

AUTOREFERAT

Grzegorz Czerwonka

Zakład Mikrobiologii

Instytut Biologii

Uniwersytet Jana Kochanowskiego

w Kielcach

Kielce 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	4
4.1. Wprowadzenie	6
4.2. Cel badań.....	9
4.3. Opis osiągnięcia naukowego.....	10
4.4. Podsumowanie	19
4.5. Literatura.....	20
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	21
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	23
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej, nieomówione w punktach 4-5.....	24
7.1. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora	24
7.2. Udział w projektach badawczych.....	27
7.3. Ekspertyzy.....	29
7.4. Członkostwa i pełnione funkcje	30
7.5. Kursy	30
7.6. Nagrody i wyróżnienia	31
7.7. Pozostałe.....	31

1. Imię i nazwisko

Grzegorz Czerwonka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**2014 r. Stopień doktora nauk biologicznych,**

- Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.
- Tytuł rozprawy: „Wpływ aktywności ureolitycznej na biofilmy szczepów *Proteus mirabilis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*”, promotor w przewodzie doktorskim prof. dr hab. Wiesław Kaca, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

2007 r. Tytuł zawodowy magistra biotechnologii,

- Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie;
- Tytuł pracy: „Zastosowanie białek GFP i DsRed w badaniach sygnałów molekularnych funkcjonujących w symbiozie rizobia-rośliny motylkowate”, promotor prof. dr hab. Anna Skorupska, Zakład Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2015 r. – obecnie adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

2008 – 2015 r. asystent w Zakładzie Mikrobiologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 6 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2016 – 2022 i powiązanych tematem:

Wykorzystanie potencjału elektrokinetycznego oraz hydrofobowości powierzchni komórki bakteryjnej w badaniach nad procesami adhezji oraz tworzenia biofilmu bakterii Gram-ujemnych

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi następujące publikacje:

A1 Czerwonka G*, Guzy A, Kałuża K, Grosicka M, Dańczuk M, Lechowicz Ł, Gmitter D, Kowalczyk P, Kaca W. *The role of Proteus mirabilis cell wall features in biofilm formation*. Archives of Microbiology 2016 Nov;198(9):877-84.

IF₂₀₁₆: 1,600 MNiSW: 20 (18 cytowań)

Mój udział polegał na: stworzeniu koncepcji pracy i określeniu celów badawczych, zaplanowaniu badań, wykonaniu pomiarów ilości biofilmu oraz adhezji bakterii do powierzchni stałych, zdjęć w mikroskopii fluorescencyjnej, pomiaru potencjału zeta, hydrofobowości powierzchni komórki metodą MATH oraz opracowaniu i dyskusji wyników, napisaniu i redakcji pracy, korespondencji z redakcją czasopisma (autor korespondencyjny) oraz odpowiedzi na recenzje.

A2 Borkowski A*, Gutowski Ł, Syczewski M, Cłapa T, **Czerwonka G**. *Adaptation of bacteria Escherichia coli in presence of quaternary ammonium ionic liquids*. Ecotoxicology and Environmental Safety 2018 Nov 30;164:370-378.

IF₂₀₁₈: 4,527 MNiSW: 30 (11 cytowań)

Mój wkład w pracę polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów potencjału elektrokinetycznego, analizie wyników rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE oraz opracowaniu wyników i ich dyskusji.

A3 Czerwonka G*, Gmitter D, Guzy A, Rogala P, Jabłońska-Wawrzycka A, Borkowski A, Cłapa T, Narożna D, Kowalczyk P, Syczewski M, Drabik M, Dańczuk M, Kaca W. *A benzimidazole-based ruthenium(IV) complex inhibits Pseudomonas aeruginosa biofilm*

formation by interacting with siderophores and the cell envelope, and inducing oxidative stress. Biofouling 2019 Jan;35(1):59-74.

IF₂₀₁₉: 2,351 MNiSW: 70 (10 cytowań)

Mój udział w pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i określeniu celów badawczych, zaplanowaniu badań, wykonaniu pomiarów MIC, MBC, pomiarów ilości biofilmu, produkcji piowerdyny, zdjęć mikroskopii konfokalnej oraz współudziale w wykonaniu zdjęć SEM oraz analizy EDS, pomiarze potencjału zeta oraz hydrofobowości powierzchni komórki, opracowaniu i dyskusji wyników, napisaniu i redakcji pracy, korespondencji z redakcją czasopisma (autor korespondencyjny) oraz odpowiedzi na recenzje.

A4 Durlik K*, Czerwonka G, Żarnowiec P, Kaca W. Characterization of *Proteus mirabilis* Lipopolysaccharide Samples by Infrared Spectroscopy and Serological Methods. Methods In Molecular Biology 2019 2021:217-230.

IF₂₀₁₉: - MNiSW: 70 (0 cytowań)

Mój udział w przygotowaniu tej procedury polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu badań, izolacji i oczyszczaniu LPS, opisie procedury, napisaniu i redakcji pracy.

A5 Czerwonka G*, Gmitter D, Durlik-Popińska K. Draft Genome of *Proteus mirabilis* Serogroup O18 Elaborating Phosphocholine-Decorated O Antigen. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2021; Mar 25;11:620010

IF₂₀₂₁: 6,073 MNiSW: 100 (0 cytowanie)

Mój udział w pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i określeniu celów badawczych, zaplanowaniu badań, izolacji DNA, współudziale w asemblacji, adnotacji oraz zdeponowaniu genomu w GenBank'u, analizie i opisie klastra kodującego antygen O, opracowaniu i dyskusji wyników, napisaniu i redakcji pracy, korespondencji z redakcją czasopisma (autor korespondencyjny) oraz odpowiedzi na recenzje.

A6 Czerwonka G*, Durlik-Popińska K, Szczerba M, Kwiatkowska M, Drabik M, Kaca W. Phosphocholine decoration of *Proteus mirabilis* O18 LPS induces hydrophobicity of the cell surface and electrokinetic potential, but does not alter the adhesion to solid surfaces. Cell Surface 2022; Jun 15;8:100079.

IF₂₀₂₂: brak - MEiN: 20 (CiteScore: 5,8) (0 cytowań)

Mój udział polegał na stworzeniu koncepcji pracy i określeniu celów badawczych, zaplanowaniu badań, pomiarze hydrofobowości oraz potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórki, pomiarze adhezji oraz agregacji bakterii w obecności przeciwciał antyfosfocholinowych, opracowaniu i dyskusji wyników, napisaniu i redakcji pracy, korespondencji z redakcją czasopisma (autor korespondencyjny) oraz odpowiedzi na recenzje.

*- autor korespondencyjny

Łączny *impact factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **14,551**

Suma punktów MNiSW/MEiN za publikacje zgodnie z rokiem opublikowania: **310 pkt**

Suma cytowań publikacji wg Web of Science™ (kwiecień 2023): **39**

4.1. Wprowadzenie

Występowanie bakterii w środowisku jest bezpośrednio związane z ich możliwościami do adhezji do powierzchni stałych. Zjawisko to dotyczy zarówno powierzchni abiotycznych jak również powierzchni organicznych, takich jak powierzchnia komórki eukariotycznej np. podczas infekcji bakteryjnej. Adhezja bakterii do powierzchni stałej jest pierwszym i kluczowym etapem tworzenia biofilmu bakteryjnego, gdzie komórki planktoniczne (wolnopływające) początkowo przyłączają się do dostępnej powierzchni, następnie dzielą się i wydzielają zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (*Extracellular Polymeric Substances* - EPS), aby na końcu wytworzyć wielowarstwową strukturę biofilmu (Wu i in., 2018). Tworzenie biofilmu jest procesem wieloetapowym, w którym najpierw bakterie ulegają odwracalnej adhezji do powierzchni stałej. Kolejnym etapem jest adhezja nieodwracalna, gdzie bakterie osiadłe na powierzchni zaczynają się dzielić, co prowadzi do wytworzenia mikrokolonii i wydzielania macierzy zewnątrzkomórkowej. EPS zapewnia biofilmowi wiele istotnych funkcji, w tym ochronę przed stresem środowiskowym np.: wysychaniem, działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych, jak również przed stresem mechanicznym (Gloag i in., 2020). Następnym etapem jest tworzenie biofilmu dojrzałego, gdzie komórki bakterii otoczone są macierzą zewnątrzkomórkową i tworzą przestrzenne struktury. Ostatni etap to dyspersja, gdzie pojedyncze komórki, bądź agregaty komórek, odłączają się od biofilmu i zostają przeniesione, zazwyczaj wraz ze strumieniem wody, w którym tworzy się biofilm, do nowego miejsca adhezji (Muhammad i in., 2020). Model ten jednak nie zawsze odzwierciedla zmiany jakie są obserwowane w środowisku i obecnie próbuje się zaproponować nowe modele tworzenia

biofilmu, dokładniej odzwierciedlające ten proces (Sauer i in., 2022). Życie w formie biofilmu jest korzystne dla przetrwania komórek bakteryjnych w trudnych warunkach. Występowanie bakterii w biofilmie może skutkować różnymi niekorzystnymi zjawiskami, m.in. wywoływaniem trudnych do wyleczenia infekcji szpitalnych lub skażenia żywności i produktów żywnościowych w zakładach przetwórczych (Cheng i in., 2019).

Adhezję bakterii do powierzchni można do pewnego stopnia wyjaśnić przez fizykochemiczne interakcje bakterie-powierzchnia. Proces adhezji bakterii do powierzchni został zdefiniowany w klasycznej teorii DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) jako całkowita siła oddziaływania między powierzchnią a komórką bakteryjną, która jest sumą przyciągania sił van der Waalsa oraz interakcji elektrostatycznych (Marshall i in., 1971), gdzie potencjał elektrokinetyczny różny od zera pomiędzy rozważanymi powierzchniami będzie powodował odpychanie się ich od siebie. Teoria ta została później rozszerzona o siły wiązań wodorowych, które mają miejsce na niewielkich dystansach pomiędzy oddziałującymi powierzchniami (eXtended DLVO - XDLVO) (Cheng i in., 2019). Oddziaływanie sił van der Waalsa jest istotne w bliskiej odległości od powierzchni i szybko maleje wraz ze zwiększającą się odległością, podczas gdy siły elektrostatyczne stają się dominującymi siłami oddziałującymi w dalszych odległościach od powierzchni komórki (Hori i Matsumoto, 2010). Ocenia się, że stabilność roztworu koloidowego jest uzależniona od zrównoważenia się tych sił (Moore i in., 2015). Komórki bakterii w roztworach wodnych w fizjologicznym dla nich zakresie pH posiadają zazwyczaj negatywny ładunek elektrokinetyczny (Ayala-Torres i in., 2014). Powoduje to powstawanie energii elektrostatycznej działającej odpychająco na obie powierzchnie, która wzrasta wraz ze wzrostem siły jonowej otaczającego roztworu wodnego (van Loosdrecht i in., 1989). Potencjał elektrokinetyczny powierzchni bakterii Gram-dodatnich jest głównie wynikiem obecności grup fosforylowych i karboksylowych zlokalizowanych w kwasie teichojowym i teichuronowym. U bakterii Gram-ujemnych potencjał elektrokinetyczny jest modyfikowany głównie przez obecność komponentów lipopolisacharydu (Cieśla i in., 2011).

