

Załącznik nr 2

Autoreferat w języku polskim

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

dr Andrzej Woźnica

Katedra Biochemii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 2018

Imię i nazwisko: Andrzej Stanisław Woźnica

1. Wykształcenie, posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- **1999: doktor nauk biologicznych** - Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (28.05.1999). Tytuł rozprawy doktorskiej: „Utlenczenie glukozy przez szczep *Aeromonas hydrophila* w obecności żelaza w warunkach niedoboru tlenu”, promotor: **prof. dr hab. Jerzy Chmielowski**
- **1987: magister biologii** - Katedra Zoologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (09.07.1987). Tytuł pracy magisterskiej: „Kariologiczne i morfologiczne zróżnicowanie mszyc z rodziny *Lachnidae*”, promotor: **prof. dr hab. Maciej Klimaszewski**
- **1982-1987: Studia magisterskie** na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **2017 do obecnie:** dyrektor Śląskiego Centrum Wody Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
- **2014 do obecnie:** starszy wykładowca, Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach (1/2 etatu)
- **2014 do obecnie:** pracownik naukowo-techniczny, Uniwersytet Śląski w Katowicach (1/2 etatu)
- **2014 do obecnie:** koordynator wdrożenia produktów projektu „Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego - ZiZOZap” /POIG 01.01.02-24-078/09/
- **2012-2014:** starszy wykładowca - Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- **1999-2012:** adiunkt - Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- **1990-1999:** asystent - Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- **1989-1990:** asystent stażysta - Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

3. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Ocena możliwości wykorzystania bakterii nityfikacyjnych
do biodetekcji substancji toksycznych w wodzie**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: (autorzy a, b, rok wydania, tytuły publikacji, wydawnictwo, tom, strony, IF_c, MNiSW_d, Cyt.: WoS)

IF₁ - wartość wskaźnika Impact Factor według Journal Citation Reports (Thomson Reuters) w roku opublikowania; IF₅ – Impact Factor 5-letni

² Punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją w wykazie czasopism naukowych obowiązującym na koniec roku kalendarzowego, w którym ukazała się publikacja

Lp.	Tytuł i autorstwo publikacji/patentu	IF ₁ /IF ₅	Punkty MNiSW ₂	Udział procentowy
Publikacje				
1.	Woznica A. , Karcz J., Nowak A., Gmur A., Bernas T. 2010. Spatial architecture of nitrifying bacteria biofilm immobilized on polyurethane foam in an Automatic Biodetector for Water Toxicity. <i>Microscopy and Microanalysis</i> 16: 550-560.	2,179/ 3,383	32	75%
Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji i planowaniu badań. Brałem udział w realizacji wszystkich eksperymentów oraz przygotowaniu materiałów do analiz, ocenie aktywności metabolicznej bakterii, analizach SEM i CLSM. Ponadto analizowałem i interpretowałem uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem tekst manuskryptu i wszystkie ryciny oraz dokonałem ostatecznej korekty manuskryptu po recenzjach. Byłem autorem korespondencyjnym.				
2.	Woznica A. , Nowak A., Beimfohr C., Karczewski J., Bernas T. 2010. Monitoring structure and activity of nitrifying bacterial biofilm in an automatic biodetector of water toxicity. <i>Chemosphere</i> 78(9): 1121-1128.	3,155/ 3,559	32	75%
Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań. Brałem udział w realizacji wszystkich eksperymentów oraz przygotowaniu materiałów do analiz, ocenie aktywności metabolicznej bakterii, analizach FISH, cytometrii				

	obrazowej i modelowania matematycznego. Ponadto analizowałem i interpretowałem uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również dokonałem korekty manuskryptu po recenzjach. Byłem autorem korespondencyjnym.			
3.	Woznica A. , Nowak A., Karczewski J., Klis Cz., Bernas T. 2010. Automatic biodetector of water toxicity (ABTOW) as a tool for examination of phenol and cyanide contaminated water. Chemosphere 81(6): 767-772.	3,155/ 3,559	32	73%
	Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji i planu badań. Brałem udział w realizacji wszystkich eksperymentów oraz w przygotowaniu materiałów do analiz, ocenie aktywności metabolicznej bakterii, ocenie hamowania aktywności pod wpływem użytych substancji toksycznych i w modelowaniu matematycznym inhibicji. Ponadto analizowałem i interpretowałem uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również dokonałem korekty manuskryptu po recenzjach. Byłem autorem korespondencyjnym.			
4.	Woznica A. , Nowak A., Ziemiński P., Kwasniewski M., Bernas T. 2013. Stimulatory effect of xenobiotics on oxidative electron transport of chemolithotrophic nitrifying bacteria used as biosensing element. Plos One, 8(1): e53484.	3,534/ 4,015	40	60%
	Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji i planowaniu badań. Brałem udział w realizacji wszystkich eksperymentów oraz w przygotowaniu materiałów do analiz, ocenie aktywności metabolicznej bakterii z użyciem spektrofluorymetrii i CLSM, ocenie hamowania aktywności pod wpływem użytych substancji toksycznych oraz przetwarzałem wyniki analiz metagenomicznych. Ponadto analizowałem i interpretowałem wszystkie uzyskane w tej pracy wyniki, przygotowałem tekst manuskryptu oraz wszystkie ryciny, jak również dokonałem korekty manuskryptu po recenzjach. Byłem autorem korespondencyjnym.			
Patent				
1.	Woźnica A. , Kliś Cz., Duda H., Dzirba J., Kosz K., Górny M., Mańka R. 2010. Patent: PL206892 (nr zgłoszenia P.379795). Urządzenie do automatycznej biodetekcji toksyczności ogólnej wód (ABTOW)	-	20	55%
	Udział w powstaniu patentu: Urządzenie do Automatycznej Biodetekcji Toksyczności Ogólnej Wód (ABTOW). Byłem głównym pomysłodawcą urządzenia, zebrałem zespół badawczy i byłem kierownikiem tego zespołu. Zadanie moje polegało na koordynowaniu działań technicznych i informatycznych pozwalających na opracowanie założeń urządzenia, testowaniu go i wdrożeniu do produkcji.			

Sumaryczny Impact Factor publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego :	IF ₁ - 12,023 IF ₅ - 14,516
Punktacja MNiSW publikacji wchodzących: w skład osiągnięcia naukowego:	136
Punktacja MNiSW patentu wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego:	20
Łącznie	156
Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Web of Science (WoS) z dnia 11 kwietnia, 2018 r.	27 (w tym 6 autocytowań)

c) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z opisem ich ewentualnego wykorzystania w praktyce

Wstęp

W środowisku pojawia się wiele niebezpiecznych substancji chemicznych, których źródłem są między innymi odpady przemysłowe i ścieki komunalne. Szczególnie zagrożenie stwarzają komercyjne produkty chemiczne, substancje wykorzystywane w chemizacji rolnictwa i chemii gospodarstw domowych, a także przedostające się środowiska aktywne biologicznie farmaceutyki. Wiele z tych związków w wyniku splotu powierzchniowego z obszarów rolniczych, dróg i autostrad dostaje się do wód powierzchniowych i podziemnych. Substancje te ze względu na dużą różnorodność są trudne do zidentyfikowania z wykorzystaniem standardowych metod chemicznych.

Wiele z tych związków pojawia się i utrzymuje w środowisku w stężeniach, które mogą być subtoksyczne, a nawet silnie toksyczne dla roślin i zwierząt (w tym ludzi). Inne, występujące w środowisku w niskich stężeniach, osiągają stężenie wywołujące efekt toksyczności w konsekwencji kumulacji tych substancji w komórkach organizmów. W przypadku wnikania do komórek organizmu wielu substancji w stężeniach nietoksycznych, może pojawić się efekt toksyczny, który będzie efektem sumowania się efektów toksyczności poszczególnych substancji (addytywność) lub/i częstych reakcji synergicznych.

Główna droga wnikania substancji toksycznych do organizmu człowieka to droga pokarmowa. Zanieczyszczenie wody do spożycia substancjami chemicznymi może powodować poważne zagrożenie dla kondycji i zdrowia populacji ludzi. Określenie stopnia zagrożenia i ryzyka, a także potrzeba podejmowania szybkich działań naprawczych, wynikających z pojawiania się takich substancji w środowisku, wymaga sprawnego systemu biomonitoringu środowiska wodnego, w szczególności wody przeznaczonej bezpośrednio do spożycia.

Do wykrywania obecności substancji toksycznych w wodzie przydatne mogą być biosensory. Biosensory to elementy łączące w sobie wrażliwość organizmów żywych z czułością metod chemicznych i fizykochemicznych. Zasada ich działania opiera się na rejestracji reakcji biologicznego elementu biosensora na zmiany środowiskowe (np. pojawienie się substancji potencjalnie toksycznych). Biosensor składa się z materiału biologicznego generującego sygnał (tkanki, komórki, enzymy, komórki mikroorganizmów, przeciwciała, fragmenty DNA), który jest odbiorcą zmiany zachodzącej w środowisku oraz elektrochemicznego lub elektronicznego przetwornika sygnału, który rejestruje i przetwarza powstały w elemencie biologicznym sygnał na mierzalny sygnał analogowy lub cyfrowy.

Rozmiar komórek mikroorganizmów, lokalizacja białek enzymatycznych na powierzchni komórki, bezpośredni ich kontakt ze środowiskiem zewnętrznym sprawiają, że znacznie szybciej reagują one na pojawiające się bodźce niż organizmy wielokomórkowe. Szczególnie ważna jest w tym przypadku możliwość wykorzystania dostatecznie dużej liczby komórek mikroorganizmów zapewniającej, zgodnie z teorią wielkich liczb, statystycznie

poprawny wynik analizy. Mikroorganizmy wykorzystywane jako element biologiczny biodetektorów powinny cechować się wrażliwością na szerokie spektrum substancji toksycznych, podobną do organizmów wyższych oraz zróżnicowaną, łatwą do rejestracji odpowiedzią na obecność bodźca (substancji toksycznych), zakresem liniowej zależności reakcji na dawkę substancji toksycznej, a także wolnym przyrostem biomasy. Takie cechy zapewniają dużą czułość złoza i stabilność biodetekcji.

