

Załącznik 3a

Autoreferat z opisem dorobku i osiągnięć naukowych
związanych z postępowaniem habilitacyjnym

Anna Koziróg

Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Łódź, 2019

1. Dane personalne

Imię i Nazwisko **Anna Koziróg**

Miejsce pracy Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
ul. Wólczańska 171/173
90-924 Łódź

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

29.06.2000 Stopień magistra inżyniera, specjalizacja Mikrobiologia Techniczna
Politechnika Łódzka
Wydział Chemii Spożywczej i Biotechnologii,
Praca magisterska nt. „Badanie dynamiki obniżania zawartości ochratoksyny A przez drożdże w podłożu modelowym”
Kierujący pracą: prof. dr hab. inż. Zofia Żakowska

30.06.2004 Kwalifikacje pedagogiczne
Politechnika Łódzka
Dwusemestralne podyplomowe Studium Doskonalenia Pedagogicznego

25.04.2006 Stopień doktora nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej
Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Praca doktorska nt. „Oporność grzybów strzępkowych na N,N-bis(3-aminopropylo) dodecyloaminę”
Promotor rozprawy: prof. dr hab. inż. Zofia Żakowska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

27.12.2006 – Politechnika Łódzka
01.01.2008 Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Asystent

01.01.2008 – Politechnika Łódzka
obecnie Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Adiunkt

4. Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

Osiągnięciem naukowym 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. 2017 r. poz.1789) jest cykl publikacji naukowych.

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Przeciwdrobnoustrojowe właściwości gemini surfaktantów – efekty morfologiczne i metaboliczne.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę o ubieganie się o stopień doktora habilitowanego

Osiągnięcie naukowe jest przedstawione w cyklu 5 publikacji

B1. Koziróg A., Brycki B. (2015) Monomeric and gemini surfactants as antimicrobial agents - influence on environmental and reference strains. Acta Biochimica Polonica 62(4), 879-883. IF₂₀₁₅=1,187; (15 pkt. MNiSW)

Autor	Indywidualny wkład	Udział %
Koziróg Anna	Koncepcja pracy, zaplanowanie badań, oznaczenie minimalnych stężeń surfaktantów hamujących wzrost szczepów bakterii i drożdży, wpływ biocydów w różnych stężeniach na ich wzrost, oznaczenie właściwości hemolitycznych surfaktantów, opracowanie wyników, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji. Autor korespondencyjny.	90
Brycki Bogumił	Konsultacja interpretacji wyników badań, korekta manuskryptu.	10

B2. Koziróg A., Kręgiel D., Brycki B. (2017) Action of monomeric/gemini surfactants on free cells and biofilm of *Asaia lannensis*. Molecules 22(11), 2036-2049. IF₂₀₁₇=3,098; (30 pkt. MNiSW)

Autor	Indywidualny wkład	Udział %
Koziróg Anna	Koncepcja pracy, zaplanowanie badań, wpływ surfaktantów na tworzenie biofilmu na powierzchniach polipropylenu oraz na jego eradykację, opracowanie i interpretacja wyników badań, analiza statystyczna, przygotowanie publikacji. Autor korespondencyjny.	80
Kręgiel Dorota	Konsultacja interpretacji wyników badań, korekta manuskryptu.	10
Brycki Bogumił	Konsultacja interpretacji wyników badań, synteza badanych gemini surfaktantów.	10

B3. Koziróg A., Otlewska A., Brycki B. (2018) Viability, enzymatic and protein profiles of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells after monomeric/gemini surfactant treatment. Molecules 23(6), 1294-1306. IF_{5-letni}=3,268; (30 pkt. MNiSW)

Autor	Indywidualny wkład	Udział %
Koziróg Anna	Koncepcja pracy, zaplanowanie badań, oznaczenie wpływu surfaktantów na komórki planktonowe i strukturę biofilmu oraz ich właściwości enzymatyczne, opracowanie wyników, analiza statystyczna, interpretacja	80

	wyników badań, przygotowanie publikacji. Autor korespondencyjny.	
Otlewska Anna	Analiza profili białkowych bakterii po działaniu surfaktantów.	15
Brycki Bogumił	Konsultacja interpretacji wyników badań, korekta manuskryptu.	5

B4. Koziróg A., Brycki B., Pielech – Przybylska K. (2018) Impact of cationic and neutral gemini surfactants to conidial and hyphal forms at *Aspergillus brasiliensis*. International Journal of Molecular Sciences 19(3), 873-886. IF_{5-letni}=3,878; (30 pkt. MNiSW)

Autor	Indywidualny wkład	Udział %
Koziróg Anna	Koncepcja pracy, zaplanowanie badań, oznaczenie wartości minimalnych stężeń surfaktantów hamujących rozwój konidiów i grzybni, oznaczenie wpływu gemini surfaktantów na wzrost i syntezę ergosterolu oraz morfologię pleśni, opracowanie wyników przeprowadzonych badań, analiza statystyczna, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji. Autor korespondencyjny.	80
Brycki Bogumił	Konsultacja interpretacji wyników badań, korekta manuskryptu.	10
Pielech – Przybylska Katarzyna	Oznaczenie zawartości ergosterolu metodą GLC.	10

B5. Koziróg A., Otlewska A., Gapińska M., Michlewska S. (2019) Influence of cationic or neutral gemini surfactants on biochemical profile and ultrastructure of *Aspergillus brasiliensis*. Applied Sciences 9(2), 245-257. IF_{5-letni}=1,855; (25 pkt. MNiSW)

Autor	Indywidualny wkład	Udział %
Koziróg Anna	Koncepcja pracy, zaplanowanie badań, określenie zmian w profilach enzymatycznych pleśni po działaniu surfaktantów, wpływ biocydów na uwalnianie białek z grzybni, opracowanie wyników badań, interpretacja wyników badań, przygotowanie publikacji. Autor korespondencyjny.	70
Otlewska Anna	Analiza profili białkowych pleśni po działaniu surfaktantów.	10
Gapińska Magdalena	Analiza grzybni w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.	10
Michlewska Sylwia	Analiza grzybni w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.	10

Oświadczenia współautorów odnośnie ich udziału we wspólnych publikacjach stanowiących jednotematyczny cykl zostały zamieszczone w **załączniku 6**.

Osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego zostało przedstawione w publikacjach o łącznej wartości współczynnika **IF=13,286; (130 pkt. MNiSW)**

Pozostałe osiągnięcia naukowe przedstawione zostały w publikacjach o wartości współczynnika **IF=30,387; (548 pkt. MNiSW)**.

Sumaryczny Impact Factor wynosi **IF=43,673**; łączna liczba punktów zgodnie z kryteriami MNiSW wynosi **678**.

Wartość Indeksu Hirscha wg bazy Web of Science wynosi **8**, zaś liczba cytowań **136 (111 bez autocytowań)**.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

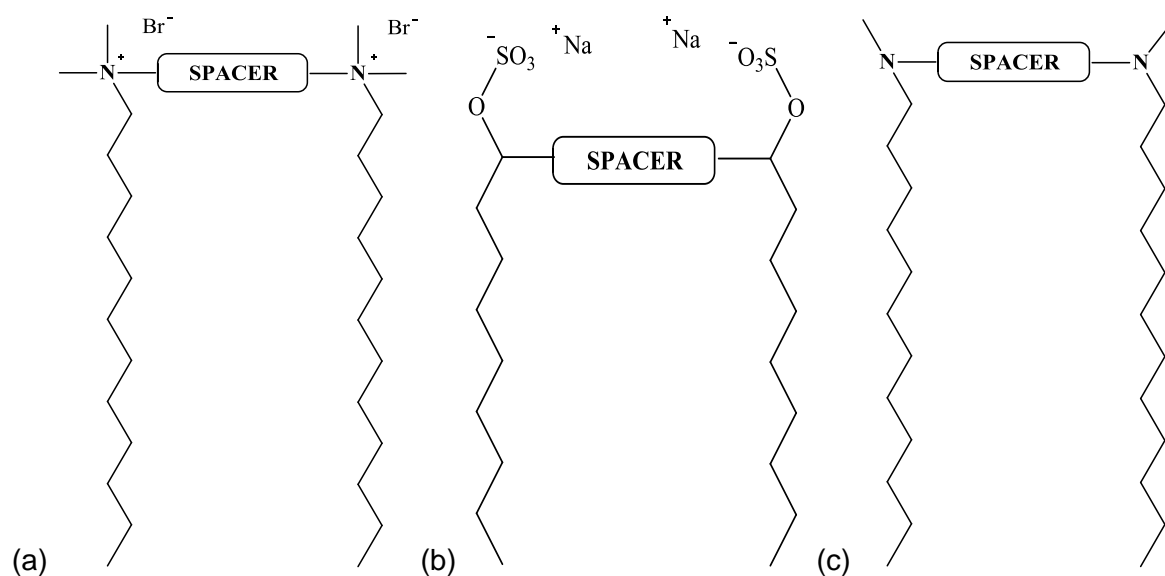
W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na poważny problem, jaki stanowią biofilmy. Wiele mikroorganizmów oprócz form planktonowych może występować w przestrzennej, wielokomórkowej strukturze otoczonej zewnątrzkomórkową warstwą (EPS) zawierającą: polisacharydy, białka, lipidy oraz zewnątrzkomórkowe DNA, które są produkowane przez te mikroorganizmy. Ta zewnątrzkomórkowa warstwa zapewnia ochronę i strukturalną stabilność biofilmu (Toyofuku, 2012; Qu i wsp., 2016). Szacuje się, że około 80% infekcji jest powodowanych przez mikroorganizmy występujące w strukturze biofilmu (Qu i wsp., 2016). Co więcej, mikroorganizmy w tej postaci mogą rozwijać się także na powierzchniach abiotycznych. W wielu gałęziach przemysłu są odpowiedzialne za biokorozję. Ich rozwój powoduje zniszczenie podstawowego sprzętu i wzrost kosztów produkcji, transportu, magazynowania oraz użytkowania materiałów technicznych (Minbiole i wsp., 2016).

Biofilm dodatkowo wykazuje specyficzne właściwości, takie jak zwiększona odporność na zmiany środowiskowe, a także związki biobójcze, w tym antybiotyki (Sauer i wsp., 2002; Bridier i wsp., 2011; Taylor i wsp., 2014; Qu i wsp., 2016). Złożona struktura EPS ogranicza proces dyfuzji cząstek substancji biobójczych do głębszych warstw biofilmu (Bridier, 2011).

Wzrasta także zainteresowanie szkodliwością grzybów strzępkowych (pleśni) w środowisku człowieka. Problem ten dotyczy nie tylko szpitali i pacjentów z obniżoną odpornością, gdzie dominujący problem stanowią patogeny z rodzaju *Aspergillus* (Pagano i wsp., 2011), ale także zakładów przemysłowych, obiektów mieszkalnych czy budynków użyteczności publicznej. Niszczenie grzybów strzępkowych jest jednak znacznie trudniejsze niż niszczenie bakterii, co wynika z odrębnej morfologii tych drobnoustrojów i ich budowy komórkowej. Ze względu na możliwość występowania pleśni w kilku postaciach morfologicznych: grzybnia wegetatywna, zarodniki i inne formy przetrwalne, a także o różnej budowie i składzie chemicznym, obserwuje się zróżnicowaną wrażliwość tych mikroorganizmów na preparaty biobójcze (Plumridge i wsp., 2004; van de Sande i wsp., 2010). Proces likwidacji pleśni jest często długotrwały, a wiele z dotychczas stosowanych związków grzybobójczych staje się mniej skutecznych z powodu samoistnej mutacji lub fenotypowej adaptacji grzybów do szkodliwych warunków środowiska.

Z powyższych względów uzasadnione jest więc poszukiwanie nowych związków, które w niskich stężeniach będą wykazywały właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec mikroorganizmów różnych środowisk. Dotychczas stosowane biocydy to: fenole i ich pochodne, organiczne i nieorganiczne związki halogenowe, substancje utleniające, czwartorzędowe związki amoniowe, alkohole, aldehydy oraz organiczne i nieorganiczne

kwasy. Najważniejszą grupę wśród nich, ze względu na szerokie spektrum działalności biobójczej, bezpieczeństwo zastosowań i niskie koszty, stanowią czwartorzędowe sole amoniowe (CSA, z ang. QAS quaternary ammonium compounds) (Brycki i wsp., 2017). Należą one do związków powierzchniowo czynnych, określanych też mianem surfaktantów. Jako związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym są wykorzystywane w wielu środkach czystości, preparatach antyseptycznych oraz dezynfekcyjnych stosowanych zarówno w gospodarstwie domowym, zakładach ochrony zdrowia, jak i na skalę przemysłową. Wykazują zdolności do hamowania wzrostu zarówno bakterii, drożdży, grzybów strzępkowych, jak i wirusów (Chapman, 2003; Xiao i wsp., 2008; Hegstad i wsp., 2010). Ich charakterystyczna, dwoista budowa hydrofilowo – hydrofobowa jest podstawą szerokich zastosowań praktycznych. CSA stosowane są, m. in. jako dodatki do farb i powłok, w tworzywach sztucznych, a także w przemyśle włókienniczym, kosmetycznym, spożywczym czy rolnym. Światowa produkcja wszystkich surfaktantów wynosi ponad 15 mln ton, co w roku 2014 dało 20,3 mld USD. Jest to duży i stale rozwijający się rynek. Jednak wzrasta liczba badań, które wykazują zwiększoną odporność drobnoustrojów na różne środki dezynfekujące oparte na QAS (Ferreira i wsp., 2011; Wessels i wsp., 2013; Bragg i wsp., 2014). Dlatego obecnie coraz większym zainteresowaniem cieszą się nowe związki powierzchniowo czynne – gemini surfaktanty. Zwane są one także surfaktantami bliźniaczymi lub dimerycznymi, gdyż zawierają dwie części hydrofilowe tzw. głowy i dwie części hydrofobowe, które najczęściej stanowią łańcuchy alkilowe zwane ogonami, a całość scala łącznik (ang. spacer). Wśród nich wyróżniamy 3 grupy: związki kationowe, anionowe i obojętne.



Rys.1. Budowa przykładowych gemini surfaktantów: kationowego (a), anionowego (b) i obojętne (c).

Dzięki swojej strukturze związki te dużo skuteczniej obniżają napięcie powierzchniowe, a tworzone przez nie micelle charakteryzują się większą stabilnością i długością życia niż micelle tworzone przez ich pojedyncze analogi (Sekhon, 2004). Wyróżniają się także wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową, ale ich efektywność zależy od struktury. Optymalne działanie wykazują gemini surfaktanty zawierające 10 lub 12 atomów węgla w łańcuchu i dłuższy łącznik (Brycki i wsp., 2011; Obłąk i wsp., 2015).

Celem badań będących podstawą osiągnięcia naukowego było wykazanie, czy nowo zsyntetyzowane gemini surfaktanty ograniczają wzrost drożdży *Candida albicans* oraz jak wpływają na biofilmy bakteryjne, ich rozwój i eradykację, profile biochemiczne i białkowe. Określiłam również czy i w jaki sposób badane gemini surfaktanty wpływają na rozwój grzybów strzępkowych, ich morfologię, profil biochemiczny i ultrastrukturę na przykładzie *Aspergillus brasiliensis*. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki stanowią osiągnięcie naukowe „Przeciwdrobnoustrojowe właściwości gemini surfaktantów – efekty morfologiczne i metaboliczne”, zaprezentowane w monotematycznym zbiorze obejmującym pięć publikacji. Kolejność przedstawienia publikacji w autoreferacie wynika z ich merytorycznej zawartości.