W procesie adhezji bierze udział wiele czynników strukturalnych występujących na powierzchni komórki bakterii, a głównymi z nich są egzopolisacharydy oraz białka zakotwiczone w ścianie komórkowej, które wystają z powierzchni komórki i tworzą połączenia pomiędzy komórkami bakterii a podłożem stałym. Choć to egzopolisacharydy są istotne w wytworzeniu dojrzałego biofilmu bakteryjnego, to elementy strukturalne na powierzchni komórki często są kluczowe aby zainicjować interakcje pomiędzy komórkami a podłożem stałym. Ocenia się, że obok fimbrii, adhezyn oraz polisacharydów, to lipopolisacharyd (LPS)

jest głównym polimerem powierzchni komórki Gram-ujemnej biorącym udział w adhezji (Hori i Matsumoto, 2010). LPS jako istotny składnik bakteryjnej błony zewnętrznej odgrywa ważną rolę w inicjowaniu adhezji do powierzchni. Wskazują na to prace nad mutantami *Pseudomonas fluorescens*, gdzie utrata jednego z typów LPS zmniejszyła zdolność komórki do wchodzenia w interakcje z powierzchniami hydrofilowymi (Davey i Toole, 2000). Badania nad oddziaływaniem LPS z powierzchnią abiotyczną doprowadziły do obserwacji, że LPS może związać komórki bakterii z powierzchnią stałą dzięki wytworzeniu wiązań wodorowych, a oddziaływania te mają miejsce na dystansie około 20 nm od powierzchni do której przytwierdzana jest komórka bakterii (Hori i Matsumoto, 2010). Lipopolisacharyd jako najbardziej zewnętrzna część powierzchni komórki bakteryjnej jest kluczowym czynnikiem wirulencji, który wpływa na wrodzoną i nabytą odpowiedź gospodarza na infekcje (Abdel-Rhman 2019), a także ma bezpośredni wpływ na adhezję i tworzenie biofilmu, poprzez modulację hydrofobowości powierzchni komórki, autoagregacji, adhezji oraz tworzenia biofilmu przez bakterie (Nakao i in., 2012). Badania wskazują na stymulujący efekt oddziaływania wyizolowanego lipopolisacharydu *P. aeruginosa* na adhezję i tworzenie biofilmu, ekspresję fimbrii typu 1 oraz oporność na surowicę zarówno u *E. coli*, jak i *K. pneumoniae* (Abdel-Rhman, 2019). Obserwacje te wskazują na zaangażowanie LPSu w procesach adhezji i tworzenia biofilmu. Jednym z istotnych elementów określających powierzchnię komórek bakteryjnych są jej parametry fizykochemiczne, które w sposób holistyczny, z uwzględnieniem wszystkich składników polimerowych budujących ścianę komórkową bakterii (białek, polisacharydów i lipidów) opisują ogólny charakter powierzchni komórki. Określenie końcowego efektu obecności i modyfikacji polimerów budujących ściany komórkowe bakterii Gram-ujemnych i ich wpływ na proces adhezji i tworzenia biofilmu jest przedmiotem prezentowanego opracowania. Jako model badawczy wykorzystano szczepy *Proteus mirabilis* o zdefiniowanych strukturach lipopolisacharydów a także szczepy *E. coli* K-12 oraz *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Pracę nad biofilmem bakteryjnym rozpocząłem podczas badań prowadzonych w ramach mojej rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ aktywności ureolitycznej na biofilmy szczepów *Proteus mirabilis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*” gdzie biofilm stanowił kluczowy element pracy. Jednym z efektów tej pracy był artykuł opublikowany w 2014 roku pt. „*Morphological changes in Proteus mirabilis O18 biofilm under the influence of a urease inhibitor and a homoserine lactone derivative*”, w którym przedstawiłem najważniejsze wyniki uzyskane podczas prowadzonych badań. W trakcie realizacji prac udowodniłem, że biofilm *Proteus mirabilis* O18 stanowi nieprzenikalną barierę dla inhibitora ureazy jakim jest kwas

acetohydroksamowy (AHA), jednak równocześnie biofilm nie hamuje dyfuzji mocznika. Sugeruje to, że głębsze regiony biofilmu są chronione przed działaniem inhibitora ureazy, podczas gdy komórki bakteryjne nadal mogą mieć dostęp do mocznika. Wynik ten podważa zasadność stosowania AHA jak inhibitora ureazy w warunkach tworzenia biofilmu bakteryjnego. Dalsze badania nad biofilmem *P. mirabilis* O18 pokazały, że macierz biofilmu składa się nie tylko polimerów polisacharydowych, ale także kwasów nukleinowych. Zahamowanie aktywności ureolitycznej ujawniło również obecność długich komórek (charakterystycznych dla ruchu rozpełzłego), których rola w biofilmie jest wciąż niejasna. Dane literaturowe wskazują, że pojawienie się komórek długich na powierzchni biofilmu może być wywołane kontaktem komórek z powierzchnią stałą (Jones i in., 2007). Badania te dotyczyły dojrzałego biofilmu, a pytanie o adhezję i formowanie biofilmu na wczesnych etapach pozostawało otwarte.

4.2. Cel badań

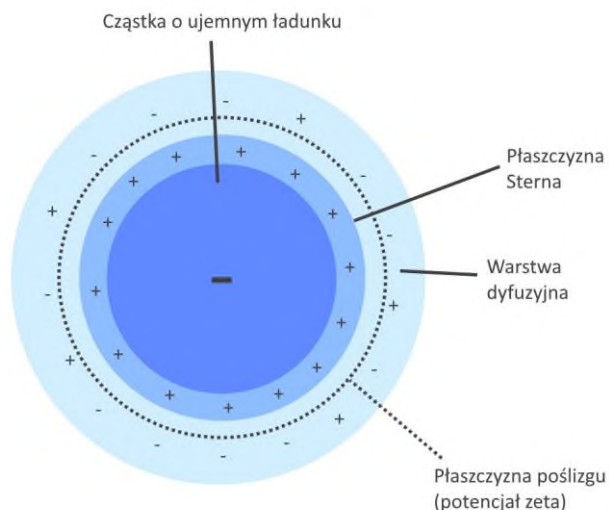
Celem prezentowanego opracowania jest ocena parametrów fizycznych powierzchni Gram-ujemnej komórki bakteryjnej w procesach adhezji do powierzchni stałej oraz tworzenia biofilmu.

Cele szczegółowe:

1. Charakterystyka procesu adhezji i tworzenia biofilmu przez szczepy *Proteus mirabilis* z uwzględnieniem ich przynależności do serogrup, poprzez ocenę hydrofobowości oraz potencjału elektrokinetycznego powierzchni ich komórek.
2. Wykorzystanie potencjału elektrokinetycznego do oceny zmian w adhezji i agregacji komórek bakterii *Escherichia coli* w odpowiedzi na stres wywołany adaptacją do wysokich stężeń czwartorzędowych amoniowych cieczy jonowych.
3. Wykorzystanie pomiarów potencjału elektrokinetycznego oraz hydrofobowości powierzchni komórki do wyjaśnienia zjawiska inhibicji procesu tworzenia biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* przez kompleks rutenu(IV).
4. Ocena z wykorzystaniem pomiaru hydrofobowości oraz potencjału elektrokinetycznego efektu zmian powierzchni komórki wywołanych dekoracją fosfocholiną lipopolisacharydu i jej znaczenia w adhezji i tworzeniu biofilmu *Proteus mirabilis* O18.

4.3. Opis osiągnięcia naukowego

Jednym z podstawowych parametrów powierzchni komórki bakterii, decydującym o jej przyłączeniu się do powierzchni stałej, co w konsekwencji doprowadzi do rozwoju biofilmu, jest hydrofobowość. Do pomiaru tego parametru wykorzystałem metodę pomiaru hydrofobowości powierzchni komórki MATH/BATH (*Microbial Adhesion To Hydrocarbons/Bacterial Adherence To Hydrocarbons*). Metoda opracowana pierwotnie przez profesora Mela Rosenberga (Rosenberg, 2006) dawała możliwość oceny stopnia hydrofobowości powierzchni komórki bakteryjnej dzięki zjawisku migracji bakterii z roztworu wodnego (bufor PUM) do roztworu organicznego (*p*-ksylen), gdzie zmniejszająca się liczba komórek bakteryjnych w roztworze wodnym, była wprost proporcjonalna do wzrastającego stopnia hydrofobowości powierzchni komórki bakterii. Pomiar ten pozwalał wykryć różnice hydrofobowości powierzchni komórki występujące pomiędzy badanymi szczepami bakterii. Dodatkowym parametrem, którego zmiana w mojej ocenie mogła znacząco modyfikować adhezję komórek bakterii do powierzchni stałych był potencjał elektrokinetyczny powierzchni bakterii (tzw. potencjał zeta). Potencjał zeta to sumaryczna wartość ładunku jaki znajduje się w warstwie podwójnej przy powierzchni cząstek (w tym przypadku bakterii) zdyspergowanych w roztworze wodnym (Rycina 1).



Ryc. 1. Rozmieszczenie ładunków elektrycznych na powierzchni cząstki (bakterii) w roztworze wodnym (opracowanie własne na podstawie materiałów firmy A.P. Instruments.).

