badawczych, będących tzw. cząstkami „miękkimi", lepszym podejściem wydaje się stosowanie ruchliwości elektroforetycznej do opisu ich właściwości elektrokinetycznych [23]. Jednak ze względu na to, że w doniesieniach literaturowych, autorzy operują wartościami zarówno potencjału elektrokinetycznego, jak i ruchliwości elektroforetycznej, w publikacjach składających się na moje osiągnięcie naukowe, również występują te dwie fizykochemiczne wielkości.

Zarówno metoda DLS jak i LDE jest szeroko wykorzystywana w badaniach naukowych, co przedstawiłam na Rysunku 3. Jednoczesne zastosowanie obu technik optycznych pozwala otrzymać informacje o wielkości cząstek fazy zdyspergowanej oraz ich właściwościach elektrycznych i elektrokinetycznych, co jest niezwykle istotne w kontekście badań stabilności i potencjalnych zastosowań koloidów i biokoloidów.



Rys. 3. Liczba publikacji prezentujących wyniki badań prowadzonych nad/z wykorzystaniem metod DLS/PCS i LDE/LDV, które pojawiły się **a)** na świecie i **b)** w Polsce w latach 1970-2017 (wg. WoS [1]).

Morfologiczne i elektrokinetyczne właściwości koloidów i biokoloidów, wyznaczone przy użyciu technik rozpraszania światła laserowego, mogą pozwolić na głębsze poznanie zjawisk towarzyszących takim procesom jak micelizacja i solubilizacja w układach ciecz/ciecz oraz oddziaływań międzykomórkowych i interakcji pomiędzy prokariotycznymi komórkami, a różnego rodzaju powierzchniami. Stanowiło to dla mnie podstawową przesłankę do podjęcia badań, których wyniki omawiam w autoreferacie.

4c_2. CEL PODJĘTYCH BADAŃ

Przeprowadzone przeze mnie badania miały na celu scharakteryzowanie fizykochemicznych właściwości wybranych układów koloidalnych (micelarnych oraz mikroemulsyjnych) i biokoloidów (komórek bakteryjnych) pod kątem interakcji zachodzących pomiędzy cząstkami zdyspergowanymi oraz cząstkami zdyspergowanymi i składnikami ośrodka dyspergującego, z wykorzystaniem metod dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz laserowej Dopplerowskiej elektroforezy (LDE).

W przypadku układów koloidalnych skoncentrowałam się na badaniu procesu solubilizacji α-tokoferolu – substancji biologicznie czynnej o charakterze hydrofobowym – w roztworach micelarnych tworzonych przez dwa modelowe jonowe związki powierzchniowo czynne, tj. bromek cetylotrimetyloamoniowy (CTAB) i dodecylosiarczan (VI) sodu (SDS) oraz mikroemulsjach typu olej/woda (o/w), woda/olej (w/o) i faza dwuciągła (bc) stabilizowanych przez te surfaktanty.

Analizy właściwości biokoloidów wykonałam dla wybranych szczepów bakterii Gram-ujemnych (*Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*) i Gram-dodatnich (*Enterococcus faecalis*), różniących się budową i strukturą otoczki komórkowej.

Zakres podjętych przeze mnie prac obejmował następujące zagadnienia:

1. opis morfologicznych i elektrokinetycznych właściwości agregatów surfaktantów jonowych w roztworach micelarnych,
2. określenie wpływu elektrolitu na wybrane właściwości roztworów micelarnych bromku cetylotrimetyloamoniowego,
3. ocenę wpływu dodatku α-tokoferolu na właściwości roztworów surfaktantu kationowego,
4. określenie wpływu obecności α-tokoferolu na wybrane właściwości mikroemulsji stabilizowanych przez surfaktanty jonowe,
5. zdefiniowanie i ocenę czynników rzutujących na wyniki analizy właściwości elektrokinetycznych biokoloidów, wykonywanej metodą laserowej Dopplerowskiej elektroforezy,
6. określenie wpływu budowy otoczki bakteryjnej, składu ośrodka dyspergującego oraz aktywności życiowej Gram-ujemnych bakterii *Rhizobium leguminosaru* bv *trifolii* na ich właściwości elektrokinetyczne w ciekłym podłożu,
7. charakterystykę wybranych właściwości fizykochemicznych powierzchni komórek Gram-dodatnich bakterii *Enterococcus faecalis* w ciekłym podłożu.

1. Opis morfologicznych i elektrokinetycznych właściwości agregatów surfaktantów jonowych w roztworach micelarnych.

Wymiary (średni promień lub średnica hydrodynamiczna) cząstek zdyspergowanych w ośrodku wodnym wyznaczane za pomocą metody DLS są zwykle zawyżone w stosunku do wyników uzyskiwanych innymi metodami (np. mikroskopii elektronowej) ze względu na obecność otoczki hydratacyjnej wokół cząstek [19, 20]. Niewielu autorów porusza kwestię wpływu stężenia fazy zdyspergowanej (w szczególności cząstek „miękkich") na otrzymywane tą metodą wyniki. Problem ten wymaga rozważenia, szczególnie w badaniach mikroemulsji, do uzyskania których konieczne jest użycie znacznych ilości surfaktantu [24]. W związku z powyższym przeanalizowałam wpływ stężenia jonowych związków powierzchniowo czynnych (SDS i CTAB) w ich roztworach micelarnych na wyniki otrzymywane metodami DLS oraz LDE.

We wstępnym etapie badań wyznaczyłam stężenia, powyżej których cząsteczki użytych surfaktantów występują w formie zagregowanej w wodnych roztworach bez domieszek innych substancji [**H1, H2**]. Posłużyłam się w tym celu metodą konduktometryczną, analizując zmiany przewodnictwa elektrolitycznego roztworów względem rosnącego stężenia związku powierzchniowo czynnego [25]. Uzyskane wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) [**H1, H2**] były zgodne z danymi publikowanymi przez innych autorów [26-32].

W czystych roztworach micelarnych SDS oraz CTAB wzrostowi stężenia surfaktantu towarzyszyło zmniejszenie rozmiaru agregatów wyznaczonego metodą DLS [**H1, H2**]. Wyniki pomiarów były bardzo powtarzalne, niemniej jednak otrzymywane wielkości cząstek (średnica hydrodynamiczna ok. 1 nm w najbardziej stężonych układach) znacząco odbiegały od oszacowanych przy użyciu wzorów Tanforda dla micel sferycznych [33]. Dopiero zastosowanie procedury polegającej na ekstrapolacji wyniku pomiaru do wartości odpowiadającej układowi o nieskończenie dużym rozcieńczeniu [34] pozwoliło uzyskać średnicę równą 3,12 nm dla agregatów SDS w temperaturze 20°C [**H1**] oraz 7,2 nm i 8,5 nm dla CTAB, odpowiednio w temperaturze 25 i 30°C [**H2**]. Wyznaczone w ten sposób wielkości cząstek dobrze korespondowały z dostępnymi w literaturze danymi, otrzymywanymi za pomocą innych metod [28, 30, 35]. Zaobserwowane przeze mnie zmniejszenie wielkości agregatów przy wzroście stężenia surfaktantów [**H1, H2**] mogło wynikać z nasilenia się oddziaływań hydrodynamicznych i elektrostatycznych [28, 34, 36] między ulokowanymi coraz bliżej siebie micelami [36] oraz spadku wartości średniej liczby agregacji [28, 34]. Moim zdaniem dodatkowym czynnikiem, który rzutuje na wartości średnicy zmierzone metodą DLS opartą na analizie światła rozpraszanego jest „nieostra" optyczna granica pomiędzy cząstkami zdyspergowanymi a ośrodkiem dyspergującym [**H1**]. W przypadku cząstek miękkich granica ta jest rozmyta ze względu na wnikanie cząsteczek fazy dyspergującej do zewnętrznych obszarów rdzenia miceli oraz rotację i możliwą dyfuzję cząsteczek surfaktantu, zarówno w micelach, jak i pomiędzy nimi [37].

Technika DLS pozwala uzyskać wielkość cząstki, która odpowiada średnicy kulki wykonującej takie same ruchy Browna jak cząstka badana. Nie uzyskujemy, zatem, bezpośredniej informacji o kształcie badanego obiektu. W związku z tym, zakładając różne wartości średniej liczby agregacji dostępne w literaturze dla roztworów micelarnych SDS [29, 38, 39] i stosując dostępne formuły matematyczne [40-42], obliczyłam średnie promienie agregatów o kształcie kuli, dysku, globuli oraz cylindra [**H1**]. Ich porównanie z wartościami otrzymanymi przez skorygowanie wyników pomiaru DLS [34] wykazało, że dla roztworu micelarnego SDS o stężeniu 6% i średniej liczbie agregacji 69 prawdopodobne były kształty sferyczne i elipsoidalne [**H1**]. Potwierdziły to również wyniki obliczeń wykonanych przy użyciu termodynamicznych modeli agregacji [43-45]. Wzrost stężenia SDS promował zanik małych sferycznych agregatów i zwiększenie ilości elipsoidalnych micel o średniej liczbie agregacji wynoszącej około 70 [**H1**].

Dla roztworów kationowego surfaktantu (CTAB) badanych w dwóch temperaturach (25 i 30°C), również zaobserwowałam wpływ stężenia na wielkość agregatów [**H2**]. Dane literaturowe wskazują, że w badanym przeze mnie zakresie stężenia (do 25 mM) CTAB tworzy głównie agregaty sferyczne [26, 46], zatem zmiana kształtu micel nie rzutowała na ich wielkość wyznaczoną metodą DLS [**H2**]. Agregaty były nieco większe w wyższej temperaturze, co wynikało z ich luźniejszej struktury powodowanej zwiększonym odpychaniem elektrostatycznym między monomerami w micelach oraz intensywniejszą penetracją rdzenia micel przez cząsteczki wody [**H2**].

Wartości ruchliwości elektroforetycznej oraz potencjału elektrokinetycznego wyznaczone przeze mnie metodą LDE dla micelarnych roztworów CTAB w temperaturze 25 i 30°C, podobnie jak średnica micel, wykazywały zmienność wraz ze stężeniem surfaktantu [**H2**]. W zakresie stężenia CTAB, dla którego występował intensywny spadek wielkości cząstek (DLS), zaobserwowałam wzrost ruchliwości elektroforetycznej i wartości potencjału elektrokinetycznego aż do osiągnięcia maksimum. Fakt ten potwierdza wpływ oddziaływań elektrostatycznych między micelami surfaktantu jonowego na wielkość agregatów. Dalsze zwiększenie stężenia układu skutkowało zmniejszeniem wartości badanych parametrów elektrokinetycznych. Duże zagęszczenie agregatów w układzie utrudniało ich ruch w polu elektrycznym [**H2**]. Niektórzy autorzy sugerowali, że spadek wartości potencjału elektrokinetycznego w roztworach CTAB o dużym stężeniu wynika z powstawania klasterów micel [32], nie jest to jednak weryfikowalne metodą DLS [**H2**].

Wykorzystując metody dynamicznego rozpraszania światła laserowego i laserowej Dopplerowskiej elektroforezy udało mi się, zatem, scharakteryzować układy micelarne surfaktantów jonowych pod względem wielkości agregatów oraz potencjału elektrokinetycznego. Wykazałam wpływ stężenia surfaktantu na wzrost oddziaływań elektrostatycznych między agregatami, skutkujący spadkiem wartości średniej średnicy hydrodynamicznej, zmierzonej metodą DLS. Podkreśliłam konieczność stosowania poprawki związanej z oddziaływaniami elektrostatycznymi w celu wyznaczenia rzeczywistych rozmiarów micel w roztworze wodnym oraz fakt występowania nieostrej granicy optycznej pomiędzy cząstkami zdyspergowanymi i ośrodkiem dyspergującym, mogący rzutować na wyniki pomiarów prowadzonych metodami analizy światła rozpraszanego. Powiązanie wyników uzyskanych technikami DLS i LDE z danymi literaturowymi oraz wykorzystanie modeli teoretycznych łączących wielkość agregatów z ich kształtem pozwoliło mi dobrze scharakteryzować badane układy micelarne pod względem właściwości morfologicznych i elektrokinetycznych.

2. Określenie wpływu elektrolitu na wybrane właściwości roztworów micelarnych bromku cetylotrimetyloamoniowego.

Kolejnym etapem przeprowadzonych przeze mnie badań było scharakteryzowanie wielkości cząstek oraz właściwości elektrokinetycznych micelarnych roztworów CTAB o stężeniu NaCl wynoszącym 0,15 i 0,50 M w temperaturze 25°C [**H3**].