Kryteria takie spełniają bakterie nitryfikacyjne (BN). Dodatkowo ich zaletą jest zdolność do tworzenia biofilmów, co umożliwia ich wykorzystanie w układach przepływowych. Wybór tych bakterii zapewnia też bezpieczeństwo ekologiczne (organizmy autochtoniczne pozyskiwane ze środowiska) oraz bezpieczeństwo ludzi (bakterie nieszkodliwe dla organizmu ludzkiego). W przeciwieństwie do biosensorów, standardowe metody oceny jakości wody stosowane w gospodarce wodnej – oparte na laboratoryjnych analizach fizykochemicznych (chromatografia, spektrofotometria) wymagają czasu. Nie spełniają więc warunku uzyskania szybkiej, online informacji o zmianie jakości wody.

Prezentowane w pracach badania były realizowane przez zespół badawczy, którego byłem liderem. W skład zespołu wchodził specjaliści z różnych dziedzin: dr Jagna Karcz odpowiedzialna za analizy SEM i EDS, dr Tytus Bernaś odpowiedzialny za badania z użyciem CLSC i cytometrii obrazowej, mgr Jerzy Karczewski odpowiedzialny za modelowanie matematyczne, dr Agnieszka Nowak i mgr Przemysław Ziemiński wykonujący analizy biochemiczne, dr Claudia Beimfohr odpowiedzialna za przygotowanie sond FISH oraz dr Mirosław Kwaśniewski wykonujący analizy metagenomiczne. Oprócz nich, zespół techniczno-wdrożeniowy w składzie: mgr inż. Michał Górny, Roman Mańka i mgr inż. Adrian Holec odpowiadali za techniczne aspekty budowy prototypów i ostateczną wersję urządzenia.

Głównym celem zespołu było stworzenie koncepcji i budowa systemu Automatycznego Biodetektora Toksyczności Ogólnej Wody (ABTOW), umożliwiającego szybką biodetekcję substancji toksycznych dla środowiska i człowieka w wodzie, urządzenia pracującego w układzie online i opartego na kontroli procesów metabolicznych prowadzonych przez BN.

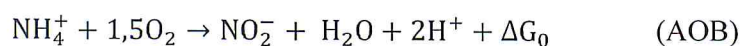
Cel ten był realizowany poprzez cele szczegółowe, które obejmowały:

- wybór metody immobilizacji i ocenę zdolności podłoża do immobilizacji BN,
- opracowanie modeli kinetycznych metabolizmu BN,
- modelowanie dynamiki procesu kolonizacji wybranego podłoża do immobilizacji przez konsorcja BN,
- opracowanie i walidację modeli toksyczności dla wybranych substancji toksycznych w automatycznej detekcji zagrożeń chemicznych wody,
- ocenę zdolności biosensorycznych BN do wykrywania substancji niebezpiecznych obecnych w wodzie,
- wyjaśnienie mechanizmów podwyższonej aktywności BN w obecności niskich stężeń niektórych substancji toksycznych,

- poznanie struktury gatunkowej populacji BN zasiedlających bioreaktor ABTOW,
- budowę urządzenia umożliwiającego automatyczną detekcję substancji niebezpiecznych w wodzie.

Cele te były dokumentowane kolejnymi publikacjami i patentem, stanowiącymi opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).

W prowadzonych badaniach stosowałem konsorcjum BN, utleniających jon amonowy (AOB) i azotanowy(III) (NOB) zgodnie ze stechiometrią zaproponowaną przez Wiesmanna i in. (2007):



Powyższe reakcje związane są z procesem fosforylacji oksydacyjnej, prowadzonym przez BN, a przepływ elektronów przez białka błonowe generuje gradient protonowy wykorzystywany zarówno do syntezy ATP, jak i redukcji NADP⁺ (Gerardini i in. 2002) Zaproponowałem, aby jako wskaźnik aktywności metabolicznej BN w wodzie wykorzystać pomiar szybkości zużycia substratów lub powstawania produktów analizowanej reakcji. Rejestracja stężeń substratów/produktów analizowanej reakcji pozwala na śledzenie dynamiki procesu nityfikacji.

W śledzeniu procesów metabolicznych testowałem: analizatory elektrochemiczne (elektrody tlenowe (analiza O₂), azotanowe (NO₃⁻, amonowe (NH₄⁺)) oraz spektrofotometrię UV (azotany(III) i (V)). Do śledzenia zachodzących reakcji konieczne było zaprojektowanie i zbudowanie układu badawczego, który umożliwił wielokrotne użycie biomasy oraz pozwalał na śledzenie analizowanych procesów metabolicznych w trybie online.

We wstępnych badaniach obecność azotanów(III) i (V) w wodzie wypływającej z reaktorów z powodzeniem monitorowałem wykorzystując metodę spektrofotometryczną z kufwą przepływową. Stechiometria procesu, w którym biorą udział dwukrotnie wyższe ilości tlenu w stosunku do jonu amonowego i azotanu(V), wskazywała, że dla oceny aktywności metabolicznej BN wystarczające jest prowadzenie pomiarów zmian stężenia tlenu w wodzie. Aby sprawdzić takie założenia, testowałem elektrody tlenowe Clarka (dane niepublikowane), a także galwaniczne elektrody tlenowe. W efekcie końcowym do pomiaru stężenia tlenu w analizowanej wodzie użyłem galwaniczne elektrody tlenowe. Ten wybór był kompromisem pomiędzy czułością, trwałością, niezawodnością i niskim kosztem eksploatacji takich elektrod. Wstępne analizy zużycia tlenu przez natywne komórki BN w warunkach standardowych i w obecności substancji toksycznych potwierdziły ich zdolność do detekcji zanieczyszczeń w wodzie.

Do śledzenia dynamiki procesu nityfikacji prowadzonej przez BN zaprojektowałem i zbudowałem układ przepływowy składający się z trzech reaktorów i czterech galwanicznych sond tlenowych. Miarą aktywności mikroorganizmów w bioreaktorze była różnica stężenia tlenu na wejściu i wyjściu z reaktora. Taki układ gwarantował ciągły pomiar zużycia tlenu w reaktorze przepływowym. Obserwowane zmiany zawartości tlenu w kolejnych, szeregowo ułożonych elektrodach, z opóźnieniem wynikającym z tempa przepływu badanego medium przez reaktory, pozwalały nie tylko na ocenę dynamiki procesu nityfikacji zachodzącego w reaktorach ABTOW, ale także na weryfikację poprawności rejestrowanego sygnału. Opracowana metoda kalibracji elektrod, z zastosowaniem medium pozbawionego źródeł elektronów do procesów nityfikacji, pozwalała na szybką i skuteczną kalibrację elektrod bez konieczności ich demontażu.

Skład konsorcjum bakterii zasiedlających biozłoża ABTOW

Do złoża bakterii w ABTOW wprowadzano niesterylną, badaną wodę. Jedynym czynnikiem, który limitował skład konsorcjów bakterii zasiedlających złoża był skład pożywki, o wysokiej zawartości jonów amonowych. Wpływało to na wyraźną dominację BN w złożach. Wyniki tych badań zaprezentowano w artykule: Woźnica i in., 2013, Plos One, 8:e53484 (zał. 3, I.A.4.). Przeprowadzona analiza metagenomiczna składu konsorcjów bakterii zasiedlających reaktory ABTOW wykazała małą bioróżnorodność złoża z dominacją BN, które stanowiły 82,7% ogólnej liczby bakterii zasiedlających złoża. Największy udział w konsorcjach miały bakterie AOB z rodzaju *Nitrosomonas* (51,1%). NOB były reprezentowane przez *Nitrobacter* (31,5%) i *Nitrococcus* (0,02%). Inne bakterie, niebiorące udziału w procesie nityfikacji, stanowiły 17,3% (Woźnica i in., 2013, Plos One, 8(1): e53484 (zał. 3, I.A.4.).

Obecność i lokalizację AOB i NOB w złożach potwierdzono dodatkowo poprzez obrazowanie złoża metodą FISH/CLSM, a także poprzez analizę aktywności metabolicznej bakteryjnych konsorcjów w ABTOW w obecności kilku związków organicznych (potencjalnych źródeł węgla). W środowisku zawierającym glukozę lub octan zaobserwowane zużycie tlenu było znikome i nie różniło się od kontroli bezsubstratowej. Aktywność metaboliczną obserwowano jednak w obecności jonu amonowego lub azotanów (III). Obserwacje te potwierdziły, że badany proces konsumpcji tlenu w ABTOW to proces litoautotroficzny, katalizowany przez konsorcja AOB i NOB. Inne bakterie, choć obecne w złożach, nie wpływały istotnie na mierzoną aktywność konsorcjum. Co więcej, aktywność (konsumpcja tlenu) AOB była 3 razy większa niż NOB, co jest zgodne ze stechiometrią procesu utleniania amonu przez BN (zał. 3, I.A.1.).

Analiza architektury 3D biofilmu bakterii nityfikacyjnych

Natywne klaczki biofilmu BN uniemożliwiały utrzymanie aktywnej biomasy w reaktorach pomiarowych. Konieczne było opracowanie metody immobilizacji BN w reaktorach. Zastosowany sposób immobilizacji powinien stabilizować/utrzymywać aktywną biomasę w obrębie bioreaktora, umożliwiając równocześnie swobodny, turbulentny przepływ analizowanej wody przez bioreaktory. Ze względu na słabą wytrzymałość mechaniczną i duże opory w trakcie przepływu wody przez reaktory niepowodzeniem zakończyły się próby

wykorzystania alginianu wapnia do immobilizowania BN (dane niepublikowane). Dlatego konieczne było poszukiwanie innych materiałów, spełniających wymagane cechy.

Testowałem możliwość immobilizacji bakterii na powierzchni gąbki poliuretanowej o otwartych porach (OCPM – Open Cellular Polymer Material). Zakładałem, że klaczki bakterii, tworząc warstwę biofilmu, przyczepią się do powierzchni ramion gąbki. Przeprowadzone testy potwierdziły tę hipotezę. Uzyskano stabilne złoża bakterii, zapewniające długotrwałą, turbulentny przepływ wody. Wyniki tych prac przedstawiłem w artykule: Woźnica i in., 2010, *Microscopy and Microanalysis*, 16: 550-560 (zał. 3, I.A.1.).