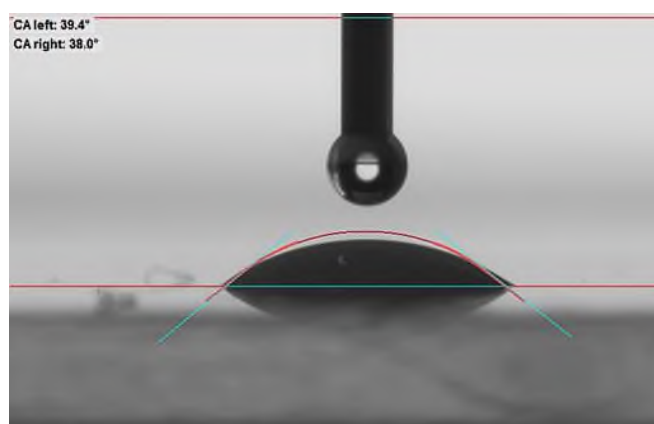
Potencjał zeta układu, w którym cząstki stałe zwieszono są w cieczy jest jedną z miar jego stabilności. Wartość potencjału zeta zależy od ładunku powierzchniowego cząstek, stężenia jonów obecnych w roztworze oraz od ich rodzaju. Cząstki o tym samym znaku naładowania będą się odpychać elektrostatycznie. Potencjał elektrokinetyczny wyznacza się mierząc szybkość migracji cząstek przy użyciu techniki dopplerowskiej elektroforezy laserowej, a następnie w powiązaniu z analizą fazową światła rozpraszanego ocenia się właściwy potencjał zeta (Cieśla i in., 2011; Ayala-Torres i in., 2014). Potencjał elektrokinetyczny opisuje uśredniony ładunek elektryczny podwójnej warstwy elektrycznej wokół analizowanej cząstki (Rycina 1). Aby wykonać pomiar potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórki nawiązałem współpracę z dr Magdaleną Dańczuk z Wydziału Inżynierii Środowiska, Geomatyki i Energetyki Politechniki Świętokrzyskiej w Kielcach. Pomiar potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórki pozwolił mi na ocenę i porównanie wartości tego parametru pomiędzy badanymi szczepami bakterii. Uzupełniając powyższe metody opanowanymi wcześniej metodami pomiaru i wizualizacji biofilmu i adhezji bakterii z wykorzystaniem mikroskopii epi-fluorescencyjnej uzyskałem wyniki, które opublikowałem w artykule „*The role of Proteus mirabilis cell wall features in biofilm formation*” (A1). Analizując uzyskane dane można dojść do wniosku, że większe ilości biofilmu były utworzone przez szczepy o bardziej ujemnych wartościach potencjału zeta, np. szczep PrK 61/57 (serogrupa O17), który wykazywał najniższe średnie wartości potencjału elektrokinetycznego (-18,2 mV), tworzył największe ilości biofilmu wyrażone jako absorbancja fioletu krystalicznego zaadsorbowanego przez komórki przytwierdzone do podłoża stałego. Odwrotne zjawisko natomiast wykazywał szczep S1959 (serogrupa O3), którego wartość potencjału zeta wynosiła -9,8 mV. Co ciekawe, badania adhezji do powierzchni stałej pokazują, że potencjał elektrokinetyczny wydaje się nie mieć wpływu na adhezję do hydrofobowej lub hydrofilowej powierzchni. Uzyskane dane pozwoliły scharakteryzować badane szczepy pod kątem parametrów powierzchni komórki a ich zdolnością do adhezji i tworzenia biofilmu. Porównanie wszystkich zebranych danych, uwidacznia korelację między potencjałem zeta a hydrofobowością powierzchni komórki oraz tempem wzrostu, gdzie tempo namnażania się komórek jest szybsze dla komórek o bardziej ujemnie naładowanej powierzchni komórki. Powyższe badania mają charakter opisowy, a pokazane korelacje nie dają jednoznacznych odpowiedzi na postawione pytania. Ze względu na charakter uzyskanych danych, pracę opublikowano w czasopiśmie mikrobiologicznym (*Archives of Microbiology*) skupującym artykuły z różnych dziedzin szeroko pojętej mikrobiologii.

Opanowanie technik badania powierzchni komórki pozwoliło na przeprowadzenie kolejnych badań, które miały odpowiedzieć na pytanie o zjawisko adaptacji *Escherichia coli* do wysokich stężeń czwartorzędowych amoniowych cieczy jonowych. Ciecze jonowe to związki chemiczne o budowie jonowej, które charakteryzują się temperaturą topnienia poniżej 100°C oraz wpisują się w postulaty tzw. zielonej chemii. Zastosowanie tych związków umożliwia redukcję lub eliminację wykorzystywania i wytwarzania substancji niebezpiecznych dla środowiska (Pernak i in., 2016). Właściami cieczy jonowych można sterować przez zmianę długości łańcuchów w kationach oraz poprzez zmianę rodzaju anionu. Opracowywanie nowych związków chemicznych o potencjalnych własnościach przemysłowych prowadzi do pytania o ich oddziaływanie na środowisko, w tym na mikroorganizmy. Aby przybliżyć ten problem postanowiono sprawdzić oddziaływanie cieczy jonowych na komórki bakteryjne. Dane literaturowe oraz same własności badanych cieczy jonowych wskazywały na możliwe oddziaływanie ze ścianą komórkową bakterii. Zdecydowano się na wykorzystanie panelu bakterii z gatunku *E. coli* ze zdefiniowanymi, zróżnicowanymi strukturami ściany komórkowej. W trakcie prowadzonych prac zauważono zjawisko adaptacji bakterii do rosnących stężeń cieczy jonowych. Badania te przedstawiono w artykule „*Adaptation of bacteria Escherichia coli in presence of quaternary ammonium ionic liquids*” (A2). Aby zbadać tę zależność posłużono się szczepem *E. coli* K-12. Potencjał elektrokinetyczny komórek bakteryjnych inkubowanych w cieczach jonowych oznaczono z wykorzystaniem metody oceny szybkości migracji cząstek przy użyciu techniki dopplerowskiej elektroforezy laserowej (Delgado i in., 2007). Teofilina – prekursor do syntez cieczy jonowych, występuje naturalnie w roślinach i może wykazywać właściwości antybakteryjne. Otrzymane czwartorzędowe teofiliniany alkiloamoniowe (TIL) charakteryzowały się różną toksycznością względem badanego szczepu w zależności od długości ich łańcuchów alkilowych. Przeprowadzono adaptację bakterii do rosnących, pierwotnie toksycznych stężeń badanych związków, a po adaptacji poddano ocenie zmiany w morfologii komórek, składu lipidów i białek, a także wrażliwość na antybiotyki. Badane ciecze jonowe modyfikowały potencjał elektrokinetyczny komórek bakterii w zależności od długości łańcucha alkilowego. Ciecze jonowe o łańcuchach alkilowych zawierających 8 atomów węgla wpływały na potencjał zeta w sposób nieznaczny, podczas gdy ciecze zawierające 10 i 12 atomów węgla wpłynęły na potencjał zeta w sposób istotny, jednak sumaryczny ładunek powierzchniowy pozostawał ujemny. W przypadku cieczy jonowych o łańcuchach alkilowych o długościach 14, 16 i 18 atomów węgla zmiana była istotna i prowadziła do przejścia z ujemnego na dodatni ładunek powierzchni komórki. Efektem adaptacji była zmiana wrażliwości bakterii na antybiotyki, gdzie największe zmiany dotyczyły

antybiotyków odpowiedzialnych za modyfikację przepuszczalności ściany komórkowej - kolistyny i amikacyny. Zwiększona wrażliwość zaadaptowanych bakterii, zwłaszcza na polimyksyny, może odzwierciedlać zmiany właściwości błony w porównaniu do bakterii nie poddanych adaptacji. Ponadto powstanie wielokomórkowych sfer składających się z komórek bakterii w hodowlach zaadaptowanych do wysokich (pierwotnie letalnych) stężeń cieczy jonowych był efektem wywołanym zmianą potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórek, co prowadziło do adhezji komórek i ich agregacji. Efekt tych zmian prawdopodobnie zapewniał ochronę przed toksycznym działaniem badanych cieczy. Dzięki wykonanym pomiarom potencjału zeta powierzchni komórek po adaptacji do wysokich stężeń cieczy jonowych udało się wyjaśnić podłoże obserwowanego zjawiska. Przy zredukowaniu wartości potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórki siły odpychające zanikają a równowaga układu zostaje zaburzona, co może powodować znaczną agregację komórek bakteryjnych. Zjawisko adaptacji może być potencjalnie przydatne w opracowywaniu synergicznych metod oddziaływania z innymi związkami stosowanymi jako bakteriocydy, wśród których najbardziej obiecujące wydają się być antybiotyki, a także nanocząsteczki. Ze względu na środowiskowe oddziaływanie badanych cieczy jonowych zdecydowano się na publikację w czasopiśmie *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Ocena hydrofobowości powierzchni komórki bakterii metodą MATH obarczona jest błędem pomiarowym oraz niską powtarzalnością uzyskiwanych wyników (Saini i Wood, 2022). Stosowane w tej metodzie rozpuszczalniki organiczne mają negatywny wpływ na metabolizm i przeżywalność badanych komórek. Biorąc pod uwagę powyższe ograniczenia postanowiłem zastosować szybszą i bardziej wydajną technikę oceny tego parametru. W tym celu nawiązałem współpracę z Panem Marcinem Drabikiem z Zakładu Astrofizyki Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, który dysponuje dostępem do goniometru, pozwalającego na pomiary kąta zwilżania osadzonej na stałej powierzchni kropli cieczy. Kropla wody posadowiona na powierzchni hydrofobowej przybiera kształt zbliżony do kuli, natomiast posadowiona na powierzchni hydrofilowej rozlewa się po niej. Mierząc kąt wytworzony pomiędzy posadowioną kroplą a powierzchnią, na której się znajduje można ocenić stopień hydrofobowości tej powierzchni. Pewnym utrudnieniem w zastosowaniu goniometru do pomiaru hydrofobowości powierzchni komórki bakterii jest uzyskanie odpowiedniej powierzchni, na której będzie prowadzony pomiar. Założyłem, że pomiar wykonany na powierzchni jednolitej warstwy komórek bakteryjnych będzie odzwierciedleniem uśrednionej dla tej grupy komórek hydrofobowości powierzchni komórki. Dużym

utrudnieniem metodologicznym było zebranie wolnopływających komórek bakteryjnych w jednolitą, szczelną (dla posadowionej kropli) warstwę na nośniku stałym. Wykorzystałem do tego celu szkiełka mikroskopowe, które dawały powierzchnię o wystarczającej gładkości i jakości do pomiarów goniometrycznych oraz opracowałem dwie techniki osadzania bakterii na płaskiej powierzchni z zastosowaniem: 1) wirowania komórek z osadzeniem ich na powierzchni szkła lub 2) ewaporacji cieczy z zawiesiny komórek bakteryjnych, tak aby zagęszczające się w trakcie odparowywania wody bakterie osadziły się na powierzchni tworząc jednolitą warstwę. Stopień pokrycia powierzchni przez warstwę bakterii sprawdzałem za pomocą barwienia prostego z wykorzystaniem fioletu krystalicznego lub safraniny. Przeżywalność bakterii oceniałem wykorzystując barwienie przyżyciowe oraz mikroskopię epi-fluorescencyjną. Oba podejścia doprowadziły do uzyskania warstw bakterii o odpowiedniej jakości, co w obu przypadkach umożliwiało wykonywanie pomiarów hydrofobowości powierzchni komórki w sposób szybki i powtarzalny (Rycina 2).