Zwiększenie siły jonowej roztworów CTAB przez wprowadzenie soli nie wyeliminowało wpływu stężenia surfaktantu na wielkość cząstek wyznaczoną metodą DLS [**H3**] obserwowanego przeze mnie w układach bez dodatku elektrolitu [**H2**]. Wraz ze wzrostem stężenia CTAB następował spadek mierzonej wielkości cząstek przy obu zastosowanych stężeniach NaCl [**H3**], choć nie był on tak znaczący jak dla serii czystych roztworów kationowego surfaktantu [**H2**]. Towarzyszył mu wzrost ruchliwości elektroforetycznej wyznaczonej metodą LDE, potwierdzający nasilanie się elektrostatycznego

odpychania między agregatami [**H3**] o coraz bardziej zwartej strukturze [34, 35, 47]. Roztwory micelarne CTAB zawierające NaCl charakteryzowały się niskimi wartościami indeksu polidyspersyjności (wyznacznika różnorodności cząstek zdyspergowanych pod względem wielkości), a zwiększenie stężenia surfaktantu skutkowało dodatkowym ujednoliceniem wymiarów cząstek fazy zdyspergowanej. Efekt ten nie był wcześniej eksponowany w publikacjach naukowych. Średnica hydrodynamiczna agregatów w układach zawierających elektrolit (5,9 nm i 6,4 nm, odpowiednio przy 0,15 i 0,50 M NaCl) [**H3**] była mniejsza w stosunku do wyznaczonej w roztworach bez dodatku NaCl [**H2**]. Jony chlorkowe neutralizowały dodatni ładunek hydrofilowych głów surfaktantu, pozwalając na zmniejszenie odległości pomiędzy monomerami w agregatach. Wprowadzenie elektrolitu skutkowało ponadto zmniejszeniem się otoczki hydratacyjnej micel [**H3**].

Wielkości agregatów nieznacznie rosły ze wzrostem stężenia NaCl, co wskazywało na możliwość upakowania większej liczby monomerów w miceli. Wykorzystując wartości średnich średnic hydrodynamicznych oraz wzory Tanforda [33] obliczyłam średnie liczby agregacji przy założonym sferycznym kształcie micel. Założenie to wynikało z faktu, iż średnica wyznaczana metodą DLS odnosi się do hipotetycznych cząstek kulistych o tym samym współczynniku dyfuzji w danym ośrodku, jaki wykazuje cząstka badana [20] oraz danych literaturowych dotyczących roztworów CTAB [48]. Przy niskich stężeniach CTAB średnie liczby agregacji wynosiły 107 i 152, odpowiednio dla 0,15 i 0,50 M NaCl. Wzrost stężenia CTAB w układach prowadził do wzrostu liczby micel i zmniejszenia liczby agregacji do około 40 i 70, odpowiednio przy stężeniu soli równym 0,15 i 0,50 M [**H3**]. Otrzymane przeze mnie wartości średnich liczb agregacji dla stężonych układów (25 mM CTAB) były niższe od uzyskanych przez innych autorów [49-51], co mogło wynikać z małych wartości średnic hydrodynamicznych wykorzystanych do obliczeń. Trudno jednak porównywać te dane ze względu na różne stężenia elektrolitu oraz metody pomiarowe stosowane przez badaczy [49-51].

Znając ruchliwości elektroforetyczne agregatów, ich średnice hydrodynamiczne i średnie liczy agregacji obliczyłam ładunek elektryczny generowany na powierzchni agregatów, liczbę zdysocjowanych monomerów w miceli i finalnie stopień dysocjacji micel. Wynosił on ok. 7,5 i 4,5%, przy stężeniu soli równym odpowiednio 0,15 i 0,50 M [**H3**] i był znacznie niższy od wyznaczonego przeze mnie metodą konduktometryczną dla roztworów micelarnych CTAB niezawierających soli (27%) [**H2**].

W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań stwierdziłam, że nawet obecność 0,5 M NaCl w układzie micelarnym kationowego surfaktantu nie eliminuje całkowicie oddziaływań elektrostatycznych między agregatami widocznego ze wzrostem stężenia związku powierzchniowo czynnego. Powiązanie wyników uzyskanych metodami DLS i LDE z metodami obliczeniowymi i wykorzystaniem odpowiednich modeli teoretycznych pozwoliło mi określić średnie liczby agregacji oraz stopień zdysocjowania micel. Z takim podejściem analitycznym nie spotkałam się w dostępnej literaturze tematycznej. Wzrost stężenia soli z 0,15 M do 0,50 M przy danym stężeniu surfaktantu skutkował nieznacznym wzrostem średniej liczby agregacji oraz zmniejszeniem stopnia dysocjacji micel.

3. Ocena wpływu dodatku α-tokoferolu na właściwości roztworów surfaktantu kationowego.

Micelarna solubilizacja substancji trudno rozpuszczalnych w danym ośrodku jest jednym ze sposobów otrzymywania nanonośników składników biologicznie czynnych o potencjalnym wykorzystaniu w farmacji oraz przemyśle kosmetycznych lub technologii żywności [52-54].

Do substancji biologicznie aktywnych o szerokim spektrum zastosowań należy witamina E. Obejmuje ona grupę związków, których cząsteczki zawierają pierścień chromanolowy o różnej liczbie i usytuowaniu grup metylowych (α, β, γ i δ) i łańcuch fitylowy z pojedynczymi wiązaniami między atomami węgla (tokoferole) lub obecnością wiązań podwójnych (tokotrienole). Najbardziej aktywną formą tej rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy jest α-tokoferol [10, 55-57]. Wykazuje on silne działanie przeciwutleniające, które zawdzięcza obecności grupy fenolowej w cząsteczce [11]. Stosuje się go jako antyoksydant i naturalny konserwant (E306) w wielu produktach [12]. Witamina E poprawia efektywność leków w terapii przeciwnowotworowej [12, 54]. Micelarne roztwory zawierające witaminę E są badane jako potencjalne nośniki substancji biologicznie czynnych, np. w terapii raka szyjki macicy, glejaka i raka piersi [54]. Badania modelowe wskazują, że w interakcji z żywymi komórkami cząsteczki α-tokoferolu lokują się w błonie komórkowej równolegle do węglowodorowych łańcuchów lipidów. Jednak ich położenie i przestrzenna orientacja w błonach biologicznych nie jest precyzyjnie określona [57]. W badaniach układów micelarnych i mikroemulsyjnych zawierających α-tokoferol główny nacisk kładziony jest na biochemiczne właściwości tej substancji [24], podczas gdy jej potencjalny wpływ na fizykochemiczne właściwości tych układów nie jest dobrze zbadany. W związku z powyższym podjęłam próbę określenia wpływu obecności witaminy E na właściwości fizykochemiczne roztworów micelarnych i mikroemulsji stabilizowanych przez jonowe związki powierzchniowo czynne.

Pierwszym etapem badań było określenie roli cząsteczek α-tokoferolu w procesie micelizacji kationowego surfaktantu **[H2]**. Krytyczne stężenie micelizacji CTAB w roztworach zawierających od 0,3 do 11,6 mM witaminy wyznaczałam metodą konduktometryczną w dwóch temperaturach (25 i 30°C). Wprowadzenie do układu hydrofobowych cząsteczek α-tokoferolu skutkowało obniżeniem przewodnictwa elektrolitycznego względem jego wartości odnotowanej w czystym roztworze CTAB o danym stężeniu. Spadek wartości przewodnictwa był wprost proporcjonalny do zadanej ilości witaminy i wynikał z możliwego powstawania hydrofobowych domen (szczególnie w roztworach o małej zawartości CTAB) oraz tworzenia się mieszanych agregatów kationowego surfaktantu i witaminy E. Agregacja kationowego surfaktantu w obecności cząsteczek α-tokoferolu w obu temperaturach następowała przy niższym stężeniu CTAB niż w układzie bez witaminy [**H2**]. Taki wpływ α-tokoferolu na proces micelizacji jonowego surfaktantu nie był wcześniej dyskutowany w literaturze. Inni autorzy wskazywali jedynie na zmiany strukturalne zachodzące w obecności witaminy E, np. w dyspersjach fosfolipidów [57, 58]. Agregacja w roztworze CTAB zawierającym witaminę E jest ułatwiona dzięki oddziaływaniom hydrofobowym pomiędzy cząsteczkami α-tokoferolu i alkilowymi łańcuchami cząsteczek surfaktantu, co sprzyja powstawaniu mieszanych

agregatów. Ponadto lokalizacja pierścieni chromanolowych w otoczeniu hydrofilowych głów CTAB zmniejsza elektrostatyczne odpychanie pomiędzy nimi [**H2**].

Wykonane przeze mnie obliczania termodynamicznych parametrów micelizacji (standardowa energia micelizacji oraz stopień wiązania przeciwjonów [59, 60]), wykazały ponadto, że mieszane agregaty α-tokoferol/CTAB są w większym stopniu zdysocjowane niż micele CTAB [**H2**]. Zmniejszenie stopnia wiązania przeciwjonów było obserwowane przez innych badaczy w roztworze CTAB zawierającym fenol [59], choć efekt ten nie był tak istotny jak w przypadku α-tokoferolu [**H2**].

Wyniki pomiarów wielkości cząstek wykonanych metodą DLS dla układów zawierających witaminę E pokazały, że wbudowywanie się cząsteczek α-tokoferolu w agregaty CTAB skutkowało znaczącym wzrostem ich średnicy hydrodynamicznej. Agregaty były tym większe, im niższe było stężenie CTAB przy tej samej ilości witaminy E wprowadzonej do układu. Przy małym stężeniu surfaktantu w układach występowały duże aglomeraty witaminy z zakotwiczonymi w nich za pomocą łańcuchów hydrofobowych cząsteczkami CTAB (ok. 100 nm). Wzrost stężenia surfaktantu promował natomiast powstawanie mniejszych mieszanych agregatów (50-60 nm). Potwierdziła to analiza wartości indeksu polidyspersyjności. Im więcej cząsteczek surfaktantu przypadało na cząsteczkę α-tokoferolu, tym układy były bardziej jednorodne pod względem wielkości cząstek [**H2**]. W całym badanym zakresie stężeń CTAB i α-tokoferolu wielkość mieszanych agregatów była niższa niż 300 nm, zatem możliwe jest ich przenikanie przez błony biologiczne [61].

Istotny wydaje się fakt, iż obecność α-tokoferolu powodowała znaczący wzrost ruchliwości elektroforetycznej i potencjału elektrokinetycznego w układzie względem wartości uzyskanych w roztworach micelarnych CTAB bez witaminy E [**H2**]. Dysocjacja elektrolityczna hydrofilowych głów CTAB w mieszanych micelach jest ułatwiona, a stężenie przeciwjonów w warstwie Sterna mniejsze niż w przypadku agregatów CTAB bez witaminy E. Podwójna warstwa elektryczna mieszanych micel α-tokoferol/CTAB ma zatem luźniejszą strukturę niż agregatów samego surfaktantu. Poprzez wzrost wartości potencjału elektrokinetycznego (oraz elektrostatycznego odpychania między agregatami) wprowadzenie witaminy E do roztworu micelarnego kationowego surfaktantu zwiększa jego stabilność [**H2**], co nie było wcześniej sygnalizowane w literaturze.

Wpływ obecności witaminy E na micelarne roztwory CTAB badałam także w układach zawierających elektrolit (0,15 i 0,50 M NaCl, 25°C) [**H3**]. Wzrost stężenia elektrolitu skutkował mniej efektywną solubilizacją α-tokoferolu w badanych układach micelarnych CTAB [**H2, H3**], co dla innych tego typu układów zawierających sól było już wcześniej obserwowane [62]. Wskazuje to, że tokoferol lokuje się pomiędzy molekułami CTAB [**H2**], gdyż przy umiejscowieniu w rdzeniu agregatów jego solubilizacja powinna rosnąć ze wzrostem stężenia soli [63].

Wbudowywanie się cząsteczek witaminy E w micele również w obecności NaCl prowadziło do zwiększenia średnicy hydrodynamicznej agregatów CTAB [**H3**], choć nie tak znacznego jak w układzie bez elektrolitu [**H2**]. Wielkość agregatów wyznaczona metodą DLS dla wszystkich kombinacji stężeń surfaktantu i witaminy nie przekraczała 10 nm [**H3**], co potwierdzało zupełną

solubilizację α-tokoferolu [64] oraz możliwość jego trans-membranowego transportu w formie mieszanych micel [61]. Dodatek witaminy przy danym stężeniu surfaktantu prowadził do wzrostu indeksu polidyspersyjności. Jednocześnie, im stężenie surfaktantu było wyższe, tym układ był bardziej jednorodny pod względem wielkości cząstek [**H3**].

Odnotowałam, iż podobnie jak w układach bez dodatku elektrolitu [**H2**] wzrost stężenia witaminy prowadził do znaczącego wzrostu ruchliwości elektroforetycznej mieszanych agregatów [**H3**]. Zakładając lokalizację α-tokoferolu w warstwie palisadowej CTAB i sferyczność agregatów oraz znając ich wielkości wyznaczone metodą DLS, obliczyłam średnie liczny agregacji surfaktantu w micelach. Przy wyższym stężeniu soli agregaty były zbudowane z większej liczby monomerów CTAB. Średnie liczby agregacji nieznacznie malały ze wzrostem ilości witaminy w układzie, co było szczególnie widoczne przy niższym stężeniu elektrolitu. Dla niektórych układów przy 0,50 M stężeniu NaCl średnie liczby agregacji były wyższe niż wartości graniczne dla sferycznych micel, co wskazywało że w roztworach mogą być obecne także agregaty innych kształtów [**H3**].