Zakres badań obejmował:

1. Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej kationowego gemini surfaktantu (dibromku heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowego) i jego monomerycznego analogu oraz ich wpływu na wzrost bakterii *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i drożdży *Candida albicans*, szczepów kolekcyjnych i izolowanych ze środowisk naturalnych.
2. Sprawdzenie czy kationowy gemini surfaktant oraz jego monomeryczny analog powodują zmiany w rozwoju *Asaia lannensis* i formowaniu biofilmu tych bakterii.
3. Ustalenie zdolności kationowego gemini surfaktantu i jego monomerycznego analogu do niszczenia biofilmu bakterii *Asaia lannensis* i *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Określenie zmian w profilach enzymatycznych i białkowych bakterii *Pseudomonas aeruginosa* po działaniu kationowego gemini surfaktantu oraz jego monomerycznego analogu.
5. Wykazanie, czy kationowe i obojętne gemini surfaktanty działają na morfologię konidiów i wzrost grzybni *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 oraz jakie powodują modyfikacje w ich strukturze.
6. Ustalenie wpływu kationowych i obojętnych gemini surfaktantów na syntezę ergosterolu, aktywność enzymatyczną, profil białkowy oraz ultrastrukturę grzybni *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Oznaczenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej kationowego gemini surfaktantu i monomerycznego surfaktantu oraz ich wpływ na wzrost bakterii *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i drożdży *Candida albicans* przedstawiłam w publikacji **B1: Koziróg A., Brycki B. (2015) Monomeric and gemini surfactants as antimicrobial agents - influence on environmental and reference strains. Acta Biochimica Polonica 62(4), 879-883. IF₂₀₁₅=1,187; (15 pkt. MNiSW)**

Badania wykonałam dla 3 szczepów (referencyjnych): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 85327 oraz *Candida albicans* ATCC 10231 zalecanych w normach PN-EN 1276 i PN-EN 1650, dotyczących ilościowych testów zawiesinowych do oceny aktywności bakteriobójczej i grzybobójczej chemicznych środków dezynfekujących i antyseptycznych. Dla porównania zastosowałam te same gatunki mikroorganizmów, ale wyizolowane od ludzi, a dokładnie z dróg rodnych (*S. aureus*), z powierzchni skóry (*P. aeruginosa*) i przewodu moczowego (*C. albicans*).

Działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec wymienionych szczepów określiłam dla dibromku heksametyleno-1,6-bis(dodecylo-dimetyloamoniowego) oznaczonego jako C6, należącego do kationowych gemini surfaktantów oraz jego monomerycznego analogu bromku dodecylo-trimetyloamoniowego, w skrócie DTAB. Gemini surfaktant (C6) to nowo zsyntetyzowany i scharakteryzowany chemicznie związek, otrzymany w ramach współpracy z Laboratorium Chemii Mikrobiocydów na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Monomeryczny analog jest związkiem dostępnym w sprzedaży (Aldrich, Germany).

Stwierdziłam, że **wszystkie badane mikroorganizmy są wrażliwe na obydwa surfaktanty**. Wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost (MIC) dla związku gemini mieściły się w przedziale od 0,0036 do 0,029 mM/l, podczas gdy dla monomerycznego były od 17 do nawet 70 razy wyższe i wynosiły od 0,126 do 1,01 mM/l. Wrażliwość na badane surfaktanty szczepów wyizolowanych ze środowisk naturalnych była od 2 do 8 razy niższa niż kolekcyjnych. Analogicznie jak wrażliwość na surfaktanty, również przeżywalność mikroorganizmów w hodowlach z dodatkiem badanych związków w stężeniach subletalnych ($\frac{1}{4}$ i $\frac{1}{2}$ MIC), jak i MIC była zróżnicowana.

Zastosowanie surfaktantów w stężeniach równych $\frac{1}{2}$ MIC powodowało opóźnienie wzrostu wszystkich badanych szczepów środowiskowych. Jednak po czasie 1- 12 godzin, w zależności od szczepu, następowała adaptacja komórek do niesprzyjających warunków środowiska i dynamiczny wzrost. W przypadku szczepów referencyjnych odnotowałam również etap zahamowania wzrostu (maksymalnie do 8 godzin), ale po nim następował jedynie krótki etap adaptacji i następnie obniżenie liczby żywych mikroorganizmów (zamieranie). Wyjątek stanowił szczep *C. albicans* ATCC 10231, dla którego mimo

zastosowania gemini surfaktantu w stężeniu subletalnym, liczba komórek w hodowli stopniowo malała. Obniżenie stężenia związków do wartości $\frac{1}{4}$ MIC także powodowało chwilowy (1-4 godziny) efekt inhibicji, jednak bez wyraźnego podziału na szczepy kolekcyjne i środowiskowe. Po 4 godzinach niemal we wszystkich próbkach stwierdziłam dynamiczny przyrost liczby komórek. Tym razem wyjątek stanowił środowiskowy szczep *S. aureus*, dla którego po działaniu związku C6 w stężeniu $\frac{1}{4}$ MIC nie odnotowałam etapu zahamowania wzrostu, nawet w początkowych godzinach hodowli.

Bez względu na rodzaj badanych mikroorganizmów w hodowlach z dodatkiem gemini surfaktantu i jego monomerycznego analogu w stężeniu MIC po 24 godzinach następowała redukcja liczby żywych komórek do poziomu ≤ 1 log. Należy jednak zwrócić uwagę, że w przypadku trzech szczepów bakterii (wyjątek *Staphylococcus aureus*, szczep kolekcyjny) poddanych działaniu związku C6 obecności żywych komórek nie odnotowuje się już po 12 godzinach.

Wykazałam, że badany **kationowy gemini surfaktant cechuje się lepszymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi w porównaniu do monomerycznego analogu. Szczepy kolekcyjne charakteryzują się większą wrażliwością niż szczepy środowiskowe, co należy uwzględnić w badaniach i aplikacji nowych biocydów. O ile użycie surfaktantów w stężeniach MIC skutecznie ogranicza rozwój mikroorganizmów, to stosowanie zbyt niskich stężeń (subletalnych) powoduje tylko krótkotrwałe ograniczenie ich wzrostu, co może skutkować rozwojem szczepów opornych. Szczególnie dotyczy to szczepów środowiskowych, które w badanych warunkach dość łatwo przystosowały się do stężeń równych $\frac{1}{2}$ MIC.**

W związku z tym, że wpływ gemini surfaktantów na tworzenie biofilmu, a także oddziaływanie na struktury już uformowane nie został dotychczas opisany, a dimeryczne surfaktanty są w kręgu zainteresowania, m.in. w przemyśle spożywczym (Brycki i wsp., 2017), czy kosmetycznym (Kumar i Tyagi, 2014) w kolejnym etapie badań zajęłam się tym problemem. Jako nośnik biofilmu zastosowałam polipropylen (PACCOR Packaging Poland Sp. z o.o.), certyfikowany przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego i zatwierdzony do kontaktu z żywnością.

Swoje badania ukierunkowałam na bakterie *Asaia lannensis* i *Pseudomonas aeruginosa*, wyizolowane ze środowisk naturalnych. Bakterie *Asaia*, to stosunkowo nowy rodzaj (po raz pierwszy wyizolowany w 2000 r.), który stanowi częste źródło zanieczyszczenia wód smakowych i napojów izotonicznych. Mikroorganizmy te mogą rozwijać się również w obecności konserwantów dodawanych do napojów, a także ekstraktów roślinnych zawierających związki fenolowe (Horsáková i wsp., 2009; Antolak i wsp., 2017). Hydrofilowy charakter komórek ułatwia im adsorpcję i tworzenie biofilmów na

różnych powierzchniach stosowanych w przemyśle spożywczym. Bakterie te mogą przetrwać nawet proces mycia i dezynfekcji z zastosowaniem ditlenku chloru, co dowodzi, że stanowią trudne do wyeliminowania zanieczyszczenie linii technologicznych (Sedláčková i wsp., 2011; Kręgiel, 2013).

Dalsze moje badania zmierzały do sprawdzenia czy dibromek heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowy) oraz jego monomeryczny analog wpływają na wzrost i formowanie biofilmu bakterii *Asaia lannensis*, a także czy będą zdolne do jego usuwania. Wyniki uzyskane w toku badań zmierzających do odpowiedzi na powyższe pytania przedstawiłam w publikacji **B2: Koziróg A., Kręgiel D., Brycki B. (2017) Action of monomeric/gemini surfactants on free cells and biofilm of *Asaia lannensis*. Molecules 22(11), 2036-2049. IF₂₀₁₇=3,098; (30 pkt. MNiSW)**

Doświadczenia przeprowadziłam dla szczepu *Asaia lannensis* FMW1 wyizolowanego w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ z wody mineralnej o smaku truskawkowym. W pierwszym etapie wyznaczyłam wartości MIC badanych związków w pożywce minimalnej zawierającej różne źródła węgla (glukozę, sacharozę, fruktozę i maltozę) oraz pożywce Tryptic Soy Broth (TSB) z dodatkiem glukozy. Dla kationowego gemini surfaktantu wartość MIC, bez względu na zastosowane źródło węgla równa była 0,0073 mM/l. Jedynie w pożywce TSB z glukozą wartość MIC zmalała dwukrotnie. W przypadku monomerycznego związku wartości MIC zależały od zastosowanego w pożywce źródła węgla i wynosiły od 0,1267 do 2,0268 mM/l. Najwyższe wartości odnotowałam w pożywce mineralnej z maltozą oraz w pożywce TSB z glukozą. Gemini surfaktant hamował wzrost bakterii *Asaia lannensis* w stężeniach znacznie niższych (17-560 razy) w porównaniu do związku monomerycznego.

W celu określenia skuteczności działania badanych związków na bakterie *Asaia lannensis* FMW1 sprawdziłam ich wpływ w stężeniach $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC i MIC na przeżywalność komórek planktonowych. Gemini surfaktant zastosowany w stężeniu 560-razy niższym (co wynika z uzyskanych wartości MIC=0,0036 mM/l) powodował większą redukcję liczby żywych komórek bakteryjnych niż związek DTAB (MIC=2,026 mM/l). Po 24 godzinach działania obydwu związków w stężeniach MIC uzyskałam obniżenie liczby żywych komórek do wartości 1 log - związek C6 i 2 log - monomeryczny surfaktant. Po zastosowaniu związków w stężeniach subletalnych ($\frac{1}{4}$ i $\frac{1}{2}$ MIC) proces inhibicji odnotowałam jedynie dla związku gemini w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC. Po 96 godzinach w hodowli ze związkiem C6 w stężeniu MIC nie zaobserwowałam żywych komórek zdolnych do wzrostu w 1 ml hodowli.

Oprócz stężenia związków biobójczych bardzo ważnym parametrem w procesie eliminacji mikroorganizmów z różnych środowisk jest czas działania. Z tego względu

w kolejnym etapie sprawdziłam czy komórki po 1-godzinnym kontakcie z surfaktantami w stężeniach $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC i MIC, pomimo częściowej redukcji ich liczby, są zdolne do wzrostu w postaci form planktonowych oraz do utworzenia biofilmu w czasie 3 i 6 dni. Krótkotrwałe działanie obydwu związków w stężeniu MIC powodowało redukcję liczby żywych komórek planktonowych, ale wraz z upływem czasu, gdy w pożywce nie ma składnika biobójczego, mogą się ponownie rozwijać. W przypadku surfaktantów zastosowanych w stężeniach subletalnych zmiany w liczebności komórek planktonowych w porównaniu do komórek nie poddanych działaniu biocydów nie były statystycznie istotne. Z kolei krótkotrwała ekspozycja komórek na surfaktanty zarówno w stężeniach MIC, jak i poniżej tej wartości, spowodowała redukcję liczby komórek zdolnych do tworzenia biofilmu o 4,3 i 5,9 log po 3 i 6 dniach dla związku C6 i odpowiednio o 3,4 i 4,5 log dla DTAB. Otrzymane wyniki wskazują, że **pomimo redukcji liczby żywych komórek o 56% dla związku C6 i 45% dla DTAB po 1 godzinie działania surfaktantów, część komórek, które przeżyły (51% po działaniu DTAB i 39% - C6) jest zdolnych do wzrostu i adhezji do powierzchni polipropylenu.**

Nowością było przeprowadzenie przeze mnie badań, które określały zdolność bakterii *Asaia lannensis* do tworzenia biofilmów na polipropylenu w obecności związków biobójczych. Komórki bakteryjne utrzymywałam w kontakcie z surfaktantem w stężeniach $\frac{1}{4}$ MIC, $\frac{1}{2}$ MIC i MIC przez 6 dni. Test ten symuluje warunki, jakie występują w środowisku produkcyjnym, gdy po etapie dezynfekcji nie przeprowadza się etapu płukania, dzięki czemu biocyd pozostaje na linii produkcyjnej.

Bakterie w testach z kationowym gemini surfaktantem w stężeniach $\frac{1}{2}$ MIC (0,0018 mM/l) i MIC (0,0036 mM/l) po 3 i 6 dniach nie adherowały do powierzchni materiału i nie tworzyły biofilmu, choć po 3 dniach przetrwały w zawiesinie jako komórki planktonowe. Tak dobrych wyników nie osiągnęłam po zastosowaniu związku monomerycznego, bowiem w żadnej z próbek nie zaobserwowano całkowitego zahamowania tworzenia biofilmu na polimerze. Najkorzystniejszy efekt otrzymałam dla próbek zawierających DTAB w stężeniu MIC (2,026 mM/l), gdzie poziom zahamowania wzrostu bakterii wynosił 82,2% po 3 dniach i 93% po 6 dniach.

Oprócz działania antyadhezyjnego, bardzo pożądaną cechą związku biobójczego jest zdolność do eradykacji biofilmów. Na podstawie wcześniejszych badań (Kręgiel, 2013) stwierdzono, że w warunkach laboratoryjnych dojrzały biofilm *Asaia lannensis* FMW1 tworzy się po 6-7 dniach. Do jego usuwania zastosowałam zarówno gemini jak i monomeryczny surfaktant, każdy w stężeniach MIC, 2 MIC i 10 MIC. Dla obydwu surfaktantów, bez względu na użyte stężenie, obserwowałam obniżenie liczby żywych bakterii w biofilmie już po 1 godzinie działania. Całkowitą eradykację bakterii *Asaia lannensis* FMW1 z powierzchni

polipropylenu osiągnęłam po działaniu gemini surfaktantu w bardzo niskim stężeniu 0,036 mM/l (po 24 godzinach), podczas gdy podobny efekt dla monomerycznego analogu uzyskałam dopiero po zastosowaniu w stężeniu 20,268 mM/l (po 4 godzinach). Po 4 godzinach działania związek C6 w stężeniu 0,036 mM/l redukował liczbę żywych komórek w biofilmie o 91,8%. Porównując także zmiany w czasie, między 1 a 24 godziną działania surfaktantów w stężeniach MIC i 2 MIC, dwukrotnie wyższy stopień redukcji liczby żywych komórek wykazałam dla surfaktantu gemini. Przedstawione wyniki dowodzą, że **nowo zsyntezowany kationowy gemini surfaktant w niskim stężeniu skutecznie usuwa biofilm *Asaia lannensis* utworzony na powierzchni polipropylenu.**

W pracy **po raz pierwszy zaprezentowałam kompleksową analizę wpływu gemini surfaktantu na wzrost komórek planktonowych, ich adhezję do powierzchni polipropylenu po krótkim i długotrwałym kontakcie z biocydem oraz na usuwanie biofilmu bakterii *Asaia lannensis* FMW1. Udowodniłam, że gemini surfaktant C6 w bardzo niskich stężeniach rzędu 10^{-2} – 10^{-3} mM/l redukuje liczbę bakterii zdolnych do wzrostu w formie planktonowej, zapobiega adhezji do powierzchni polipropylenu, a także wykazuje wysoką skuteczność w procesie eradykacji biofilmów.**

Jednym z głównych gatunków bakterii zdolnych do tworzenia biofilmów jest *Pseudomonas aeruginosa*. Ten oportunistyczny patogen powszechnie występuje w glebie i wodzie, często powodując zanieczyszczenia żywności i wody pitnej (Tielen i wsp., 2010). Pałeczki *P. aeruginosa* mogą kolonizować różne środowiska, czego przykładem jest prezentowany w pracy szczep wyizolowany z biofilmu, który rozwinął się na powierzchni taśmy transportującej biomasę roślinną w elektrociepłowni. Jak wykazałam w artykule B1, szczepy środowiskowe są mniej wrażliwe na związki biobójcze, dlatego badania dotyczące biofilmu wykonałam na szczepie środowiskowym, który został zidentyfikowany genetycznie i oznaczony jako PB_1.

Biofilm *P. aeruginosa* jest jednym z lepiej poznanych, ale nadal prowadzone są liczne badania nad szlakami transdukcji sygnału, czy mechanizmem jego tworzenia na różnych powierzchniach. Poszukuje się także związków, które mogą hamować jego rozwój lub umożliwiać usuwanie dojrzałych form (Taylor i wsp., 2014; Rasamiravaka i wsp., 2015; Chang i wsp., 2018). Do takich związków należą gemini surfaktanty, o czym w swoich pracach piszą Jennings i wsp. (2014) oraz Obłąk i wsp. (2014). Badaniem m.in. szczepu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 zajął się drugi z wymienionych zespołów, który sprawdzał oddziaływania gemini surfaktantów (m.in. dibromków N,N'-bis[2-(n-alkiloksy)-2-oksoetylo]-N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamoniowych) na adhezję, jak i usuwanie biofilmów ze szklanej powierzchni. Przeprowadzone badania dotyczyły głównie zależności między budową

poszczególnych związków a wartością stężeń, w których następowały wyżej wymienione procesy.