Rycina 2. Przykładowy wynik pomiaru hydrofobowości powierzchni komórki *Proteus mirabilis* O18 z wykorzystaniem goniometru OCA 15EC (DataPhysics Instruments) – zdjęcie własne.

Optymalizacja metody pomiaru hydrofobowości powierzchni komórki pozwoliła na zbadanie i częściowe wyjaśnienie zjawiska inhibicji tworzenia biofilmu przez badany kompleks rutenu na +IV stopniu utlenienia z benzimidazolem. Uzyskane wyniki przedstawiono w pracy pt. ***“A benzimidazole-based ruthenium(IV) complex inhibits Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by interacting with siderophores and the cell envelope, and inducing oxidative stress”*** (A3). W pracy tej, wykazano, że chlorkowy kompleks rutenu(IV) może wchodzić w interakcje z powierzchnią bakterii *P. aeruginosa* wpływając na proces tworzenia się biofilmu. Do badań wybrano szczep PAO1, który jest często wykorzystywany jako wzorcowy szczep do badań nad biofilmem bakteryjnym. W trakcie badań postanowiłem

udowodnić, że ekspozycja bakterii, podczas inkubacji w roztworze zawierającym badany kompleks, prowadzi do inhibicji tworzenia się biofilmu oraz akumulacji rutenu wewnątrz komórki. Wyniki pomiarów hydrofobowości wykazały, że inkubacja komórek planktonicznych z kompleksem rutenu(IV) znacząco podnosi hydrofobowość powierzchni komórki. Zasugerowało to, że kompleks nie wnika do wnętrza komórki i oddziałuje z materiałem genetycznym, tak jak wcześniej zakładano, ale akumuluje się w ścianie komórkowej bakterii i modyfikuje jej właściwości. W następnym etapie wykonane zostały zdjęcia z mikroskopii SEM (*Scanning Electron Microscopy*) oraz zostały nałożone na nie wyniki pomiarów jonów Ru dzięki metodzie mapowania pierwiastków EDS (*Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*). Wyniki pokazały, że ruten akumuluje się w obrębie ściany komórkowej bakterii. Obserwacje te udowodniły, że to właśnie zmiany w powierzchni komórki mogą być odpowiedzialne, za zaburzenie procesu adhezji i w efekcie inhibicji tworzenia biofilmu. Eksperymenty wykazały ponadto silne wiązanie kompleksu rutenu zarówno do DNA plazmidowego jak i surowiczej albuminy bydlęcej (BSA). Pokazano również, że badany związek wpływa znacząco na produkcję sideroforów, co może wskazywać na tę drogę transportu kompleksu do struktur ściany komórkowej bakterii. Kompleksy rutenu naśladują kompleksy żelaza naturalnie występujące w środowisku i mogą wiązać się z sideroforami wydzielanymi do środowiska przez bakterie (Laurent i in., 2018). Uzyskane wyniki wskazują, że kompleks Ru może generować stres oksydacyjny podczas odpowiedzi na toksyczne działanie badanego kompleksu, co zostało potwierdzone podniesionym poziomem ekspresji katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej. Dodatkowo kompleks rutenu prawdopodobnie indukuje uszkodzenia DNA komórkach bakterii. Co ciekawe efekt ten widoczny jest jedynie w bakteriach z wyłączonym systemem naprawczym opartym na białku RecA (*E. coli* szczep DH5 α). Tak więc wydaje się, że uszkodzenia DNA generowane przez ten związek w zakresie badanych stężeń dla *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 jeśli występują, to prawdopodobnie nie można ich uznać za letalne. Kompleks rutenu wykazywał właściwości bakteriostatyczne oraz hamował proces tworzenia biofilmu przez *P. aeruginosa*. Biorąc pod uwagę silną oporność tej bakterii na różne rodzaje związków antybakteryjnych, wyniki te mogą dostarczyć informacji dla rozwoju terapii lub procedur antybakteryjnych w przyszłości. Ze względu na to, że uzyskane wyniki dotyczyły inhibicji biofilmu bakteryjnego pracę opublikowano w czasopiśmie *Biofouling*.

Parametry fizykochemiczne powierzchni komórki bakterii są determinowane komponentami wchodzącymi w skład ściany komórkowej. U bakterii Gram-ujemnych

głównym polimerem kontaktującym się ze środowiskiem zewnętrznym jest lipopolisacharyd. Wysoka heterogenność LPSu w obrębie gatunku powoduje, że również parametry powierzchni komórki mogą różnić się znacząco pomiędzy szczepami, a zmienność antygeny O zapewnia bakteriom możliwość modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza podczas infekcji. Unikalną cechą serogrupy O18 *Proteus mirabilis* jest obecność antygeny O zawierającego fosfocholinę (ChoP) w LPS. Dekoracja fosfocholiną jest ważną modyfikacją struktur powierzchniowych wielu bakterii. Obecność ChoP na powierzchni bakterii jest związana z jej patogennością i wykazano, że dekoracja ChoP odgrywa ważną rolę w adhezji bakterii do powierzchni błony śluzowej i oporności na peptydy przeciwdrobnoustrojowe (Clark i Weiser, 2013). Aby ocenić reaktywność LPS pochodzącego ze szczepu PrK 34/57 (O18) (Fudala i in., 2003) z przeciwciałami niezbędna jest izolacja LPS z komórek bakteryjnych. Postanowiono przeprowadzić i przedstawić metodę ekstrakcji LPS oraz sposoby oceny LPS za pomocą technik serologicznych oraz spektroskopii w podczerwieni (FT-IR). Klasyczna metoda ekstrakcji opiera się na procedurze zaproponowanej przez Westphala (Westphal i Jann, 1965) i dotyczy ekstrakcji hydrofilowej, gładkiej postaci LPS, pobieranej z fazy wodnej mieszaniny fenolowo-wodnej. Ze względu na złożone procedury ekstrakcji i oczyszczania próbek LPS, potrzebne są metody weryfikacji powtarzalności, czystości i jakości uzyskanych próbek. W pracy przeprowadziłem procedurę hodowli bakterii, izolacji i oczyszczania próbek lipopolisacharydu *Proteus mirabilis* O18 (PrK 34/57). Ponadto do oceny uzyskanych próbek wykorzystano metody elektroforezy SDS-PAGE, immunoblottingu, ELISA oraz widma w podczerwieni (FT-IR). Najważniejsze etapy ekstrakcji i walidacji metody opisano w procedurze pt. „*Characterization of Proteus mirabilis Lipopolysaccharide Samples by Infrared Spectroscopy and Serological Methods*” (A4) stanowiącej rozdział książki pt.: „*Proteus mirabilis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*”, gdzie edytorem była Prof. Melanie M. Pearson z University of Michigan Medical School. Kontynuując badania dotyczące dekoracji fosfocholiną lipopolisacharydu *Proteus mirabilis* serogrupy O18 postanowiłem zsekwencjonować i zanalizować genom tego szczepu pod kątem występowania w nim transferaz odpowiedzialnych za mechanizm dekoracji. Poprzednie badania prowadzone w celu opisu klastrów genetycznych odpowiedzialnych za biosyntezę antygeny O w *Proteus mirabilis* doprowadziły do wyodrębnienia takiego klastra i wskazania genów w nim zawartych dla 55 serogrup *Proteus* spp. (Yu i in., 2017). Opisana serogrupa O18 posiadała niekompletną informację na temat budowy klastra genów zaangażowanych w biosyntezę antygeny O18. Dzięki zaangażowaniu metod bioinformatycznych poddano asemblacji *de novo* analizowany genom oraz przypisano funkcję rozpoznany genom. Podczas prac nad tym genomem udało

mi się przyporządkować funkcje genom odpowiedzialnym za transport choliny i dekorację LPSu. Dzięki porównaniom z istniejącymi w bazie NCBI sekwencjami, przypisałem funkcję trzem genom zaangażowanych w transport choliny (*licB* – permeaza choliny), fosforylację (*licA* – kinaza choliny) oraz przyłączanie fosfocholiny do reszty cukrowej (*licD* – transferaza fosfocholiny). Funkcję dla kolejnego genu, zaangażowanego w ten proces (*licC* – cytydylotransferaza fosfocholiny) udało się ustalić poprzez modelowanie struktury białek z wykorzystaniem narzędzia Phyre2 (Kelley i in., 2015). Dzięki temu przypisano funkcję do wszystkich genów (*licABCD*) zaangażowanych w proces dekoracji LPS O18 fosfocholiną i przedstawiono organizację klastra genów biosyntezy antygeny O18 *P. mirabilis*. W klastrze antygeny O18 *P. mirabilis* sekwencje genów *licABC* nakładają się na siebie, co sugeruje, że są zorganizowane w oddzielnie regulowany region, który odpowiada za pobranie i fosforylację choliny oraz modyfikację do CDP-fosfocholiny. Co ciekawe, gen transferazy *licD* nakłada się na sekwencję flipazy *wzx*, co sugeruje, że oba geny mogą być kotranskrybowane, a ekspresja LicD może być zależna od ekspresji Wzx i być regulowana wspólnymi czynnikami. Pokazuje to, że przyłączanie fosfocholiny do powstającej powtarzającej się jednostki antygeny O18 u *P. mirabilis* jest prawdopodobnie regulowane przez dwa niezależne czynniki regulacyjne, wpływające na regiony *licABC* i *wzx/licD*. Transport choliny do wnętrza komórki może odbywać się jeszcze jednym szlakiem, związanym z syntezą kompleksu glicyny-betainy, który chroni komórki przed zmianami ciśnienia osmotycznego. Wychwyt choliny realizowany jest przez białko o wysokim powinowactwie do choliny - BetT (Deole i Hoff, 2020), które to również jest obecne w genomie *Proteus mirabilis* O18. Pozyskiwanie choliny poprzez enzymatyczne uwalnianie jej z czynnika aktywacji płytek krwi (PAF – *platelet activating factor*) jest prawdopodobnie realizowane przez esterazę GlpQ, której sekwencja nukleotydowa jest obecna w genomie badanej bakterii. Uzyskane dane przedstawiono w artykule pt.: **“Draft Genome of *Proteus mirabilis* Serogroup O18 Elaborating Phosphocholine-Decorated O Antigen” (A5)**. Artykuł ten został włączony do serii artykułów zebranych pod tytułem „*The Biofilm Lifestyle of Uropathogens*” w czasopiśmie *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Sekwencjonowanie genomu zostało sfinansowane w ramach projektu NCN Miniatura „Znaczenie zróżnicowania genetycznego klastrów genów *ids* i *idr* w terytorializmie i zdolności do konkurencji wewnątrzgatunkowej *Proteus mirabilis*” (2017/01/X/NZ6/01141), którego byłem kierownikiem.