Dla oceny sposobu immobilizacji BN analizowałem organizację przestrzenną 3D unieruchomionych kolonii bakterii na trzech poziomach rozdzielczości: tomografii rentgenowskiej, konfokalnej mikroskopii laserowej (CLSM) i skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Subtelna struktura analizowanego biofilmu wymagała zastosowania specjalnych, autorskich technik utrwalania materiału, które miały na celu zachowanie struktury 3D obiektu, niezbędnej do analiz przestrzennych. Opracowana metoda oparta na utrwaleniu struktury biofilmu do analiz tomograficznych, technik mikroskopii elektronowej i CLSM bazująca na liofilizacji materiału została opatentowana w UPR (zał. 3, C.2.).

Tomografia rentgenowska umożliwiła analizę rozkładu biofilmu w objętości użytego podłoża i ocenę objętości biofilmu w złożu. Użycie CLSM pozwoliło na rekonstrukcję obrazu 3D struktury biofilmu. Rekonstrukcje wykonywano techniką komputerowej analizy obrazu (Fuji ImageJ). Dzięki temu można było wykazać istnienie trzech podstawowych sposobów immobilizacji bakterii w złożu. Były to: (1) duże, nieregularne agregaty, sznury biofilmu bakteryjnego na powierzchni ramion gąbki; (2) kuliste skupiska bakterii zlokalizowanych na zewnętrznej powierzchni warstwy biologicznej oraz (3) dwuwarstwa biofilmu AOB/NOB przylegająca bezpośrednio do powierzchni gąbki poliuretanowej.

W analizach SEM zastosowałem autorską technikę utrwalania subtelnej struktury biofilmu, opartą na wcześniejszej liofilizacji (zał. 3, C.2.). Dzięki takim działaniom uniknąłem ingerencji chemicznej w strukturę biofilmu, a także obkurczania się biofilmu w trakcie odwadniania preparatu. Zastosowana metodyka ujawniła strukturę przestrzenną użytego do immobilizacji bakterii materiału polimerowego o otwartych porach (OCPM). Obrazowanie takie pokazało również strukturę przestrzenną biofilmu z gęstą siecią zewnątrzkomórkowej substancji polimerowej (EPS), do której przymocowane były komórki bakterii. Taka struktura umożliwia łatwą penetrację w strukturę biofilmu substancji odżywczych przy jednoczesnej stabilizacji struktury przestrzennej. Pokazywała również istotną rolę EPS w stabilizacji biofilmu na powierzchni OCPM.

Badania dynamiki wzrostu bakterii nityfikacyjnych na powierzchni gąbki poliuretanowej (OCPM)

Użycie klaczków bakterii unieruchomionych na powierzchni OCPM do biodetekcji substancji toksycznych wymagało uzyskania stabilnego biofilmu, charakteryzującego się stałą aktywnością biokatalityczną. Przeprowadzone przeze mnie analizy miały na celu ocenić, w jakim czasie dochodzi do uzyskania dojrzałego złoża, to znaczy stabilnego, dobrze przytwierdzonego do OCPM biofilmu, przy względnie stałej aktywności. W celu oceny

dojrzałości złoża analizowano równocześnie wzrost biofilmu, udziały bakterii AOB i NOB w biofilmie oraz aktywność metaboliczną bakterii. Dla oceny optymalizacji badanych procesów modelowałem dynamikę nityfikacji prowadzonej przez AOB i NOB immobilizowanych w OCPM, co stało się podstawą do analiz związanych ze wzrostem biofilmu w OCPM. Wyniki tych prac zamieszczono w artykule: Woźnica i in., 2010, *Chemosphere*, 78(9): 1121-1128 (zał. 3, I.A.2.). Badania pokazały, że biofilm stabilizował się/dojrzał po 21 dniach od momentu zaszczepienia bakterii w OCPM. Dojrzały biofilm charakteryzował się stałą proporcją udziału komórek bakterii AOB do NOB. Analizy z wykorzystaniem metody FISH i cytometrii obrazowej wykazały, że proporcja ta wynosiła $1,85 \pm 0,2$. Proporcje aktywności AOB (pierwszy etap: nityfikacja amonu do azotanu(III)) w stosunku do NOB (drugi etap nityfikacji: utlenienie azotanu(III) do azotanu(V)) były podobne i wynosiły $2,1 \pm 0,38$. Analizy pozwoliły również na określenie tempa wzrostu mikroorganizmów w złożach. Na tej bazie wraz z zespołem opracowałem model wzrostu bakterii i wyznaczyłem czas podwojenia aktywności bakterii w złożu.

Proces zmiany aktywności bakterii AOB i NOB w trakcie tworzenia biozłoża opisałem logistycznym równaniem Verhulsta. Wyjaśniłem znaczenie biologicznych parametrów tego równania, w którym symbolem „ μ ” określano współczynnik aktywności; „ A_m ” - maksymalną aktywność; „ d_A ” - względny współczynnik wzrostu aktywności, a „ t ” - czas. Na podstawie wypracowanego modelu wzrostu aktywności opracowałem algorytm pozwalający na wyznaczenie czasu podwojenia aktywności BN. Na podstawie tego algorytmu wyliczyłem, że aktywność bakterii najszybciej wzrastała w okresie niskiej stabilności podłoża, to jest do 9 dnia zarastania złoża, a czas podwojenia aktywności wynosił w tym okresie $4,3 \pm 0,002$ doby. Wraz z postępowaniem procesu dojrzewania biofilmu, czas podwojenia aktywności stale wzrastał (zał. 3, I.A.2.).

Początek stabilizacji złoża wyznaczał punkt czasowy odpowiadający aktywności maksymalnej (wierzchołek 1 pochodnej modelu), który został przekroczony w 13 dniu od zaszczepienia złoża, a czas podwojenia aktywności osiągał wartość nieskończoną. Po około 15 dniach biofilm rozpoczynał fazę stabilizacji (wierzchołek 2 pochodnej modelu). W tym okresie w medium przepływającym przez złoża biofilmu nie obserwowano azotanu(III), który pojawiał się wcześniej na etapie zarastania OCPM. Wskazywało to na stabilizację struktury i optymalizację proporcji pomiędzy aktywnością AOB i NOB w złożach. Wskazywało to, że w dojrzałym biofilmie wytwarzany przez AOB azotan(III) stymulował aktywność NOB i był utleniany całkowicie do azotanu(V).

Stabilizacja struktury biofilmu i jego aktywność sugeruje istnienie czynnika ograniczającego wzrost bakterii. Uznałem, że tym czynnikiem było stężenie tlenu. Stężenie tlenu w wodzie przepływającej przez bioreaktor malało z uwagi na aktywność metaboliczną bakterii. W momencie zaszczepienia spadek ten odpowiadał 5% zawartości tlenu i sięgał 50% w 20 dniu eksperymentu. Dowodzi tego również obserwowany z użyciem tomografii rentgenowskiej spadek objętości zajmowanej przez biofilm wraz ze wzrostem odległości od wlotu bioreaktora (zał. 3, I.A.2.).

Ocena zdolności immobilizowanych bakterii nitrifikacyjnych w reaktorach ABTOW do detekcji substancji toksycznych w wodzie

Aby ocenić przydatność BN immobilizowanych w reaktorach ABTOW do detekcji obecności substancji toksycznych w wodzie, badałem odpowiedź ABTOW na dwie modelowe substancje toksyczne – słabo rozpuszczalny w wodzie fenol (8,3 g/100 mL 20 °C) i dobrze rozpuszczalny cyjanek (71,2 mg/100 mL w 20°C). Wyniki tych badań zaprezentowano w artykule: Woźnica i in., 2010, Chemosphere, 81(6): 767-772 (zał. 3, I.A.3.).

Wyznaczałem stopień toksyczności (ST), który odpowiadał powierzchni piku hamowania konsumpcji tlenu w bioreaktorach pod wpływem określonej dawki substancji toksycznej. Efekt hamowania konsumpcji tlenu przez BN w reaktorach ABTOW w obecności różnych stężeń substancji toksycznych pozwalał na wyznaczenie krzywych toksyczności, na których można było wyróżnić zakresy stężeń substancji toksycznej wywołujących: efekt hormezy, brak reakcji na stężenie substancji toksycznej, liniową zależność na stężenia substancji toksycznej oraz całkowite zahamowanie metabolizmu.

Odpowiedź reaktora ABTOW na badane substancje toksyczne była różna. Nisko toksyczny, słabo rozpuszczalny fenol powodował powolne narastanie inhibicji w trakcie podawania substancji toksycznej. W trakcie wypłukiwania substancji niebezpiecznej ze złoża następował powolny powrót aktywności. W przypadku silnie toksycznego, dobrze rozpuszczalnego cyjanunku, jego pojawienie się w reaktorach powodowało gwałtowny spadek aktywności. Przy zastosowaniu niskich dawek badanych substancji toksycznych, po ich wypłukaniu z bioreaktorów ABTOW, obserwowałem zwiększenie aktywności złoża, co wskazywało na efekt stymulacji aktywności drobnoustrojów – efekt hormezy. Wyższe dawki substancji toksycznych powodowały zazwyczaj obniżanie aktywności w stosunku do aktywności wyjściowej, co tłumaczono letalnym charakterem uszkodzeń części biomasy (zał. 3, I.A.3.).

Na podstawie reakcji hamowania zużycia tlenu przez BN w ABTOW w obecności fenolu i cyjanunku zaproponowałem matematyczny model inhibicji $I(c)$ jako funkcję stężenia substancji toksycznej. Użycie tak wypracowanego modelu pozwalało na matematyczne wyznaczanie stężenia powodującego 50% zahamowanie reakcji nityfikacji (EC_{50}) (wierzchołek pierwszej pochodnej funkcji $I'(c)$) oraz najniższej dawki powodującej obserwowany efekt (LOAEL - lowest-observed-adverse-effect level) i efektywnego stężenia powodującego całkowite zahamowanie reakcji nityfikacji (EC_{100}) (punkty krytyczne drugiej pochodnej funkcji $I''(c)$) dla każdej z analizowanych substancji.