Z doniesień literaturowych (Sauer i wsp., 2002; Toyofuku i wsp, 2012) wynika, że trudniejsze usuwanie biofilmów w porównaniu do komórek planktonowych może być powodowane między innymi różnicowaniem struktury białek między tymi dwoma formami.

Nowością moich badań było ustalenie czy stosowany przeze mnie gemini surfaktant oraz monomeryczny analog mogą powodować zmiany w profilach enzymatycznych i białkowych *Pseudomonas aeruginosa*, zarówno formy planktonowej, jak i biofilmu. Wyniki przedstawiłam w publikacji **B3: Koziróg A., Otlewska A., Brycki B. (2018) Viability, enzymatic and protein profiles of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells after monomeric/gemini surfactant treatment. *Molecules* 23(6), 1294-1306. IF_{5-letni}=3,268; (MNiSW 30 pkt.)**

Analogicznie jak w poprzednich pracach wyznaczyłam wartości MIC dla form planktonowych, które wynosiły 0,0145 mM/l dla gemini surfaktantu i 1,013 mM/l dla DTAB. Stwierdziłam, że najintensywniejszy wzrost środowiskowego szczepu *P. aeruginosa* PB_1 w biofilmie utworzonym na powierzchni polipropylenu następuje po 2 dniach hodowli. Tak przygotowane próbki poddałam działaniu surfaktantów w stężeniach ½ MIC, MIC, 2 MIC i 20 MIC. Dla gemini surfaktantu w stężeniu $\geq 0,0145$ mM/l, a dla monomerycznego analogu w $\geq 1,013$ mM/l odnotowałam statystycznie istotną redukcję liczby żywych bakterii w biofilmie już po 1 godzinie ($p < 0,05$). **Efekt całkowitego zahamowania rozwoju biofilmu uzyskałam po 4 godzinach działania gemini surfaktantu w stężeniu 0,29 mM/l (20 MIC) i po 24 godzinach od dodania związku DTAB w stężeniu 20,26 mM/l (20 MIC).** Ten sam efekt dla form planktonowych uzyskałam po 4 godzinach działania związków w stężeniach 2 MIC.

W kolejnym etapie prac porównując zmiany w profilach białkowych i enzymatycznych komórek planktonowych oraz biofilmów zastosowałam obydwa związki w stężeniach subletalnych (¼ MIC, ½ MIC). Zarówno w biofilmie, jak i w formach planktonowych przed zastosowaniem surfaktantów stwierdziłam aktywność siedmiu enzymów: fosfatazy alkalicznej, esterazy, esterazy lipazy, lipazy, arylamidazy leucyny, fosfatazy kwasowej i fosfohydrolazy naftolowej, przy czym ich aktywność w biofilmie była niższa. Po działaniu surfaktantów na formy planktonowe nie wykryłam aktywności fosfatazy alkalicznej oraz lipazy (dla obydwu związków, ale tylko w stężeniach ½ MIC). Aktywność esterazy lipazy i arylamidazy leucyny nie uległa zmianie, a aktywność pozostałych enzymów była obniżona. W profilach enzymatycznych biofilmów po wprowadzaniu badanych surfaktantów nie wykryłam aktywności esterazy, lipazy i arylamidazy leucyny oraz esterazy lipazy - tylko dla C6. Stwierdziłam, że **zarówno gemini surfaktant, jak i jego monomeryczny analog**

powodują mniejsze zmiany w profilach enzymatycznych planktonowych form *P. aeruginosa* w porównaniu do biofilmu. Dodatkowo, gemini surfaktant po 4 godzinach działania na biofilmy, przyczynia się do bardziej rozległych zmian w profilach enzymatycznych niż jego monomeryczny analog.

Wykazałam także duże zmiany w profilach białkowych biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*, ale tylko pod wpływem działania kationowego gemini surfaktantu C6 w stężeniach 0,0072 mM/l ($\frac{1}{2}$ MIC) oraz 0,0036 mM/l ($\frac{1}{4}$ MIC). W celu określenia podobieństwa profili białkowych, wyznaczyłam indeks Dice'a i stwierdziłam 50,0% podobieństwo po działaniu gemini surfaktantu w stężeniu $\frac{1}{4}$ MIC oraz 17,4% podobieństwo po działaniu tego związku w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC w porównaniu do szczepu nie poddanego działaniu surfaktantów. Wysoki indeks Dice'a <95% otrzymałam dla profili białkowych otrzymanych z komórek planktonowych po zastosowaniu zarówno DTAB, jak i surfaktantu dimerycznego, a także biofilmów poddanych działaniu związku monomerycznego.

Dużo istotniejsze zmiany zaobserwowałam porównując intensywność prążków otrzymanych w wyniku elektroforezy SDS-PAGE. Analiza porównawcza odpowiednich profili białkowych ujawniła wyższą ekspresję w komórkach planktonowych niż w biofilmie. Po działaniu związku C6 na formy planktonowe intensywność prążków białkowych widocznych na elektroforegramach wzrosła w porównaniu do próbek bez biocydu.

Oceniając profil białek na elektroforegramach, niezależnie od próbki, zawsze większą liczbę prążków otrzymałam dla komórek planktonowych niż dla biofilmu. Po działaniu monomerycznym surfaktantem profile białek wykazywały duże podobieństwo do profili uzyskanych w próbce bez biocydu dla obydwu form, w jakich występowały bakterie, a liczba wspólnych prążków wynosiła 9. Z kolei wraz ze wzrostem stężenia gemini surfaktantu następowało stopniowe zmniejszenie różnorodności białek w biofilmie, ale jednocześnie jej zwiększenie w komórkach planktonowych. W próbkach ze związkiem C6 w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC nie odnotowano żadnych białek, które występowały jednocześnie w biofilmie i komórkach planktonowych.

Z dwóch badanych surfaktantów wyraźniejsze zmiany w profilach enzymatycznych, jak i białkowych, zarówno form planktonowych i biofilmów powodował gemini surfaktant C6.

Wykazałam, że kationowy gemini surfaktant (dibromek heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowy)) C6 nawet w bardzo niskich stężeniach (0,0145 mM/l) zmniejsza liczbę żywych komórek w formie planktonowej, a w stężeniu 0,29 mM/l skutecznie działa na biofilm utworzony na powierzchni polipropylenu. Dodatkowo w stężeniach subletalnych gemini surfaktant powoduje obniżenie aktywności enzymów, głównie z grupy lipaz, zarówno w komórkach planktonowych, jak i w biofilmie oraz powoduje zmiany w profilach białek w strukturach biofilmu.

Zaobserwowane zmiany są reakcją obronną komórek bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PB_1 na badane surfaktanty.

W publikacjach B1-B3 porównując działanie gemini surfaktantu dibromku heksametyleno-1,6-bis(dodecyldodimetyloamoniowego) C6 z monomerycznym bromkiem dodecylotrimetyloamoniowym DTAB na różne gatunki bakterii i ich odmienne formy morfologiczne udowodniłam większe zalety stosowania gemini surfaktantu.

Dotychczasowe publikacje na temat wpływu tej grupy związków w bardzo wąskim zakresie dotyczyły pleśni i ograniczały się do wyznaczenia wartości MIC (Laska i wsp., 2006; Ding i Fang, 2015). Z tego względu moje dalsze badania dotyczyły grzybów strzępkowych i zmian na poziomie komórkowym, jakie powodują u nich gemini surfaktanty. W pracach zastosowałam kationowe gemini surfaktanty oraz ich obojętne analogi. Eksperymenty prowadziłam w ramach projektu MNiSW N N401 027736 „Właściwości grzybobójcze gemini surfaktantów”, którego byłam kierownikiem. W publikacjach przedstawionych przeze mnie w głównym osiągnięciu naukowym eksperymenty bazują na jednym szczepie – *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (wcześniej *A. niger*), ale prace prowadziłam także na innych gatunkach (Koziróg i wsp., 2009; Brycki i wsp., 2011; Koziróg i Brycki, 2013). Do badań wybrałam szczep, który jako jedyny wśród grzybów strzępkowych jest rekomendowany w europejskiej normie (PN-EN 1650) dotyczącej aktywności chemicznych środków dezynfekujących i antyseptycznych stosowanych w żywności, przemyśle i gospodarstwach domowych. Jest to gatunek występujący w różnych środowiskach, często powodujący psucie żywności czy biodegradację materiałów budowlanych (Anderson i wsp., 2000; Gutarowska, 2010).

Grzyby strzępkowe najczęściej występują w postaci zarodników i grzybni. W badaniach aktywności przeciwgrzybowej głównie stosuje się zarodniki. Tymczasem z danych literaturowych wynika, że te dwie formy charakteryzują się zróżnicowaną wrażliwością na związki biobójcze (Plumridge i wsp., 2004; van de Sande i wsp. 2010). Ponadto prowadząc w praktyce procesy dezynfekcji należy mieć świadomość, że nawet po usunięciu widocznej makroskopowo grzybni w środowisku nadal mogą pozostawać jej fragmenty.

Powyższa hipoteza skłoniła mnie do podjęcia badań mających na celu wykazanie, czy i jak kationowe i obojętne gemini surfaktanty działają na wzrost i morfologię konidiów oraz grzybni szczepu *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Wyniki przedstawiłam w publikacji **B4: Koziróg A., Brycki B., Pielech – Przybylska K. (2018) Impact of cationic and neutral gemini surfactants to conidial and hyphal forms at *Aspergillus brasiliensis*. International Journal of Molecular Sciences 19(3), 873-886. IF_{5-letni}=3,878; (30 pkt. MNiSW).**

Badania wykonałam dla czterech gemini surfaktantów, stosując dwa związki kationowe: dibromek heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowy) C6 i dibromek pentametyleno-1,5-bis(dodecyldimetyloamoniowy) C5 oraz ich dwa obojętne analogi: heksametyleno -1,6-bis-(N-metylo-N- dodecyloaminę) A6 i pentametyleno -1,5-bis-(N-metylo-N- dodecyloaminę) A5. Wszystkie badane gemini surfaktanty są nowo zsyntezowanymi i scharakteryzowanymi pod względem chemicznym związkami otrzymanymi w Laboratorium Chemii Mikrobiocydów na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu (Brycki i wsp., 2011).

Stwierdziłam, że **wszystkie badane surfaktanty hamują zarówno rozwój konidiów, jak i grzybni**. Wartości minimalnych stężeń (MIC) dla kationowych gemini surfaktantów hamujących rozwój konidiów były identyczne, równe 0,12 mM/l, a ograniczających wzrost grzybni 0,31 mM/l. Dla obojętnych gemini surfaktantów MIC dla konidiów wynosiło 0,38 mM/l. W przypadku grzybni wartość wzrosła około 100-krotnie w porównaniu ze związkami jonowymi i wynosiła 30 mM/l dla związku A5 i 25 mM/l dla A6. Udowodniłam, że **na stosowane gemini surfaktanty grzybnia jest mniej wrażliwa niż konidia**.

Określając skuteczność działania badanych związków na konidia *A. brasiliensis* stwierdziłam, że w najniższym stężeniu ($\frac{1}{2}$ MIC) jedynie związek kationowy C6 powodował ograniczenie procesu kiełkowania, ale po 24 godzinach już w każdej próbce widoczny był wzrost grzybni. Rozwój konidiów w obecności obydwu związków kationowych w stężeniach MIC został całkowicie zahamowany po 24 godzinach. W próbkach ze związkami obojętnymi po tym czasie pojedyncze konidia wykazywały zdolność kiełkowania. **Związkiem najskuteczniejszym wobec konidiów był dibromek heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowy) C6**, który w stężeniu 2 MIC (0,24 mM/l) już po 8 godzinach uniemożliwiał ich rozwój. Wyniki te potwierdziłam prowadząc obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM).

Ustalając wpływ gemini surfaktantów na grzybnię jako parametry świadczące o jej rozwoju wybrałam suchą masę i stężenie ergosterolu, charakterystycznego składnika błon komórkowych u grzybów. Nieznaczłą redukcję poziomu suchej masy w czasie 48 godzin odnotowałam w próbkach, w których stężenie surfaktantu wynosiło $\frac{1}{2}$ MIC (najmniejsze zmiany dla związków obojętnych). Wraz ze wzrostem stężeń wszystkich czterech gemini surfaktantów, do wartości MIC i 2 MIC, obserwowałam stopniowe obniżenie stężenia suchej masy grzybni. W porównaniu do próbek bez dodatku surfaktantów największe ograniczenie rozwoju grzybni uzyskałam po 48 godzinach dla związku C6 w stężeniu 2 MIC, gdzie wartość suchej masy zmalała 15-krotnie. Również wyniki analizy SEM pokazały, że już po 4 godzinach działania związków A6 i C6 w stężeniach MIC

widoczne były strzępki miejscowo uszkodzone. Po 24 godzinach powstawała skonsolidowana struktura, w której trudno wyróżnić pojedyncze strzępki grzybni, szczególnie po działaniu kationowego gemini surfaktantu C6.

Stężenie ergosterolu w grzybni w hodowlach z dodatkiem kationowych gemini surfaktantów w stężeniach MIC w miarę upływu czasu malało, ale z dodatkiem obojętnych związków wzrastało, pomimo zmniejszenia poziomu suchej masy. Dopiero zwiększenie stężenia wszystkich badanych związków do wartości równych 2 MIC (0,62 mM/l dla C5 i C6, 60 mM/l dla A5 oraz 50 mM/l dla A6) spowodowało zahamowanie syntezy ergosterolu. Na podstawie uzyskanych wyników **udowodniłam, że ergosterol nie jest dobrym wskaźnikiem rozwoju grzybów po zastosowaniu związków biobójczych.** Potwierdzeniem są uzyskane przeze mnie wyniki testu wiązania czystego ergosterolu z kationowymi i obojętnymi gemini surfaktantami, które jednoznacznie dowodzą, że tylko związki jonowe wykazują powinowactwo do ergosterolu. **Zdolność łączenia się kationowych gemini surfaktantów z ergosterolem może powodować zwiększoną przepuszczalność błon komórkowych, a przez to przyczyniać się do hamowania rozwoju grzybni.**

Przedstawione badania dowodzą, że **kationowe gemini surfaktanty w bardzo niskim stężeniu (0,12 mM/l) zmniejszają liczbę żywych konidiów. Związki te w stężeniu 0,31 mM/l hamują rozwój grzybni i redukują zawartość ergosterolu. Ponadto, powodują rozległe zmiany morfologiczne konidiów i grzybni.** Otrzymane wyniki wskazują, że kationowe gemini surfaktanty cechują się lepszymi właściwościami przeciwgrzybowymi w porównaniu do ich niejonowych analogów.

Kolejne badania zmierzały do określenia, czy zmiany w morfologii i błonach biologicznych *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, jakie nastąpiły po działaniu gemini surfaktantów dotyczą także innych obszarów w komórkach. Związki przeciwdrobnoustrojowe u *Eucaryota* oddziałują zarówno na struktury komórkowe, jak i na procesy zachodzące w komórkach i w ten sposób mogą hamować lub zakłócać ich funkcjonowanie (Mazu i wsp., 2016). Wyniki uzyskanych badań przedstawiłam w publikacji **B5: Koziróg A., Otlewska A., Gapińska M., Michlewska S. (2019) Influence of cationic or neutral gemini surfactants on biochemical profile and ultrastructure of *Aspergillus brasiliensis*. Applied Sciences 9, 245. IF_{5-letni}=1,689; (25 pkt. MNiSW)**

W profilach enzymatycznych *Aspergillus brasiliensis* po działaniu kationowych i obojętnych gemini surfaktantów zastosowanych w stężeniach ½ MIC, MIC i 2 MIC (wyznaczonych w pracy B4) odnotowałam duże zmiany. Dotyczyły one utraty aktywności alkalicznej fosfatazy, esterazy, esterazy lipazy oraz α-glukozydazy w porównaniu ze szczepem nie poddanym działaniu surfaktantów. Ponadto w żadnej z próbek po działaniu

związkami obojętnymi nie stwierdziłam aktywności dwóch enzymów amylolitycznych: α -galaktozydazy i N-acetylo- β -glukozaminidazy, a po zastosowaniu związków kationowych stężenie tych dwóch enzymów było minimalne (5 nM). We wszystkich próbkach występowała natomiast nafto-AS-BI-fosfohydrolaza i kwaśna fosfataza – związana ze ścianą komórkową. Pod wpływem związków A5 i A6 stężenie tych dwóch enzymów malało w miarę wzrostu stężenia surfaktantów. Z kolei kationowe surfaktanty C5 i C6 nie wpływały na ich stężenia, które pozostały na takim samym, wysokim poziomie (≥ 40 nM), jak w próbce bez związku biobójczego.