Analiza genomu i wskazanie potencjalnego mechanizmu dekoracji fosfocholiną antygeny O doprowadziły do pytania w jaki sposób dekoracja fosfocholiną wpływa na adhezję i tworzenie

biofilmu przez badany szczep i czy dekoracja fosfocholiny antygeny O oprócz znaczenia immunologicznego będzie miała wpływ na interakcje jakie zachodzą pomiędzy powierzchnią komórki a podłożem. Ze względu na to, że cholina nie jest syntetyzowana *de novo* wewnątrz komórki bakteryjnej tylko musi być pobrana ze środowiska, postanowiłem wykorzystać ten fakt i uzyskać komórki pozbawione dekoracji za pomocą metod hodowlanych. Niezbędnym było przygotowanie chemicznie zdefiniowanego podłoża hodowlanego. Zdecydowałem się na wykorzystanie zmodyfikowanego podłoża PMSM (*Proteus Minimal Salt Medium*) (Armbruster i in., 2013), które zapewnia większą gęstość hodowli niż inne powszechnie stosowane podłoża mineralne (np. sztuczny moczek) oraz hodowlę w bioreaktorze (Biostat A, Sartorius). Dzięki temu uzyskałem wystarczającą do dalszych testów ilość biomasy bakteryjnej. Obecność lub brak fosfocholiny na powierzchni bakterii wykrywano za pomocą przeciwciał antyfosfocholinowych TEPC-15, a najważniejsze obserwacje zebrano w artykule pt. **„Phosphocholine decoration of *Proteus mirabilis* O18 LPS induces hydrophobicity of the cell surface and electrokinetic potential, but does not alter the adhesion to solid surfaces” (A6)**. Obecność choliny w podłożu minimalnym powodowała agregację komórek bakterii po zastosowaniu monoklonalnych przeciwciał antyfosfocholinowych, co sugeruje, że na powierzchni komórki bakterii pojawił się epitop fosfocholiny. Ponadto obecność choliny w podłożu hodowlanym spowodowała wzrost hydrofobowości powierzchni komórki o średnio 12,88°, wyrażonej jako kąt zwilżania kropli wody posadowionej na warstwie bakterii. Potencjał elektrokinetyczny uległ natomiast zmniejszeniu średnio o 2,8 mV. Co ciekawe parametry te nie wpłynęły w sposób znaczący na adhezję bakterii do powierzchni stałych. Ponadto wykorzystując test ELISA i przeciwciała antyfosfocholinowe TEPC-15 udało się wykryć epitop fosfocholiny na powierzchni biofilmu bakteryjnego. Wskazuje to na możliwy udział reszt cukrowych antygeny O w tworzeniu macierzy biofilmu, tak jak to sugerowała Linda M. Beynon (Beynon i in., 1992) w artykule pt. *„Capsule structure of *Proteus mirabilis* (ATCC 49565)”*. Dane literaturowe wskazują, że zmiana ładunku powierzchniowego komórki i jej hydrofobowości wpływa na mikrośrodowisko komórki bakteryjnej, co zmienia bioaktywność związków (np. przeciwciał) na granicy faz ciało stałe-ciecz, a w konsekwencji zmienia kinetykę oddziaływań pomiędzy związkami bioaktywnymi i jego celem na powierzchni komórki (np. receptor powierzchniowy) (Kolská i in., 2013). Co więcej, zwiększona hydrofobowość powierzchni bakterii umożliwia drobnoustrojom adhezję do powierzchni stałych, komórek gospodarza lub hydrofobowych materiałów (Krasowska i Sigler, 2014) oraz łączenie się komórek ze sobą (agregację). Zebrane wyniki opisują parametry powierzchni komórki pod

wpływem dekoracji LPS fosfocholiną i opublikowano je w czasopiśmie *The Cell Surface*, które publikuje artykuły skupiające się na analizie powierzchni komórek.

4.4. Podsumowanie

1. Adhezja i tworzenie się biofilmu przez *Proteus mirabilis* jest cechą szczepowo swoistą, gdzie tworzenie biofilmu było pozytywnie skorelowane z ujemnym potencjałem elektrokinetycznym komórki.
2. Zmiana ładunku powierzchniowego pod wpływem inkorporacji cieczy jonowych do ściany komórkowej *E. coli* prowadzi do agregacji komórki. Zjawisko to jednak prawdopodobnie nie jest strategią przetrwania, ale efektem ubocznym zmiany ładunku powierzchniowego. Modyfikacja ładunku powierzchniowego oprócz agregacji prowadzi do zwiększenia wrażliwości komórek na antybiotyki, przede wszystkim oddziałujących na błonę zewnętrzną bakterii.
3. Oddziaływania chlorkowego kompleksu rutenu(IV) z komórkami *P. aeruginosa* prowadzi do inhibicji procesu tworzenia biofilmu. Ocena hydrofobowości powierzchni komórki bakterii pod wpływem badanego kompleksu wskazała, że to ściana komórkowa bakterii jest prawdopodobnym miejscem interakcji kompleksu z bakterią. Wykorzystanie techniki mikroskopii skaningowej wraz mapowaniem pierwiastków (EDS) potwierdziły tę obserwację.
4. Dekoracja fosfocholiną lipopolisacharydu serogrupy O18 *Proteus mirabilis* jest unikalną modyfikacją LPS dla tego gatunku. Izolacja LPS metodą fenolowo-wodną oraz oczyszczanie LPS z wykorzystaniem enzymów nukleolitycznych pozwoliły na badanie LPS metodami immunoenzymatycznymi oraz spektroskopowymi. Dekoracja LPS fosfocholiną realizowana jest przez kinazy, permeazy i transferazy kodowane przez geny *licABCD* zorganizowane w klaster biosyntezy antygeny O. Przyłączanie fosfocholiny do LPS powoduje zwiększenie hydrofobowości powierzchni komórki oraz moduluje jej potencjał elektrokinetyczny, co może przekładać się na zmienione interakcje receptor-przeciwciało, jednak nie wpływa w sposób znaczący na adhezję bakterii do powierzchni stałych. Ponadto potwierdzono obecność fosfocholiny w biofilmie *Proteus mirabilis* O18, co wskazuje na rolę lipopolisacharydu szczepu PrK 34/57 (O18) w tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej oraz biofilmu.

4.5. Literatura

- Abdel-Rhman, S. H. (2019). Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides in modulation of biofilm and virulence factors of Enterobacteriaceae. *Annals of Microbiology*, 69(3), 299–305. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1420-5>
- Armbruster, C. E., Hodges, S. a., & Mobley, H. L. T. (2013). Initiation of swarming motility by *Proteus mirabilis* occurs in response to specific cues present in urine and requires excess L-glutamine. *Journal of Bacteriology*, 195(6), 1305–1319. <https://doi.org/10.1128/JB.02136-12>
- Ayala-Torres, C., Hernández, N., Galeano, A., Novoa-Aponte, L., & Soto, C. Y. (2014). Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1189–1195. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0758-y>
- Beynon, L. M., Dumanski, A. J., McLean, R. J. C., MacLean, L. L., Richards, J. C., & Perry, M. B. (1992). Capsule structure of *Proteus mirabilis* (ATCC 49565). *Journal of Bacteriology*, 174(7), 2172–2177. <https://doi.org/10.1128/jb.174.7.2172-2177.1992>
- Cheng, Y., Feng, G., & Moraru, C. I. (2019). Micro- and Nanotopography Sensitive Bacterial Attachment Mechanisms: A Review. *Front Microbiol.* 21;10:191. doi: 10.3389/fmicb.2019.00191.
- Cieśla, J., Bieganowski, A., Janczarek, M., & Urbanik-Sypniewska, T. (2011). Determination of the electrokinetic potential of *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii Rt24.2 using Laser Doppler Velocimetry - A methodological study. *Journal of Microbiological Methods*, 85(3), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.004>
- Clark, S. E., & Weiser, J. N. (2013). Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infection and Immunity*, 81(2), 392–401. <https://doi.org/10.1128/IAI.01168-12>
- Davey, M. E., & Toole, G. A. O. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4):847-67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000. 64(4), 847–867.
- Delgado, A. V., González-Caballero, F., Hunter, R. J., Koopal, L. K., & Lyklema, J. (2007). Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science*, 309(2), 194–224. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.075>
- Deole, R., & Hoff, W. D. (2020). A potassium chloride to glycine betaine osmoprotectant switch in the extreme halophile *Halorhodospira halophila*. *Scientific Reports*, 10(1), 3383. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59231-9>
- Fudala, R., Kondakova, A. N., Bednarska, K., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A., Zähringer, U., & Kaca, W. (2003). Structure and serological characterization of the O-antigen of *Proteus mirabilis* O18 with a phosphocholine-containing oligosaccharide phosphate repeating unit. *Carbohydrate Research*, 338(1), 1835–1842. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00274-X)
- Gloag, E. S., Fabbri, S., Wozniak, D. J., & Stoodley, P. (2020). Biofilm mechanics: Implications in infection and survival. *Biofilm* 19(2)100017. doi: 10.1016/j.biofilm.2019.100017
- Hori, K., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>
- Jones, S. M., Yerly, J., Hu, Y., Ceri, H., & Martinuzzi, R. (2007). Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS Microbiology Letters*, 268(1), 16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00587.x>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kolská, Z., Makajová, Z., Kolářová, K., Slepíčková, N. K., Trostová, S., Rezníčková, A., Siegel, J., & Švorčík, V. (2013). Electrokinetic Potential and Other Surface Properties of Polymer Foils and Their Modifications. *IntechOpen* (Vol. 11, Issue Polymer Science, p. 13)
- Krasowska, A., & Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol.* 19(4)112. doi: 10.3389/fcimb.2014.00112.
- Laurent, Q., Batchelor, L. K., & Dyson, P. J. (2018). Applying a Trojan Horse Strategy to Ruthenium Complexes in the Pursuit of Novel Antibacterial Agents. *Organometallics*, 37(6), 915–923. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.7b00885>