Odpowiedź ABTOW na fenol i cyjanek charakteryzowała się dużą wrażliwością (natychmiastowa odpowiedź na obecność substancji toksycznej) i dużą czułością: LOAEL wynosił odpowiednio 3,5 μ M fenolu i 0,19 μ M cyjanunku. Obserwowany efekt toksyczności był zgodny z przebiegiem funkcji $I(c)$ i pozwalał na wyznaczenie stężeń krytycznych funkcji $I(c)$ (LOAED, $EC_{50\%}$, $EC_{100\%}$) dla analizowanych substancji.

Model ten walidowano analizując toksyczności 4 różnych jonów: Cd^{2+} , Cr^{6+} , Pb^{2+} i N_3^- oraz 3 związków aromatycznych: 2,4-dichlorofenolu, 2,5-dichlorofenolu i 2,6-dichlorofenolu. Wyznaczone dla tych substancji parametry toksyczności były zgodne z parametrami opisywanymi w literaturze. W trakcie prowadzonych badań zaobserwowałem addytywne działanie fenolu i cyjanku na aktywność BN. Efekt toksyczności substancji podanych równocześnie odpowiadał sumie efektów działania tych substancji podanych niezależnie (zał. 3, I.A.3.).

Mechanizmy toksyczności u bakterii nitryfikacyjnych

Jednym z ciekawszych zagadnień w trakcie badań mechanizmów toksyczności u BN było obserwowanie stymulacji zużycia tlenu u bakterii utleniających azotany(III) (NOB) pod wpływem niższych, stosowanych dawek dikumarolu (40-80 μM). Podałem falsyfikacji hipotezę, która zakładała, że proces ten jest związany z rozwidleniem (bifurkacją) drogi elektronów w łańcuchu transportu elektronów u NOB. Zablokowanie drogi elektronów w kierunku NAD(P)^+ może powodować zwiększony przepływ elektronów w kierunku oksydazy cytochromowej. Stąd istotnie zwiększone zużycie tlenu. Falsyfikacja tej hipotezy polegała na użyciu blokerów przepływu elektronów, takich jak: cyjanek i azydek (oksydaza cytochromowa), dikumarol i quinakryna (miejsca Q), blokujących przepływ elektronów w łańcuchu transportu elektronów oraz analizie potencjału błonowego u bakterii utleniających amon (AOB) i bakterii utleniających azotany(III) (NOB) w obecności tych blokerów. Negatywna falsyfikacja potwierdziła słuszność postawionej hipotezy. Pozwoliło to na przedstawienie modelu łańcucha przepływu elektronów u NOB. Wyniki tych prac przedstawiono w artykule: Woźnica i in., 2013, Plos One, 8(1): e53484 (zał. 3, I.A.4.).

Omówione badania potwierdziły, że opisane powyżej rozwiązanie oparte na złożach BN to wiarygodne i skuteczne narzędzie oceny toksyczności w wodzie o krótkim czasie reakcji na analizowane bodźce, które odzwierciedla procesy kinetyczne metabolizmu jonu amonowego zachodzące w reaktorach. Zastosowanie metod amperometrycznych pozwala na automatyczne rejestrowanie danych dotyczących stężenia tlenu w przepływającym przez reaktory medium i analizowanie ich przetwarzając na informacje o konsumpcji tlenu przez bakterie w złożach.

Nowości naukowe wypracowane w trakcie realizacji osiągnięcia naukowego

- Opracowanie koncepcji biodetektora opartego na śledzeniu kinetyki procesów metabolicznych u bakterii nitryfikacyjnych (zał. 3, I.A.5.).
- Wypracowanie sposobu immobilizacji mikroorganizmów w bioreaktorach (zał. 3, I.A.1.).
- Opisanie mechanizmu immobilizacji oraz tworzenia biofilmu przez BN na polimerach komórkowych o otwartych porach (OCPM) (zał. 3, I.A.1.).
- Opracowanie modelu szybkości wzrostu AOB i NOB w układach przepływowych ABTOW (zał. 3, I.A.2.).
- Opracowanie modeli optymalizacji procesów nitryfikacji w biodetektorze ABTOW (zał. 3, I.A.2.).
- Opracowanie modelu do wyznaczania czasu podwojenia aktywności w biozłożach (zał. 3, I.A.2.).
- Opracowanie modelu inhibicji metabolizmu BN w obecności ksenobiotyków umożliwiającego proste wyznaczanie współczynników toksyczności (LOED, ED₅₀) (zał. 3, I.A.3.).
- Walidacja modelu inhibicji dla wybranych ksenobiotyków (zał. 3, I.A.3.).
- Wykazanie synergicznego działania substancji toksycznych na bakterie BN obecne w biodetektorze (zał. 3, I.A.3.).
- Określenie składu gatunkowego, architektury przestrzennej i aktywności metabolicznej konsorcjów mikroorganizmów zasiedlających bioreaktor ABTOW (zał. 3, I.A.4.).
- Opracowanie modelu łańcucha oddechowego NOB z uwzględnieniem bifurkacji drogi elektronów w łańcuchu elektronów u NOB (zał. 3, I.A.4.).

Wykorzystanie prowadzonych badań w praktyce

Równoległe z pracami badawczymi prowadziłem wraz z zespołem prace wdrożeniowe. Uzyskane w trakcie badań wyniki dały podstawy teoretyczne do budowy instrumentów analitycznych umożliwiających ciągły monitoring wód surowych i uzdatnionych, przeznaczonych do spożycia, pod kątem obecności w wodach substancji toksycznych. Wskazywały na to wykazane w trakcie badań możliwości techniczne identyfikacji toksyczności w wodzie, która wynika z obecności w badanych wodach niezidentyfikowanych substancji chemicznych. Badania udowodniły, że jest możliwa detekcja obecności takich substancji, monitorowanie wzajemnych oddziaływań pomiędzy nimi (addycja, synergizm/antagonizm) poprzez rejestrację reakcji użytych do biodetekcji organizmów na stresory chemiczne. Dla ochrony własności intelektualnej wypracowanej w trakcie prowadzenia badań w 2006 roku dokonano zgłoszenia patentowego, a w 2010 uzyskano patent na urządzenie do Automatycznej Biodetekcji Toksyczności Ogólnej Wody (ABTOW) na rzecz Uniwersytetu Śląskiego

w Katowicach autorstwa: **Woźnica A.**, Kliś Cz., Duda H., Dzirba J., Kosz K., Górny M., Mańka R. (zał. 3, I.A.5.).

Efektom prowadzonych działań było opracowanie koncepcji budowy, testowanie i walidacja urządzenia do Automatycznej Biodetekcji Toksyczności Ogólnej Wody (ABTOW) – automatycznego systemu umożliwiającego ciągły monitoring toksyczności w przepływającej wodzie. Stwierdzenie obecności substancji toksycznych w wodzie umożliwia biodetektor komórkowy na bazie reakcji BN.

Przeprowadzone badania dowiodły, że taki system pozwala na wstępną, szybką weryfikację powstającego sygnału. Opracowano technologiczny schemat budowy urządzenia, wykorzystującego BN, będącego układem modułowym, składającym się z kilku reaktorów z immobilizowaną biomasą konsorcjów BN (3 reaktory), poprzedzielanych układami pomiarowymi do wykrywania zawartości tlenu w przepływającej wodzie (4 elektrody tlenowe). Obrazem zachodzenia procesów metabolicznych u BN był spadek zawartości tlenu w analizowanej wodzie, przepływającej przez bioreaktor ABTOW.

Etapy prowadzonych prac badawczych starano się ściśle powiązać z osiągnięciem kolejnych poziomów gotowości technologicznej (technology readiness levels, **TRL**) dla zastosowanych rozwiązań. Takie podejście umożliwiało ocenę stanu zaawansowania prac technologicznych. Taką metodykę po raz pierwszy zastosowano w projektach B+R realizowanych przez NASA oraz przemysł obronny w USA. Według niej dojrzałość technologii opisuje się od fazy konceptualizacji konkretnego rozwiązania (**TRL 1**), aż do etapu dojrzałości (**TRL 9**), kiedy koncepcja (w wyniku prowadzonych badań naukowych i prac rozwojowych) przybiera postać rozwiązania technologicznego. Ten z kolei można zastosować w praktyce, np. w wyniku uruchomienia rynkowej produkcji.

Przedstawiam istotne etapy gotowości technologicznej w trakcie powstawania urządzenia ABTOW.

2006 – TRL 1; 2 i 3: Opracowanie koncepcji technologicznej

Przedstawiono koncepcję ABTOW, zbudowano prototyp *ad hoc* i dokonano procedur związanych z ochroną własności intelektualnej rozwiązania. W 2006 roku dokonano zgłoszenia patentowego na rzecz Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Uzyskany efekt działania – 21 grudnia 2008 roku nasze rozwiązanie zostało wyróżnione nagrodą I stopnia za rozwiązania w dziedzinie ekologii i tytułem Mistrz Ekologii na VII Międzynarodowym Konkursie na Rozwiązania w dziedzinie Ochrony Środowiska w Częstochowie (zał. 3, L.6.).

W 2010 roku uzyskano patent: PL206892 (nr zgłoszenia P.379795) na urządzenie do Automatycznej Biodetekcji Toksyczności Ogólnej Wody (ABTOW) (zał. 3, I.A.5.).

2010 – Poziomy TRL 4 i 5: budowa prototypu laboratoryjnego

W roku 2010 stworzono model pracy urządzenia i wewnętrznej weryfikacji uzyskanych wyników. Dla potrzeb analizy toksyczności z użyciem ABTOW zbudowano cyfrowy system analityczny, który umożliwiał rejestrację i interpretację uzyskanych wyników. System opiera się na modelu kinetycznych reakcji nityfikacji. Zaprojektowano i przetestowano system sterowalnych zdalnie zaworów i pomp stabilizujących sposób podawania badanej wody i pożywki do ABTOW oraz umożliwiający zdalną kalibrację i weryfikację uzyskanych wyników.

Uzyskany efekt działania: Zbudowano prototyp laboratoryjny umożliwiający testowanie możliwości proponowanego rozwiązania.

Poziom TRL 6: demonstracja modelu w warunkach zbliżonych do rzeczywistych

Zintegrowano wszystkie testowane elementy i zbudowano system analityczny, który przetwarza uzyskane dane i wyznacza aktywność złoży w bioreaktorze. Układ trzech bioreaktorów pozwala na analizę kinetyczną zmiany aktywności oddechowej użytych w biosensorze BN. Sygnał z czterech elektrod tlenowych urządzenia jest rejestrowany z użyciem analizatora – przetwornika analogowo-cyfrowego umożliwiającego zbieranie i zapisywanie danych w pamięci komputera.