Zaobserwowałam także różnice jakie nastąpiły w profilach białek zewnątrzkomórkowych grzybni między próbkami bez działania związku, a tymi po zastosowaniu gemini surfaktantów. Indeks Dice'a po działaniu związków obojętnych w stężeniach MIC (30 mM/l dla A5 i 25 mM/l dla A6) wynosił 72,7%, a dla gemini surfaktantów kationowych 66,7% (MIC=0,31 mM/l). Po zastosowaniu kationowych surfaktantów w stężeniach 2MIC w profilach białek nie odnotowałam tych o masach cząsteczkowych poniżej 65 kDa, a współczynnik Dice'a zmalał do 54,5%. Sprawdzając zmiany w profilach po zastosowaniu związków C5 i C6 w stężeniach $\frac{1}{2}$ MIC, MIC i 2 MIC **udowodniłam, że zmiany w profilach białek zależą od stężenia gemini surfaktantów i zwiększają się wraz ze wzrostem stężeń.**

Wszystkie zmiany dotyczące grzybni, jakie zaobserwowałam po działaniu dibromku heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowego) C6 i opisałam w pracach B4-B5, znajdują swoje potwierdzenie w wynikach otrzymanych z analizy z zastosowaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Niektóre komórki w strzępkach grzybni potraktowane związkiem C6 w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC wykazywały istotne zmiany ultrastrukturalne, szczególnie w apikalnych częściach strzępek, inne pozostawały bez zmian. **W stężeniach MIC i 2MIC związek ten spowodował zamieranie strzępek *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Widoczne były zniszczone błony, z których pozostawały jedynie struktury błoniaste - co potwierdza obniżenie stężenia ergosterolu. Niezależnie od stężenia kationowego gemini surfaktantu C6, ściana komórkowa zachowała swoją integralność, chociaż była rozciągnięta, szczególnie na wierzchołkach strzępek – co tłumaczy brak zmian w aktywności kwaśnej fosfatazy. Mniej zwarta struktura ściany komórkowej umożliwia przedostawanie się części związków (w tym białek), na zewnątrz. Jednak w środowisku zewnętrznym, pod wpływem związku C6, białka te (szczególnie o masie cząsteczkowej poniżej 65 kDa) mogą ulegać denaturacji, na co wskazują badania Wu i wsp. (2007) z surowiczą albuminą wołową o masie 66,4 kDa.**

W publikacjach B1-B3 wykazałam, że gemini surfaktant w porównaniu z monomerycznym analogiem skuteczniej i w dużo niższych stężeniach działa na formy planktonowe, jak i biofilm bakteryjny. W kolejnych dwóch pracach B4-B5 udowodniłam, że kationowe gemini surfaktanty hamują kiełkowanie konidiów i rozwój grzybni powodując rozległe zmiany na poziomie komórkowym. Badany dibromek heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowego) C6 jest mniej toksyczny dla organizmów wodnych niż monomeryczny analog, ma także bardzo dobre właściwości antykorozyjne i dyspergujące (Garcia i wsp., 2016, Brycki i wsp., 2018).

Kationowe gemini surfaktanty, z uwagi na ich bardzo dobre właściwości detergencyjne, dyspergujące i biobójcze obecnie są przedmiotem szczególnego zainteresowania w przemyśle petrochemicznym, włókienniczym i papierniczym.

W ostatnich latach wzrasta zapotrzebowanie na związki, które podwyższają jakość mikrobiologiczną wyrobów papierniczych i dzięki temu mogą znaleźć zastosowanie np. w produkcji papierów higieniczno-sanitarnych (ręczników, papieru toaletowego) czy tektury falistej.

Największe zagrożenie mikrobiologiczne jakie występuje w produkcji papieru i wyrobów papierniczych, zaczynając od wstępnych etapów produkcji, aż po wyrób finalny, to rozwój biofilmów bakteryjnych i wzrost grzybów strzępkowych. Szczególnym problemem są bakterie, które tworzą biofilmy, takie jak z rodzaju *Pseudomonas*. Powodują one wydzielanie nadmiernych ilości szlamu, który blokuje rurociągi i sita, co prowadzi do korozji, a nawet rozerwania wstęgi arkusza papierniczego (Goyer 2001, Huang i wsp., 2009). W produkcji papieru jak i na wyrobach gotowych bardzo dobrze rozwijają się grzyby strzępkowe. Do najczęściej izolowanych należą te z rodzaju: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* czy *Fusarium*, które wymagają mniejszej wilgotności podłoża, a także *Alternaria*, *Chaetomium*, *Stachybotrys* zdolne do hydrolizy opornych włókien celulozy. Przyczyniają się do obniżenia parametrów technologicznych i wytrzymałościowych mas celulozowych, co może doprowadzić do dużych ubytków masy, nawet o 48% (Fabbri i wsp. 1997, Pinzari i wsp. 2006).

Z tego względu moje dalsze plany naukowe dotyczą zastosowania gemini surfaktantów jako związków poprawiających jakość mikrobiologiczną papieru. Część wykonanych już prac została przedstawiona w zgłoszeniu patentowym: Koziróg A., Brycki B., Olejnik K., Wysocka – Robak A. „Sposób podwyższenia odporności włóknistych materiałów celulozowych na działanie mikroorganizmów oraz sposób przygotowania środka do podwyższenia odporności tych materiałów na działanie mikroorganizmów”, z dnia 17.09.2018 nr P. 427036. Przygotowałam również artykuł „Cellulose products modified with monomeric and gemini surfactants – antimicrobial aspects” (Koziróg A., Brycki B., Olejnik K.,

Wysocka-Robak A., Dębska-Winkler P.), który obecnie jest po pierwszej recenzji w czasopiśmie Cellulose. W pracy tej określiłam aktywność przeciwdrobnoustrojową papieru modyfikowanego związkami monomerycznymi – chlorkiem didecyldimetyloamoniowym (DDAC) oraz kationowym gemini surfaktantem dibromkiem heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowym) C6 wobec 2 szczepów bakterii i 7 szczepów grzybów strzępkowych. Związki biobójcze DDAC lub C6 w stężeniu 3% (v/v) nanosiłam na powierzchnie papieru metodą natrysku i metodą powlekania w dwóch grubościach warstwy 24 i 50 μm . Wykazałam, że wszystkie próbki papieru zawierające surfaktanty, bez względu na sposób ich aplikacji są mikrobiologicznie stabilne.

Moje najbliższe plany naukowe dotyczą kontynuacji prac związanych z zastosowaniem gemini surfaktantów jako związków do higienizacji opakowań papierowych. Planuję kontynuować współpracę z Instytutem Papiernictwa i Poligrafii na Politechnice Łódzkiej, a także z Pracownią Chemii Mikrobiocydów na Wydziale Chemii, na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza w Poznaniu i zastosować badane przeze mnie związki m. in. w opakowaniach do transportu i przechowywania jajek. Przewiduję podjęcie współpracy z partnerem przemysłowym i wdrożenie otrzymanych materiałów do seryjnej produkcji.

Najważniejsze osiągnięcia prac opisanych w cyklu publikacji (B1-B5) to wykazanie, że:

1. Kationowe gemini surfaktanty w porównaniu do ich monomerycznych analogów hamują rozwój mikroorganizmów w dużo niższych stężeniach, co przyczynia się do zmniejszenia ich zawartości w środowisku.
2. Krótkotrwały kontakt bakterii *Asaia lannensis* z gemini i monomerycznym surfaktantem w stężeniach poniżej minimalnych wartości hamujących ogranicza liczbę komórek zdolnych do tworzenia biofilmu o 50%, ale może też powodować powstanie form planktonowych o mniejszej wrażliwości. Minimalne stężenia gemini surfaktantu hamujące wzrost bakterii w różnych pożywkach są jednak od 17 do 563 razy niższe w porównaniu do jego monomerycznego analogu.
3. Bakterie *Asaia lannensis* w obecności gemini surfaktantu w stężeniach \leq MIC po 3 i 6 dniach nie adherowały do powierzchni materiału i nie tworzyły biofilmu, choć przetrwały w zawiesinie jako komórki planktonowe.
4. Kationowy gemini surfaktant C6 wykazuje zdolność do eradykacji biofilmów *Asaia lannensis* i *Pseudomonas aeruginosa* utworzonych na powierzchni polipropylenu.
5. Zarówno gemini surfaktant C6, jak i monomeryczny analog DTAB w stężeniach subletalnych są odpowiedzialne za większe zmiany w profilach enzymatycznych biofilmów *P. aeruginosa* w porównaniu do form planktonowych. Jednak tylko kationowy gemini surfaktant powoduje zmiany w profilach białkowych biofilmów.

6. Kationowe i obojętne gemini surfaktanty hamują kiełkowanie konidiów i rozwój grzybni *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, powodując rozległe zmiany w morfologii obydwu form. W niższych stężeniach działają jednak związki kationowe, a formą bardziej wrażliwą są konidia.
7. Kationowy gemini surfaktant C6 niszczy błonę komórkową w komórkach strzępek i powoduje rozluźnienie struktury ściany komórkowej. Wiele związków wewnątrzkomórkowych wydostaje się na zewnątrz. Część z nich, jak niektóre białka, w środowisku zewnętrznym może ulegać zniszczeniu pod wpływem gemini surfaktantu. Takie działanie prowadzi do śmierci komórek.
8. Duża efektywność dibromku heksametyleno-1,6-bis(dodecyldimetyloamoniowego) C6 kwalifikuje go jako związek przeciwdrobnoustrojowy o szerokim zastosowaniu.

Literatura zawarta w tekście

1. Anderson J.G.; Rowan N.J.; MacGregor S.J.; Fouracre R.A.; Farish O. (2000) Inactivation of food-borne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE T Plasma Sci*, 28, 83-88.
2. Antolak H.; Czyżowska A.; Kręgiel D. (2017) Antibacterial and antiadhesive activities of extracts from edible plants against soft drink spoilage by *Asaia* spp. *J Food Protect*, 80, 25–34.
3. Bragg R.; Jansen A.; Coetzee M.; van der Westhuizen W.; Boucher Ch. (2014) Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. *Adv Exp Med Biol*, 808, 1-13.
4. Bridier A.; Dubois-Brissonnet F.; Greub G.; Thomas V.; Briandet, R. (2011) Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Ch*, 55, 2648-2654.
5. Brycki B.; Kowalczyk I.; Koziróg A. (2011) Synthesis, molecular structure, spectral properties and antifungal activity of polymethylene- α,ω -bis(N,N- dimethyl-N-dodecyloammonium bromides). *Molecules*, 16(1), 319-335.
6. Brycki B.; Kowalczyk I.; Szulca A.; Kaczerewska O.; Pakiet M. (2017) Multifunctional gemini surfactants: Structure, synthesis, properties and application. W: *Application and Characterization of Surfactants* (red. Najjae, R.), Wyd. InTech, Chorwacja, 97-155.
7. Brycki B.; Kowalczyk I.; Szulca A.; Kaczerewska O.; Pakiet M. (2018) Organic corrosion inhibitors. W: *Corrosion inhibitors, principles and recent application* (red. M. Aliofkhaezrai) Wyd. InTech, Chorwacja, 3-33.
8. Chang C.-Y. (2018) Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 8, 2671–2678.
9. Chapman J.S. (2003) Biocide resistance mechanisms. *Int Biodeter Biodegr*, 51, 133-138.
10. Ding Z.; Fang S. (2015) Synthesis, surface and antimicrobial activities of novel cationic gemini surfactants. *J Surfact Deterg*, 18, 1051–1057.
11. Fabbri A.A.; Ricelli A.; Brasini S.; Fanelli C. (1997) Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *Int Biodeter Biodegr*, 39, 61-65.
12. Ferreira C.; Pereira A.M.; Pereira M.C.; Melo L.F.; Simões M. (2011) Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyltrimethylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. *J Antimicrob Chemoth*, 66, 1036-1043.
13. Garcia M.T.; Kaczerewska O.; Ribosa I.; Brycki B.; Materna P.; Drgas M. (2016) Biodegradability and aquatic toxicity of quaternary ammonium-based gemini surfactants: Effect of the spacer on their ecological properties. *Chemosphere*, 154, 155-160.
14. Goyer N.; Lavoie J. (2001) Identification of sources of chemical and bioaerosols emissions into the work environment during secondary treatment of pulp mill effluents. *Tappi J*, 84, 2-13.

15. Gutarowska B. (2010) Metabolic activity of moulds as a factor of building materials biodegradation. *Pol J Microbiol*, 59, 119-124.
16. Hegstad K.; Langsrud S.; Lunestad B.T.; Scheie A.A.; Sunde M.; Yazdankhah S.P. (2010) Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist*, 16, 91-104.
17. Horsáková I.; Voldřich M.; Čeřovský M.; Sedláčková P.; Šicnerová P.; Ulbrich P. (2009) *Asaia* sp. as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. *Czech J Food Sci*, 27, S362–S365.
18. Huang C.Y.; Hsieh S.P.; Kuo P.A.; Jane W.N.; Tu J.; Wang Y.N.; Ko C.H. (2009) Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system. *Int Biodeter Biodegr*, 63, 998-1007.
19. Jennings M.C.; Ator L.E.; Paniak T.J.; Minbiole K.P.C.; Wuest W.M. (2014) Biofilm-eradicating properties of quaternary ammonium amphiphiles: simple mimics of antimicrobial peptides. *ChemBioChem*, 15, 2211-2215.
20. Koziróg A.; Brycki B. (2013) Effect of cationic gemini surfactants on different morphological forms of *Aspergillus* and *Penicillium* moulds. The 3rd Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection MIKROBIOT, Łódź.
21. Koziróg A.; Żakowska Z.; Brycki B. (2009) Budowa chemiczna dibromków alkileno- α,ω -bis(dodecylo-dimetyloamoniowych) a właściwości przeciwgrzybowe. V Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna Materiałów Technicznych", Łódź.
22. Kręgiel D. (2013) Attachment of *Asaia lannensis* to materials commonly used in beverage industry. *Food Control*, 32, 537–542.
23. Kumar N.; Tyagi R. (2014) Dimeric surfactants: promising ingredients of cosmetics and toiletries. *Cosmetics*, 1, 3-13.
24. Laska U.; Wilk A.; Maliszewska I.; Syper L. (2006) Novel glucose-derived gemini surfactants with a 1,1'-ethylenebisurea spacer: Preparation, thermotropic behavior, and biological properties. *J Surfactants Deterg*, 9, 115-124.
25. Mazu T.K.; Bricker B.A.; Flores-Rozas H.; Ablordeppey S.Y. (2016) The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. *Mini Rev Med Chem*, 16, 555-578.
26. Minbiole K.P.C.; Jennings M.C.; Ator L.E.; Black J.W.; Grenier M.C.; LaDow J.E.; Caran K.L.; Seifert K.; Wues W.M. (2016) From antimicrobial activity to mechanism of resistance: the multifaceted role of simple quaternary ammonium compounds in bacterial eradication. *Tetrahedron*, 72, 3559-3566.
27. Obłąk E.; Piecuch A.; Guz-Regner K.; Dworniczek E. (2014) Antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts. *FEMS Microbiol Lett*, 350, 190–198.
28. Obłąk E.; Piecuch A.; Dworniczek E.; Olejniczak T. (2015) The influence of biodegradable gemini surfactants, N,N'-bis(1-Decyloxy-1-Oxopronan-2-yl)-N,N',N' tetramethylpropane -1,3-diammonium dibromide and N,N'-bis(1-dodecyloxy-1-oxopronan-2-yl)-N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide, on fungal biofilm and adhesion. *J Oleo Sci*, 64, 527-537.
29. Pagano L.; Akova M.; Dimopoulos G.; Herbrecht R.; Drgona L.; Blijlevens N. (2011) Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother*, 66, i5–i14.
30. Pinzari F.; Pasquariello G.; De Mico A. (2006) Biodeterioration of paper: a SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions. *Macromol Symp*, 238, 57-66.
31. Plumridge A.; Hesse S. J.A.; Watson A. J.; Lowe K.C.; Stratford M.; Archer D.B. (2004) The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl Environ Microbiol*, 70, 3506-3511.
32. PN-EN 1276 (2010) Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne -- ilościowa zawieszinowa metoda określania działania bakteriobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych stosowanych w sektorze żywnościowym, warunkach przemysłowych i domowych oraz zakładach użyteczności publicznej -- Metoda badania i wymaganie (faza 2, etap 1).