- Marshall, K. C., Stout, R., & Mitchell, R. (1971). Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68(3), 337–348. <https://doi.org/10.1099/00221287-68-3-337>
- Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., & Petri-Fink, A. (2015). Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6287–6305. <https://doi.org/10.1039/c4cs00487f>
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol.* 21(11)928. doi: 10.3389/fmicb.2020.00928.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N., & Uhlin, B. E. (2012). Enhanced Biofilm Formation by Escherichia coli LPS Mutants Defective in Hep Biosynthesis. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051241>
- Pernak, J., Rzemieniecki, T., Materna, K. (2016). O cieczach jonowych „w pigułce”. *Chemik*, 70(9) 471–475.
- Rosenberg, M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*, 262(2), 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x>
- Saini, G., & Wood, B. D. (2022). Investigating the effects of variability of operational parameters on MATH test for bacterial hydrophobicity measurement. *Archives of Microbiology*, 204(12). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03327-5>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 20(10):608-620. doi: 10.1038/s41579-022-00767-0.
- van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. B. (1989). Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microbial Ecology*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF02025589>.
- Westphal, O., & Jann, K. (1965). Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 83–91.
- Wu, S., Zhang, B., Liu, Y., Suo, X., & Li, H. (2018). Influence of surface topography on bacterial adhesion : A review. *Biointerphases*. 27;13(6):060801. doi: 10.1116/1.5054057.
- Yu, X., Torzewska, A., Zhang, X., Yin, Z., Drzewiecka, D., Cao, H., Liu, B., Knirel, Y. A., Rozalski, A., & Wang, L. (2017). Genetic diversity of the O antigens of Proteus species and the development of a suspension array for molecular serotyping. *PLoS ONE*, 12(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183267>.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Pracę naukowo-dydaktyczną rozpocząłem w październiku 2008 roku w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego w Kielcach (obecnie Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach) w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. Wiesława Kacę. Podczas realizacji badań do pracy doktorskiej miałem możliwość wzięcia udziału w stażu naukowym realizowanym w ramach Short-Term Scientific Mission (STSM) w projekcie COST BM1003 “*Microbial cell surface determinants of virulence as targets for new therapeutics in Cystic Fibrosis*”, którego uczestnikiem był promotor mojej pracy doktorskiej Prof. dr hab. Wiesław Kaca. Staż odbyłem w School of Biosciences w

Uniwersytecie Cardiff w 2012 roku, gdzie poznałem i rozwinąłem metodologię pomiaru i oceny ilości i morfologii biofilmu bakteryjnego z wykorzystaniem barwienia przyżyciowego w mikroskopii konfokalnej oraz opracowałem metodykę pomiaru aktywności ureolitycznej bakterii. Jednym z efektów stażu było nawiązanie współpracy w celu scharakteryzowania kolekcji *Pseudomonas aeruginosa*, która miała stanowić reprezentatywny zbiór szczepów, pomocny w badaniach nad rolą tej bakterii podczas infekcji płuc w mukowiscydozie. Najczęściej wykorzystywanymi szczepami w badaniach były szczepy PAO1 oraz PA14, jednak jak pokazywały badania gatunek *Pseudomonas aeruginosa* jest zróżnicowany genetycznie i skupianie uwagi jedynie na wybranych szczepach modelowych uniemożliwiało uzyskanie pełnych odpowiedzi na stawiane pytania. *Pseudomonas aeruginosa* zasiedla różne środowiska i wykazuje wysokie zróżnicowanie zarówno genetyczne jak fizjologiczne. Aby rozwiązać ten problem zebrano międzynarodową kolekcję - panel referencyjny *P. aeruginosa*, pozwalający na konsolidację badań i ujednoczenie uzyskiwanych wyników podczas badań and mechanizmami patogenezы tego gatunku. Panel składał się z 42 szczepów, które zostały wybrane tak, aby reprezentowały różnorodność gatunku *P. aeruginosa* i obejmowały szczepy z szerokiej gamy źródeł zarówno klinicznych jak i środowiskowych. W panelu umieszczono szczepy z różnych regionów geograficznych, w tym zakaźne (epidemiczne) szczepy pochodzące od pacjentów cierpiących na mukowiscydozę. Współpraca z Prof. Eshwarem Mahenthiralingamem (School of Biosciences, Cardiff University) wynikająca m.in. ze stażu STSM zaowocowała przygotowaniem i opisaniem wyników aktywności ureolitycznej szczepów wchodzących w skład zebranego panelu. Uzyskane dane zostały zebrane w postaci manuskryptu: Cullen L, Weiser R, Olszak T, Maldonado RF, Moreira AS, Slachmuylders L, Brackman G, Paunova-Krasteva TS, Zarnowiec P, Czerwonka G, Reilly J, Drevinek P, Kaca W, Melter O, De Soyza A, Perry A, Winstanley C, Stoitsova SR, Lavigne R, Mahenthiralingam E, Sá-Correia I, Coenye T, Drulis-Kawa Z, Augustyniak D, Valvano MA, McClean S. *Phenotypic characterization of an international Pseudomonas aeruginosa reference panel: strains of cystic fibrosis (CF) origin show less in vivo virulence than non-CF strains*. Microbiology (Reading). 2015 Oct;161(10):1961-1977 (A7). Ponadto opracowane w trakcie stażu metody zostały wykorzystane w mojej pracy doktorskiej pt. „Wpływ aktywności ureolitycznej na biofilmy szczepów *Proteus mirabilis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*”.

Realizacja badań do pracy doktorskiej skłoniła mnie do podjęcia starań nad wykorzystaniem mutagenезы ukierunkowanej do wyciszenia ekspresji genu ureazy w badanych szczepach bakteryjnych. W tym celu odbyłem staż realizowany z projektu pn. „PROGRES - Program rozwoju: Gospodarka - Edukacja - Sukces” w 2012 roku w UMCS

w Lublinie, gdzie podjąłem się próby przeprowadzenia mutagenezy *Proteus mirabilis* PrK 34/57 (O18) w celu wyciszenia genu *ureC* kodującego podjednostkę alfa ureazy. Uzyskane wyniki stanowiły fragment mojej pracy doktorskiej pt „*Wpływ aktywności ureolitycznej na biofilmy szczepów Proteus mirabilis oraz Pseudomonas aeruginosa*”.

W trakcie trwania studiów magisterskich w UMCS uczestniczyłem w 3 miesięcznym stażu w Environmental Biotechnology Institute w University of Idaho, USA, gdzie podjąłem się udziału w scharakteryzowaniu nowego szczepu należącego do rodzaju *Aeromicrobium* spp. Moim opiekunem naukowym podczas pobytu w University of Idaho był Profesor Andrzej Paszczyński. Badany przez mnie szczep wykazywał oporność na wysokie stężenia dimetyloformamidu (DMF) oraz zdolność do wykorzystania DMF jako jedyne źródła węgla oraz miał potencjał przemysłowy jako czynnik degradujący skażenia środowiska rozpuszczalnikami organicznymi. Celem realizowanego projektu była identyfikacja głównego chinonu uczestniczącego w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym oraz głównego aminokwasu występującego w peptydoglikanie ściany komórkowej badanej bakterii z wykorzystaniem technik chromatografii gazowej.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Po uzyskaniu stopnia doktora w 2014 roku podjąłem opieki nad realizacją prac dyplomowych. Sprawowałem naukową opiekę nad 9 studentami wykonującymi część eksperymentalną prac magisterskich. Ponadto byłem promotorem 14 prac licencjackich oraz 16 prac magisterskich. Moje zaangażowanie w proces dyplomowania studentów zaowocowało napisaniem 34 recenzji prac dyplomowych. W 2019 roku zostałem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim dr Dawida Gmitera (obrona pracy 27 kwietnia 2022 r.). Moja działalność organizacyjna dotyczyła m.in. założenia i opieki nad Studenckim Kołem Naukowym Biotechnologów „Mikroby” w latach 2012-2019. Wraz ze studentami należącymi do Studenckiego Koła Naukowego Biotechnologów w latach 2014 - 2018 organizowałem warsztaty w ramach Nocy Biologów w Instytucie Biologii UJK, w ramach Nocy Muzeów w Centrum Nauki Leonardo da Vinci w Podzamczu w latach 2017 i 2018 oraz w ramach Europejskich Dni Kreatywnej i Aktywnej Edukacji w 2017 roku w Instytucie Biologii UJK. Dodatkowo w ramach programu POWER: „Uniwersytet Młodych - innowacyjne moduły zajęć wspierające uczniów uzdolnionych w zakresie nauk przyrodniczych i ścisłych” prowadziłem w 2018 roku cykl zajęć dla uczniów zainteresowanych poszerzeniem swojej wiedzy z biologii. W 2021 roku zostałem członkiem Komitetu Okręgowego olimpiady

biologicznej w ramach której sprawowałem opiekę i nadzorowałem przebieg egzaminu w etapie okręgowym w formie *online*. Ponadto byłem organizatorem warsztatów pt. „Spotkania z biologią. Wykłady i warsztaty dla uczniów” w 2022 roku oraz „Spotkania z biologią i chemią. Wykłady i warsztaty dla uczniów” w 2023 roku, w których udział wzięło około 600 uczniów szkół średnich. Moja aktywność organizacyjna oraz dydaktyczna polegała m.in. na uczestnictwie w działalności Wydziałowej Komisji ds. Kształcenia (Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UJK) od 2019 roku, Kierunkowym Zespole ds. Jakości Kształcenia – kierunek Biotechnologia od 2019 roku oraz Kierunkowym Zespole ds. Jakości Kształcenia – Biologia od 2019 roku, gdzie brałem udział w przygotowywaniu programów uczenia na obu kierunkach studiów oraz uczestniczyłem w przygotowaniu raportów samooceny dla komisji akredytacyjnych (PKA). Ponadto angażuję się w pracę Rady Naukowej Instytutu Biologii UJK, jako Członek Rady Naukowej od 2019 roku oraz przewodniczący Komisji Skrutacyjnej od 2020 roku.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej, nieomówione w punktach 4-5