Uzyskany efekt działania: Zbudowano prototyp laboratoryjny i przetestowano jego możliwości.

2011 - Poziom TRL 7: demonstracja prototypu w warunkach operacyjnych

Rozwiązanie było przez rok testowane w warunkach laboratoryjnych, gdzie symulowano ciągły przepływ wody przez reaktory ABTOW i zbierano w odstępach 5 s informacje o jakości wody. Testowano w ten sposób stabilność podłoża w czasie oraz wrażliwość na obecność substancji toksycznych w wodzie. Uzyskane w ten sposób dane były poddawane obróbce matematycznej. Pozwala to na wyznaczenie szybkości zużycia tlenu w bioreaktorach.

2012 – Poziom TRL 8: zakończenie badań i zaprezentowanie ostatecznej formy technologii (ang. proof of manufacturing)

W roku 2012 podjęto w zakładach produkcji soków roczne testy technologiczne ABTOW, których celem było dostosowanie prototypu laboratoryjnego do pracy w warunkach przemysłowych. ABTOW przyłączono do linii przesyłowej wody na linii produkcji soków. Efektem testów były zmiany konstrukcyjne umożliwiające ciągłą pracę ABTOW w warunkach hali przemysłowej (zmienne warunki termiczne w zakresie 4-50 °C, rozstrzygnięcie problemów ze zdalną komunikacją), pozwalające na zdalną kontrolę i sterowanie urządzeniem. Dostosowano moduły poboru wody z instalacji przemysłowej, stabilizacji temperatury i dozowania pożywki, do zdalnej komunikacji i kalibracji. Na bazie tych doświadczeń w roku 2013 przygotowano ostateczną dokumentację urządzenia, która obejmowała standaryzację rozwiązań technicznych, w tym: certyfikację, optymalizację pracy i budowę interfejsu komunikacji z użytkownikiem.

Uzyskany efekt działania: Gotowa dokumentacja urządzenia. Rozwiązanie wyróżnione w konkursie Polskiej Agencji Rozwoju Przedsiębiorczości – Polski Produkt Przyszłości 2013 za produkt Automatyczny Biodetektor Toksyczności Ogólnej Wody – ABTOW w kategorii: wyrób w fazie przedwdrożeńiowej (zał. 3, Ł.4.).

2013 – Poziom TRL 9- uruchomienie produkcji ABTOW

W roku 2013 roku powołano spółkę ABTOW biotechnology, która przygotowała na podstawie przeprowadzonych badań urządzenie komercyjne, gotowe do sprzedaży. Obecnie trwa kampania umożliwiająca sprzedaż urządzenia.

Literatura

1. Wiesmann U., Choi I.S., Dombrowski E.M. 2007. Fundamentals of biological wastewater treatment. Wiley VCH Verlag GmbH & Co.
2. Gerardi M.H. 2002. Nitrification and denitrification in the activated sludge process. John Wiley & Sons, Inc.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Pracę naukową rozpocząłem w 1989 roku na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Zainspirowany przez prof. dr hab. Jerzego Chmielowskiego rozpocząłem badania nad biologicznymi aspektami procesów mineralurgii ze szczególnym uwzględnieniem akumulacji izotopów promieniotwórczych metali i metaloidów w biomacie bakterii i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Moim celem było wyjaśnienie mechanizmów akumulacji radionuklidów, a w szczególności procesu biosorpcji jonów metali, w tym radionuklidów, na powierzchni komórek, oraz ich odkładania w postaci nierozpuszczalnych fosforanów uwalnianych z substancji organicznych w procesach enzymatycznych, zachodzących na powierzchni komórek. W swoich badaniach wykazałem związek między podwyższoną aktywnością fosfatazową i silną akumulacją uranu na powierzchni komórek. Wykazałem również zdolność drobnoustrojów do sorpcji i transportu uranu do wnętrza komórek. Efektem tych prac były publikacje dotyczące akumulacji radionuklidów przez drobnoustroje (zał. 3, II.B.1.1-4).

Akumulacja radionuklidów i metaloidów przez drobnoustroje

W latach 1990-1994 prowadziłem badania w celu oceny możliwości akumulacji radionuklidów przez komórki drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*, hodując je w obecności uranu(VI) i kontrolując ich zdolność do bioakumulacji tego metalu. Aby ocenić udział uranu transportowanego do wnętrza komórek i jego sorpcję w ścianie komórkowej drożdży analizowałem zdolności protoplastów komórek drożdży do jego akumulacji wewnątrzkomórkowej. Badania te wykazały mały udział transportu do wnętrza komórki, lecz znaczącą rolę ściany komórkowej w akumulacji uranu. W związku z tym przeprowadziłem szczegółowe analizy w celu wyjaśnienia roli ściany komórkowej i jej składników w procesach wiązania uranu. Badałem zdolność wiązania uranu przez izolowane z komórek drożdży podstawowe polisacharydowe składniki ściany komórkowej: mannan i glukan. Badania te pokazały dominującą rolę mannana w procesach akumulacji metalu (zał. 3, II.B.1.2.). Prowadziłem również prace nad akumulacją toru przez szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (zał. 3, II.B.1.3.) i akumulacją uranu przez drobnoustroje o wzmożonej aktywności fosfatazowej (zał. 3, II.B.1.1). W tym okresie badałem także kinetykę transportu germanu do wnętrza komórek drożdży oraz propagację i zmiatanie wolnych rodników tlenowych.

Powiązanie doświadczeń związanych z akumulacją metali i biodetekcją pozwoliło mi włączyć się do badań nad określeniem możliwości wykorzystania różnych tkanek *Robinia pseudoacacia* do bioindykacji zanieczyszczenia powietrza metalami (Cd, Pb i Zn). Badania te wykazały, że wysokie stężenia tych metali w tkankach robinii akacjowej z obszarów wiejskich było wynikiem transportu zanieczyszczeń na duże odległości (zał. 3, II.A.2.2.).

Umiejętności i doświadczenie uzyskane w pracy z izotopami promieniotwórczymi, a w szczególności opanowanie techniki ciekłych scyntylatorów, umożliwiły mi włączenie się do badań, których celem było kontrolowane wprowadzanie estradiolu i progesteronu do

żywego organizmu z użyciem szkieł porowatych zol-żel. Analizowałem uwalnianie się do krwi hormonów znakowanych ^3H z wszczepionych domięśniowo implantów krzemionkowych. Badania wykazały możliwość zastosowania szkieł porowatych do dozowania hormonów w żywym organizmie (zał. 3, II.A.1.1-2.).

Degradacja związków fenolowych

W latach 1995-1998 brałem udział w projekcie badawczym pt. „Pozyskiwanie wysoko aktywnej mieszanej populacji drobnoustrojów zdolnych do degradacji związków fenolowych” (Projekt badawczy KBN Nr 4 S401 060 05), kierowanym przez prof. dr hab. Sylwię Łabużek. Celem tego projektu było wykorzystanie drobnoustrojów do oczyszczenia zanieczyszczonego związkami fenolowymi stawu Kalina w Świętochłowicach. W zespole realizującym ten projekt zajmowałem się pozyskiwaniem wysoko aktywnych mieszanych populacji drobnoustrojów zdolnych do biodegradacji związków fenolowych. Moje doświadczenia były ukierunkowane na procesy adaptacji szczepów do bytowania w środowisku odpowiadającym wodom stawu Kalina i degradacji wysokich stężeń fenoli. W wyniku tych badań uzyskano wysokowydajne szczepy bakterii zdolne do degradacji związków fenolowych oraz pokazano możliwość degradacji biologicznej fenoli rozpuszczonych w wodach stawu Kalina (zał. 3, II.A.1.3.).

Oddychanie żelazowe (oparte na redukcji Fe^{3+})

W 1995 roku włączyłem się w szerszy nurt badań dotyczących relacji między metabolizmem drobnoustrojów a ograniczeniem stężenia metali w środowisku, koncentrując się na mechanizmach redukcji metali. Wyizolowałem ze środowiska wodnego szczep *Aeromonas hydrophila* KB1, zdolny do utlenienia glukozy i redukcji żelaza w warunkach anoksji oraz wyjaśniłem zależność między utlenieniem glukozy (donor elektronów) a redukcją żelaza(III) (akceptor elektronów) w procesach oddechowych zachodzących w komórkach bakterii w warunkach beztlenowych. Analizowałem stechiometrię tego procesu i oceniałem wpływ obecności żelaza(III) na przebieg procesów metabolicznych w warunkach anoksji. Badałem również powiązania procesu redukcji żelaza z przenoszeniem elektronów w łańcuchu oddechowym przez blokowanie przenośników łańcucha oddechowego z użyciem KCN, NaN_3 i rozprzęgania fosforylacji (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone CCCP). Uzyskane wyniki były podstawą do otwarcia 16 stycznia 1998 roku przewodu doktorskiego oraz przygotowania rozprawy doktorskiej pt. „Utlenienie glukozy przez szczep *Aeromonas hydrophila* w obecności żelaza w warunkach niedoboru tlenu”, zakończonej uzyskaniem stopnia doktora 28 maja 1999 roku.

Po uzyskaniu stopnia doktora, opierając się na opisanych powyżej wynikach badań, kontynuowałem prace dotyczące mechanizmów redukcji metali przez komórki mikroorganizmów, skupiając się na ocenie udziału łańcucha oddechowego w redukcji żelaza(III). Badałem lokalizację przenośników elektronów biorących udział w procesie redukcji żelaza(III) i analizowałem przepływ elektronów przez powiązany z nim łańcuch oddechowy. Badania te dowiodły, że u *Aeromonas hydrophila* KB1 utlenienie glukozy i redukcja żelaza w warunkach anoksji zachodzi z udziałem skróconego łańcucha

oddechowego. Wynikiem tego było opracowanie schematu łańcucha oddechowego związanego z redukcją żelaza(III) (zał. 3, II.A.2.7.).