33. PN-EN 1650 (2013) Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne -- Ilościowa zawiesinowa metoda określania działania grzybobójczego lub bójczego na grzyby drożdżopodobne chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych stosowanych w obszarze spożywczym, przemysłowym, domowym oraz instytucjonalnym -- Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1).
34. Qu L.; She P.; Wang Y.; Liu F.; Zhang D.; Chen L.; Luo Z.; Xu H.; Qi Y.; Wu Y. (2016) Effect of norspermidine on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and eradication. *MicrobiologyOpen*, 5, 402-412.
35. Rasamiravaka T.; Labtani Q.; Duez P.; El Jaziri M. (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Res Int*, Article ID 759348, 17 pages.
36. Sauer K.; Camper A.K.; Ehrlich G.D.; Costerton J.W.; Davies D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriology*, 184, 1140 – 1154.
37. Sedláčková P.; Čeřovský M.; Horsáková I.; Voldřich M. (2011) Cell surface characteristic of *Asaia bogorensis*-spoilage microorganism of bottled water. *Czech J Food Sci*, 29, 457–461.
38. Sekhon B.S. (2004) Gemini (dimeric) surfactants. *Resonance*, 9, 42–49.
39. Taylor P.K.; Yeung A.T.Y.; Hancock R.E.W. (2014) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotech*, 191, 121-130.
40. Tielen P.; Rosenau F.; Wilhelm S.; Jaeger K.-E.; Flemming H.-C.; Wingender J. (2010) Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology+*, 156, 2239–2252.
41. Toyofuku M.; Roschitzki B.; Riedel K.; Eberl L. (2012) Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J Proteome Res*, 11, 4906-4915
42. van de Sande W.W.; Tavakol M.; van Vianen W.; Bakker-Woudenberg I.A. (2010) The effects of antifungal agents to conidial and hyphal forms of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 48, 48-55.
43. Wessels S.; Ingmer H. (2013) Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regul Toxicol Pharm*, 67, 456-467.
44. Wu D.; Xu G.; Sun Y.; Zhang H.; Mao H.; Feng Y. (2007) Interaction between proteins and cationic gemini surfactant. *Biomacromolecules*, 8, 708-712.
45. Xiao Y.H.; Chen J.H.; Fang M.; Xing X.D.; Wang H.; Wang Y.J.; Li F. (2008) Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salt (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections. *J Oleo Sci*, 50, 323-327.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje pozostałe zainteresowania naukowo-badawcze mieszczą się w następujących obszarach tematycznych:

1. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w przemyśle oraz dezynfekcja chemiczna jako metoda ich usuwania
2. Materiały techniczne odporne na działanie mikroorganizmów
3. Grzyby strzępkowe - mikroorganizmy odpowiedzialne za rozkład drewna
4. Ciecze jonowe jako związki przeciwgrzybowe w ochronie papieru
5. Mikroorganizmy na materiałach zabytkowych i ochrona przed ich rozwojem
6. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowo zsyntetyzowanych pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych

5.1. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w przemyśle oraz dezynfekcja chemiczna jako metoda ich usuwania

O tym, że zanieczyszczenia mikrobiologiczne stanowią ważny punkt w całym łańcuchu produkcyjnym, a higiena produkcji nie jest związana tylko z produkcją żywności, świadczy bardzo duże zainteresowanie prowadzonym przeze mnie Seminarium szkoleniowym „Mycie i dezynfekcja jako podstawowe elementy dobrej praktyki produkcyjnej”. W latach 2007-2008 zorganizowałam 7 edycji seminarium, dzięki czemu udało mi się nawiązać współpracę i przeprowadzić badania dla przemysłu.

Moje doświadczenie zdecydowało o tym, że kierowałam i zrealizowałam dwie istotne prace naukowo-badawcze dotyczące oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego w zakładzie produkującym opakowania oraz w zakładzie energetycznym, gdzie do produkcji energii wykorzystuje się biomasę. Badania dotyczyły analizy mikrobiologicznej powietrza, powierzchni, surowców, produktów oraz opakowań. Dzięki temu udało mi się wskazać potencjalne źródła zanieczyszczeń mikrobiologicznych i zaproponować możliwości ich usuwania. Wykonałam także szereg analiz dotyczących zanieczyszczenia mikrobiologicznego różnych materiałów, jak: tektury faliste, ręczniki papierowe, platonki oraz różnych rodzajów produktów spożywczych. Wyniki prac wykonanych dla partnerów przemysłowych nie mogły być opublikowane ze względu na ich poufny charakter.

Partnerzy przemysłowi, dla których przeprowadzałam badania mikrobiologiczne to m.in.: Emsur Polska Sp. z o.o.; CID LINES Sp. z o.o.; Simet S.A.; Zakłady Tłuszczowe „Kruszwica” S.A. Zakład w Kruszwicy i Brzegu; Zakład Energetyczny w Szczecinie; Spółdzielnia Mleczarska w Gostyniu; Pepsi-Cola General Bottlers Poland Sp. z o.o. w Warszawie; Faurecja Automotive Polska S.A. w Grójcu.

Ważnym aspektem mojej pracy naukowej jest dezynfekcja chemiczna jako metoda stosowana w procesach dekontaminacji różnych środowisk. Jest używana w wielu zakładach przemysłowych i dotyczy zarówno powierzchni, jak i powietrza. Coraz częściej jest wykorzystywana także do zwalczania mikroorganizmów zasiedlających obiekty muzealne. W ramach pracy naukowo- badawczej „Instalacja przemysłowa do dezynfekcji obiektów archiwalnych i muzealnych metodą chemicznego zamgławiania”, w której byłam wykonawcą, zajęłam się optymalizacją rozmiarów i stężeń nanosrebra jako związku przeciwdrobnoustrojowego do dezynfekcji chemicznej. Wykazałam, że istotnym parametrem wpływającym na aktywność nanosrebra jest średnica jego cząstek. Skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazują cząsteczki o średnicy 10-15 nm. Porównując wrażliwość mikroorganizmów na podstawie wartości biobójczych, jakie są potrzebne do zahamowania wzrostu, ustaliłam, że najbardziej wrażliwe są kolejno: bakterie *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, drożdże *Candida albicans*, grzyby strzępkowe *Aspergillus niger* i *Penicillium chrysogenum*, a najmniej wrażliwe są bakterie przetrwalnikujące *Bacillus subtilis*. Wykazałam, że stężenie, które skutecznie działa na wszystkie testowane szczepy, wynosi 45 ppm.

Zdobyte w toku przeprowadzonych badań dane i wyniki przedstawiłam w 5 publikacjach, głównie w czasopismach branżowych przeznaczonym dla odbiorców przemysłu i 3 doniesieniach na konferencjach. Łączna liczba punktów z tego obszaru badań to IF=2,059 (52 pkt. MNiSW).

Publikacje:

1. **Koziróg A.**, Żakowska Z. (2014) Od czego zależy skuteczna dezynfekcja. W: Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią i korozją biologiczną (red. W. Skowroński). Monografia 10, t. IX, 46-51. Wyd. Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, Wrocław (**4 pkt. MNiSW**)
2. Gutarowska B., Rębisz D., Zduniak K., Skóra J., Szynkowska M., Gliścińska E., **Koziróg A.** (2012) Optimization and application of the misting method with silver nanoparticles for disinfection of the historical objects. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 75, 167 –175. **IF₂₀₁₂= 2,059; (25 pkt. MNiSW)**
3. **Koziróg A.** (2012) Dezynfekcja w zakładach produkujących żywność. *Przemysł Spożywczy*, 4 (66), 18-20. (**6 pkt. MNiSW**)
4. **Koziróg A.** (2012) Higiena i bezpieczeństwo w procesie wytwarzania żywności. *Przemysł Spożywczy*, 2 (66), 12-15. (**6 pkt. MNiSW**)
5. Gutarowska B., Brycki B., **Koziróg A.**, Brycka J. (2010) Dezynfekcja powietrza metodą zamgławiania chemicznego. *Instal*, 3, 30-33. (**5pkt. MNiSW**)
6. **Koziróg A.**, Żakowska Z., Brycki B. (2008) Dibromki alkileno- α , ω -bis(dodecyldimetyloamoniowe) - nowoczesne związki chemiczne wykorzystywane w dezynfekcji. *Ekologia i Technika*, 16, 5A, 82-85. (**6 pkt. MNiSW**)

Doniesienia na konferencjach:

1. **Koziróg A.** (2010) Obszary działania mikrobiocydów w komórkach grzybów strzępkowych. VII Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania”, Poznań.
2. Gutarowska B., **Koziróg A.** (2009) Dezynfekcja powietrza metodą zamglawiania oraz UV z zastosowaniem lamp przepływowych. Konferencja: „Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce”, Warszawa.
3. **Koziróg A.** (2008) Modern substances used as a fungicidal disinfectants. The International Symposium on New Researches in Biotechnology, Bukareszt, Rumunia.

5.2. Materiały techniczne odporne na działanie mikroorganizmów

Materiały techniczne w środowisku ich stosowania narażone są nieustannie na proces biodeterioracji. Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów, takich jak np. beton czy polimery, powodują bardzo duże straty ekonomiczne rejestrowane na całym świecie. Z tego względu w ostatnich latach coraz częściej modyfikuje się wytwarzane materiały, tak aby były odporne na destrukcyjne działanie drobnoustrojów. W tym celu często już w trakcie produkcji dodawane są związki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, które wbudowują się w strukturę wytwarzanego materiału.

W latach 2009-2012 brałam udział jako wykonawca w projekcie „Nanokompozyty polimerowe o zwiększonej odporności na działanie mikroorganizmów” UDA-POIG.01.03.01-00-073/09-00 (zadanie 7), którego koordynatorem była dr hab. inż. Regina Jeziórska, prof. ICHP z Instytutu Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego w Warszawie. W ramach projektu określałam przeciwrzybowe właściwości polimerów (polietylenu, polipropylenu), które zawierały także różne dodatki, m.in. mączką drzewną, a jako związek przeciwdrobnoustrojowy nanosrebro. W badaniach testowałam grzyby strzępkowe z gatunku *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporoides*, czy *Penicillium funiculosum*. Na podstawie hodowli na pożywkach niepełnowartościowych (bez źródła węgla) lub z 3% glukozy (zgodnie z normą PN-EN ISO 846) oraz zawartości ergosterolu stwierdziłam, że polimery z dodatkiem związku biobójczego w porównaniu z czystymi polimerami są mniej wrażliwe na działanie grzybów strzępkowych. Z kolei dodatek samej tylko mączki stanowi dodatkowe źródło węgla i ułatwia wzrost grzybów strzępkowych. Zabezpieczenie tych próbek nanosrebrem ograniczyło w pewnym stopniu rozwój grzybów strzępkowych, ale nie w takim jak w samym polimerze bez mączki.

Byłam kierownikiem i wykonawcą pracy naukowo-badawczej „Przeciwdrobnoustrojowe właściwości poliamidowych związków kationowych i ich adduktów z barwnikami na papierze”, którą wykonałam na zlecenie Instytutu Technologii Polimerów i Barwników Politechniki Łódzkiej w ramach grantu „Nowa proekologiczna metoda barwienia papieru” (N N508 485 438) finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa

Wyższego, a rozliczonego z Narodowym Centrum Nauki. Udowodniłam, że papiery barwione adduktami reaktywnych pochodnych barwników 3'-karboksypiradynotriazyny z polioctametylenoguanidyną (POMG) i poliheksametylenoguanidyną (PHMG) są odporne na działanie bakterii i grzybów mikroskopowych.

Brałam udział jako wykonawca w projekcie badawczym: „Opracowanie i przygotowanie do wdrożenia technologii wytwarzania siarkobetonów w oparciu o produkty odpadowe z energetyki i przemysłu petrochemicznego” (GEKON 1/05/213122/26/2015 zadanie 6). W latach 2015-2016 przeprowadziłam badania dotyczące odporności kompozytów betonowych modyfikowanych siarką na rozwój grzybów strzępkowych. W eksperymentach zastosowałam mieszaninę trzech szczepów: *Penicillium chrysogenum* ATCC 60739, *Aspergillus versicolor* ATCC 9577 i *Cladosporium herbarum* ATCC 6506. Po 1 i 2 miesiącach dokonałam makroskopowych obserwacji wzrostu grzybni na powierzchni kompozytów i oznaczyłam ergosterol jako wskaźnik rozwoju grzybów strzępkowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że materiałem najmniej podatnym na rozwój grzybów strzępkowych jest kompozyt betonowy zawierający kopolimer siarki z dicyklopentadienem oraz fosfogips.

W ramach prezentowanej tematyki na zlecenie Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Oddział Materiałów Ogniotrwałych w Gliwicach w 2017 r. byłam kierownikiem i wykonawcą pracy naukowo-badawczej dotyczącej oceny wrażliwości płyt izolacyjnych na bazie perlitu na działanie grzybów strzępkowych. W toku prac stwierdziłam, że perlit ekspandowany zawierający spoiwo na bazie sizolu nie jest odporny na działanie grzybów strzępkowych. Również perlit ekspandowany wiązany spoiwem na bazie szkła wodnego potasowego i glikocelu oraz wiązany spoiwem na bazie szkła wodnego potasowego nie jest w pełni grzybostatyczny.

Rezultaty swoich prac przedstawiłam w 3 publikacjach w czasopiśmie naukowych, 1 rozdziale w monografii, 5 doniesieniach na konferencjach krajowych i zagranicznych, 2 patentach i 1 zgłoszeniu patentowym. Impact Factor publikacji z tego zakresu wynosi IF=0,667 (83,3 pkt. MNiSW).

Publikacje:

1. Blus K., Czechowski J., **Koziróg A.** (2014) New eco-friendly method for paper dyeing. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 5(107), 121-125. **IF₂₀₁₄= 0,667; (25 pkt. MNiSW)**
2. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A., Przybysz K., Żakowska Z., Jeziórska R. (2012) Materiały techniczne modyfikowane biocydami a ich oporność na rozwój grzybów strzępkowych. *Ochrona przed Korozją* 9s/A, 331- 335. **(4 pkt. MNiSW)**
3. **Koziróg A.**, Pajewski Z., Żakowska Z., Brycki B. (2007) Skuteczność działania biocydów na grzyby strzępkowe rozwijające się na powierzchniach materiałów. *Ochrona przed Korozją*, 50, 10s/A, 94 – 98. **(4 pkt. MNiSW)**

Rozdział w monografii:

1. Piotrowska M., **Koziróg A.**, Czyżowska A., Pielech -Przybylska K., Żakowska Z., Gutarowska B. (2017) Ocena odporności kompozytów betonowych modyfikowanych siarką na korozję mikrobiologiczną. W: Właściwości siarkobetonów wytwarzanych w oparciu o produkty odpadowe z energetyki i przemysłu petrochemicznego (red. Dziugan P., Berłowska A.). Wyd. Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ, 145-165. **(4 pkt. MNiSW)**

Doniesienia na konferencjach:

1. **Koziróg A.**, Witek J., Kusiorowski R. (2017) Odporność płyt izolacyjnych na bazie perlitu ekspandowanego na grzyby strzępkowe. XIV Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mykologów Budownictwa „Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem”, Złoty Potok.
2. Anyszka R., Bieliński D., Siciński M., Imiela M., Gozdek T., Kleczewska J., Wręczycki J., Dębek C., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. (2015) Application of oil originated from rubber pyrolysis as a monomer/modifier for sulphur-organic copolymers synthesis. Elastomers 2015, 16th Conference “Elaboration, Characterization, Recycling and Durability”, Tours, France.
3. Wręczycki J., Anyszka R., Bieliński D., Siciński M., Imiela M., Gozdek T., Kleczewska J., Dębek C., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. (2015) Zastosowanie oleju z pirolizy gumy jako komonomera/modyfikatora kopolimerów siarkowo-organicznych. Zjazd Zimowy PTChem, Kraków.
4. Downar K., **Koziróg A.** (2012) Wzrost grzybów strzępkowych na powierzchni polimerów modyfikowanych srebrem i miedzią. III Sesja Magistrantów i Doktorantów Łódzkiego Środowiska Chemików, Łódź.
5. **Koziróg A.**, Pajewski Z., Żakowska Z., Brycki B. (2007) Skuteczność działania biocydów powodujących niszczenie grzybów strzępkowych rozwijających się na powierzchniach materiałów. IX Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mykologów Budownictwa „Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem”, Zakopane.