W oparciu o wyniki pomiarów ruchliwości elektroforetycznej uzyskane metodą LDE, znając wielkość micel i średnie liczby agregacji, obliczyłam powierzchniowy ładunek elektryczny agregatów oraz ich stopień dysocjacji [**H3**]. Wzrost stężenia NaCl skutkował zmniejszeniem stopnia dysocjacji agregatów [**H2, H3**]. Stopień dysocjacji micel rósł ze wzrostem wartości stosunku molowego witaminy do CTAB. Efekt ten był lepiej widoczny przy niższym stężeniu soli [**H3**]. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż dotychczas brak jest doniesień naukowych dotyczących badania wpływu obecności α-tokoferolu na elektryczne i elektrokinetyczne właściwości micelarnych roztworów jonowych surfaktantów [**H2, H3**].

Przeprowadzone z wykorzystaniem metod analizy rozpraszanego światła laserowego kompleksowe badania roztworów micelarnych kationowego surfaktantu pozwoliły mi określić wpływ obecności witaminy E na wybrane właściwości fizykochemiczne tych układów. Dodatek α-tokoferolu do roztworu CTAB ułatwiał agregację surfaktantu, prowadząc do obniżenia wartości CMC. Solubilizacja witaminy E skutkowała wzrostem wielkości agregatów - czego należało oczekiwać - szczególnie widocznym w roztworach niezawierających soli. Jej obecność pomiędzy monomerami CTAB w mieszanych micelach ułatwiała dysocjację hydrofilowych głów surfaktantu, zwiększając stabilność układów, zarówno przy braku elektrolitu, jak i w jego obecności. Taki efekt nie był wcześniej prezentowany i dyskutowany w literaturze. Udało mi się go zaobserwować analizując wyniki pomiarów wykonanych metodami DLS i LDE.

4. Określenie wpływu obecności α-tokoferolu na wybrane właściwości mikroemulsji stabilizowanych przez surfaktanty jonowe.

Początkowy etap badań wykonanych przeze mnie w celu określenia wpływu α-tokoferolu na właściwości mikroemulsji stabilizowanych przez modelowe jonowe związki powierzchniowo czynne dotyczył charakterystyki mikroemulsji SDS/woda/pentanol niezawierającej dodatkowych składników. W powyższym układzie o różnej zawartości alkoholu (1-77%), odpowiadającej systemom olej/woda

(o/w), faza dwuciągła (bc) i woda/olej (w/o), wyznaczyłam wielkość cząstek fazy zdyspergowanej (temperatura 20°C), stosując metodę DLS [**H1**]. Wyniki pomiarów wykonanych w układzie o/w, podobnie jak w roztworze micelarnym SDS, były znacznie zaniżone względem wartości szacowanych teoretycznie. Był to rezultat odpychania elektrostatycznego pomiędzy cząstkami zdyspergowanymi. Zastosowanie poprawki związanej z tym efektem [34] pozwoliło uzyskać wielkości cząstek, jakich można było oczekiwać biorąc pod uwagę budowę cząsteczki SDS [33]. Analiza skorygowanych wielkości cząstek zdyspergowanych pozwoliła zaobserwować, że w układzie o/w wzrost stężenia pentanolu prowadził do zmniejszenia się ich promienia. Zostało w ten sposób potwierdzone działanie alkoholu, jako kosurfaktantu. Pentanol, lokując się w warstwie palisadowej cząsteczek SDS, zmniejszał odpychanie pomiędzy hydrofilowymi głowami surfaktantu, a tym samym także odległości między nimi [**H1**].

W oparciu o publikowane przez innych autorów średnie liczby agregacji możliwe do wystąpienia w układach o/w i w/o stabilizowanych przez SDS [29, 38, 39], zakładając różne możliwe kształty cząstek zdyspergowanych, obliczyłam odpowiadające im wartości promieni. Ich porównanie z wynikami otrzymanymi bezpośrednio z pomiaru DLS, jak również skorygowanymi na efekt oddziaływań elektrostatycznych, pozwoliło mi oszacować najbardziej prawdopodobny kształt cząstek fazy zdyspergowanej. Wyniki wykonanych przeze mnie obliczeń pokazały, że drobiny fazy olejowej w układzie o/w były sferyczne a wzrostowi stężenia alkoholu towarzyszyło zmniejszenie liczby monomerów SDS w obszarze międzyfazowym. W układzie w/o wzrostowi stężenia alkoholu, tworzącego fazę pseudo-olejową, również towarzyszył spadek wielkości agregatów, przy czym oprócz kształtu sferycznego możliwy był także elipsoidalny – a przy najwyższej ilości pentanolu – cylindryczny [**H1**].

Na wyniki pomiaru wielkości cząstek metodą DLS w mikroemulsji SDS/woda/pentanol wpływa nieostra „optyczna" granica faz występująca w układach ciecz/ciecz. W układzie o/w wynika to możliwej penetracji zewnętrznych obszarów hydrofobowego rdzenia przez cząsteczki wody, natomiast w układzie w/o z częściowej rozpuszczalności alkoholu w wodzie, czyli przenikania jego cząsteczek przez obszar międzyfazowy do hydrofilowego rdzenia. Wyniki pomiarów uzyskane dla fazy bc, mimo że bardzo powtarzalne i odpowiadające długości alkilowego łańcucha SDS [**H1**], są trudno interpretowalne. Faza ta jest definiowana jako domeny cząsteczek wody i fazy olejowej przenikające się dzięki monowarstwie surfaktantu obecnej między nimi [65, 66].

Dzięki pomiarom wielkości cząstek, wykonywanym metodą DLS w kilkudniowych odstępach przez okres miesiąca, udało mi się wykazać stabilność badanych typów układu SDS/woda/pentanol [**H1**], charakterystyczną dla mikroemulsji [7].

Kolejny etap badań dotyczył solubilizacji witaminy E (α-tokoferolu) w mikroemulsjach SDS/woda/pentanol [8] i CTAB/butanol/oktan/woda [67] o różnej zawartości alkoholu jako fazy pseudo-olejowej, narzucającej typ o/w, bc lub w/o danego układu. Zawartość α-tokoferolu w próbkach wynosiła od 0,01 do 0,25 %. Układy były badane pod kątem przewodnictwa elektrolitycznego, ruchliwości elektroforetycznej oraz wielości cząstek fazy zdyspergowanej w temperaturze 25°C [**H4**]. W układach o/w stabilizowanych przez SDS oraz CTAB zastosowano odpowiednią poprawkę [**H1, H2,** 34]

w celu wyeliminowania wpływu oddziaływań elektrostatycznych na wielkość cząstek uzyskiwaną metodą DLS. Udało się zaobserwować, że dla tego samego typu układu większą średnicę hydrodynamiczną wykazywały drobiny fazy zdyspergowanej obecne w mikroemulsji stabilizowanej przez surfaktant kationowy. Wynikało to z nieco innego składu ilościowego próbek, jak również tworzenia przez CTAB agregatów złożonych z większej liczby monomerów niż jest to w przypadku SDS [68]. Wielkość cząstek fazy zdyspergowanej w układach o/w rosła ze wzrostem stężenia alkoholu, natomiast w układach w/o – malała. Solubilizacja witaminy E w mikroemulsji stabilizowanej przez anionowy surfaktant nie prowadziła do istotnych zmian wielkości cząstek wyznaczonej metodą DLS. W przypadku mikroemulsji stabilizowanej przez CTAB średnica hydrodynamiczna cząstek fazy zdyspergowanej nieznacznie rosła w układzie o/w o stężeniu butanolu równym 10%, natomiast przy dwukrotnie wyższej zawartości alkoholu malała ze wzrostem stężenia α-tokoferolu. W przypadku mikroemulsji CTAB/butanol/oktan/woda także w próbce o charakterze fazy dwuciągłej zaobserwowałam nieznaczny spadek średnicy hydrodynamicznej cząstek [**H4**]. Zmiany wielkości cząstek, bądź ich brak, wynikały z różnej lokalizacji cząsteczek α-tokoferolu, wprowadzonych do mikroemulsji. W układach o/w cząsteczki substancji bioaktywnej lokowały się pomiędzy cząsteczkami surfaktantu na granicy faz, co przy niskich stężeniach witaminy nie skutkowało wzrostem wielkości cząstek fazy olejowej. w układzie w/o. Ponadto dobra rozpuszczalność α-tokoferolu w zastosowanych alkoholach (pentanol, butanol) tworzących fazę olejową powodowała brak wpływu witaminy na wielkość cząstek. Układy stabilizowane przez obecność CTAB charakteryzowały się wyższymi wartościami indeksu polidyspersyjności niż w przypadku SDS, co wynikało prawdopodobnie z różnych zdolności emulgujących tych surfaktantów [69]. Wprowadzenie witaminy E do mikroemulsji modyfikowało stopień jednorodności wielkości cząstek fazy zdyspergowanej zależnie od typu układu i zawartości poszczególnych komponentów [**H4**]. Obecność cząsteczek α-tokoferolu znacząco wpływała na ruchliwość elektroforetyczną cząstek fazy zdyspergowanej w układach o/w stabilizowanych przez jonowe surfaktanty (SDS i CTAB). W tego typu mikroemulsjach o najniższej zawartości alkoholu obserwowano wzrost bezwzględnej wartości ruchliwości elektroforetycznej ze wzrostem stężenia witaminy. Potwierdziło to postulowane wcześniej przeze mnie wbudowywanie się cząsteczek α-tokoferolu w monowarstwę molekuł surfaktantu na granicy faz. Wyniki moich wcześniejszych badań wskazywały, że taka lokalizacja cząsteczek witaminy E ułatwia dysocjację cząsteczek surfaktanu [**H2, H3**]. Wzrost ładunku elektrycznego na powierzchni cząstek fazy zdyspergowanej skutkuje zwiększeniem szybkości ich przemieszczania się w polu elektrycznym. Wzrost stężenia alkoholu powoduje, że cząsteczki α-tokoferolu zostają głębiej zakotwiczone w olejowym rdzeniu i efektywność ekranowania prze nie hydrofilowych głów surfaktantu maleje [**H4**].

Wyniki pomiarów wielkości cząstek i ich ruchliwości elektroforetycznej w mikremulsjach stabilizowanych przez jonowe surfaktanty pozwoliły zaobserwować, że wprowadzenie α-tokoferolu nieznacznie modyfikuje właściwości powyższych układów. Wpływ witaminy E był widoczny w systemach typu o/w. W obecności niewielkiej ilości alkoholu, jako kosurfaktantu, wbudowywanie się

α-tokoferolu w mieszane agregaty ułatwiało dysocjację hydrofilowych głów surfaktantu, przez co ruchliwość elektroforetyczna cząstek zdyspergowanych rosła. Zwiększenie zawartości fazy olejowej efekt ten niwelowało. Przy stężeniu witaminy E nieprzekraczającym 0,25% w analizowanych mikroemulsjach typu o/w, bc i w/o bardziej znaczący był wpływ zawartości fazy olejowej niż solubilizowanej substancji na wielkość cząstek i właściwości elektrokinetyczne układów.

5. Zdefiniowanie i ocena czynników rzutujących na wyniki analizy właściwości elektrokinetycznych biokoloidów wykonywanej metodą laserowej Dopplerowskiej elektroforezy.

Technika laserowej Dopplerowskiej elektroforezy w połączeniu z analizą fazową światła rozpraszanego jest metodą pozwalającą szybko i precyzyjnie wyznaczać ruchliwość elektroforetyczną cząstek zdyspergowanych w cieczy, których wielkość nie przekracza kilku mikrometrów. Została ona szybko zaadaptowana do badań obiektów biologicznych [14, 16]. Jednak porównanie wyników uzyskiwanych przez różnych badaczy nawet dla tego samego szczepu bakteryjnego jest trudne. Wynika to, m.in. z zaniedbywania informacji o preparatyce i kondycjonowaniu próbek, sposobie prowadzenia pomiarów oraz – co wydaje się istotne dla badań żywych komórek – fazy życiowej (np. faza wzrostu lub udział liczbowy martwych komórek w badanej populacji) aktualnej dla prowadzonych analiz.

W związku z powyższym moja pierwsza publikacja odnosząca się do badań właściwości biokoloidów dotyczyła metodycznych aspektów wyznaczania potencjału elektrokinetycznego bakterii zdyspergowanych w ciekłych podłożach [**H5**]. Obiektem badawczym był szczep dziki Rt24.2 bakterii glebowych *Rizobium leguminosarum* bv *trifolii* żyjących w symbiozie z roślinami motylkowatymi, wyhodowany i scharakteryzowany pod względem genetycznym oraz biochemicznym w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie - Skłodowskiej w Lublinie [70]. Przeanalizowałam wpływ składu i siły jonowej ośrodka dyspergującego, ilości komórek zawieszonych w cieczy (wyrażonej jako gęstość optyczna) oraz temperatury na wartości potencjału elektrokinetycznego. Opierając się na teorii zjawisk elektrokinetycznych czynniki te powinny modyfikować szybkość poruszania się komórek w polu elektrycznym [22]. Badałam także znaczenie takich parametrów, jak faza wzrostu komórek, czas przechowywania ich dyspersji, powtarzanie pomiaru dla tej samej próbki oraz zastosowanie termicznego lub chemicznego czynnika dezaktywującego bakterie [**H5**].