7.1. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora podjąłem się współpracy z zespołem prof. Barbary Barszcz: dr Agnieszką Jabłońską-Wawrzycką oraz dr Partycją Rogalą z Instytutu Chemii UJK. Celem współpracy było określenie aktywności biologicznej kompleksów metali przejściowych z ligandami heteroaromatycznymi. Pierwszym artykułem wskazującym zastosowanie biologiczne kompleksów był artykuł: Jabłońska-Wawrzycka A., Rogala P., Czerwonka G., Hodorowicz M., Stadnicka K. *Zinc(II) complexes with heterocyclic ether, acid and amide. Crystal structure, spectral, thermal and antibacterial activity studies*. J. Mol. Struct. 2016, 1105, 357–369 (**A8**), w którym udało się potwierdzić antybakteryjne własności badanych kompleksów. Następne syntezy miały doprowadzić do uzyskania kompleksów rutenu o potencjalnym zastosowaniu jako związki przeciwnowotworowe, tak jak to miało miejsce w przypadku związków rutenu NAMI-A oraz KP1019/1339. Badania biologiczne wykazały jednak, że kompleksy rutenu z benzimidazolem wykazują własności antybiofilmowe. Bazując na doświadczeniu i metodyce opracowanej na potrzeby pracy "A benzimidazole-based ruthenium(IV) complex inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by interacting with siderophores and the cell envelope, and inducing oxidative stress" (**A3**) opracowano cykl

5 publikacji dotyczący aktywności antybiofilmowej badanych kompleksów rutenu i manganu względem biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*:

- Rogala P, Czerwonka G, Michałkiewicz S, Hodorowicz M, Barszcz B, Jabłońska-Wawrzycka A. *Synthesis, Structural Characterization and Antimicrobial Evaluation of Ruthenium Complexes with Heteroaromatic Carboxylic Acids*. Chem Biodivers. 2019 Nov;16(11):e1900403 (A9)
- Jabłońska-Wawrzycka A, Rogala P, Czerwonka G, Michałkiewicz S, Hodorowicz M, Kowalczyk P. *Ruthenium(IV) Complexes as Potential Inhibitors of Bacterial Biofilm Formation*. Molecules. 2020 Oct 26;25(21):4938 (A10)
- Jabłońska-Wawrzycka A, Rogala P, Czerwonka G, Michałkiewicz S, Hodorowicz M, Gałczyńska K, Cieślak B, Kowalczyk P. *Tuning Anti-Biofilm Activity of Manganese(II) Complexes: Linking Biological Effectiveness of Heteroaromatic Complexes of Alcohol, Aldehyde, Ketone, and Carboxylic Acid with Structural Effects and Redox Activity*. Int J Mol Sci. 2021 May 3;22(9):4847 (A11)
- Jabłońska-Wawrzycka A, Rogala P, Czerwonka G, Gałczyńska K, Drabik M, Dańczuk M. *Ruthenium Complexes with 2-Pyridin-2-yl-1H-benzimidazole as Potential Antimicrobial Agents: Correlation between Chemical Properties and Anti-Biofilm Effects*. Int J Mol Sci. 2021 Sep 18;22(18):10113 (A12)
- Rogala P, Jabłońska-Wawrzycka A, Czerwonka G, Kazimierczuk K, Gałczyńska K, Michałkiewicz S, Kalinowska-Tłuścik J, Karpieł M, Klika KD. *Synthesis, Characterization and Biological Investigations of Half-Sandwich Ruthenium(II) Complexes Containing Benzimidazole Moiety*. Molecules. 2022 Dec 21;28(1):40. doi: 10.3390/molecules28010040. (A13).

Równolegle prowadzone badania nad biofilmem bakteryjnym oraz próby oceny kompozycji macierzy zewnątrzkomórkowej doprowadziły do zaangażowania analizy widm spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR) do wykrycia głównych komponentów wchodzących w skład macierzy biofilmu *Proteus mirabilis*. Porównanie widm pochodzących z komórek planktonicznych oraz z biofilmu wskazało na różnice, które dotyczyły prawdopodobnie kompozycji kwasów tłuszczowych ściany komórkowej bakterii oraz zmian strukturalnych w kwasach nukleinowych. Wyniki te zaprezentowano w artykule: Czerwonka G, Arabski M, Wąsik S, Jabłońska-Wawrzycka A, Rogala P, Kaca W. *Morphological changes in Proteus mirabilis O18 biofilm under the*

influence of a urease inhibitor and a homoserine lactone derivative. Arch. Microbiol. 2014 196(3):169-77 (A14).

Ponadto analiza widm spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) w dalszych pracach okazała się efektywną techniką do różnicowania szczepów bakterii oraz lipopolisacharydów. Efektem tych pracy były artykuły:

- Żarnowiec P, Czerwonka G, Kaca W. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Tool in Analysis of Proteus mirabilis Endotoxins*. Methods. Mol. Biol. 2017 1600:113-124 (A15).
- Lechowicz L, Chrapek M, Czerwonka G, Korzeniowska-Kowal A, Tobiasz A, Urbaniak M, Matuska-Łyzwa J, Kaca W. *Detection of ureolytic activity of bacterial strains isolated from entomopathogenic nematodes using infrared spectroscopy*. J. Basic. Microbiol. 2016 56(8):922-8 (A16).
- Żarnowiec P, Lechowicz Ł, Czerwonka G, Kaca W. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a Tool for the Identification and Differentiation of Pathogenic Bacteria*. Curr. Med. Chem. 2015 22(14):1710-8. (A17).

Wyniki uzyskane podczas badań prowadzonych w ramach artykułu „*Adaptation of bacteria Escherichia coli in presence of quaternary ammonium ionic liquids*” (A2), były kontynuacją współpracy nawiązanej w celu zbadania wpływu cieczy jonowych na układy biologiczne w oparciu o mikroorganizmy. Efektem tych prac są dwa artykuły, gdzie mój wkład polegał również na wykonaniu analizy hydrofobowości oraz potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórki bakterii:

- Kowalczyk P, Borkowski A, Czerwonka G, Cłapa T, Cieśla J, Misiewicz A, Borowiec M, Szala M. *The microbial toxicity of quaternary ammonium ionic liquids is dependent on the type of lipopolysaccharide*. J. Mol. Liq. 2018 266, 540–547 (A18).
- Borkowski A, Kowalczyk P, Czerwonka G, Cieśla J, Cłapa T, Misiewicz A, Szala M, Drabik M. *Interaction of quaternary ammonium ionic liquids with bacterial membranes - Studies with Escherichia coli R1–R4-type lipopolysaccharides*. J. Mol. Liq. 2017 246, 282–289 (A19).

Pozostałe prace, których jestem współautorem, powstały w ramach współpracy z pracownikami Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w ramach realizacji projektów prowadzonych w Zakładzie:

- Zegadło K, Gieroń M, Żarnowiec P, Durlík-Popińska K, Kręcisz B, Kaca W, Czerwonka G. *Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections*. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(2), 1707 (A20).
- Konieczna I, Kolesińska B, Gleńska-Olender J, Czerwonka G, Relich I, Frączyk J, Kamiński ZJ, Kaca W. *Synthesis of Bacterial Urease Flap Region Peptide Equivalents and Detection of Rheumatoid Arthritis Antibodies Using Two Methods*. Int J Pept Res Ther. 2020, 26, 53–65. (A21).
- Gmiter D, Czerwonka G, Drewnowska JM, Swiecicka I, Kaca W. *Draft Genome Sequences of Proteus mirabilis K1609 and K670: A Model Strains for Territoriality Examination*. Curr Microbiol. 2019 Feb;76(2):144-152. (A22).
- Gmiter D, Czerwonka G, Kaca W. *Type Vb And VI Secretion Systems As Competition Agents Of Gram-Negative Bacteria*. Postep Mikrobiol. 2018 57(4):360-373 (A23).
- Arabski M, Węgierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W. *Effects of saponins against clinical E. coli strains and eukaryotic cell line*. J Biomed Biotechnol. 2012:286216. Epub 2012 Feb 21. (A24).
- Czerwonka G, Kaca W. *Comparing Methods of 17 α -ethinylestradiol (EE2) Determination in Surface Water*. Pol. J. Environ. Stud. 2012;21(4):1089–1093 (A25).