Patenty:

1. **Koziróg A.**, Brycki B., Olejnik K., Wysocka-Robak A. Sposób podwyższenia odporności włóknistych materiałów celulozowych na działanie mikroorganizmów oraz sposób przygotowania środka do podwyższenia odporności tych materiałów na działanie mikroorganizmów. Zgłoszenie patentowe P.427036 z dnia 17.09.2018
2. Jeziórska R., Zielecka M., Szadkowska A., Dzierżawski J., Kolasa J., Jaczewska T., Wenda M., Kępska B., Żakowska Z., Gutarowska B., **Koziróg A.** Kompozyty poliolefinowe odporne na działanie mikroorganizmów P.219275 udzielony 30.04.2015 **(20 pkt. MNiSW)**
3. Blus K., **Koziróg A.**, Bilińska L. Sposób barwienia wyrobów włókienniczych z włókien celulozowych barwnikami reaktywnymi. P.228778 udzielony 30.05.2018 **(20 pkt. MNiSW)**

5.3. Grzyby strzępkowe - mikroorganizmy odpowiedzialne za rozkład drewna

Jednym z aspektów mojej pracy naukowej była tematyka związana z grzybami mikroskopowymi, które rozwijają się na drewnie. Materiał ten ze względu na swój skład chemiczny (66-88% polisacharydy, 19-25% lignina) w warunkach podwyższonej wilgotności łatwo ulega biodeterioracji, za którą odpowiadają m.in. grzyby strzępkowe i grzyby domowe. Grzyby domowe mogą powodować zmiany w strukturze i składzie chemicznym, a także wpływać na właściwości fizyczne i mechaniczne drewna. Grzyby pleśniowe o uzdolnieniach celulolitycznych należące do rodzaju *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Penicillium* powodują powierzchniowe zmiany o charakterze sinizny. Brakuje jednak informacji jak dokładnie odróżnić drewno porażone przez grzyby strzępkowe, kiedy nie widać makroskopowych oznak ich wzrostu.

Wspólnie z zespołem dr hab. inż. Andrzeja Fojutowskiego, prof. ITD z Instytutu Technologii Drewna w Poznaniu w latach 2011-2013 prowadziliśmy badania mające na celu ułatwienie oceny drewna i materiałów drewnopochodnych porażonych przez grzyby strzępkowe. Prace wykonywane były w ramach grantu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (N N309 108940) pt. „Instrumentalnie skwantyfikowana ocena odporności substratów lignocelulozowych na porażenie przez grzyby pleśniowe”.

W ramach tego projektu przeprowadziłam szereg analiz dotyczących zastosowania ergosterolu jako wskaźnika rozwoju grzybów strzępkowych na powierzchni drewna. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że ergosterol jest dobrym wskaźnikiem. Jednak po procesie acetylacji, który jest często stosowaną chemiczną modyfikacją drewna, na niektórych próbkach (np. olchy) zaobserwowałam wyższą zawartość ergosterolu niż w próbce kontrolnej. Wywnioskowałam, że prawdopodobnie po procesie acetylowania powstały substancje, które wpłynęły na zwiększenie syntezy ergosterolu.

Wykazałam, że oznaczania stężenia ergosterolu pośród stosowanych metod są bardziej szczegółowe i wykazują większe zróżnicowanie klas porażenia drewna niż ocena oparta na metodach wizualnych (kolorymetrycznych). Należy jednak zwrócić uwagę na próbki, które wcześniej zostały poddane obróbce chemicznej i przy ich badaniu połączyć obie metody.

Otrzymane rezultaty badań przedstawiłam w postaci 3 artykułów w czasopiśmie naukowych oraz 4 doniesieniach na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Sumaryczny Impact Factor z tego zakresu wynosi IF=2,131 (52 pkt. MNiSW).

Publikacje:

1. Fojutowski A., **Koziróg A.**, Kropacz A., Noskowiak A. (2014) The susceptibility of some acetylated hardwood species to mould fungi attack – An attempt to objectify the assessment. *International Biodegradation and Biodeterioration*, 86, 60-65. **IF₂₀₁₄= 2,131; (25 pkt. MNiSW)**

2. Fojutowski A., Kropacz A., **Koziróg A.** (2014) Growth of *Paecilomyces variotii* fungus on salt-agar medium and on natural and chemically preserved wood. *Annals of Warsaw University of Life Science, Forestry and Wood Technology*, 87, 64-69. **(6 pkt. MNiSW)**
3. Fojutowski A., **Koziróg A.**, Kropacz A. (2012) Wzrost grzybów strzępkowych na drewnie bielu sosny – ocena subiektywna, pomiar zmiany barwy i oznaczenie ergosterolu. *Ochrona przed Korozją*, 9s/A, 378 – 383. **(4 pkt. MNiSW)**

Doniesienia na konferencjach:

1. Fojutowski A., **Koziróg A.**, Kropacz A. (2014) Instrumental measurement of the effect of mould fungi growth in laboratory conditions on control and preserves wood. XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Łódź.
2. Fojutowski A., **Koziróg A.**, Kropacz A., Noskowiak A. (2013) The susceptibility of some acetylated hardwood species to mould fungi attack – An attempt to objectify the assessment. 2nd International Conference “Biodeterioration of Wood and Wood Products” BWWP, Tartu, Estonia.
3. Fojutowski A., **Koziróg A.**, Kropacz A. (2012) Wzrost grzybów strzępkowych na drewnie bielu sosny – ocena subiektywna, pomiar zmiany barwy i oznaczenie ergosterolu. VI Międzynarodowa Konferencja Naukowa “Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych”, Łódź.
4. **Koziróg A.**, Żakowska Z. (2011) Ergosterol w ocenie stanu zagrzybienia powierzchni. XI Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mykologów Budownictwa „Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem”, Augustów.

5.4.Ciecze jonowe jako związki przeciwgrzybowe w ochronie papieru

Ważnym aspektem mojej pracy naukowej była tematyka cieczy jonowych i ich zastosowania jako związków przeciwgrzybowych w ochronie papieru. Wraz z zespołem prof. dr hab. inż. Juliusza Pernaka z Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej oraz prof. dr hab. inż. Kazimierza Przybysza z Instytutu Papiernictwa i Poligrafii Politechniki Łódzkiej jako wykonawca uczestniczyłam w projekcie naukowym realizowanym w latach 2010-2013, finansowanym ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, rozliczony z Narodowym Centrum Nauki (N N209 199138).

W projekcie tym wykonałam kompleksowe badania związane z oddziaływaniem grzybów strzępkowych na papier. W pierwszym etapie prac określiłam wartości minimalnych stężeń (MIC) 9 związków należących do cieczy jonowych lub ich pochodnych, hamujące rozwój 5 szczepów grzybów strzępkowych: *Aspergillus brasiliensis* (wcześniej *A.niger*), *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium aurantiogriseum*, pochodzących z kolekcji ATCC. Najniższe wartości MIC (39-156 µg/ml) otrzymałam dla azotanu (V) benzalkoniowego, DL-mleczanu benzalkoniowego i DL-mleczanu didecyłodimetyloamoniowego.

W dalszych pracach wykorzystałam cztery rodzaje papieru: sosnowy, brzozowy, makulaturowy oraz CTMP (masa celulozowa po obróbce chemiczno- termomechanicznej), które zawierały ciecze jonowe: DL-mleczan benzalkoniowy; DL-mleczan didecyldimetyloamoniowy; azotan (V) benzalkoniowy; benzotriazol 1-dodecylo-3-metyloimidazoliowy, dodawane do materiału w ilości 3, 5 i 8%. Wykazałam, że spośród badanych szczepów grzybów strzępkowych najmniej wrażliwym na działanie cieczy jonowych jest *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Najbardziej wrażliwe były szczepy *Aspergillus versicolor* ATCC 9577 i *Aspergillus terreus* ATCC 10020. Najlepsze działanie przeciwgrzybowe w papierze obserwowałam dla cieczy jonowych, które znajdują się w papierze sosnowym w stężeniu 5% lub wyższym. Biorąc pod uwagę rodzaj badanych papierów stwierdziłam, że otrzymany z masy celulozowej po obróbce chemiczno-mechanicznej papier CTMP zawierający ciecze jonowe wykazał najłabsze właściwości przeciwgrzybowe.

Uzyskane wyniki badań zaprezentowałam w 2 publikacjach naukowych, 1 patencie, rozdziale w książce oraz 5 doniesieniach na konferencjach o zasięgu krajowym. Łączny Impact Factor publikacji z tej tematyki wynosi IF=0,933 (62 pkt. MNiSW).

Publikacje:

1. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A., Przybysz K. (2015) Antifungal activity of paper modified with ionic liquids. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 4 (112), 134-137. **IF₂₀₁₅= 0,566; (25 pkt. MNiSW)**
2. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A., Przybysz K., Michalczyk A, Walkiewicz F. (2013) Azolany imidazoliowe. Właściwości przeciwgrzybowe i możliwość wykorzystania w papiernictwie. *Przemysł Chemiczny*, 92, 9, 1618-1620. **IF₂₀₁₃ =0,367; (15 pkt. MNiSW)**

Rozdziały w książkach:

1. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A. (2016) Application of ionic liquids in the paper. W: *Ionic Liquids* (red. S. Handy) Wyd. InTech, Chorwacja, 51-72. **(5 pkt. MNiSW)**

Patent:

1. Pernak J., Markiewicz B., Kot M., Przybysz K., Drzewińska E., Wysocka-Robak A., Przybysz P., **Koziróg A.** Zastosowanie azotanu (V) benzalkoniowego, DL-mleczanu benzalkoniowego lub DL-mleczanu didecyldimetyloamoniowego. P.222258 udzielony 29.07.2016 **(20 pkt. MNiSW)**

Doniesienia na konferencjach:

1. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A., Przybysz K. (2013) Aktywność przeciwgrzybowa papierów modyfikowanych cieczami jonowymi. XII Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Techniczna, INPAP, Kudowa-Zdrój.
2. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A., Przybysz K., Walkiewicz F. (2013) Imidazoliowe ciecze jonowe – właściwości przeciwgrzybowe a możliwości wykorzystania w papiernictwie. VIII Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania”, Poznań.

3. Wysocka-Robak A., **Koziróg A.**, Przybysz K. (2013) Wpływ cieczy jonowych na właściwości optyczne papieru. VIII Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania”, Poznań.
4. **Koziróg A.**, Wysocka-Robak A., Przybysz K., Pernak J. (2011) Wykorzystanie cieczy jonowych w ochronie papieru przed rozwojem grzybów strzępkowych. VII Kongres Technologii Chemicznej, Kraków, 2011
5. Wysocka-Robak A., **Koziróg A.**, Przybysz K., Pernak J. (2011) Odkwaszanie papieru z zastosowaniem cieczy jonowych. VII Kongres Technologii Chemicznej, Kraków.

5.5. Mikroorganizmy na materiałach zabytkowych i ochrona przed ich rozwojem

W ramach Globalnego Planu Konserwacji, finansowanego ze środków Fundacji Auschwitz-Birkenau, brałam udział w projekcie badawczym „Badania nad korozją biologiczną obiektów na terenie Muzeum Auschwitz-Birkenau w zakresie rozpoznania i zwalczania czynników biologicznych”, którego koordynatorem była prof. dr hab. Beata Gutarowska. W latach 2012–2013 pracowałam w zespole z naukowcami z Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii (ITFiM) PŁ, Instytutu Ekologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz Katedry Fizyki Budowli i Materiałów Budowlanych PŁ.

Naszym celem była ocena stopnia zanieczyszczenia biologicznego 40 baraków drewnianych i murowanych na terenie byłego nazistowskiego obozu koncentracyjnego i zagłady Auschwitz II-Birkenau w Brzezince. Badania przeprowadzone przez zespół z ITFiM PŁ dotyczyły szczegółowej analizy stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego powierzchni zabytkowych, a także powietrza, w zależności od zmiany temperatury i wilgotności powietrza wynikającej ze zmiennych pór roku. W badaniach ustalono taksonomiczne grupy mikroorganizmów odpowiadających za proces biodeterioracji oraz wytypowano gatunki dominujące.

Mój zakres prac obejmował współplanowanie badań, pobór próbek, określenie ilościowego zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza i powierzchni wewnątrz baraków, ze szczególnym uwzględnieniem powierzchni drewnianych. W zespole odpowiadałam też za dokumentację fotograficzną, która była wymagana w ramach projektu.

Po zakończeniu pierwszego projektu, po raz kolejny zespół z ITFiM PŁ przystąpił do współpracy z Państwowym Muzeum Auschwitz-Birkenau w Oświęcimiu realizując w latach 2013-2016 drugi projekt „Badania w zakresie doboru preparatów chemicznych do zwalczania mikroorganizmów i glonów oraz zabezpieczenia powierzchni drewnianych i mineralnych przed ich rozwojem”. Do współpracy, oprócz wcześniej wymienionych, zostały zaproszone także zespoły badawcze z Pracowni Chemii Mikrobiocydów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Katedry Geologii Żyłowej i Górniczej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Prace prowadzone w tym projekcie dotyczyły w pierwszej kolejności

doboru substancji czynnych, a następnie stężeń i częstotliwości aplikacji preparatów przeznaczonych do dezynfekcji zabytkowych powierzchni materiałów, w celu skutecznego ograniczenia wzrostu mikroorganizmów. W przygotowanym raporcie z badań zamieszczone zostały także zalecenia odnośnie działań prewencyjnych, jakie powinny być prowadzone, aby ograniczać proces biodeterioracji oraz wskazówki na temat skutecznej dezynfekcji badanych materiałów zabytkowych.

W prezentowanym projekcie moja praca polegała na udziale w planowaniu schematu badań; doborze substancji czynnych, które skutecznie hamowały rozwój bakterii i grzybów strzępkowych oraz wykonaniu badań dotyczących przeciwdrobnoustrojowego działania wybranych preparatów dezynfekcyjnych wobec grzybów strzępkowych rozwijających się na drewnie.