Przeanalizowałam wpływ składu i siły jonowej kilku ciekłych podłoży stosowanych do hodowli bakterii *R. leguminosarum* (t.j. 79CA [71], TY [72], 20E [73], GYM [74] i M1 [75]; pH pożywek: 7,0-7,2) oraz wodnego roztworu NaCl (stężenie 0,9% i 0,2%). Pomiary potencjału elektrokinetycznego wykonałam w temperaturze 20°C przy stałym stężeniu komórek bakteryjnych w ośrodkach dyspergujących. Nie tylko średnie wartości potencjału, ale także powtarzalność wyników w serii pomiarowej zależały od zastosowanego podłoża. Wartości bezwzględne potencjału elektrokinetycznego komórek bakteryjnych w podłożach o zbliżonej sile jonowej (TY, 79CA i 20E)

były bliskie sobie a zmniejszenie siły jonowej ciekłego podłoża skutkowało ich wzrostem, czego należało oczekiwać. Znaczne wartości odchylenia standardowego uzyskane w przypadku niektórych typów układów sugerowały, że zastosowane w nich podłoża nie są odpowiednie do prowadzenia elektroforezy. Do badania wpływu kolejnych czynników na wartości potencjału elektrokinetycznego bakterii wybrano podłoże TY, jako ośrodek dyspergujący ubogi w składniki mineralne, ale zapewniający bakteriom dobre warunki do przeżycia. Wykonano pomiary potencjału elektrokinetycznego komórek bakterii w temperaturze równej odpowiednio 5, 10 i 20 (±0,1) °C po wcześniejszym ich kondycjonowaniu w zadanych warunkach przez 1,5 godziny. Wartość potencjału zmieniała się wraz z temperaturą, jednak ze względu na małą liczbę punktów pomiarowych nie udało się wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących wpływu temperatury. Wzrost ilości komórek zdyspergowanych w podłożu TY (zakres gęstości optycznej od 0,05 do 0,5) skutkował wzrostem bezwzględnej wartości potencjału elektrokinetycznego.

Wartości potencjału elektrokinetycznego komórek (przy stałej gęstości optycznej próbek) zmieniały się wraz z fazą wzrostu bakterii. Najwyższe wartości bezwzględne potencjału charakteryzowały dyspersję komórek pochodzących z 24-godzinnnej hodowli. Zmiany aktywności metabolicznej bakterii wraz z wiekiem populacji skutkowały zmniejszeniem wartości bezwzględnej potencjału. Przechowywanie próbek przez 48 godzin w niskiej temperaturze (4°C) nieznacznie różnicowało uzyskane wyniki pomiarów względem uzyskanych dla próbek świeżo przygotowanych lub przechowywanych przez 24 godziny. Wykonywanie kilku powtórzeń pomiarów w tej samej próbce wprowadzonej do celki pomiarowej również rzutowało na uzyskiwane rezultaty. Wyniki badań przewodnictwa elektrolitycznego, które prowadziłam równolegle z badaniami potencjału elektrokinetycznego pokazały, że po wykonaniu pierwszego pomiaru ruchliwości elektroforetycznej przewodnictwo układu rośnie, przy czym dalsze zwiększenie ilości pomiarów nie wpływa już na jego wartość. W przypadku powtarzania pomiarów przewodnictwa w próbce dyspersji komórek bakteryjnych niepoddawanej elektroforezie taki efekt nie występuje [**H5**]. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego zjawiska jest desorpcja jonów z otoczki bakteryjnej do fazy dyspergującej lub efekt Joule'a [76]. Zastosowanie fizycznego (wysoka temperatura [75]) lub chemicznego (izopropanol [77]) czynnika dezaktywującego bakterie skutkuje zmniejszeniem wartości bezwzględnej potencjału elektrokinetycznego komórek [**H5**].

Wykonywanie pomiarów potencjału elektrokinetycznego żywych komórek bakteryjnych wymaga, zatem, uwzględnienia wpływu różnych czynników na uzyskiwane wyniki. Obejmują one zarówno sposób preparatyki próbek, jak też warunki prowadzenia pomiaru. Ich definiowanie w opisie metodyki badań pozwala na pełniejszą interpretację i umożliwia porównanie wyników otrzymywanych przez różne zespoły badawcze.

6. Określenie wpływu budowy otoczki bakteryjnej, składu ośrodka dyspergującego oraz aktywności życiowej Gram-ujemnych bakterii *Rhizobium leguminosaru* bv *trifolii* na ich właściwości elektrokinetyczne w ciekłym podłożu.

Struktura i budowa chemiczna otoczki komórki bakteryjnej odgrywa istotną rolę nie tylko w procesach wymiany substancji pomiędzy jej wnętrzem a otoczeniem oraz ochrony przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, ale wpływa także na właściwości adhezyjne komórki, rzutujące na jej przyczepność do różnych powierzchni (w tym tkanek roślinnych i zwierzęcych). Warunkiem samoagregacji komórek oraz tworzenia przez nie biofilmu jest pokonanie sił odpychania pomiędzy komórkami oraz komórkami i powierzchnią danego materiału [14, 78, 79]. Otoczka komórek bakterii Gram-ujemnych, do których zaliczają się rizobia, zbudowana jest z peptydoglikanu (mureiny) ulokowanego w przestrzeni peryplazmatycznej oraz zewnętrznej błony, w której skład wchodzą fosfolipidy, lipoproteiny oraz lipopolisacharydy (LPS) [80]. Dodatkowymi składnikami otoczki komórkowej są egzopolisacharydy (EPS), kapsularne polisacharydy (CPS) [81] oraz syntezowane przez komórkę β-glukany i polisacharydy tworzące żel (GPS) [82]. Wyniki wstępnych badań pokazały, że szczepy *R. leguminosarum* bv *trifolii* syntezujące większe ilości EPS łatwiej pokrywają powierzchnię korzeni roślin motylkowatych i drobin piasku. Z drugiej jednak strony, im większa jest zawartość EPS w otoczce komórkowej, tym wyższa wartość bezwzględna potencjału elektrokinetycznego bakterii zdyspergowanych w ciekłym podłożu [**b5**], czyli większa stabilność elektrostatyczna układu. EPS jest heteropolimerem zbudowanym z jednostek oktasacharydowych, zawierających reszty cukrowe D-glukozy, kwasu D-glukuronowego i D-galaktozy w stosunku molowym 5:2:1 oraz grupy pirogronianowe i O-acetylowe [83,84]. Biorąc pod uwagę złożoną budowę chemiczną EPS i jego rolę w adhezji komórek do różnych powierzchni, uznałam za celowe kompleksowe przebadanie właściwości fizykochemicznych powierzchni komórek pięciu szczepów *R. leguminosarum* bv *trifolii* [70] różniących się zdolnością syntezy tego polisacharydu [**H6**].

Bakterie hodowano w dwóch ciekłych podłożach (TY i 79CA) o tym samym pH, zbliżonej sile jonowej i przewodnictwie elektrolitycznym, ale różnym składzie. W tych samych podłożach przygotowywano dyspersje komórek bakteryjnych z zachowaniem ich stałego stężenia w próbkach dla wszystkich eksperymentów. W celu określenia wpływu pH na właściwości powierzchniowe komórek bakterie hodowano i dyspergowano w podłożach o pH zawartym w przedziale 3 - 10. Wszystkie analizy biokoloidów prowadzono w temperaturze 20°C. Pomiary ruchliwości elektroforetycznej dyspersji komórek bakteryjnych wykonałam metodą LDE, korzystając z opracowanej wcześniej metodyki [**H5**]. Dodatkowo zarówno dyspersje biokoloidów, jak i czyste ciekłe podłoża, poddałam miareczkowaniu potencjometrycznemu w celu wyznaczenia powierzchniowego ładunku komórek oraz określenia udziału różnych grup funkcyjnych w jego generowaniu i oceny ogólnego kwasowo-zasadowego charakteru powierzchni [85]. W oparciu o pomiary kątów zwilżania filmów bakteryjnych, stosując metodę van Ossa [86] obliczyłam swobodną

energię powierzchniową i jej składowe oraz określiłam charakter hydrofilowo-hydrofobowy powierzchni komórek [87-89].

Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły stwierdzić, że ilość EPS w otoczce bakteryjnej rzutuje na ruchliwość elektroforetyczną komórek. Szczepy wykazujące nadprodukcję tego polimeru charakteryzowały się najwyższymi bezwzględnymi wartościami ruchliwości w polu elektrycznym. Skład ciekłych podłoży, w których zdyspergowane były komórki bakteryjne także modyfikował wartości ruchliwości elektroforetycznej, mimo tej samej siły jonowej i pH. Komórki hodowane w podłożu o bogatszym składzie mineralnym charakteryzowały się większą ruchliwością elektroforetyczną. Wstępnie łączyłam to ze zwiększoną produkcją EPS w tym podłożach. Jednakże w przypadku szczepu nieposiadającego tego polisacharydu w otoczce komórkowej ruchliwość jego komórek w tym podłożu była również wyższa. Większa ruchliwość elektroforetyczna komórek w bogatszym podłożu związana była z tym, że w jego składzie kationy jednowartościowe dominowały nad dwuwartościowymi, co skutkowało słabszą neutralizacją ujemnego ładunku otoczki komórkowej. Dla wszystkich szczepów i podłoży uzyskałam zależności intensywności światła rozpraszanego od ruchliwości elektroforetycznej wskazujące na niejednorodną pod względem elektrycznym budowę otoczki. Średnie wartości ruchliwości były dla wszystkich bakterii ujemne, jednak przedziały wartości ruchliwości elektroforetycznej i położenia maksimów pików były specyficzne dla danego szczepu. W przypadku szczepu niesyntezującego EPS niewielki udział w powierzchni piku miały dodatnie wartości ruchliwości elektroforetycznej. Otrzymane przeze mnie funkcje rozkładu pozornych stałych dysocjacji powierzchniowych grup funkcyjnych potwierdziły kwasowy charakter otoczek bakteryjnych oraz znaczącą rolę grup karboksylowych w generowaniu ujemnego ładunku elektrycznego powierzchni. Wyznaczone wartości składowych swobodnej energii powierzchniowej również odzwierciedlały wpływ złożonej budowy otoczki komórkowej na jej charakter hydrofobowo/hydrofilowy. W oparciu o wyniki badań udało się stwierdzić, że obecność EPS o kwasowym charakterze na powierzchni komórki jest z jednej strony źródłem jej ujemnego ładunku elektrycznego, z drugiej zaś – zwiększa jej hydrofobowość, przez co w istotnym stopniu determinuje interakcje komórka-komórka oraz komórka-powierzchnia. Modyfikacja pH ośrodka dyspergującego wpływała na wartości ruchliwości elektroforetycznej komórek nie tylko ze względu na różnice w dysocjacji poszczególnych grup funkcyjnych, ale również przeżywalność komórek. Dla każdego z badanych szczepów i podłoży ruchliwość elektroforetyczna była statystycznie istotnie skorelowana z zawartością żywych komórek w dyspersji. Przyjmowała tym wyższe wartości bezwzględne im wyższy był udział żywych komórek w populacji [**H6**].

Wykonane przeze mnie badania pozwoliły na kompleksową charakterystykę fizykochemicznych właściwości powierzchni komórek Gram-ujemnych symbiotycznych bakterii oraz ich powiązanie ze zdolnością szczepów do syntezy egzopolisacharydów. Pomiary ruchliwości elektroforetycznej dostarczyły istotnych informacji o elektrokinetycznych właściwościach dyspersji

komórek. Właściwości te zależały od składu ośrodka dyspergującego, budowy otoczki komórkowej oraz etapu życia komórki.

7. Charakterystyka wybranych właściwości fizykochemicznych powierzchni komórek Gram-dodatnich bakterii *Enterococcus faecalis* w ciekłym podłożu.

Bakterie *Enterococcus faecalis* występują w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, mogą być jednak przyczyną różnego rodzaju infekcji [90]. Należą do bakterii Gram-dodatnich, których otoczka komórkowa składa się zwykle z kilkudziesięciu warstw mureiny z zakotwiczonymi w niej kwasami tejchojowymi. Kwasy te są polimerami zawierającymi do kilkudziesięciu cząsteczek fosforanów glicerolu i rybitolu połączonych wiązaniami fosfodiestrowymi [13]. Patogenność bakterii *Enterococcus faecalis* oraz ich antybiotykoodporność jest związana ze zdolnością ich komórek do tworzenia biofilmu na powierzchniach tkanek [91]. Podobnie jak w przypadku bakterii Gram-ujemnych znaczącą rolę odgrywają w tym procesie fizykochemiczne właściwości powierzchni komórek. Szczepy występujące u ludzi są pod tym względem dość dobrze scharakteryzowane [92-95], w przypadku szczepów pochodzenia zwierzęcego takich informacji brakuje.