7.2. Udział w projektach badawczych

Podczas prowadzenia badań do pracy doktorskiej jedną z moich obserwacji było zjawisko zahamowania wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 przez *Proteus mirabilis* O18 (szczep PrK 34/57). Obserwacje te doprowadziły do przeprowadzenia wstępnych badań dotyczących występowania konkurencji międzygatunkowej oraz wewnątrzgatunkowej (test Dienes) dla badanych szczepów *Proteus mirabilis*. Tematyka ta była realizowana w formie prac magisterskich których byłem promotorem, a później w formie pracy doktorskiej dr Dawida Gmitera, w której pełniłem rolę promotora pomocniczego. Wyniki wstępne uzyskane w trakcie prac nad zjawiskiem konkurencji *Proteus mirabilis* stały się podstawą projektu NCN Miniatura 2017 pt: „Znaczenie zróżnicowania genetycznego klastrów genów *ids* i *idr* w terytorializmie i zdolności do konkurencji wewnątrzgatunkowej *Proteus mirabilis*” (2017/01/X/NZ6/01141), którego byłem kierownikiem. Pozyskane w trakcie jego realizacji sekwencje genomów wybranych szczepów *Proteus mirabilis* stanowiły wstęp do dalszych badań obecnie realizowanych. Ponadto byłem współautorem i wykonawcą projektów MNiSW:

- „Modyfikacja aktywności ureolitycznej i formowania biofilmów w środowisku przez szczep *Proteus mirabilis* w obecności substancji sygnałowych” (N N304 275540) - byłem głównym wykonawcą projektu, gdzie celem była ocena efektu oddziaływania molekuł sygnałowych systemu quorum sensing na biofilm i aktywność ureolityczną *Proteus mirabilis*. Jednym z efektów realizacji tego projektu był publikacja: Czerwonka G, Arabski M, Wąsik S, Jabłońska-Wawrzycka A, Rogala P, Kaca W. *Morphological changes in Proteus mirabilis O18 biofilm under the influence of a urease inhibitor and a homoserine lactone derivative*. Arch Microbiol. 2014 Mar;196(3):169-77 (A14).
- „Nowy molekularny marker identyfikacji bakterii środowiskowych” (N N304 044639) – podczas realizacji tego projektu byłem jednym z jego wykonawców, gdzie podjąłem się wykonania zadania „Opracowanie metody oznaczania swoistych dla danego środowiska „genetycznych profili ureazowych” w oparciu o startery specyficzne wobec genów podjednostki α ureazy i metodę elektroforezy w gradientowym żelu denaturującym (DGGE).” Jednymi z efektów realizacji badań związanych z tym projektem były publikacje:
 - 1) Stankowska D, Czerwonka G, Rozalska S, Grosicka M, Dziadek J, Kaca W. *Influence of quorum sensing signal molecules on biofilm formation in Proteus mirabilis O18*. Folia Microbiol (Praha). 2012 Jan;57(1):53-60. (A26).
 - 2) Czerwonka G, Konieczna I, Żarnowiec P, Zieliński A, Malinowska-Gniewosz A, Gałuszka A, Migaszewski Z, Kaca W. *Characterization of Microbial Communities in Acidified, Sulfur Containing Soils*. Pol J Microbiol. 2017 Dec 4;66(4):509-517. (A27).
 - 3) Arabski M, Węgierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W. *Effects of saponins against clinical E. coli strains and eukaryotic cell line*. J Biomed Biotechnol. 2012:286216. Epub 2012 Feb 21. (A24).
- „Analiza epidemiologiczna uropatogennych szczepów *Escherichia coli*” (2011/01/D/NZ7/00107) – w projekcie tym podjąłem się wykonania oceny ilościowej i jakościowej biofilmu uropatogennych szczepów *E. coli*. Efektem tej pracy była publikacja: Adamus-Białek W, Kubiak A, Czerwonka G. *Analysis of uropathogenic Escherichia coli biofilm formation under different growth conditions*. Acta Biochim Pol. 2015;62(4):765-71. (A28).

Ponadto kierowałem 6 projektami finansowanymi ze środków własnych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach:

- Projekt Badawczy UJK 2022 r. pt. „Ocena typów ruchu bakterii i ich znaczenie w infekcjach ran” - efektem prac była publikacja: Zegadło K, Gieroń M, Żarnowiec P, Durlik-Popińska K, Kręcisz B, Kaca W, Czerwonka G. *Bacterial Motility and Its Role in Skin and Wound Infections*. Int. J. Mol. Sci. 2023 24(2),1707 (A20).
- Projekt Specjalny UJK 2021 r. - działania niezbędne do złożenia do instytucji zewnętrznej wniosku o finansowanie projektu badawczego zakończone złożeniem wniosku – Sonata-17 NCN.
- Grant Rektora UJK 2020 r. - publikacja wyników badań w czasopiśmie zamieszczonym w wykazie czasopism i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych: Czerwonka G, Gmiter D, Durlik-Popińska K. *Draft Genome of Proteus mirabilis Serogroup O18 Elaborating Phosphocholine-Decorated O Antigen*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2021; Mar 25;11:620010 (A5).
- MiniGrant UJK 2020 r. pt. „Charakterystyka szczepu bakterii *Viridibacillus sp. nov.*”.
- MiniGrant UJK 2019 r. pt. „Ocena biofilmu i czynników wirulencji kolekcji szczepów *P. mirabilis* z wykorzystaniem metod jakościowych i ilościowych”
- Badania statutowe dla młodej kardy - lata 2016-2018 pt. „Antybakteryjne własności kompleksów rutenu na wysokich stopniach utlenienia” – efektem prac była publikacja: Czerwonka G, Gmiter D, Guzy A, Rogala P, Jabłońska-Wawrzycka A, Borkowski A, Cłapa T, Narożna D, Kowalczyk P, Syczewski M, Drabik M, Dańczuk M, Kaca W. *A benzimidazole-based ruthenium(IV) complex inhibits Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by interacting with siderophores and the cell envelope, and inducing oxidative stress*. *Biofouling* 2019 Jan;35(1):59-74. (A3).

7.3. Ekspertyzy

Praca w zakładzie mikrobiologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego dała mi możliwość realizacji ekspertyz dla firm zewnętrznych. W latach 2009 - 2022 wykonałem ekspertyzy:

- „Analiza mikrobiologiczna powierzchni stropu piwnicy budynku Urzędu Miasta i Gminy w Daleszycach” dla Urzędu Miasta i Gminy w Daleszycach w 2022 roku.
- „Opracowanie procedury sterylizacji wkładów filtrujących” umowa z firmą Formaster S.A. z Kielc w 2020 roku.
- „Analiza mikrobiologiczna paliwa alternatywnego” dla firmy Dobra Energia Sp. z o.o. z Jędrzejowa w 2018 w roku.

- „Analiza mikrobiologiczna i chemiczna wód powierzchniowych i wodociągowych miasta Kielce” – umowa z Urzędem Miasta Kielce w 2009 roku. Zebrane doświadczenia z opracowania metodologii na rzecz tej ekspertyzy zostały zaprezentowane w postaci manuskryptu: Czerwonka G., Kaca W. *Comparing Methods of 17 α -ethinylestradiol (EE2) Determination in Surface Water*. Pol. J. Environ. Stud. 2012;21(4):1089–109 (A25).

7.4. Członkostwa i pełnione funkcje:

- Członek Uniwersyteckiej Komisji ds. Komercjalizacji Dóbr Intelektualnych UJK od 2020 roku.
- Członek Rady Naukowej Instytutu Biologii UJK od 2019 roku oraz przewodniczący komisji skrutacyjnej od 2020 roku.
- Członek Wydziałowej Komisji ds. Kształcenia – Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UJK od 2019 roku.
- Członek Kierunkowego Zespołu ds. Jakości Kształcenia – kierunek Biotechnologia od 2019 roku.
- Członek Kierunkowego Zespołu ds. Jakości Kształcenia – Biologia od 2019 roku.
- Instytutowy koordynator programu Erasmus+ w roku akademickim 2016/2017.
- Przewodniczący Komisji Rewizyjnej PTM oddział Kielce od 2016 roku.
- Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów od 2013 roku.
- Założyciel i opiekun studenckiego koła naukowego biotechnologów „Mikroby” od 2012 do 2019 roku.

7.5. Kursy:

W ramach podnoszenia swoich kwalifikacji brałem udział w szkoleniach:

- Szkolenie z programu Statistica (2019 r.):
 - 1) moduł podstawowy,
 - 2) moduł „Analiza wariancji”,
 - 3) moduł „Metody wizualizacji danych”.
- „Ekologia molekularna – możliwości wykorzystania metod DGGE oraz RISA do badania zróżnicowania gatunkowego mikroorganizmów” – 2012 r.
- Kwalifikacyjny Kurs Pedagogiczny – 2009 r.

7.6. Nagrody i wyróżnienia:

- Nagrody za osiągnięcia naukowe – 3 Nagrody I stopnia Rektora UJK przyznane w latach: 2015, 2018 i 2019.
- Zespołowa Nagroda Rektora II stopnia za osiągnięcia organizacyjne przyznana w 2022 roku.
- Wyróżnienie w konkursie „Eureka! DGP – odkrywamy polskie wynalazki” organizowanego przez Dziennik Gazeta Prawna - za patent „Wykorzystanie nowych kompleksów $Ru(IV)$ i $Ru(VI)$ jako inhibitorów procesu tworzenia się biofilmu bakteryjnego” nr P.411704 (Pat.228178).
- Świętokrzyski Racjonalizator – nagroda za patent „Wykorzystanie nowych kompleksów $Ru(IV)$ i $Ru(VI)$ jako inhibitorów procesu tworzenia się biofilmu bakteryjnego” nr P.411704 (Pat.228178).

7.7. Pozostałe:

- Przygotowanie i prowadzenie jako tymczasowy edytor (Guest Associate Editor) wydania specjalnego w czasopiśmie *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* zatytułowanego „*Molecular Basis of Uropathogens Adaptation and its Clinical Meaning*”, w którym opublikowano 4 prace eksperymentalne - 2021-2022r.
- Wykład na seminarium naukowym w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN pt. „*Importance of electrokinetic potential and cell surface hydrophobicity in adhesion and biofilm formation by gram-negative bacteria*”, który odbył się *online* 25 marca 2021 roku za pośrednictwem aplikacji Microsoft Teams.
- Ukończenie studiów podyplomowych i uzyskanie dyplomu “Menedżer komercjalizacji i transferu wiedzy” prowadzonych przez Wydział Zarządzania i Administracji Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz obrona pracy pt.: “Optymalizacja procesu wiązania azotu podczas symbiozy roślin motylkowatych z bakteriami z rodziny *Rhizobiaceae*” – 2009 r.
- Patent „Wykorzystanie nowych kompleksów $Ru(IV)$ i $Ru(VI)$ jako inhibitorów procesu tworzenia się biofilmu bakteryjnego” nr P.411704 (Pat.228178)
- Przygotowanie 37 recenzji artykułów naukowych do czasopism takich jak: *Infection*, *Genetics and Evolution*, *Chemosphere*, *RSC Advances*, *Microbial Pathogenesis*,

Virulence, Microbial Drug Resistance, Applied and Environmental Microbiology, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.

Moje przyszłe plany naukowe dotyczą zagadnień:

- hydrofobowości i potencjału elektrokinetycznego biofilmu bakteryjnego, w szczególności biofilmu *Proteus mirabilis*;
- budowy i organizacji genetycznej klastrów biosyntezy antygeny O szczepów *Proteus mirabilis*.

.....*Grzegorz Czerwonka*.....
(podpis wnioskodawcy)