Otrzymane wyniki badań zostały przedstawione w 6 artykułach w czasopismach naukowych, 4 rozdziałach w monografiach naukowych, 18 doniesieniach na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Łączny Impact Factor publikacji z tego zakresu wynosi IF=14,839 (185 pkt. MNiSW)

Publikacje:

1. **Koziróg A.**, Rajkowska K., Otlewska A., Piotrowska M., Kunicka-Styczyńska A., Brycki B., Nowicka-Krawczyk P., Kościelniak M., Gutarowska B. (2016) Protection of historical wood against microbial degradation – selection and application of microbicides. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1364–1379. **IF₂₀₁₆=3,226; (30 pkt. MNiSW)**
2. Rajkowska K., **Koziróg A.**, Otlewska A., Piotrowska M., Nowicka-Krawczyk P., Brycki B., Kunicka-Styczyńska A., Gutarowska B. (2016) Quaternary ammonium biocides as antimicrobial agents protecting historical wood and brick. *Acta Biochimica Polonica*, 63(1), 153–159. **IF₂₀₁₆=1,159; (15 pkt. MNiSW)**
3. Piotrowska M., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Otlewska A., Brycki B., Konca P., Gutarowska B. (2015) Aktywność przeciwgrzybowa preparatów dezynfekcyjnych na materiałach budowlanych. W: *Ochrona budynków przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem* (red. W. Skowroński). Monografia 11, t. XXII, 215–224. Wyd. Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, Wrocław. **(4 pkt. MNiSW)**
4. Nowicka-Krawczyk P., Żelazna-Wieczorek J., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Piotrowska M., Gutarowska B., Żydziak-Białek A. (2014) Diversity of an aerial phototrophic coating of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp. *Science of the Total Environment*, 493, 116–123. **IF₂₀₁₄=4,099; (35 pkt. MNiSW)**
5. Rajkowska K., Otlewska A., **Koziróg A.**, Piotrowska M., Nowicka-Krawczyk P., Hachułka M., Wolski G.J., Kunicka-Styczyńska A., Gutarowska B., Żydziak-Białek A. (2014) Assessment of biological colonization of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp. *Annals of Microbiology*, 64(2), 799–808. **IF₂₀₁₄=0,990; (15 pkt. MNiSW)**

6. **Koziróg A.**, Otlewska A., Piotrowska M., Rajkowska K., Nowicka-Krawczyk P., Hachułka M., Wolski G.J., Gutarowska B., Kunicka-Styczyńska A., Libudzisz Z., Żakowska Z., Żydzik-Białek A. (2014) Colonizing organisms as a biodegradation factor on historical wood materials at the former concentration camp of Auschwitz II–Birkenau. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86, 171–178. **IF₂₀₁₄=2,131; (30 pkt. MNiSW)**
7. Piotrowska M., Otlewska A., Rajkowska K., **Koziróg A.**, Hachułka M., Nowicka-Krawczyk P., Wolski G.J., Gutarowska B., Kunicka-Styczyńska A., Żydzik-Białek A. (2014) Abiotic determinants of the historical buildings biodeterioration in the former Auschwitz II - Birkenau concentration and extermination camp. *PLOS ONE*, 9 (10), e109402, 1–12. **IF₂₀₁₄=3,234; (40 pkt. MNiSW)**
8. Otlewska A., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Gutarowska B. (2013) Wytwarzanie kalcytu przez szczepy bakterii wyizolowane z materiałów budowlanych. W: *Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią i korozją biologiczną*. (red. W. Skowroński) Monografia 9, t. XII, 226–232. Wyd. Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, Wrocław. **(4 pkt. MNiSW)**
9. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Hachułka M., Nowicka-Krawczyk P., Gutarowska B., Żydzik-Białek A., Żakowska Z. (2013) Warunki techniczne budowlanych obiektów zabytkowych a korozja biologiczna. W: *Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią i korozją biologiczną*. (red. W. Skowroński) Monografia 9, t. XII, 251–262. Wyd. Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, Wrocław. **(4 pkt. MNiSW)**
10. **Koziróg A.**, Otlewska A., Piotrowska M., Rajkowska K., Gutarowska B., Żakowska Z., Brycki B. (2013) Aktywność związków biobójczych z różnych grup chemicznych wobec grzybów strzępkowych izolowanych z powierzchni budowlanych. W: *Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią i korozją biologiczną* (red. W. Skowroński). Monografia 9, t. XII, 127–131. Wyd. Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, Wrocław. **(4 pkt. MNiSW)**
11. Otlewska A., Piotrowska M., Rajkowska K., **Koziróg A.**, Gutarowska B., Żydzik-Białek A. (2012) Zanieczyszczenie mikrobiologiczne wybranych obiektów na terenie Państwowego Muzeum Auschwitz-Birkenau w Oświęcimiu. *Ochrona przed Korozją*, 9s/A, 157-161. **(4 pkt. MNiSW)**

Opublikowane sekwencje nukleotydowe szczepów izolowanych w ramach projektów i zdeponowane w bazie GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI):

1. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K. *Engyodontium album* strain 60/16, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036090
2. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K. *Engyodontium album* strain 70/15, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036091
3. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K. *Engyodontium album* strain 124/40, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,

- and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036092
4. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K. *Epicoccum nigrum* strain 114/39, 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036093
 5. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Staphylococcus equorum* strain 179J/2012, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036089
 6. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Sporosarcina globispora* strain I/5W/5, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036088
 7. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Sporosarcina aquimarina* strain I/8/1, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036087
 8. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Rhodococcus fascians* strain I/9/3, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036086
 9. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Psychrobacillus psychrodurans* strain W8/159, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036085
 10. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Psychrobacillus psychrodurans* strain 185/I/2012, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036084
 11. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Pseudomonas fluorescens* strain I/1/1, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036083
 12. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Paenibacillus terrigena* strain A1E, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036082
 13. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Micrococcus luteus* strain 179D/2012, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036081
 14. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus weihenstephanensis* strain 182C/2012, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036080
 15. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus subtilis* strain W7/70, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036079
 16. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus simplex* strain I/1W/6, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036078
 17. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus safensis* strain II/10, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036077
 18. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus pumilus* strain A34J, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036076

19. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus mycooides* strain P8/13, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036075
20. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus muralis* strain I/2/3, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036074
21. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus idriensis* strain 184H/2012, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036073
22. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus gibsonii* strain I/9/2, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036072
23. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus pumilus* strain A34J, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036071
24. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B., *Bacillus pumilus* strain A34J, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036071
25. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus cereus* strain II/39/2, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036070
26. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus atrophaeus* strain II/39/3, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036069
27. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Bacillus amyloliquefaciens* strain I/2/5, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036068
28. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Arthrobacter sulfureus* strain W4/124, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036067
29. Otlewska A., Rajkowska K., Adamiak J., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Gutarowska B. *Arthrobacter agilis* strain II/11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: KM036066

Doniesienia na konferencjach:

1. Piotrowska M., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Otlewska A., Brycki B., Konca P., Gutarowska B. (2017) Ocena skuteczności działania preparatów dezynfekcyjnych na zabytkowych materiałach budowlanych. Seminarium Naukowe „Dezynfekcja – od pomysłu do aplikacji”, Łódź.
2. Gutarowska B., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Otlewska A., Rajkowska K., Nowicka-Krawczyk P., Hachułka M., Wolski G.J., Brycki B., Kunicka-Styczyńska A., Bonifay V., Aydin E., Cellikol-Ayidin S., Sunner J., Beech I. (2016) Biodeterioration of historic building objects in the former Auschwitz II-Birkenau concentration and extermination camp and chemical methods of protection. International Conference “Biodeterioration and Protection of Cultural Heritage”, Łódź.
3. **Koziróg A.**, Piotrowska M., Rajkowska K., Otlewska A., Kunicka-Styczyńska A., Brycki B., Gutarowska B. (2016) Historical wood protection against microbial growth by using quaternary ammonium compounds based disinfectants. International Conference “Biodeterioration and Protection of Cultural Heritage”, Łódź.
4. Gutarowska B., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Otlewska A., Rajkowska K., Nowicka-Krawczyk P., Hachułka M., Wolski G., Brycki B., Kościelniak M. (2016) Biodeterioracja zabytkowych obiektów budowlanych na terenie Muzeum Auschwitz-Birkenau i chemiczne metody zwalczania

- czynników biologicznych. I Konferencja Naukowo-Techniczna „Chemia w Budownictwie” CHEMBUD’2016, Bronisławów.
5. **Koziróg A.**, Rembiś M., Rajkowska K., Otlewska A., Piotrowska M., Brycki B., Gutarowska B., Kościelniak M. (2016) Zastosowanie mikrobiocydów i preparatów do konsolidacji oraz hydrofobizacji do ochrony materiałów budowlanych przed mikroorganizmami. I Konferencja Naukowo-Techniczna „Chemia w Budownictwie” CHEMBUD ‘2016, Bronisławów.
 6. Nowicka-Krawczyk P., Żelazna-Wieczorek J., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Piotrowska M., Gutarowska B. (2015) Cyanobacteria and algae involved in temporal changes of anthropogenic materials’ structure. 34th International Conference of the Polish Phycological Society “Algae as Indicators of Environmental Changes”, Rzeszów-Polańczyk.
 7. Rajkowska K., **Koziróg A.**, Otlewska A., Piotrowska M., Brycki B., Gutarowska B., Kunicka-Styczyńska A., Nowicka-Karwczyk P. (2015) Sensitivity of environmental bacterial and fungal strains to quaternary ammonium salts. 6th International Weigl Conference on Microbiology “From microbiology to synthetic biology”, Gdańsk.
 8. Nowicka-Krawczyk P., Olszyński R., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Piotrowska M., Gutarowska B., Żydziak-Białek A. (2014) Does algae bloom terrestrial environment? – *Scytonema drilosiphon* case. 33th International Conference of the Polish Phycological Society „Cyanobacterial and algal blooms – effects on water management and human health”, Gdynia.
 9. Piotrowska M., Otlewska A., Rajkowska K., **Koziróg A.**, Gutarowska B., Kunicka-Styczyńska A., Libudzisz Z., Żakowska Z., Żydziak-Białek A. (2014) Environmental aspects of biodeterioration in the former Auschwitz II-Birkenau concentration and extermination camp. XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Łódź.
 10. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K. (2014) Characteristics of *Engyodontium album* – the uncommon species isolated from historical objects. XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Łódź.
 11. **Koziróg A.**, Otlewska A., Rajkowska K., Piotrowska M., Nowicka-Krawczyk P., Gutarowska B., Brycki B., Kunicka-Styczyńska A., Libudzisz Z., Żakowska Z. (2014) Biocides’ active compounds to prevent development of microorganisms isolated from historical wooden surfaces. XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Łódź.
 12. Nowicka-Krawczyk P., Olszyński R., **Koziróg A.**, Otlewska A., Piotrowska M., Rajkowska K., Gutarowska B., Brycki B. (2014) The influence of active chemicals on the growth of phototrophic biofilm coating brick substrates. XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Łódź.
 13. Rajkowska K., **Koziróg A.**, Otlewska A., Piotrowska M., Brycki B., Gutarowska B., Kunicka-Styczyńska A., Libudzisz Z., Żakowska Z. (2014) Application of quaternary ammonium salts to protect historical brick against microorganisms. XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Łódź.
 14. Adamiak J., Gutarowska B., Otlewska A., Rajkowska K., Piotrowska M., **Koziróg A.** (2014) Molecular methods for evaluation of microbial diversity of indoor air and historic objects in the museum environments. 3rd Workplace and Indoor Aerosols Conference, Wrocław.

15. Piotrowska M., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Hachułka M., Nowicka-Krawczyk P., Gutarowska B., Żydzik-Białek A., Żakowska Z. (2013) The influence of abiotic factors on colonization of historic buildings in the former Auschwitz II-Birkenau concentration camp by bacteria, fungi, algae and lichens. V International Conference "Environmental, Industrial and Applied Microbiology" BioMicroWorld, Madryt, Hiszpania.
16. Hachułka M., Piotrowska M., **Koziróg A.**, Otlewska A., Rajkowska K., Gutarowska B. (2013) Korozja biologiczna wybranych obiektów na terenie Państwowego Muzeum Auschwitz-Birkenau. 56. Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego „Interdyscyplinarne i aplikacyjne znaczenie nauk botanicznych”, Olsztyn.
17. **Koziróg A.**, Piotrowska M., Otlewska A., Rajkowska K., Nowicka-Krawczyk P., Gutarowska B., Hachułka M., Wolski G., Żydzik-Białek A., Libudzisz Z., Żakowska Z. (2013) Organisms colonizing historical wood materials in the former concentration camp Auschwitz II-Birkenau. 2nd International Conference "Biodeterioration of Wood and Wood Products" BWWP, Tartu, Estonia.
18. Otlewska A., Piotrowska M., Rajkowska K., **Koziróg A.**, Gutarowska B., Żydzik-Białek A. (2012) Zanieczyszczenie mikrobiologiczne wybranych obiektów na terenie Państwowego Muzeum Auschwitz-Birkenau w Oświęcimiu. VI Międzynarodowa Konferencja Naukowa "Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych", Łódź.

5.6. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowo zsyntetyzowanych pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na produkty biobójcze, stosowane w wielu obszarach naszego życia. Część z nich jest zgodnie z rozporządzeniami Unii Europejskiej wycofywana z powodu dużej szkodliwości dla środowiska lub organizmów, w tym człowieka. Kolejne są stosowane w mniejszym zakresie, często z powodu uodpornienia się organizmów (szczególnie bakterii czy grzybów mikroskopowych) na ich działanie. Z tego względu poszukuje się nowych związków, które będą skutecznie działały, m.in. na mikroorganizmy, a jednocześnie będą przyjazne dla środowiska.

Ważnym aspektem moich badań było i jest poszukiwanie takich związków. Zespół Pracowni Chemii Mikrobiocydów Wydziału Chemii na Uniwersytecie im. A. Mickiewicza kierowany przez dr hab. Bogumiła Bryckiego, prof. UAM przeprowadza syntezy nowych związków, które są najczęściej różnymi modyfikacjami czwartorzędowych soli amoniowych. Moim zadaniem jest określenie skuteczności ich działania na bakterie i grzyby mikroskopowe. Badania prowadzę najczęściej na mikroorganizmach zalecanych do testowania biocydów: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 85327, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Obserwuję zależności pomiędzy wartościami minimalnych stężeń pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych hamujących wzrost mikroorganizmów a ich budową chemiczną, a dokładniej długością łańcucha alkilowego. Zjawisko to jest opisywane

jako efekt „cut-off” i pokazuje, że powyżej pewnych długości łańcucha alkilowego aktywność biologiczna danego związku nie może dalej wzrastać. Oznacza to, że minimalne stężenia hamujące wzrost mikroorganizmów są coraz wyższe i związki z dłuższymi łańcuchami nie są tak skuteczne, jak ich analogi z krótszymi łańcuchami. Uzyskiwane w toku badań wartości minimalnych stężeń modyfikowanych czwartorzędowych soli amoniowych hamujących wzrost mikroorganizmów są często ponad 100- krotnie niższe w porównaniu do klasycznych soli.

Otrzymane wyniki badań przedstawiłam w 4 artykułach w czasopismach naukowych oraz 3 doniesieniach na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Łączny Impact Factor publikacji z tego zakresu wynosi IF=8,582; (90 pkt. MNiSW)

Publikacje:

1. Brycki B., Małecka I., **Koziróg A.**, Otlewska A. (2017) Synthesis, structure and antimicrobial properties of novel benzalkonium chloride analogues with pyridine ring. *Molecules*, 22 (1), 130-141. **IF₂₀₁₇= 3,098; (30 pkt. MNiSW)**
2. Brycki B., **Koziróg A.**, Kowalczyk I., Pospieszny T., Materna P., Marciniak J. (2017) Synthesis, structure, surface and antimicrobial properties of new oligomeric quaternary ammonium salts with aromatic spacers. *Molecules* 22(11), 1810-1827. **IF₂₀₁₇= 3,098; (30 pkt. MNiSW)**
3. Brycki B., Kowalczyk I., Werner J., Pospieszny T., **Koziróg A.** (2017) Synthesis and structural analysis of novel norspermidine derivatives. *International Journal of Organic Chemistry*, 7(2), 106-139.
4. Brycki B., Kowalczyk I., **Koziróg A.** (2011) Synthesis, molecular structure, spectral properties and antifungal activity of polymethylene- α,ω -bis(N,N-dimethyl-N-dodecyloammonium bromides). *Molecules*, 16(1), 319-335. **IF₂₀₁₁= 2,386; (30 pkt. MNiSW)**

Doniesienia na konferencjach:

1. **Koziróg A.**, Brycki B., Żakowska Z. (2013) Chemical composition of the cell wall and membrane of moulds after long term activity of N, N-bis(3-aminopropyl)dodecylammin. V International Conference “Environmental, Industrial and Applied Microbiology” BioMicroWorld, Madryt, Hiszpania.
2. Kowalczyk I., Brycki B., **Koziróg A.** (2013) Spectroscopic analysis of alkylazaammonium salts with the antimicrobial activity. 18th European Symposium on Organic Chemistry, Marsylia, Francja.
3. **Koziróg A.**, Brycki B. (2011) Influence of spacer and alkyl chain in gemini surfactants on antifungal activity. 4th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology “From microbiology to synthetic biology”, Wrocław.

6. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Jestem autorką lub współautorką 34 oryginalnych prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach zagranicznych i krajowych (w tym 24 w czasopismach

z listy JCR), 1 rozdziału w książce, 1 rozdziału w monografii w języku angielskim, 6 rozdziałów w monografiach w języku polskim, 4 skryptów do zajęć laboratoryjnych oraz 3 patentów i 1 zgłoszenia patentowego. Jestem również autorką lub współautorką 61 doniesień prezentowanych na konferencjach i seminariach międzynarodowych oraz krajowych, zamieszczonych w materiałach konferencyjnych. Jestem także współautorką 29 sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w bazie GenBank NCBI. Pełny wykaz dorobku habilitacyjnego przedstawiłam w załączniku 4.