W związku z tym, w ramach współpracy z dr Dagmarą Stępień-Pyśniak z Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie podjęłam badania właściwości powierzchni komórek bakterii izolowanych z tkanek serca kurcząt oraz szczepu referencyjnego ATCC29212 dostępnego komercyjnie. Jako materiał kontrolny wykorzystałam komórki powyższych bakterii dezaktywowane w autoklawie (121°C, 1 atm, 25 min). Komórki dyspergowałam w podłożu MH o pH 7,2. Dla wszystkich układów (komórki żywe i martwe) i różnej ilości komórek zawieszonych w ciekłym podłożu wykonałam pomiary ruchliwości elektroforetycznej. Dla dyspersji o największym stężeniu biokoloidów przeprowadziłam dodatkowo miareczkowanie potencjometryczne, aby uzyskać informacje o ładunku elektrycznym powierzchni komórek i udziale powierzchniowych grup funkcyjnych w jego powstawaniu [85]. Wykonano również pomiary kątów zwilżania filmów bakteryjnych [86] oraz analizy FTIR dyspersji komórek i podłoża.

Dla wszystkich szczepów, zarówno dla żywych jak i dezaktywowanych komórek, wartości ruchliwości elektroforetycznej były ujemne i co do wartości bezwzględnej rosły ze wzrostem ilości komórek zdyspergowanych w podłożu [**H7**]. Podobny wpływ stężenia biokoloidów odnotowałam wcześniej w przypadku Gram-ujemnych bakterii *R. leguminosarum* [**H5**]. Trudnym do zinterpretowania faktem były wyższe bezwzględne wartości ruchliwości elektroforetycznej martwych komórek w stosunku do żywych. Wyniki te korespondowały jednak z rezultatami miareczkowania potencjometrycznego, gdzie ładunek powierzchniowy martwych komórek był również wyższy niż żywych. Postawiłam hipotezę, że w autoklawie następuje fizyczna destrukcja części komórek, prowadząca do pojawienia się małych fragmentów błony komórkowej o dużej ruchliwości w polu elektrycznym. Nie udało się tego zweryfikować za pomocą mikroskopii optycznej, dlatego wykonałam dodatkowo pomiary wielkości cząstek metodą DLS. Należy mieć świadomość, że w przypadku żywych

komórek wyniki obarczone były błędem wynikającym z posiadania przez nie własnego aparatu ruchu. Zakres wielkości od 1 do 3 μm uzyskany dla żywych, i ok. 0,5 μm dla poddanych działaniu autoklawu komórek, potwierdził tezę o ich destrukcji [**H7**].

Wyniki otrzymane przy użyciu metody potencjometrycznej wskazały na kwasowy charakter powierzchni komórek badanych bakterii. Źródłem ujemnego ładunku powierzchniowego były grupy fosfodiestrowe i karboksylowe peptydoglikanu i kwasów tejchojowych [90, 95]. Dla martwych komórek ważną rolę odgrywały także grupy fosforylowe. Udział apolarnej składowej w całkowitej swobodnej energii powierzchni był dominujący dla wszystkich szczepów bakterii [**H7**]. Jest to istotne ze względu na fakt, iż oddziaływania hydrofobowe ułatwiają powstawanie biofilmu [94]. Szczepy izolowane z tkanek serca ptaków charakteryzowały się wyższymi wartościami bezwzględnymi ruchliwości elektroforetycznej oraz ładunku powierzchniowego niż szczep referencyjny. Rzutowało to na produkcję biofilmu przez te bakterie. Szczep referencyjny był pod tym względem efektywniejszy. W przypadku Gram-dodatnich bakterii wysokie wartości ruchliwości elektroforetycznej komórek przekładają się, zatem, nie tylko na większą stabilność ich dyspersji w cieczy, ale także niższą skłonność do interakcji z powierzchniami materiałów syntetycznych [**H7**].

Pomiary ruchliwości elektroforetycznej komórek bakteryjnych w powiązaniu z informacją o budowie ściany komórkowej i jej hydrofilowo/hydrofobowych właściwościach oraz morfologii układu ułatwiają interpretację oddziaływań bakterii z różnego typu powierzchniami. Jest to szczególnie istotne w przypadku szczepów potencjalnie patogennych. Dla badanych bakterii Gram-dodatnich zdolność do tworzenia biofilmu była odwrotnie skorelowana z bezwzględną wartością ruchliwości elektroforetycznej.

4c_3. OGÓLNE PODSUMOWANIE I POTENCJAŁ APLIKACYJNY OSIĄGNIĘCIA

Zastosowanie technik rozpraszania światła laserowego, w szczególności dynamicznego rozpraszania światła i laserowej Dopplerowskiej elektroforezy, pozwala uzyskać wiele cennych informacji o morfologii i właściwościach elektrokinetycznych koloidów asocjacyjnych oraz biokoloidów. Wykorzystanie powyższych metod wraz z innymi powszechnie stosowanymi w analityce chemicznej, takimi jak konduktometria, potencjometria, czy pomiary kątów zwilżania oraz metodami teoretycznego modelowania, umożliwia scharakteryzowanie obszaru międzyfazowego cząstka zdyspergowana/ośrodek dyspergujący i wnioskowanie o oddziaływaniach pomiędzy cząstkami zdyspergowanymi oraz o stabilności układów.

Przeprowadzone przeze mnie badania wniosły istotne informacje o rozmiarach i właściwościach powierzchniowych micel surfaktantów jonowych (CTAB i SDS), stabilizowanych przez nie układów mikroemulsyjnych typu o/w, bc i w/o oraz o wpływie obecności hydrofobowej substancji bioaktywnej (α-tokoferolu) na wielkość cząstek i stabilność tych układów. Wiedza ta może być wykorzystana przy opracowywaniu składu produktów kosmetycznych, farmaceutycznych

czy też środków ochrony roślin, tym bardziej, że układy te mogą być nanonośnikami składników biologicznie czynnych.

Charakterystyka fizykochemicznych właściwości powierzchniowych komórek bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych pozwoliła zaobserwować ich związek z obecnością zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (egzopolisacharydy syntezowane przez *R. leguminosarum* bv *trifolii*) oraz wyjaśnić zdolności do tworzenia biofilmu (*Enterococcus faecalis*). Właściwości fizykochemiczne osłonek komórek bakteryjnych zależą m.in. od składu i pH ośrodka dyspergującego i rzutują na oddziaływanie komórek z różnymi powierzchniami (np. tkanek roślinnych lub zwierzęcych).

Otrzymane przeze mnie wyniki badań pokazują, że zarówno w przypadku analizy właściwości koloidów asocjacyjnych, jak też biokoloiów, nieostra „optyczna" granica faz, związana z możliwością przenikania cząsteczek fazy dyspergującej w głąb cząstek fazy zdyspergowanej, jest źródłem niepewności pomiaru wielkości cząstek i ruchliwości elektroforetycznej, prowadzonego metodami analizy światła rozpraszanego.

Stwierdziłam, że w przypadku wyznaczania potencjału elektrokinetycznego dyspersji żywych komórek bakteryjnych nie tylko właściwości chemiczne (skład) fazy dyspergującej czy warunki prowadzenia pomiaru (np. temperatura), ale także ilość komórek, ich wiek i stan fizjologiczny wpływają na otrzymywane wyniki. Parametry te powinny być precyzowane w publikacjach naukowych, by ułatwić porównywanie wyników i interpretację zjawisk zachodzących w układach tworzonych przez biokoloidy.

W przypadku roztworów micelarnych udało mi się zaobserwować, iż wzrostowi stężenia agregatów surfaktantów jonowych, nawet w obecności elektrolitu (0,5 M NaCl), towarzyszy wzrost elektrostatycznego odpychania, przejawiający się zwiększeniem ruchliwości elektroforetycznej (oraz wartości potencjału elektrokinetycznego) oraz zmniejszeniem wielkości cząstek, zmierzonej metodą DLS. Uzyskanie miarodajnych informacji o wielkości cząstek fazy zdyspergowanej w układach micelarnych i mikroemulsjach typu o/w, stabilizowanych przez użycie wysokiego stężenia surfaktantu, wymaga więc zastosowania odpowiedniej korekty.

Dzięki powiązaniu wyników uzyskanych metodami DLS i LDE z metodami obliczeniowymi i wykorzystaniu odpowiednich modeli teoretycznych wyznaczyłam średnie liczby agregacji oraz stopień zdysocjowania micel CTAB. Wzrost stężenia soli z 0,15 M do 0,50 M przy danym stężeniu surfaktantu skutkował nieznacznym wzrostem średniej liczby agregacji oraz zmniejszeniem stopnia dysocjacji micel. Uzyskane przeze mnie wyniki są zgodne z danymi literaturowymi. Oznacza to, że metody DLS i LDE w połączeniu z modelowaniem matematycznym mogą być z powodzeniem stosowane do charakterystyki układów koloidalnych.

Sprzężenie metody konduktometrycznej z technikami DLS i LDE pozwoliło stwierdzić, że obecność α-tokoferolu w układach micelarnych CTAB ułatwia agregację surfaktantu, co przejawia się zmniejszeniem wartości CMC. Cząsteczki bioaktywnej hydrofobowej substancji, lokując się pomiędzy cząsteczkami

surfaktantu w miceli ułatwiają dysocjację hydrofilowych głów, przez co wzrasta elektrostatyczna stabilność układu. Według mojej wiedzy, takie działanie witaminy E nie było wcześniej dyskutowane. Efekt dał się zaobserwować zarówno w układach zawierających sól, jak też bez jej obecności. Wzrost stężenia α-tokoferolu prowadził do wzrostu stopnia dysocjacji agregatów. Solubilizacja witaminy skutkowała wzrostem wielkości agregatów, szczególnie widocznym w roztworach niezawierających NaCl. Wielkość mieszanych agregatów była jednak na tyle mała, że mogłyby przenikać przez błony biologiczne.

Wykorzystanie technik DLS i LDE pozwoliło również określić wpływ witaminy E na właściwości mikroemulsji stabilizowanych przez jonowe surfaktanty. Wprowadzone dawki α-tokoferolu nie wpływały znacząco na wielkość cząstek fazy zdyspergowanej, co w przypadku układu w/o wynikało z rozpuszczalności witaminy w fazie olejowej. Istotny był natomiast wpływ substancji bioaktywnej na właściwości elektrokinetyczne mikeoemulsji o/w. W tych układach, przy niskiej zawartości alkoholu jako kosurfaktantu, dodatek witaminy zwiększał ruchliwość elektroforetyczną cząstek fazy zdyspergowanej. Efekt wystąpił zarówno w przypadku kationowego jak i anionowego surfaktantu. Zanikał on ze wzrostem zawartości fazy olejowej w układzie o/w. Wynikało to z faktu, iż cząsteczki α-tokoferolu były coraz głębiej zakotwiczone w hydrofobowym rdzeniu fazy zdyspergowanej i w mniejszym stopniu ekranowały hydrofilowe głowy surfaktantu w obszarze międzyfazowym.

Wyniki badań symbiotycznych Gram-ujemnych bakterii *Rhizobium leguminosaru* bv *trifolii*, przeprowadzonych z wykorzystaniem metod rozpraszania światła laserowego, pokazały rolę egzopolisacharydów w powstawaniu ujemnego ładunku powierzchniowego komórek oraz modyfikowaniu właściwości hydrofobowo/hydrofilowych i samoagregacji komórek. Wartości bezwzględne ruchliwości elektroforetycznej szczepów zależały od syntezowanej ilości EPS oraz składu ciekłego podłoża (w tym pH). W oparciu o rezultaty elektroforetycznych analiz bakterii, wykonanych przy różnym pH, wykazałam nie tylko wpływ zmiennego ładunku elektrycznego powierzchni komórek, ale także zawartości martwych komórek na właściwości elektrokinetyczne układów.

Kompleksowe badania dyspersji komórek Gram-dodatnich bakterii *Enterococcus faecalis* izolowanych z tkanek serca kurcząt oraz szczepu referencyjnego ATCC 29212 pokazały znaczenie składu, charakteru kwasowo-zasadowego, właściwości hydrofilowo/hydrofobowych i ładunku elektrycznego powierzchni komórek w oddziaływaniach między komórkami i powierzchnią materiału. Im wyższą wartość bezwzględną ruchliwości elektroforetycznej przejawiały komórki, tym mniejszą wykazywały zdolność do tworzenia warstwy biofilmu. Ponadto, zastosowanie metody DLS do wyznaczenia wielości komórek dezaktywowanych za pomocą autoklawu pozwoliło wyjaśnić wyższe wartości bezwzględne ich ruchliwości i powierzchniowego ładunku elektrycznego w stosunku do komórek żywych. Przyczyną była fizyczna destrukcja komórek prowadząca do pojawienia się w układzie małych fragmentów błony komórkowej o dużym ładunku elektrycznym.

Zastosowanie obu metod analizy światła rozpraszanego (DLS i LDE) wraz z innymi technikami analitycznymi pozwala uzyskać szeroki zasób informacji o właściwościach fizykochemicznych i zjawiskach międzyfazowych zarówno w układach tworzonych przez koloidy asocjacyjne jak i biokoloidy.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Jestem absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W ramach specjalizacji podczas studiów realizowałam blok przedmiotów o tematyce fizykochemiczno-teoretycznej. W pracy magisterskiej, wykonywanej pod kierunkiem dr hab. Jolanty Narkiewicz-Michałek, prof. UMCS, opisywałam proces micelizacji surfaktantów gemini o różnej długości alkilowego łącznika hydrofilowych głów oraz adsorpcję powyższych związków na krzemionce. Wykorzystywałam do tego odpowiednio modele Nagarajana [43, 44] oraz agregacji powierzchniowej [96,97]. Wyniki obliczeń teoretycznych zostały opublikowane [**a1**].