W dalszych badaniach postawiłem pytanie: na ile procesy oddychania bakterii z udziałem jonów metali jako akceptorów elektronów są zjawiskiem powszechnym? Dlatego ze środowisk mikroaerofilnych izolowałem szczepy bakterii wykorzystujące procesy redukcji żelaza do pozyskiwania energii metabolicznej w warunkach anoksji. Wyizolowałem siedem szczepów bakterii, przeprowadziłem ich charakterystykę biochemiczną i analizę filogenetyczną (zał. 3, II.F.1-6). Badane szczepy, podobnie jak *Aeromonas hydrophila* KB1, w warunkach anoksji metabolizowały różne substraty glikolizy. Uzyskane tą drogą elektrony były wykorzystywane w procesach redukcji żelaza(III). Substraty cyklu Krebsa nie stanowiły donorów elektronów. Badania bakterii redukujących żelazo(III) wskazały, że procesy oddychania żelazowego w badanych środowiskach są powszechne. Czynnikiem istotnym w procesach oddechowych bakterii była relacja pomiędzy donorami elektronów, którymi były substraty glikolizy, a dostępnością jonów Fe^{3+} w roztworze.

Automatyczny Biodetektor Toksyczności Ogólnej Wody (ABTOW)

W 2004 roku rozpocząłem współpracę z Górnośląskim Przedsiębiorstwem Wodociągów S.A. w Katowicach. Zagrożenia związane z jakością wody, sygnalizowane przez to przedsiębiorstwo, stały się impulsem do podjęcia badań nad wykorzystaniem bakterii jako bioindykatorów do szybkiego informowania o zmianie jakości wody. Przedostające się do wód powierzchniowych i podziemnych, trudne do zidentyfikowania, niebezpieczne substancje chemiczne stanowią bowiem poważne zagrożenie dla wszystkich organizmów środowisk wodnych, a także konsumentów wody przeznaczonej do spożycia. Możliwość zastosowania bakterii w automatycznym systemie monitorowania jakości wody było dla mnie nie tylko poważnym wyzwaniem badawczym, ale także technicznym.

W 2004 r. podjąłem szczegółowe badania nad reakcjami bakterii nitryfikacyjnych (BN) na obecność substancji toksycznych. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w publikacjach, które wchodziły w skład osiągnięcia naukowego wynikającego 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. Nr 65, poz. 595 ze zm.). Omówienie tych prac przedstawiłem w punkcie 4c autoreferatu.

Analiza struktury przestrzennej gąbki

Od początku prac nad immobilizacją bakterii na materiale polimerowym o otwartych komórkach (OCPM – Open Cellular Polymer Material) poszukiwałem nowych materiałów do immobilizacji bakterii. Zwróciłem uwagę na duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne złożu BN do struktury szkieletu i mesohylu żywych gąbek. Do badań struktury przestrzennej wybrałem słodkowodną gąbkę *Spongilla lacustris* L. – typu leukonoid. Gatunek ten okazał się dobrym modelem do prowadzenia pogłębionych analiz struktury szkieletu, obecności bakterii i innych organizmów symbiotycznych w mesohylu. Analiza obrazów skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) i obrazu mikrotomografii komputerowej (μ Xray CT) pokazała złożoność struktury szkieletu i struktur wewnętrznych gąbki (zał. 3, II. A.2.3.) oraz obecność licznych

organizmów symbiotycznych (okrzemki, zielenice) na jej powierzchni. Analiza obrazu μ Xray CT, ze wsparciem obrazów SEM, pozwoliła na rozdzielenie struktur wewnętrznych gąbki zgodnie z poziomami szarości obrazu, który odpowiadał różnicom pochłaniania promieniowania rentgenowskiego. Powiązanie obrazów SEM EDS oraz uzyskane rekonstrukcje 3D poszczególnych elementów ciała gąbki umożliwiły ocenę funkcjonalną jej struktury. Połączenia sztywnych, krzemionkowych spikul z powierzchniową warstwą elastycznej spongilli ujawniły tensegralny charakter szkieletu. Uważam, że ma to istotne znaczenie w procesie wymiany wody w leukonoidzie. Aby potwierdzić tę hipotezę, pracujemy obecnie wraz z zespołem nad zastosowaniami modeli matematycznych do analizy tych struktur.

Analizy techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) ujawniły wewnątrz leukonoidu liczne bakterie, wśród nich BN, a obrazowanie z użyciem konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (CLSM) pozwoliło na ich lokalizację przestrzenną. Obecnie trwają badania nad wykorzystaniem uzyskanych informacji do konstruowania nowych materiałów biomimetycznych, opartych na strukturze gąbki. Moim zdaniem poznanie budowy tych struktur i mechanizmów ich działania jest szczególnie istotne w konstruowaniu, wzorowanych na strukturze gąbki, złożych biologicznych wykorzystywanych w technologii oczyszczania wód, zważywszy na wysoką sprawność gąbek w filtracji wody.

Analizy tomograficzne gąbki wymagały modyfikacji istniejących technik obrazowania. Opracowano autorską metodę utrwalania i wzmocnienia obrazu tomograficznego powierzchni gąbki. W maju 2016 roku opis metody został przesłany do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej (UPRP) (zał. 3, II.D.2.2.), co przedłuża znacząco złożenie publikacji z uzyskanymi wynikami badań do druku.

Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego

Problemem sygnalizowanym przez przedsiębiorstwa wodociągowe, z którymi współpracowałem było obniżanie się potencjału ekologicznego zbiorników zaporowych w wyniku załadowiania i pogarszania się stanu technicznego. Niekorzystne zmiany warunków przyrodniczych obserwowane na tych zbiornikach są nie tylko skutkiem tych procesów, ale związane są również z pojawianiem się nowych funkcji użytkowych zbiorników, jak na przykład sportu i rekreacji. Europejskie standardy zarządzania zbiornikami retencyjnymi wymagają zachowania dobrego potencjału ekologicznego zasobów wodnych i związanych z nimi ekosystemów, wykorzystania wód zbiorników zgodnie z ich funkcją gospodarczą, a także zapewnienia bezpieczeństwa budowli piętrzących w warunkach zagrożeń naturalnych i technologicznych. Dlatego w szerokim zakresie uczestniczyłem w dyskusjach nad problemem: czy i w jaki sposób badania naukowe mogą wspomóc zarządzanie zbiornikami zaporowymi?

Rozwiązanie tego problemu wymagało wieloaspektowego podejścia do zarządzania zasobami wodnymi i zbiornikami zaporowymi, uwzględniającego relacje pomiędzy efektywnością gospodarczą, ochroną przed zagrożeniami naturalnymi i antropogenicznymi oraz wartościami środowiska przyrodniczego. Ustaliłem, że są do tego potrzebne narzędzia oparte na wiedzy naukowej, wspomagające zarządzanie takimi obiektami. Moje doświadczenie

zdobyte w czasie prowadzenia badań związanych z takimi dyscyplinami naukowymi, jak: biochemia, biotechnologia, metabolizm drobnoustrojów, modelowanie kinetyki procesów metabolicznych, czy analiza obrazu pozwoliło mi na wykorzystanie zdobytej wiedzy i przeniesienie jej do dyscyplin związanych z gospodarowaniem środowiskiem, w szczególności do wspomagania gospodarowania środowiskiem wodnym.

W 2008 roku byłem jednym z głównych inicjatorów powstania konsorcjum naukowo-badawczego, w którego skład weszły: Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach, Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN w Zabrze oraz Politechnika Krakowska. Jednostki te zajmują się m.in. problemami gospodarki wodnej i zarządzaniem środowiskiem. Rok później zespół przygotował projekt badawczy „Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego – ZiZOZap”, który uzyskał finansowanie w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (2007-2013), priorytet 1. „Badania i rozwój nowoczesnych technologii”, nr umowy POIG 01.01.02-24-078/09 (zał. 3, L.7.).

Od stycznia 2010 roku pracowałem jako zastępca koordynatora tego projektu i byłem odpowiedzialny za koordynację badań terenowych, badań dotyczących mikroorganizmów zasiedlających zbiornik oraz za wykorzystanie uzyskanych danych biologicznych w modelowaniu funkcjonowania ekosystemów wodnych na przykładzie zbiornika goczalkowickiego. Mój udział w pracach badawczych projektu był znaczący i dotyczył różnych aspektów prowadzonych badań, co dokumentuję poniżej.

Zgodnie z Ustawą z 18 lipca 2001 Prawo Wodne oraz rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 19 lipca 2016 r. stan ekologiczny/potencjał ekologiczny jest określeniem jakości struktury i funkcjonowania ekosystemu wód powierzchniowych, sklasyfikowanej na podstawie wyników badań elementów biologicznych oraz wspierających je wskaźników fizykochemicznych i hydromorfologicznych. W wykazie elementów biologicznych nie uwzględnia się bakterii, z wyjątkiem bakterii chorobotwórczych. Jednym z problemów, który postanowiłem rozwiązać w ramach projektu było uwzględnienie mikroorganizmów jako istotnego elementu funkcjonowania zbiornika wodnego, w aspekcie budowy modelu ekosystemu do oceny stanu i prognozowania krótko- i długoterminowych zmian środowiskowych.

Wykorzystując techniki metagenomiczne badałem bioróżnorodność i sezonową zmienność zbiorowisk mikroorganizmów zbiornika goczalkowickiego. Próbkę wody były pobierane trzykrotnie w kolejnych porach roku, w czterech reprezentatywnych miejscach zbiornika. Liczba wykrytych operacyjnych jednostek taksonomicznych bakterii (OTU) w próbkach osiągnęła 50 000. Wykazałem znaczące sezonowe wahania w liczbie OTU w punktach pomiarowych Z01 (dopływ Bajerki do zbiornika), Z05 (ujście Wisły do zbiornika) i Z08 (pelagial). Określałem także zależności OTU w odniesieniu do wskaźników fizykochemicznych (odczytu pH, rozpuszczonego tlenu, zawartość azotu, itd.). Najwyższe wartości współczynników korelacji między wskaźnikami fizykochemicznymi oraz bogactwem i gęstością względną określonej OTU uzyskano dla *Methylophilales* (6 parametrów silnie skorelowanych), *Pseudanabaenales* (4), *Rickettsiales*, *Actinomycetales*, *Burkholderiales*,

Roseiflexales (2) i *Cryptophyta* (1). Analizy metagenomiczne słodkowodnego mikrobiomu zbiornika sklasyfikowanego jako limniczny i eutroficzny/mezotroficzny wykazały, że drobnoustroje stanowią konserwatywną społeczność, która ulega zmianom sezonowym i lokalnym w odniesieniu do względnego udziału zidentyfikowanych taksonów. Różnica właściwości metabolicznych zidentyfikowanych taksonów drobnoustrojów pokazała ich ważną rolę w utrzymaniu homeostazy ekosystemu wodnego. Struktura taksonomiczna, relatywny udział zidentyfikowanych taksonów, bioróżnorodność, obecność taksonów specyficznych – mogą stanowić biomarkery do monitorowania stanu zbiorników wodnych. Wyniki tych prac przedstawiono w raportach z realizowanych zadań (zał. 3, E.4-6), a artykuł opisujący omawiane zagadnienia jest obecnie na etapie przygotowania do druku.