Prace publikowałam w następujących czasopismach anglojęzycznych (uporządkowane według aktualnego pięcioletniego współczynnika IF):

– Science of the Total Environment (IF _{5-letni} 5,102)	1
– International Journal of Molecular Sciences (IF _{5-letni} 3,482)	2
– PLOS ONE (IF _{5-letni} 3,394)	1
– International Biodeterioration & Biodegradation (IF _{5-letni} 3,202)	3
– Molecules (IF _{5-letni} 3,268)	5
– Applied Sciences (IF _{5-letni} 1,855)	1
– Folia Microbiologica (IF _{5-letni} 1,353)	1
– Acta Biochimica Polonica (IF _{5-letni} 1,491)	2
– Fibres&Textiles in Eastern Europe (IF _{5-letni} 0,757)	2
– Annals of Microbiology (IF _{5-letni} 1,110)	1
– Przemysł Chemiczny (IF _{5-letni} 0,345)	1
– Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica (IF _{5-letni} 0,928)	1

oraz wydawanych w języku polskim:

– Annals of Warsaw University of Life Science, Forestry and Wood Technology	1
– Ochrona przed Korozją	5
– Przemysł Spożywczy	2
– Przegląd Papierniczy	2
– Instal	1
– Ekologia i Technika	1

Wykonałam recenzje 11 artykułów dla czasopism:

– Microbial Ecology (IF _{5-letni} 3,710)	1
– Journal of Cultural Heritage (IF _{5-letni} 1,943)	2
– Polish Journal of Microbiology (IF _{5-letni} 0,951)	1
– Acta Biochimica Polonica (IF _{5-letni} 1,463)	2
– Mini-Reviews in Medicinal Chemistry	1

- Annual Research&Review in Biology 1
- Ochrona przed Korozją 2
- ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość 1

Podsumowanie mojego dorobku przedstawiłam w tabeli zamieszczonej poniżej.

Tabela 1. Zestawienie dorobku naukowego

Dane	Przed uzyskaniem tytułu doktora	Po uzyskaniu tytułu doktora	Suma
Liczba artykułów w czasopismach z listy JCR	1	21	22
Liczba artykułów w czasopismach spoza listy JCR	0	12	12
Liczba rozdziałów w monografiach i książkach (w tym w jęz. angielskim)	0	8 (2)	8 (2)
Liczba referatów (w tym w jęz. angielskim)	1	21 (6)	22 (6)
Liczba doniesień konferencyjnych (w tym w jęz. angielskim)	2 (0)	61 (30)	63 (30)
Liczba patentów	0	3	3
Liczba zrealizowanych projektów (w tym jako kierownik/ wykonawca)	1 (0/1)	7 (1/6)	8 (1/7)
Liczba punktów IF	0,286	43,673	43,673
Liczba punktów MNiSW	10	678	688
Liczba cytowań* (bez autocytowań)	0	136 (111)	136 (111)
Indeks Hirscha h^*	0	8	8

* wg Web of Science

stan liczby cytowań i indeks h z dnia 27.02.2019

7. Współpraca z instytucjami naukowymi i staże naukowe

Od 2002 roku współpracuję z Pracownią Chemii Mikrobiocydów na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu kierowaną przez dr hab. Bogumiła Bryckiego,

prof. UAM. W latach 2008-2011 wspólnie realizowaliśmy projekt finansowany ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N N401 027736) nt. „Właściwości grzybobójcze gemini surfaktantów”, którego byłam kierownikiem. W latach 2013-2016 kontynuowaliśmy naszą współpracę w ramach projektu badawczego: „Badania nad korozją biologiczną obiektów na terenie Muzeum Auschwitz-Birkenau w zakresie rozpoznania i zwalczania czynników biologicznych”. Wynikiem prac są liczne publikacje, których łączny IF wynosi 24,398.

W latach 2009-2013 brałam udział w interdyscyplinarnych badaniach „Nanokompozyty polimerowe o zwiększonej odporności na działanie mikroorganizmów” realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Projekt (UDA-POIG.01.03.01-00-073/09-00) wykonany był przez konsorcjum, w skład którego wchodził naukowcy z Instytutu Chemii Przemysłowej im. prof. Ignacego Mościckiego w Warszawie, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy oraz Uniwersytetu Opolskiego.

W ramach projektu badawczego „Instrumentalnie skwantyfikowana ocena odporności substratów lignocelulozowych na porażenie przez grzyby pleśniowe” (N N309 108940) realizowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w latach 2011-2013 współpracowałam z Instytutem Technologii Drewna w Poznaniu (zespół dr hab. inż. Andrzeja Fojutowskiego, prof. ITD). Wynikiem naszej współpracy są artykuły i wspólne wystąpienia na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Od 2010 roku prowadziłam wspólne badania z Instytutem Papiernictwa i Poligrafii Politechniki Łódzkiej. Jako jedyny mikrobiolog w latach 2010-2013 brałam udział w badaniach Instytutu Papiernictwa i Poligrafii Politechniki Łódzkiej (zespół prof. dr hab. inż. Kazimierza Przybysza) oraz Instytutu Technologii i Inżynierii Chemicznej Wydział Chemii Politechniki Poznańskiej (zespół prof. dr hab. inż. Juliusza Pernaka) prowadzonych w ramach projektu: „Badania konserwacji papieru z wykorzystaniem cieczy jonowych” (N N209 199138) realizowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Efektem naszej współpracy są publikacje naukowe, referaty na konferencjach krajowych oraz wspólny patent.

Obecnie prowadzę także prace z Instytutem Papiernictwa i Poligrafii PŁ, z zespołem dr hab. inż. Konrada Olejnika dotyczące m.in. zastosowań gemini surfaktantów do ochrony papieru przed mikroorganizmami. Rezultatem naszych prac jest zgłoszenie patentowe z dnia 17.09.2018 (P.427036): Koziróg A., Brycki B., Olejnik K., Wysocka-Robak A. Sposób podwyższenia odporności włóknistych materiałów celulozowych na działanie mikroorganizmów oraz sposób przygotowania środka do podwyższenia odporności tych materiałów na działanie mikroorganizmów.

Współpracuję również z Pracownią Mikroskopii Elektronowej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, z zespołem kierowanym początkowo przez prof. dr hab. Barbarę Gabarę, a obecnie przez dr Sławę Glińską. Wyniki naszych wspólnych badań zostały zawarte w 3 publikacjach naukowych w: Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica (2006), Folia Microbiologica (2006) oraz Applied Sciences (2019) .

W latach 2012–2016 uczestniczyłam w dwóch projektach badawczych pt. „Badania nad korozją biologiczną obiektów na terenie Muzeum Auschwitz-Birkenau w zakresie rozpoznania i zwalczania czynników biologicznych” oraz „Badania w zakresie doboru preparatów chemicznych do zwalczania mikroorganizmów i glonów oraz zabezpieczenia powierzchni drewnianych i mineralnych przed ich rozwojem”. W ramach badań współpracowałam z naukowcami z Katedry Algologii i Mikologii Uniwersytetu Łódzkiego, Katedry Geobotaniki i Ekologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego, Pracowni Chemii Mikrobiocydów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Katedry Fizyki Budowli i Materiałów Budowlanych PŁ, Katedry Geologii Żyłowej i Górniczej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, Akademią Sztuk Pięknych w Krakowie oraz Działem Konserwacji Państwowego Muzeum Auschwitz-Birkenau w Oświęcimiu.

W Politechnice Łódzkiej w latach 2011-2012 we współpracy z Instytutem Technologii Polimerów i Barwników (reprezentowanym przez dr inż. Kazimierza Blusa) prowadziłam badania mające na celu określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych poliamidowych związków kationowych i ich adduktów z barwnikami na papierze oraz na tkaninach. Wyniki prac zawarłam w publikacji w Fibres & Textiles in Eastern Europe (2014) oraz w patencie: „Sposób barwienia wyrobów włókienniczych z włókien celulozowych barwnikami reaktywnymi” P.228778.

W 2017 roku w ramach badań z zakresu oceny wrażliwości płyt izolacyjnych na bazie perlitu na działanie grzybów strzępkowych współpracowałam z Instytutem Ceramiki i Materiałów Budowlanych, Oddział Materiałów Ogniotrwałych w Gliwicach. Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione jako doniesienie ustne na XIV Sympozjum Polskiego Stowarzyszenia Mykologów Budowlanych „Ochrona obiektów budowlanych przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem” Złoty Potok, 2017.

8. Działalność dydaktyczna

Od 2000 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne (wykłady i zajęcia laboratoryjne) dla studentów Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności, a od 2012 także w języku angielskim dla studentów International Faculty of Engineering (IFE).

W latach 2007-2015 uczestniczyłam w przygotowaniu programu i materiałów dydaktycznych, a także prowadziłam wykłady i zajęcia laboratoryjne **Mikrobiologia i higiena**

żywności dla kierunku Biotechnologia, studia niestacjonarne. Do 2017 roku (do wygaśnięcia kierunku Ochrona Środowiska/ Biotechnologia Środowiska) prowadziłam zajęcia laboratoryjne i wykład **Monitoring skażeń** oraz zajęcia laboratoryjne, dla których opracowałam instrukcje: **Mikrobiologiczne aspekty w ochronie środowiska** i **Procesy fermentacyjne**. Dla kierunku Biotechnologia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności prowadziłam lub nadal prowadzę zajęcia laboratoryjne: **Mikrobiologia ogólna**, **Mikrobiologia przemysłowa**, **Naturalne stabilizatory żywności**, **Laboratorium specjalizacyjne**, **Procesy fermentacyjne**, a od 2018 roku również wykład **Analityka mikrobiologiczna w przemyśle**, dla którego przygotowałam nowe opracowanie. Dla kierunku Technologia Kosmetyków prowadzę zajęcia laboratoryjne **Mikrobiologia ogólna** oraz **Mikrobiologia kosmetyków**, dla którego współtworzyłam instrukcje do zajęć. Dla studentów z IFE opracowałam materiały dydaktyczne i prowadzę zajęcia laboratoryjne z **Technical Microbiology**, a także część zajęć laboratoryjnych w ramach przedmiotu **Industrial Fermentation Technology**, **Microbiological Analytics**. W ciągu roku akademickiego w latach 2010-2018 liczba moich zajęć dydaktycznych zawierała się w przedziale 245-312 godzin.

Dla słuchaczy Studiów Podyplomowych „Mikrobiologia, higiena i jakość w przemyśle” opracowałam program, przygotowałam materiały dydaktyczne i prowadziłam zajęcia laboratoryjne **Metody wyznaczania minimalnych stężeń hamujących rozwój drobnoustrojów** oraz wykład **Fizyczne i chemiczne metody dezynfekcji**. Prowadziłam także zajęcia laboratoryjne: **Techniki mikroskopowe** oraz **Identyfikacja grzybów strzępkowych**.

W ramach Seminarium Szkoleniowego „Mycie i dezynfekcja jako podstawowe elementy dobrej praktyki produkcyjnej” przygotowałam program seminarium i prowadziłam wykłady: **Oporność drobnoustrojów na działanie preparatów dezynfekcyjnych**, **Działanie środków dezynfekcyjnych na drobnoustroje** oraz zajęcia laboratoryjne: **Nowoczesne metody kontroli linii produkcyjnych**.

Jestem współautorką 4 skryptów wykorzystywanych przez studentów w ramach zajęć:

1. Kręgiel D., Otlewska A., **Koziróg A.**, Rajkowska K., Antolak H (2018) Laboratorium specjalizacyjne - kierunek Biotechnologia, studia I stopnia, semestr VI ISBN 978-83-63929-41-1.
2. Rajkowska K., Kunicka-Styczyńska A., **Koziróg A.**, Rygała A. (2017) Podstawowe zagadnienia mikrobiologii kosmetyków - ćwiczenia laboratoryjne. ISBN 978-83-63929-33-6.

3. Kręgiel D., Otlewska A., Dybka K., **Koziróg A.**, Rajkowska K. (2012) Laboratorium specjalizacyjne. Specjalizacja Mikrobiologia Techniczna dla studentów semestru VI studiów inżynierskich I stopnia na kierunku Biotechnologia. ISBN 978-83-63929-00-8.
4. **Koziróg A.**, Rajkowska K., Nowak A. (2012) Mikrobiologia i higiena żywności. Instrukcje do zajęć laboratoryjnych dla studentów V semestru niestacjonarnych studiów inżynierskich I stopnia na kierunku Biotechnologia. ISBN 978-83-930577-5-7.

Od 2007 roku, kiedy rozpoczęłam pracę w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, byłam opiekunem 16 prac dyplomowych magisterskich na kierunku: Biotechnologia i Biotechnologia Środowiska oraz 25 prac inżynierskich na kierunkach: Biotechnologia, Ochrona Środowiska, Inżynieria Biochemiczna i Biotechnology (IFE) w języku angielskim. Sprawowałam również opiekę nad 10 pracami dyplomowymi w ramach Studiów Podyplomowych „Mikrobiologia, higiena i jakość w przemyśle”.

W celu podnoszenia swoich kwalifikacji i udoskonalenia warsztatu dydaktycznego biorę udział w różnych szkoleniach: dwumiesięczny Kurs języka angielskiego dla nauczycieli akademickich (2018), Design Thinking (2017), Zastosowanie mikroskopii konfokalnej w badaniach mikrobiologicznych, biotechnologicznych, mykologicznych i parazytologicznych (2017), Problem Based Learning (2015), Cytometria przepływowa (2015), Nowoczesne metody analiz żywności i napojów (2014), Warsztaty „Writing great papers in international journals. An introduction for researchers”, Wiley (2014), Letnia Szkoła Zarządzania Projektami (2011), Podstawowe zasady użytkowania programu STATISTICA – wybrane zagadnienia analizy danych z uwzględnieniem metod statystycznych (2010), Wykorzystanie metody Real Time PCR do wykrywania patogenów w próbkach żywnościowych i środowiskowych (2009), Użytkowanie programu RefWorks (2007).

Byłam wyróżniona:

- ośmioma nagrodami JM Rektora Politechniki Łódzkiej za osiągnięcia w działalności dydaktyczno-wychowawczej (2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016),
- czterema nagrodami JM Rektora Politechniki Łódzkiej za osiągnięcia w działalności naukowej (2014, 2015, 2016, 2018),
- jedną nagrodą JM Rektora Politechniki Łódzkiej za osiągnięcia w działalności organizacyjnej (2017).

W roku 2019 dostałam nominację do Brązowego Medalu *Za długoletnią służbę*.

9. Działalność organizacyjna, działalność popularyzująca naukę

W latach 2007-2010 byłam organizatorką sześciu edycji Seminarium Szkoleniowego „Mycie i dezynfekcja jako podstawowe elementy dobrej praktyki produkcyjnej”, w ramach których przygotowałam program wykładów i zajęć laboratoryjnych.

W roku 2009 i 2012 byłam przewodniczącą Komitetu Organizacyjnego V i VI Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Rozkład i korozja mikrobiologiczna materiałów technicznych”, organizowanej przez Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ. Brałam także udział w organizacji Międzynarodowych Konferencji Naukowych „XVI International Biodeterioration & Biodegradation Symposium” (2014) oraz “International Conference of Biodeterioration & Protection of Cultural Heritage” (2016) pracując w Komitecie Organizacyjnym. W 2017 roku zorganizowałam Seminarium Naukowe „Dezynfekcja – od pomysłu do aplikacji” i byłam przewodniczącą Komitetu Organizacyjnego.

W roku 2007 oraz w latach 2013-2016 byłam członkiem Wydziałowej Komisji Rekrutacyjnej. Od roku 2010 do 2013 sprawowałam opiekę nad studentami na kierunku Ochrona Środowiska.

W ramach prac organizacyjnych w Zakładzie Mikrobiologii Technicznej PŁ nadzorowałam przeprowadzanie egzaminów inżynierskich i magisterskich na kierunku Biotechnologia (2007-2012), na kierunku Ochrona Środowiska i Biotechnologia Środowiska (2007-2018), a od 2018 roku koordynuję przebieg tych egzaminów na kierunku Biotechnologii IFE w języku angielskim.

Jestem członkiem organizacji i stowarzyszeń naukowych: American Society for Microbiology, International Biodeterioration Biodegradation Society, Polskiego Towarzystwa Mykologicznego oraz Polskiego Stowarzyszenia Mykologów Budowlanych.

Przez cały okres pracy zawodowej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności biorę czynny udział w działalności promocyjnej. Prezentuję Instytut gościom odwiedzającym nasz Wydział, m.in. z Holandii, Litwy. Od 2009 r. prowadzę zajęcia laboratoryjne z dziećmi ze szkół podstawowych i gimnazjalnych, które przyjeżdżają do nas na zajęcia praktyczne w ramach programu „Drzwi zawsze otwarte”.

W 2017 roku reprezentowałam Wydział na XVII Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi, gdzie wygłosiłam wykład „Antybakteryjny świat”. W ramach tego Festiwalu byłam współorganizatorką i prowadzącą stoisko Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności na Pikniku Naukowym, które zdobyło I nagrodę JM Rektora PŁ.

Anna Koxinóg