W czerwcu 2004 r. ukończyłam pięcioletnie studia magisterskie na Wydziale Chemii UMCS, uzyskując tytuł zawodowy magistra chemii w zakresie chemii podstawowej i stosowanej oraz uprawnienia do nauczania chemii. W listopadzie tego samego roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie. Dołączyłam do zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Ryszarda Walczaka, gdzie jako chemik zostałam zaangażowana w badania nad potencjalnym wykorzystaniem elektrod jonoselektywnych w systemach automatycznego monitorowania temperatury, wilgotności, zasolenia oraz aktywności wybranych jonów *in situ* w glebie. Były one częścią projektu badawczego realizowanego w latach 2004-2006 w Instytucie Agrofizyki we współpracy z zespołem prof. dr hab. Zbigniewa Brzózki i prof. dr hab. Elżbiety Malinowskiej z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Podjęta przeze mnie tematyka rozprawy doktorskiej koncentrowała się na określeniu zakresu stosowalności średniej wielkości elektrod membranowych [98] oraz miniaturowych czujników [99] do oznaczania aktywności jonów potasu w glebie. Po śmierci prof. dr hab. R. Walczaka (08.07.2006 r.) realizowałam ją pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Józefaciuka. Rezultaty wykonanych przeze mnie badań wskazały na szeroki zakres możliwego wykorzystania elektrod jonoselektywnych do analiz ekstraktów glebowych oraz próbek po wstępnej preparatyce [**a7**]. Jednocześnie wykazały ograniczenia zastosowania metody potencjometrycznej *in situ* w glebie. Uzyskane wyniki prezentowałam w publikacjach [**a2-a5 i a7**] oraz podczas krajowych i międzynarodowych konferencji.

W latach 2005-2007 byłam stypendystką projektu finansowanego w ramach EFS ZPRR, a w okresie 2007-2008 – wykonawcą projektu promotorskiego. W Zakładzie Metrologii i Modelowania Procesów Agrofizycznych, gdzie realizowałam eksperymentalną część rozprawy doktorskiej, stosowano głównie fizyczne i matematyczne techniki badań. Uzyskanie projektu promotorskiego pozwoliło mi na zorganizowanie niewielkiego laboratorium chemicznego z podstawowym sprzętem i odczynnikami.

W 2007 r. we współpracy z dr hab. Arturem Nosalewiczem z Instytutu Agrofizyki oraz Olgą Ksynets z Lwowskiego Narodowego Uniwersytetu Rolniczego zajmowałam się badaniem adsorpcji jonów ołowiu i kadmu w glebie z wykorzystaniem metody potencjometrycznej [**a6**]. Znajomość technik

elektrochemicznych wykorzystałam, uczestnicząc w prowadzeniu zleconego zewnętrznie monitoringu fizyko-chemicznych właściwości wody i osadów Zalewu Zemborzyckiego w Lublinie, wykonywanego w latach 2007-2008. Dla zawiesin osadów pobranych z dna Zalewu poza realizacją projektu wyznaczyłam potencjał elektrokinetyczny i przeanalizowałam jego zmienność sezonową [**a8**].

Przygotowywanie rozprawy doktorskiej w Instytucie Agrofizyki PAN pozwoliło mi poszerzyć wiedzę z zakresu elektrochemicznych (potencjometrii oraz konduktometrii) technik analitycznych, jak również metrologii, mineralogii oraz procesów sorpcji i wymiany jonowej. Poznałam podstawy gleboznawstwa, chemii rolnej oraz metod uprawy roli i roślin. Miałam możliwość pracy w interdyscyplinarnym zespole. W ramach międzynarodowych projektów współpracy bilateralnej Polskiej Akademii Nauk przebywałam na kilku krótkoterminowych stażach zagranicznych (Instytut Hydrologii Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie, Wydział Chemii Stosowanej i Mikrobiologii Uniwersytetu Helsińskiego i Wydział Gospodarki i Ochrony Gleby Uniwersytetu w Gandawie, 2007 r.), co było okazją do wymiany doświadczeń naukowych oraz poznania warsztatu naukowego, wykorzystywanego przez innych badaczy do opisu procesów zachodzących w środowisku glebowym.

W latach 2007-2008 byłam zaangażowana w realizację przez Instytut Agrofizyki interregionalnego projektu we współpracy z Poleskim Parkiem Narodowym, Szackim Narodowym Parkiem Przyrodniczym i Fizyczno-Mechanicznym Instytutem im. G. Karpenki NANU we Lwowie. Projekt ten był współfinansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Sąsiedztwa Polska - Białoruś - Ukraina INTERREG IIIA/Tacis CBC. Zajmowałam się monitorowaniem jego postępów rzeczowo-finansowych. Była to dla mnie sposobność zdobycia doświadczenia, m.in. w zakresie kontroli realizacji założonych wskaźników, oceny kwalifikowalności wydatków oraz prowadzenia dokumentacji i sprawozdawczości projektu finansowanego ze źródeł Europejskich. Późniejsze studia podyplomowe, które odbyłam na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim im. Jana Pawła II, pozwoliły mi znacznie poszerzyć i usystematyzować informacje o zarządzaniu badaniami naukowymi i pracami rozwojowymi w jednostkach naukowych.

Jako młody pracownik naukowy byłam członkiem Komisji Rekrutacyjnej na Studia Doktoranckie w Instytucie Agrofizyki PAN. Angażowałam się również w aktywność dydaktyczną i popularyzatorską poprzez organizowanie zajęć i pokazów dla uczniów oraz udział w Lubelskim Festiwalu Nauki i Pikniku Naukowym Radia BIS w Warszawie. Otrzymałam Dyplomy Prezesa Polskiej Akademii Nauk w dwóch edycjach konkursu Mistrz popularyzacji wiedzy „Złoty Umysł".

W styczniu 2009 r. uzyskałam stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii-agrofizyki w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie, a moja rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą Dyrektora na wniosek Rady Naukowej Instytutu.

DZIAŁALNOŚĆ PO UZYSKANIU STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA

Praca w interdyscyplinarnym zespole oraz zaangażowanie we współpracę z naukowcami spoza Instytutu Agrofizyki, reprezentującymi różne dziedziny i specjalności naukowe (fizyka, biologia, biotechnologia, technologia żywności, agronomia i weterynaria), przyczyniły się do uelastycznienia i poszerzenia zakresu mojej wiedzy i umiejętności. Prowadzone przeze mnie badania wymagały posługiwania się szerokim wachlarzem metod stosowanych w chemii (m.in. elektrochemicznych, spektroskopowych i wagowych), pozwalających badać i opisywać (z wykorzystaniem modeli teoretycznych) właściwości powierzchniowe (m.in. sorpcyjne i hydrofilowe/hydrofobowe) różnych materiałów (począwszy od minerałów i nanocząstek metali aż po komórki bakteryjne). Moja działalność naukowa obejmowała wiele obszarów tematycznych.

Ocena stosowalności czujników FDR do wyznaczania zasolenia *in situ* w glebie

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych kontynuowałam pracę nad wykorzystaniem metod elektrochemicznych do monitoringu wybranych właściwości gleby, współpracując z zespołem kierowanym przez prof. dr hab. inż. Wojciecha Skieruchę. Uczestniczyłam w badaniach nad wykorzystaniem czujników FDR (reflektometria w dziedzinie częstotliwości) do wyznaczania zasolenia gleby, rozumianego jako konduktywność elektryczna roztworu glebowego [**b1, b16**].

Zdobyte przeze mnie doświadczenie w stosowaniu metod potencjometrycznych i konduktometrycznych było pomocne w opracowaniu hasła do *Encyklopedii Agrofizyki*, mówiącego o badaniach gleb za pomocą technik elektrochemicznych [**b14**].

Charakterystyka fizycznych i fizykochemicznych właściwości koloidów i cząstek glebowych

Moje zainteresowania naukowe zaczęły się skłaniać ku badaniom stabilności układów koloidalnych. Początkowo skoncentrowałam się na układach typu ciało stałe/ciecz, starając się uzyskać jak najwięcej informacji o obszarze międzyfazowym w oparciu o potencjał elektrokinetyczny (ζ, zeta), wyznaczany metodą laserowej Dopplerowskiej elektroforezy [**b12, b13, b15**]. We współpracy z prof. dr hab. Zofią Sokołowską i prof. dr hab. Mieczysławem Hajnosem z Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie oraz prof. Pinskim i Jego współpracownikami z Instytutu Podstawowych Problemów Fizyko-Chemicznych i Biologicznych Gleb Rosyjskiej Akademii Nauk w Puszczino prowadziłam badania nad wpływem chemicznej modyfikacji próbek gleb i minerałów na ich właściwości powierzchniowe. Udało się zaobserwować, iż obecność kwasu poliakrylowego na powierzchni cząstek fazy stałej prowadzi do znaczącego wzrostu wartości bezwzględnej potencjału elektrokinetycznego w stosunku do próbek niemodyfikowanych oraz pokrytych poliakrylamidem. Była to informacja istotna ze względu na strukturotwórcze właściwości minerałów ilastych w glebie [**b3, b4**].

Poza badaniami cząstek fazy stałej gleby zdyspergowanymi w cieczy zajmowałam się również analizą procesu adsorpcji pary wodnej na cząstkach glebowych. Dzięki współpracy z prof. dr hab. Barbarą Witkowską-Walczak i prof. dr hab. Zofią Sokołowską z Instytutu Agrofizyki

PAN w Lublinie miałam możliwość przeprowadzić analizę izoterm adsorpcji pary wodnej i azotu na cząstkach gleb arktycznych pochodzących ze Spitsbergenu. Uzyskane izotermy adsorpcji/desorpcji pary wodnej odpowiadały II typowi sorpcji fizycznej w klasyfikacji IUPAC [100], który jest bardzo dobrze opisywany przez model Brunauera-Emmeta-Tellera (BET) [101]. Przetestowałam dodatkowo dwa inne modele, oparte na teorii BET, tj. model Aranovicha [102, 103] i Guggenheima – Andersona - de Boera (GAB) [104, 105]. Wszystkie modele dobrze charakteryzowały przebieg izoterm w zakresie niskich wartości względnego ciśnienia (0,05- 0,35), natomiast w zakresie rozszerzonym do 0,86 lepsze parametry dopasowania uzyskałam dla modeli Aranovicha i GAB niż BET. Obliczone przeze mnie wartości całkowitej powierzchni właściwej cząstek glebowych korelowały z zawartością frakcji iłu i pyłu w badanych glebach inicjalnych a także zależały od mikroreliefu gleby, co nie było wcześniej analizowane [**b11**].

Kolejne prowadzone przeze mnie badania dotyczyły właściwości kwasów huminowych (HA) wyekstrahowanych z gleby. Podjęłam je w ramach współpracy z prof. dr hab. Dorotą Gołębiowską i Jej zespołem z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Kwasy huminowe (HA) są polimerami o złożonej budowie. Rdzeń ich makrocząsteczek stanowią ugrupowania aromatyczne, połączone np. z aminokwasami, peptydami, resztami cukrowymi lub fragmentami innych cząsteczek o budowie alifatycznej. Dysocjacja elektrolityczna grup funkcyjnych o charakterze kwasowym (głównie –COOH) jest źródłem ujemnego ładunku elektrycznego cząsteczek HA, dzięki któremu mogą aktywnie uczestniczyć w wymianie i transporcie kationów [106]. Struktura i samoorganizacja cząsteczek HA w roztworach nie są jednoznacznie zdefiniowane [107-112]. Ze względu na amfifilowy charakter HA mogą tworzyć micele lub „pseudo-micele" z hydrofobowym rdzeniem, otoczonym fragmentami cząsteczki zawierającymi grupy hydrofilowe [112-114]. Stabilność dyspersji HA zależy m.in. od siły jonowej, składu i pH ośrodka dyspergującego oraz czynników fizycznych, takich jak temperatura [115-120].