Do oceny biomasy i oceny struktury populacji drobnoustrojów wybrałem dwie niezależne metody. Tańsza, o małej czułości metoda, z wykorzystaniem fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA), pozwalała wyznaczyć biomasę mikroorganizmów oraz wskazać występowanie w badanej wodzie charakterystycznych grup mikroorganizmów. Wysokorozdzielcza metoda metagenomiczna, oparta na analizach 16S rDNA, pozwalała z kolei na identyfikację drobnoustrojów, ale badania ograniczał wysoki koszt uzyskania wyników. Stosunkowo niskie koszty metody opartej na analizach PLFA pozwalały na częste śledzenie zmian zachodzących w zbiorniku. Stąd pobory prób i analizę profili PLFA wykonywano raz w miesiącu. Na podstawie tych badań opracowano, bazującą na metodach statystycznych, technikę analizy struktury populacji drobnoustrojów, opartą na analizach PLFA izolowanych z wody i indywidualnych profilach PLFA komórek drobnoustrojów (dane literaturowe) oraz analizach metagenomicznych. Głównym *novum* tych badań było zastosowanie mieszanej, zmodyfikowanej, ważonej analizy wieloczynnikowej do analizy danych, w których każda próbka wody jest reprezentowana przez jeden profil PLFA. Wykazano, że taka metoda może być z powodzeniem stosowana do interpretacji przestrzennych i czasowych zmian w społeczności drobnoustrojów w zbiornikach wodnych. Połączenie stosunkowo prostej i taniej metody analitycznej do oznaczania składu PLFA w badanej wodzie z zaawansowanymi technikami chemometrycznymi zwiększa znacząco możliwości interpretacji takich danych. Praca opisująca te analizy ukazała się w 2016 roku w czasopiśmie *Talanta* (zał. 3. II.A.2.1.).

Będąc odpowiedzialnym za badania terenowe, byłem również inicjatorem wielu innych działań, które pozwoliły opracować nowe rozwiązania. Przykładem takich działań może być „Klatka do prowadzenia monitoringu stanu zdrowia zwierząt i eksperymentów, zwłaszcza na rybach w mezokosmach”, która została opracowana dla potrzeb badania wody z wykorzystaniem organizmów testowych. Rozwiązanie to w 2016 roku uzyskało ochronę UPR jako wzór użytkowy Y1 068708 (zał. 3. D.1.3.). Wzór ten został wdrożony w 2017 roku na stacji uzdatniania Maczki, Górnośląskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów, do testowania wody surowej pod kątem obecności geosmin w wodzie.

Innym, ważnym z punktu widzenia modelowania ekologicznego zbiorników wodnych rozwiązaniem jest „Brama kalibracyjna do pomiarów sonarowych”. Umożliwia ona walidację danych pomiarowych, prowadzonych przez różne zespoły badawcze na jednym akwenie

wodnym. W 2017 roku na rozwiązanie to Uniwersytet Śląski uzyskał ochronę patentową UPR (zał. 3, C.1.).

Ważnym rozwiązaniem jest również zaproponowana przeze mnie i współpracujący zespół metoda pomiarowania zbiorników wodnych: „Method of waterbody measurements and a set for conducting waterbody measurements” (PCP/PL2017/050034), zgłoszona do europejskiej ochrony patentowej Zaproponowane rozwiązanie pozwala na szybką i dokładną analizę czaszy zbiornika, służącą do opracowania modeli cyfrowych hydrodynamiki i ekologii zbiorników wodnych (zał. 3, D.2.1.).

W trakcie prac na zbiorniku goczalkowickim dostrzegłem możliwość wykorzystania metod hydroakustycznych do badania rozmieszczenia i szacowania zasobów ryb, rozmieszczenia roślinności zanurzonej w śródlądowych ekosystemach wodnych oraz opracowywania i doskonalenia metod oceny stanu ekologicznego ekosystemów wodnych. Wspólnie z zespołem opracowaliśmy autorską metodę analizy obrazu, która pozwala na szacowanie liczebności ryb w zbiorniku. Wyniki tych prac przedstawiono w artykułach: Koprowski i in., 2013, BioMedical Engineering OnLine, 12:60 (zał. 3, II.A.2.5.) i Łozowski i in., 2014, Gospodarka Wodna, 8: 308-311 (zał. 3, II.B.2.2.). Zaproponowana idea analizy została zgłoszona do ochrony w UPRP jako „System oraz sposób szacowania liczebności ryb w zbiornikach wodnych” (zał. 3, D.2.4.).

Powiązanie analiz fizykochemicznych z obserwacjami ornitofauny występującej na zbiorniku goczalkowickim pozwoliło mi na wyjaśnienie przyczyn podwyższonej zawartości biogenów i mikroorganizmów (*E. coli*, bakterii typu fekalnego) w wodach zbiornika. W pracy: Gwiazda i in., 2014, International Journal of Oceanography and Hydrobiology, 43: 418-426 pokazaliśmy m.in. problem pogarszających się parametrów fizykochemicznych wody i powiązania tego faktu z dużymi koloniami ptaków (zał. 3, II.A.2.4.).

Wyniki prowadzonych prac oraz uzyskane w wyniku realizacji wielu projektów przedstawiałem wielokrotnie w formie prezentacji ustnych lub posterów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (zał. 3, M.2.7-14). Opracowane metody czy innowacyjne rozwiązania przedstawiałem również w postaci artykułów wieloautorskich w czasopiśmie i monografiach dotyczących gospodarowania wodami. Na przykład w czasopiśmie „Gospodarka Wodna” zamieszczono serię artykułów naukowych dotyczących gospodarowania wodami zbiornika goczalkowickiego (zał. 3, II.B.2.1-3).

Działalność aplikacyjna i wdrożeniowa:

W czasie ostatnich kilku lat byłem inicjatorem spotkań z przedstawicielami biznesu, instytucji państwowych i samorządowych, których rezultatem było podpisanie umów o współpracy z Uniwersytetem Śląskim w Katowicach. Jestem też koordynatorem realizacji zadań wynikających z umów z 12 jednostkami badawczymi (zał. 4, F.1.1-12), 6 przedsiębiorstwami (zał. 4, F.2.1-6) i 11 jednostkami administracji publicznej (zał. 4, F.3.1-14). Umowy te zaowocowały 19 wdrożeniami (zał. 3, G.1.1-19) i 18 aplikacjami (zał. 3, G.2.1-18), realizacją projektów badawczych na rzecz Urzędu Gminy Miasta Jaworzno i Urzędu

Miasta Tychy. W tych działaniach byłem odpowiedzialny za organizację zespołów badawczych i koordynację realizacji prac badawczo-rozwojowych. W 2016 roku zespół, którym kierowałem, został uhonorowany tytułem Innowator Śląska 2015 dla Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za wdrażanie Zintegrowanego systemu wspomagającego zarządzaniem i ochroną zbiorników zaporowych (zał. 3, Ł.1.).

Obecnie realizowane badania i dalsze plany naukowe

Od 2014 roku jestem odpowiedzialny za komercjalizację i wdrożenia produktów projektu ZiZOZap. Obecnie moje prace badawcze koncentrują się na ulepszaniu tych produktów, a także przygotowywaniu nowych, innowacyjnych rozwiązań do kolejnych wdrożeń. W pracach tych wykorzystuję nowatorskie metody badawcze, takie jak: modelowanie matematyczne ekosystemów wodnych, analizy wielkoobszarowe i mapowanie chemiczne i wieloaspektowe analizy w badaniach środowiskowych. Metody te są obecnie stosowane w ramach projektu Proline. W styczniu 2017 roku zainicjowałem i wraz z zespołem realizującym wdrożenie projektu ZiZOZap rozpocząłem przygotowania do powołania międzywydziałowego zespołu badawczego zajmującego się badaniem wód i środowisk wodnych. Efektem tych działań było powołanie we wrześniu 2017 roku przez JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach Śląskiego Centrum Wody Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W październiku 2017 roku, decyzją JM Rektora UŚ, zostałem powołany na stanowisko dyrektora tego Centrum.

Wcześniejsze prace związane z badaniem struktury przestrzennej gąbki pokazały mi również nowe kierunki poszukiwań innowacyjnych materiałów o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii środowiska. Obecnie trwają prace nad modelowaniem przestrzennym gąbki i tworzeniem/drukiem materiałów o właściwościach strukturalnych i funkcjonalnych żywej gąbki. Ważnym kierunkiem moich działań będą także badania związane z doskonaleniem urządzenia ABTOW i wdrażaniem biologicznych systemów wczesnego ostrzegania.