Wykonane przeze mnie badania dotyczyły procesu dyfuzji oraz wielkości cząstek i właściwości elektrokinetycznych dwóch frakcji HA (o masie cząsteczkowej niższej oraz wyższej niż 30 kDa) zdyspergowanych w buforze Michaelisa o pH 5.59 i różnej zawartości chlorku sodu. Miały one na celu, m.in. ocenę stabilności dyspersji HA oraz możliwego wpływu fizykochemicznych właściwości powyższych kwasów na wzrost i rozwój siewek soi w uprawie hydroponicznej. W przypadku obu frakcji HA dodatek NaCl oraz siedmiodniowe przechowywanie skutkowało pojawieniem się dużych zagregowanych cząstek o mniejszym współczynniku dyfuzji. Cząstki HA charakteryzowały się ujemnymi wartościami ruchliwości elektroforetycznej, co wynikało z dysocjacji grup karboksylowych [121]. Ponadto większą ruchliwość w polu elektrycznym przejawiały cząstki o mniejszej masie cząsteczkowej i dużym zagęszczeniu grup –COOH na powierzchni. Niskie pH buforu, przy którym tylko najsilniejsze grupy kwasowe były zdysocjowane, jak też wprowadzenie kationów sodu neutralizujących ujemny ładunek elektryczny cząstek, sprzyjały zachodzeniu procesu agregacji HA. Uzyskane przeze mnie informacje o fizycznych i fizykochemicznych właściwościach HA ułatwiły

interpretację wpływu HA na wzrost i kondycję roślin soi. Zaobserwowano bowiem, że obecność frakcji wielkocząsteczkowej kwasów (masa cząsteczkowa > 30 kDa) redukowała niekorzystny wpływ obecności NaCl na wzrost i rozwój siewek. Interakcja pomiędzy powierzchnią korzeni i dużymi cząstkami HA była prawdopodobnie ułatwiona poprzez fakt, iż cząstki te były słabiej odpychane przez korzenie (również posiadające ujemny ładunek elektryczny powierzchni) niż cząstki o mniejszej masie i większym ładunku. Ponadto, duże cząsteczki wolniej docierały w pobliże korzeni, ale dłużej pozostawały w kontakcie z nimi. Stwierdzone przeze mnie agregowanie HA podczas przechowywania może być niekorzystne ze względu na możliwe strącenie z roztworu wraz z zaadsorbowanymi składnikami pokarmowymi, przez co te przestają być łatwo dostępne dla korzeni roślin [**b8**].

Badania wybranych fizykochemicznych właściwości powierzchni korzeni i liści roślin

W latach 2010-2014 byłam zaangażowana w realizację badań właściwości fizykochemicznych wybranych organów roślin w procesie adaptacji do warunków suszy. Badania koordynował prof. dr hab. Grzegorz Józefaciuk w ramach projektu rozwojowego POLAPGEN. Brałam udział w analizach właściwości powierzchni korzeni i liści roślin jęczmienia poddawanych stresowi suszy. W zakresie tej tematyki byłam opiekunem, a następnie promotorem pomocniczym (17.04.2015r.) w przewodzie doktorskim, zrealizowanym w Instytucie Agrofizyki (rozprawa została z sukcesem obroniona 21.02.2017 r.).

Badania nanomateriałów

We współpracy z dr hab. Agnieszką Nawrocką z Instytutu Agrofizyki prowadziłam badania nad wpływem nanocząstek srebra na jakość ziarna pszenicy. Nanocząstki srebra o odpowiednim stopniu rozdrobnienia wykazują działanie antybakteryjne [122, 123], które jest pożądane, biorąc pod uwagę procesy transportu i długotrwałego przechowywania produktów rolno-spożywczych.

Pokrycie powierzchni ziaren pszenicy nanocząstkami srebra, stabilizowanymi cytrynianem sodu, nie rzutowało w prawdzie na wartości wskaźników stosowanych typowo do oceny jakości zboża, prowadziło jednak do zmian drugorzędowej struktury białek glutenowych. Zastosowanie nanocząstek srebra jako potencjalnej ochrony przed patogenami, np. w przechowalnictwie żywności, wymaga zatem dalszych badań, ponieważ nie pozostaje bez wpływu na składniki spożywcze ziarna [**b2**].

Analizy wielkości nanocząstek wykonywałam również na zlecenie firm zewnętrznych, m.in. by oszacować stopień zanieczyszczenia produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi i poprawić ich jakość.

Ocena zdolności sorpcyjnych proszków spożywczych

Byłam zaangażowana we współpracę z dr hab. Ewą Domian, prof. SGGW, i Jej zespołem z Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W ramach tej współpracy udało się wyznaczyć izotermy adsorpcji pary wodnej na proszkach uzyskanych przez suszenie rozpyłowe emulsji typu o/w o różnej zawartości tłuszczów roślinnych, cukrów i białka. Przebieg izoterm opisałam stosując model Guggenheima – Andersona - de Boera (GAB) [104, 105].

wyznaczyłam wartości parametrów charakteryzujących go oraz jego dopasowanie. Stosując metodę dynamicznej sorpcji pary wodnej przy zadanym tempie wzrostu względnej wilgotności [124], wyznaczone zostały jej wartości krytyczne (RHc), odpowiadające punktowi zeszklenia [**b7**]. Do opisu procesu adsorpcji pary wodnej na proszkach spożywczych stosowałam również modele BET [101], Halsey'a, Kuhna i Oswina [125-127]. Prowadzenie procesu adsorpcji w różnych temperaturach pozwoliło na wyznaczenie izosterycznego ciepła adsorpcji [**b10**].

Analizy właściwości powierzchniowych komórek mikroorganizmów w badaniach mikrobiologicznych

Od 2009 roku jestem zaangażowana we współpracę z dr hab. Moniką Janczarek, prof. UMCS, z Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie - Skłodowskiej w Lublinie. Prowadzone przez Nią badania dotyczą m.in. poznania mechanizmów adaptacji *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* do niekorzystnych warunków środowiska oraz symbiozy tych bakterii z roślinami koniczyny. W latach 2013-2016 nasza współpraca odbywała się w ramach projektu kierowanego przez dr hab. M. Janczarek. Wykonane przeze mnie pomiary potencjału elektrokinetycznego komórek bakterii były pomocne w wyjaśnieniu roli ich ładunku powierzchniowego w oddziaływaniu z powierzchniami różnych materiałów (piasek i korzenie roślin) [**b5**]. Obecnie kontynuowane są badania właściwości powierzchniowych komórek bakterii poddanych działaniu czynników stresu środowiskowego. Na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie przygotowywana jest rozprawa doktorska, częściowo poruszająca tą tematykę. W czerwcu 2017 r. zostałam powołana na promotora pomocniczego w powyższym przewodzie.

Z inicjatywy dr hab. Adama Waśko z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie analizowałam wpływ pH na właściwości elektrokinetyczne komórek bakterii kwasu mlekowego w kontekście wiązania przez nie jonów kadmu [**b6**]. W 2016 roku nawiązał ze mną współpracę dr Paweł Kowalczyk z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonnej k. Warszawy. W ramach niej wykonywałam badania nad wpływem czwartorzędowych amoniowych cieczy jonowych na potencjał elektrokinetyczny powierzchni komórek *Escherichia coli,* różniących się typem lipopolisacharydów [**b9**].

Wyniki powyższych badań, choć odnosiły się do właściwości biokoloidów, nie zostały uwzględnione w przedkładanym osiągnięciu naukowo-badawczym, ponieważ stanowiły tylko element uzupełniający badań mikrobiologicznych, kierowanych przez innych naukowców.

Badania procesów agregacji i żelowania polisacharydów ścian komórkowych roślin z wykorzystaniem metod elektrochemicznych i spektroskopowych

Od stycznia 2017r. pracuję w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Artura Zdunka. Wraz z Jego Doktorantką prowadziłam badania fizykochemicznych właściwości roztworów pektyn, pozwalające na charakterystykę procesu sieciowania w układach o różnym stężeniu polisacharydów i zawartości metali dwuwartościowych.

We współpracy z dr hab. Moniką Szymańską-Chargot, prof. IAPAN, i Jej zespołem zajmowałam się również analizą właściwości fizykochemicznych nanocelulozy. Badania te kontynuuję, jako wykonawca w kierowanym przez Nią projekcie LIDER VI.

Główny nurt moich zainteresowań naukowych stanowią badania właściwości układów micelarnych i (mikro-, nano-) emulsyjnych. Chciałabym kontynuować i rozwijać te badania, przede wszystkim w odniesieniu do solubilizacji w tych układach składników bioaktywnych o pozytywnym działaniu na organizm człowieka, jak też stosowania różnego rodzaju substancji emulgujących i stabilizujących, szczególnie pochodzenia naturalnego [**b12**]. Zamierzam aplikować o grant, który pozwoliłby mi stworzyć zespół realizujący tą tematykę. Jestem obecnie promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim realizowanym w Instytucie Agrofizyki, dotyczącym również właściwości fizykochemicznych układów koloidalnych.

Jestem autorką/współautorką łącznie 34 publikacji (jako pierwszy i korespondencyjny autor niemal połowy z nich) i 54 doniesień konferencyjnych (19 krajowych i 35 międzynarodowych). Po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam w realizacji 5 projektów o różnych źródłach finansowania, a dwoma z nich kierowałam. Uczestniczyłam we współpracy międzynarodowej pomiędzy Instytutem Agrofizyki PAN a innymi jednostkami naukowymi m.in. ze Słowacji, Belgii, Węgier i Bułgarii. Opiekowałam się wieloma stażystami i magistrantami w ramach współpracy z lubelskimi uczelniami. Wykonałam 23 recenzje publikacji dla czasopism krajowych i międzynarodowych (w tym 20 z IF). Prowadziłam również badania i przygotowywałam ekspertyzy na zlecenie zewnętrzne. Angażowałam się w projekty popularyzujące naukę. Prowadziłam zajęcia dydaktyczne dla młodzieży i studentów. Z ramienia Instytutu Agrofizyki byłam koordynatorem trzech edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki. Za działalność naukową, organizatorską i popularyzatorską otrzymałam liczne dyplomy, podziękowania i nagrody. Liczbowe podsumowanie mojej aktywności naukowej i popularyzatorskiej z podziałem na okres przed i po uzyskaniu stopnia doktora zestawiłam poniżej w tabeli.

Tabelaryczne zestawienie informacji
o osiągnięciach, dorobku naukowym i aktywności popularyzatorskiej

Rodzaj aktywności	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Publikacje naukowe, w tym	**8**	**26**	**34**
w czasopismach posiadających IF	1	19	20
pozostałe publikacje	7	5	12
redakcje naukowe	-	2	2
Sumaryczny IF	**1,237**	**48,304**	**49,541**
Łączna liczba punktów $MNiSW_{2016}$	**30**	**570**	**600**
Udział w projektach naukowo-badawczych krajowych, europejskich oraz innych,	**5**	**9**	**14**
-naukowo-badawcze,	**4**	**5**	**9**
w tym jako kierownik	-	**2**	**2**
- programy międzynarodowe	1	4	5
Udział w konferencjach krajowych	**1**	**12**	**13**
-liczba referatów	1	6	7
w tym **wygłoszone osobiście**	**1**	**3**	**4**
-liczba posterów	-	12	12
Udział w konferencjach międzynarodowych	**7**	**22**	**29**
- liczba referatów	3	11	14
w tym **wygłoszone osobiście**	**2**	**1**	**3**
- liczba posterów	4	17	21
Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski			
Wykłady i seminaria	1	10	11
Artykuły i prace popularno-naukowe	-	9	9
Materiały do e-learningu	-	6	6
Udział w imprezach popularyzujących naukę	7	14	21
Opieka naukowa nad studentem, stażystą	-	8	8
Opieka nad doktorantem (rola promotora pom.)	-	3	3
Współpraca międzynarodowa			
Staże zagraniczne (dni)	18	32	50
Współpraca z otoczeniem społecznym i gospodarczym, w tym	**2**	**6**	**8**
Ekspertyzy i inne opracowania na zlecenie instytucji zewnętrznych	1	3	4
Udział w zespołach eksperckich i konkursowych	1	3	4
Recenzowanie prac w czasopismach naukowych,	**-**	**23**	**23**
w tym czasopisma z IF	-	20	20

Jolanta Cieśla

Jolanta Cieśla

Lublin, 01.03.2018r.

Literatura uzupełniająca

1. Web of Science; https://apps.webofknowledge.com
2. Graham T. *Philos Tr* 151 (1861) 183
3. Medical Dictionary (2009); https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/biocolloid
4. Segen's Medical Dictionary (2011); https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/biocolloid
5. McNaught A.D., Wilkinson A. *Compendium of Chemical Terminology – IUPAC Recommendations*. 2nd ed. (the "Gold Book"). Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997
6. Dziubakiewicz E., Hrynkiewicz K., Walczyk M., Buszewski B., *Colloid Surf B* 104 (2013) 122
7. McClements D.J. *Soft Matter* 8 (2012) 1719
8. Szymula M., Szczypa J., Friberg S.E. *J Dispers Sci Technol* 23 (2002) 789
9. Szymula M., Narkiewicz-Michałek J. *J Appl Electrochem* 39 (2009) 681
10. Dubbs M.D., Gupta R.B. *J. Chem. Eng. Data* 43 (1998) 590
11. Jaiswal P.V., Ijeri V.S., Srivastava A.K. *Anal Chim Acta* 441 (2001) 201
12. Alayoubi A., Kanthala S., Satyanarayanajois S.D., Anderson J.F., Sylvester P.W., Nazzal S. *Colloid Surf B* 103 (2013) 23
13. Beveridge T.J. *Can J Microbiol* 34 (1988) 363
14. Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Schraa G., Zehnder A.J.B. *Appl Environ Microbiol* 53 (1987) 1898
15. Mozes N., Amory D.E., Leonard A.J., Rouxhet P.G. *Colloid Surf* 42 (1989) 313
16. Van der Wal A., Minor M., Norde W., Zehnder A.J.B., Lyklema J. *Langmuir* 13 (1997) 165–171
17. Van Merode A.E.J., van der Mei's H.C., Busscher H.J., Krom B.P. *J Bacteriol* 188 (2006) 2421
18. Fanun M. (Ed.) *Colloids in Drug Delivery*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2010
19. Mayinger F. (Ed.) *Optical Measurements Techniques and Applications*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994
20. Pecora R. *J Nanopart Res* 2 (2000) 123
21. Gradzielski M. *Curr Opin Colloid Int* 13 (2008) 263
22. Delgado A.V., Gonzales-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., Lyklema J., *J Colloid Interf Sci* 309 (2007) 194.
23. Ohshima H. *Adv Colloid Interf Sci* 62 (1995) 189
24. Drach M., Narkiewicz-Michałek J., Sienkiewicz A., Szymula M., Bravo-Díaz C. *Colloid Surf A* 379 (2011) 79
25. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solutions*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2003
26. Hertel G., Hoffmann H. *Progr Colloid Polym Sci.* 76 (1988) 123
27. Li F., Li G.-Z., Wang H.-Q., Xue Q.-J. *Colloid Surf A* 127 (1997) 89
28. Shah S.S., Saeed A., Sharif Q.M. *Colloid Surf A* 155(1999) 405
29. Shah S.S., Jamroz N.U., Sharif Q.M. *Colloid Surf A* 178 (2001) 199
30. Dutkiewicz E., Jakubowska A. *Colloid Polym Sci* 280 (2002) 1009
31. Wei L., Ming Z., Jinli Z., Yongcai H. *Front Chem Chin* 4 (2006) 438
32. Manna K., Panda A.K. *J Surfactant Deterg* 14 (2011) 563
33. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect, Formation of Micelles and Biological Membranes*; New York: Wiley, 1980

34. Lin T.-L., Hu Y., Lee T.-T. *Progr Colloid Polym Sci* 105 (1997) 268.
35. Zhang W., Li G., Mu J., Shen Q., Zheng L., Liang H., Wu C. *Chin Sci Bull* 45 (2000) 1854
36. Patist A., Kanicky J.R., Shukla P.K., Shah D.O. *J Colloid Interf Sci* 245 (2002) 1
37. Bruce Ch.D., Senapati S., Berkowitz M.L., Pereram L., Forbesm M.D.E. *J Phys Chem B* 106 (2002) 10902
38. Pastoriza Gallego M.J., Bravo-Diaz C., Gonzalez-Romero E. *Colloid Surf. A* 249 (2004) 25
39. Yoshii N., Okazaki S. *Chem Phys Letters* 425 (2006) 58
40. Kabir-ud-Din, Umme Salma, Siddiqui Goutam Ghosh *J Disper Sci Technol* 30 (2009) 1310
41. Bockstahl F., Duplatre G. *J Phys Chem B* 105 (2001) 13
42. Perrin F. *J Phys Radium* 7 (1936) 1
43. Camesano T.A., Nagarajan R. *Colloid Surf A* 167 (2000) 165
44. Nagrajan R., Ruckenstein E. *Langmuir* 7 (1991) 2934
45. Johnson R.A. Nagrajan R. *Colloid Surf. A* 167 (2000) 21
46. Charkaborty T., Ghosh S., Moulik S.P. *J Phys Chem B* 109 (2005) 14813
47. Pisarcik M., Devinsky F., Svajdlenka E. *Colloid Surf A*119 (1996) 115
48. Kuperkar K., Adezgauz L., Prasad K., Bahadur P., *J Surfactant Deterg* 13 (2010) 293
49. Naskar B., Dan A., Ghosh S., Aswal V.K., Moulik S.P. *J Mol Liq* 170 (2012) 1
50. Dorshow R., Briggs J., Bunton C.A., Nicoli D.F. *J Phys Chem* 86 (1982) 2388
51. Funasaki N. *Adv. Colloid Interf Sci* 43 (1993) 87
52. Rangel-Yagui C.O., Pessoa-Jr A., Costa Tavares L. *J Pharm Pharmaceut Sci* 8 (2005) 147
53. Gong Y., Wu Y., Zheng C., Fan L., Xiong F., Zhu J. *AAPS Pharm Sc iTech* 13 (2012) 961
54. Duhem N., Danhier F., Préat V. *J Control Release* 182 (2014) 33
55. Hosomi A., Arita M., Sato Y., Kiyose C., Ueda T., Igarashi O., Arai H., Inoue K. *FEBS Lett* 409 (1997) 105
56. Rozman B., Zvonar A., Falson F., Gasperlin M. *AAPS Pharm Sci Tech* 10 (2009) 54
57. Wang X., Quinn P.J. *Prog Lipid Res* 38 (1999) 309
58. Dwiecki K., Górnaś P., Wilk A., Nogala-Kałucka M., Polewski K. *Cell Mol Biol Lett* 12 (2007) 51
59. Chaghi R., de Ménorval L.-C., Charnay C., Derrien G., Zając J. *Colloid Interf Sci* 326 (2008) 227
60. Mata J., Varade D., Bahadur P. *Thermochim Acta* 428 (2005) 147
61. Barry B.W. *Eur J Pharm Sci* 14 (2001) 101
62. Chiu Y.C., Jiang F.C. *J Disper Sci Technol* 20 (1999) 449
63 Seedher N., Kanojia M. *AAPS Pharm Sc iTech* 9 (2008) 431
64. Cohn W., Gross P., Grun H., Loechleiter F., Muller D.P.R., Zulauf M. *Proc Nutr Soc* 51 (1992) 179
65. Friberg S.E., Brancewicz Ch., Morrison D.S. *Langmuir* 10(1994) 2945
66. Lindman B., Shinoda K., Olsson U., Anderson D., Kalstrom G., Wennerstrom H. *Colloid Surf. A* 38 (1989) 205
67. Chen Z., Cheng X., Cui H., Cheng P., Wang H. *Colloid Surf A* 301 (2007) 437
68. Khanom R., Susan A.B.H., Mollah M.Y.A., Rahman A.N.M.S. *Am J Appl Chem* 3 (2015) 105
69. Saberi A.H., Fang Y., McClements D.J. *J. Colloid Interf Sci* 391 (2013) 95
70. Janczarek M., Jaroszuk-Ściseł J., Skorupska A. *Anton Leeuw* 96 (2009) 471
71. Vincent J.M. *A manual handicap the practical study of root nodule bacteria*. International Biological Program Handbook, 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, UK, 1970
72. Beringer J.E. *J Gen Microbiol* 84 (1974) 188

73. Werner D., Wilcockson J., Zimmermann E. *Arch Microbiol* 105 (1975) 27
74. Dylan T., Helinski D.R., Ditta G.S. *J Bacteriol* 172 (1990) 1400
75. Sambrook J., Fitsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning and Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989
76. Tang G.Y., Yang C., Chai J.C., Gong H.Q. *Int J Heat Mass Transfer* 47 (2002) 215
77. Leuko S., Legat A., Fendrihan S., Stan-Lotter H. *Appl Environ Microbiol* 70 (2004) 6884
78. Rutter P.R., Vincent B. *Physicochemical interactions of the substratum microorganisms and the fluid phase*. pp. 21–38, In: Marshall, K.C. (Ed.) *Microbial Adhesion and Aggregation*. Springer-Verlag AG, Berlin, 1984
79. Thioa B.J.R., Meredith J.C. *Colloids Surf B* 65(2008) 308
80. Wilson W.W., Wade M.M., Holman S.C., Champlin F.R., *J Microbiol Meth* 43 (2001) 153
81. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. *Microb Cell Fact* 5 (2006) 7
82. Downie J.A. *FEMS Microbiol Rev* 34 (2010) 150
83. Robertsen B.K., Aman P., Davill A.G., McNeil M., Albersheim P. *Plant Physiol* 67 (1981) 389
84. Philip-Hollingsworth S., Hollingsworth R.I., Dazzo F.B. *J Biol Chem* 264 (1989) 1461
85. Nederlof M.M., De Wit J.C., Riemsdijk W.H., Koopal L.K. *Environ Sci Technol* 27 (1993) 846
86. Van Oss C.J., Chaudhury M.K., Good R.J. *Adv Colloid Interf Sci* 28 (1987) 35
87. Van Oss C.J. *Colloid Surf B* 5 (1995) 91
88. Van Oss C.J., Giese R.F., Bronson P.M., Docoslis A., Edwards P., Ruyechan W.T. *Colloid Surf B* 30 (2003) 25
89. Van Oss C.J. *Colloid Surf B* 54 (2007) 2
90. Gilmore MS. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance.* Washington (DC): ASM Press, 2002
91. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Gilmore M.S., Shankar N. *Infect Immun* 72 (2004) 6032
92. Gallardo-Moreno A.M., van der Mei H.C., Busscher H.J., Perez-Giraldo C. *Colloid Surf B* 24 (2002) 285
93. Waar K., van der Mei H.C., Harmsen H.J.M., Degener J.E., Busscher H.J. *Appl Environ Microbiol* 68 (2002) 3855
94. Van Merode A.E.J., Duval J.F.L., van der Mei H.C., Busscher H.J., Krom B.P. *Colloid Surf B* 64 (2008) 302
95. Signoretto C., Lleò M.M., Tafi M.C., Canepari P. *Appl Environ Microbiol* 66 (2000) 1953
96. Drach M., Łajtar L., Narkiewicz-Michałek J., Rudziński W., Zając J. *Colloids Surf* 145 (1998) 243
97. Drach M., Narkiewicz-Michałek J., Rudziński W., Findenegg G.H., Kilary Z. *Phys Chem Chem Phys* 4 (2002) 2307
98. Grygołowicz-Pawlak E., Wyglądacz K., Sęk S., Bilewicz R., Brzózka Z., Malinowska E. *Sensor Actuator B* 111-112 (2005) 310
99. Wyglądacz K., Malinowska E., Jaźwiński J., Brzózka Z. *Sensor Actuator B* 83 (2002) 109
100. Sing K.S.W., Everett D.H., Haul R.A.W., Moscou L., Pierotti R.A., Rouquerol J., Siemieniewska T. *Pure and Appl. Chem.* 57 (1985) 603
101. Brunauer S., Emmet P., Teller E. *J Am Chem Soc* 60 (1938) 309
102. Aranovich G.L. *J. Colloid Interf Sci* 141 (1991) 30
103. Aranovich G.L. Donohue M.D. *J. Colloid Interf Sci* 173 (1995) 515
104. Anderson R.B. *J Am Chem Soc* 68 (1946) 686
105. Van den Berg C. *Description of water activity of foods for engineering purposes by means of the GAB model of sorption*. In: Engineering and food (Ed. B.M. McKenna) Elsevier, London, UK, 1984
106. Stevenson F.J. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1994

107. Senesi N. *Soil Sci* 164 (1999) 841
108. Swift R.S. *Soil Sci* 164 (1999) 790
109. Cozzolino A., Conte P., Piccolo A. *Soil. Biol. Biochem.* 33 (2001) 563
110. Piccolo A. *Soil Sci* 66 (2001) 810
111. Simpson A.J., Kingery W.L., Hayes M.H.B., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P., Kerssebaum R., Godejohann M., Hofmann M. *Naturwissenschaften* 89 (2002) 84
112. Wershaw R. L. *Soil Sci* 164 (1999) 803
113. Palmer N.E., von Wandruszka R. *Fresenius J Anal Chem* 371 (2001) 951
114. Young C., von Wandruszka R. *Geochem Trans* 2 (2001) 16
115. Baigorri R., Fuentes M., Gonzalez-Gaitano G., Ma Garcia-Mina J. *Colloid Surf A* 302 (2007) 301
116. O'Melia C.R., Tiller C.L., *Physicochemical aggregation and deposition in aquatic environments*, pp. 353–386 in: Buffle J., van Leeuwen H.P. (Eds.), Environmental Particles, Lewis Publishers, Boca Raton, 1993
117. Pinheiro J.P., Mota A.M., d'Oliveira J.M.R., Martinho J.M.G. *Anal Chim Acta* 329 (1996) 15
118. Powell H.K. Town R.M. *Anal Chim Acta* 267 (1992) 47
119. Riggle J., von Wandruszka R. *Talanta* 62 (2004) 103
120. Tombacz E. *Soil Sci* 164 (1999) 814
121. Baalousha M., Motelica-Heino M., Le Coustumer P. *Colloid Surf A* 272 (2006) 48
122. Fernandez A., Soriano E., Lopez-Carballo G., Picouet P., Lloret E., Gavara R., Hernandez-Munoz P. *Food Res Int* 42 (2009) 1105
123. Guzman M.G., Dille J., Godet S. *International J Chem Biol Eng* 2 (2009) 104
124. Burnett D. J., Thielmann F., Booth J. *Int J Pharm* 287 (2004) 123
125. Kaymak-Ertekin F., Gedik A. *LWT Food Sci Technol* 37(4) (2004) 429
126. Al-Muhtaseb A.H., McMinn W.A.M., Magee T.R.A. *Food Bioprod Process* 80 (2002) 118
127. Iglesias H.A., Chirife J. *Food Res Int* 28 (1995) 317

Jolanta Cieśla
Lublin 01.03.2018