Wykaz publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC):

1. Stanimirova I., **Woźnica A.**, Plociniczak T., Kwaśniewski M., Karczewski J. 2016. A modified weighted mixture model for the interpretation of spatial and temporal changes in the microbial communities in drinking water reservoirs using compositional phospholipid fatty acid data. *Talanta* 160: 148-156. doi:10.1016/j.talanta.2016.07.006 (IF₁ - 4,035; IF₅ – 3,749; punkty MNiSW – 40).
2. Palowski B., Małkowska E., Kurtyka R., Szymanowska-Pułka J., Woźnica A., Małkowski Ł., Gucwa-Przepióra W., Małkowski E. 2016. Bioaccumulation of heavy metals in selected organs of black Locust (*Robinia pseudoacacia*) and their potential use as air contamination bioindicator. *Polish Journal of Environmental Studies* 25: 2085-2096 (IF₁ - 0,871; IF₅ – 0,888; punkty MNiSW – 15).
3. Karcz J., **Woźnica A.**, Binkowski M., Klonowska-Olejniak M., Bernas T., Karczewski J., Mígula P. 2015. SEM-EDS and X-ray micro computed tomography studies of

- skeletal surface pattern and body structure in the freshwater sponge *Spongilla lacustris* collected from Goczalkowice reservoir habit (Southern Poland), *Folia Histochemica et Cytobiologica* 53: 88-95 (IF₁ - 1,364; IF₅ – 1,081; punkty MNiSW – 15).
4. Gwiazda R., **Woźnica A.**, Łozowski B., Kostecki M., Flis A. 2014. Impact of waterbirds on chemical and biological features of water and sediments of a large, shallow dam reservoir. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology* 43: 418–426 (IF₁ - 0,670; IF₅ – 0,626; punkty MNiSW – 15).
 5. Koprowski R., Wróbel Z., Kleszcz A., Wilczyński S., **Woźnica A.**, Łozowski B., Pilarczyk M., Karczewski J., Migula P. 2013. Mobile sailing robot for automatic estimation of fish density and monitoring water quality. *BioMedical Engineering OnLine* 12: 60 (IF₁ – 1,746; IF₅ – 1,872; punkty MNiSW – 25)
 6. Karcz J., Bernas T., Nowak A., Talik E., **Woźnica A.** 2011. Application of lyophilization to prepare the nitrifying bacterial biofilm for imaging with scanning electron microscopy. *Scanning* 33: 1–11 (IF₁ - 1,287; IF₅ – 1,519; punkty MNiSW – 20).
 7. **Woźnica A.**, Dzirba J., Mańka D., Łabużek S. 2003. Effects of electron transport inhibitors on iron reduction in *Aeromonas hydrophila* strain KB1. *Anaerobe* 9: 125-130 (IF₁ - 0,762; IF₅ – 2,630; punkty MNiSW – 25).
 8. Sieminska L., Buntner B., **Woźnica A.**, Zerda T.W. 1996. Controlled release of estradiol and progesterone from porous sol-gel glass: in vitro and in vivo studies. *New slow drug delivery system. European Journal of Pharmaceutical Sciences* 4: 155-155. IF₁ - niedostępny ; IF₅ - niedostępny; punkty MNiSW – niedostępne
 9. Sieminska L., Buntner B., **Woźnica A.**, Zerda T.W. 1996. The use of sol-gel glass as a carrier for prolonged release of progesterone in the rat. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 2: 567–568 (IF₁ - 1,049, IF₅ – niedostępny; punkty MNiSW – niedostępne
 10. Łabużek S., Kłapcińska B., Mrozik A., Radecka I., **Woźnica A.** 1996. Pozyskiwanie wysoko aktywnej mieszanej populacji drobnoustrojów zdolnych do biodegradacji związków fenolowych. *Archiwum Ochrony Środowiska* 1-2: 49-63 (IF₁ – 0,188; IF₅ – niedostępny; punkty MNiSW – 13).

Sumaryczny IF publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego

IF₁ – 11,972

IF₅ – 12,365

Łączna liczba punktów MNiSW dla tych publikacji -

168

Wykaz innych publikacji, spoza listy JRC :

1. Miguła P., Łaszczyca P., **Woźnica A.** 2014. Strategiczny projekt badawczy Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego (ZiZOZap), *Gospodarka Wodna* 8: 279 (**Punkty MNiSW – 5**).
2. Łozowski B., Małkowski E., **Woźnica A.**, Łaszczyca P., Gwiazda R., Koprowski R., Wróbel Z., Pszczeliński L., Siudy A., Pasierbiński A., Miguła P. 2014. Badania ichtiofauny jako podstawa racjonalnej gospodarki rybackiej i zarządzania zbiornikiem zaporowym na przykładzie zbiornika goczalkowickiego. *Gospodarka Wodna* 8: 308–311 (**Punkty MNiSW – 5**).
3. Łaszczyca P., Augustyniak M., Pasierbiński A., Małkowski E., Kwaśniewski M., **Woźnica A.**, Miguła P. 2014. Innowacyjne metody monitoringu jako przyszłość zintegrowanych analiz środowiskowych w racjonalnym gospodarowaniu zasobami wodnymi. *Gospodarka Wodna*, 8: 292–295 (**Punkty MNiSW – 5**).
4. **Woźnica A.**, Łaszczyca P., Kwaśniewski M., Augustyniak M., Miguła P., Siudy A., Szlęk Z. 2011. Zastosowanie biotestów i biomarkerów molekularnych w ocenie stanu zbiornika zaporowego i przewidywaniu skutków dla jakości wody. *Instal* 7-8: 74-78 (**Punkty MNiSW – 5**).
5. **Woźnica A.**, Nowak A., Siudy A., Kliś C. 2010. Automatyczny biodetektor toksyczności ogólnej wody - narzędzie do monitoringu wody w czasie rzeczywistym. *Gospodarka Wodna* 10: 404-407 (**Punkty MNiSW – 6**).
6. Szymanowska Pułka J., Karczewski J., Kudelski E., **Woźnica A.** 2005. E-learning in biology: example of Faculty of Biology and Environmental Protection. *Journal of Medical Informatics & Technologies* 9: 347-352 (**Punkty MNiSW – 5**).
7. Chmielowski J., Pytlak M., **Woźnica A.** 1995. Bioaccumulation of uranium by bacteria with enhanced phosphatase activity. *Fizykochemiczne Procesy Mineralurgii* 29: 157-168 (**Punkty MNiSW – niedostępne**)
8. Chmielowski J., **Woźnica A.**, Kłapcińska B., Pytlak M., Piech W. 1994. Binding of uranium by yeast cell wall polysaccharides. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological Sciences* 42: 147-149 (**Punkty MNiSW – niedostępne**)
9. Chmielowski J., Pytlak M., Chwistek M., **Woźnica A.** 1994. Akumulacja toru przez szczepy drożdży *Sacharomyces cerevisiae*. *Fizykochemiczne Procesy Mineralurgii* 28: 125-136 (**Punkty MNiSW – niedostępne**)
10. Chmielowski J., **Woźnica A.**, Pytlak, M. 1993. Akumulacja i ługowanie radionuklidów przez drobnoustroje. *Fizykochemiczne Procesy Mineralurgii* 27: 195-204 (**Punkty MNiSW – niedostępne**)

Rozdziały w monografiach:

1. **Woźnica A.**, Łozowski B., Ułańczyk R., Absalon D., Sitek S., Czekał J., Siudy A., Migula P., Pszczeliński Ł., Jarosz W., Zarychta A., Małkowski E., Pasierbiński A. 2017. Comprehensive approach to Upper Silesian reservoir water quality issues. Case study: the Paprocany Reservoir in Tychy, Southern Poland. (in) Sierka E., Nadgórska-Socha A. (eds). The assesment of the state of environment. Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Katowice, pp. 117. (**Punkty MNiSW – 5**).
2. **Woźnica A.**, Łozowski B., Ułańczyk R., Absalon D., Siudy A., Migula P., Pszczeliński Ł., Jarosz W., Małkowski M., Pasierbiński A. 2017. Program rekultywacji Jeziora Paprocany i działań naprawczych w jego zlewni jako przykład kompleksowego podejścia do problemu jakości wody w małych akwenach. (W) Wiśniewski R. Ochrona i rekultywacja jezior. Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Toruń, str 169 (**Punkty MNiSW – 5**).
3. Łaszczyca P., Augustyniak M., Migula P., **Woźnica A.**, Pasierbiński A. 2013. System diagnozowania i prognozowania stanu środowiska zbiorników zaporowych działających w obszarach Natura 2000. Gospodarowanie w dolinach rzecznych na obszarach Natura 2000, (ed) Pawluśkiewicz B., Wydawnictwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, 01: 147-160 (**Punkty MNiSW – 4**).
4. Łaszczyca P., Augustyniak M., Absalon D., Długosz J., Gwiazda R., Kliś Cz., Kostecki M., Migula P., Nachlik E., Palowski B., Pasierbiński A., Strzelec M., Wilk-Woźniak E., **Woźnica A.** 2013. Monitoring hydrologiczny i ekologiczny jako podstawa modelowania zbiornika zaporowego i predykcji zjawisk w nim zachodzących (Projekt PO IG ZiZOZap). (W) Wiśniewski R. Ochrona i rekultywacja jezior. Toruń, ISBN 978-63-931293-9-3 (**Punkty MNiSW – 4**).
5. **Woźnica A.**, Latusek E., Płonka A., Łabużek S., Duda, H., Gorny M., Klis Cz., Kosz K., Siudy A. 2006. Automatic detection of water toxicity based on nitrifying bacteria biosensor. In: Proceedings of ECOpole International Conference. Society of Ecological Chemistry and Engineering, Opole, pp. 165-170 (**Punkty MNiSW – 7**).
6. **Woźnica A.**, Dzirba J., Kocot B., Hupert-Kocurek K., Łabużek S. 2005. Wykorzystanie bakterii przeprowadzających nitryfikację jako biosensora zagrożeń w środowisku wodnym. W: VIII Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-Techniczne, Biotechnologia Środowiska. (ed) Miksz K. Politechnika Śląska. Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki. Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Gliwice (**Punkty MNiSW – 4**).

6. Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe

1. 2017 - PL 226571 (B1) - Brama kalibracyjna do pomiarów sonarowych.
Autorzy: **Woźnica A.**, Łozowski B., Karpiński J., Koprowski R., Szlęk W.

Punkty MNiSW = 30 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 27 października 2015)

2. **2013 - PL 386173 (B1)** - Sposób przygotowania uwodnionej próbki materiału biologicznego do trójwymiarowych analiz mikroskopem świetlnym i elektronowym. Autorzy: **Woźnica A.**, Karcz J., Bernaś T., Nowak A.

Punkty MNiSW = 25 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

3. **2010 - PL 379795 (B1)** - Urządzenie do Automatycznej Biodetekcji Toksyczności Ogólnej Wody (ABTOW). Autorzy: **Woźnica A.**, Kliś Cz., Duda H., Dzirba J., Kosz K., Górny M., Mańka R.

Punkty MNiSW = 25 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

7. Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe:

Wzory użytkowe:

1. **2016 - Y1 068727:** Komora mikroinkubacyjna do obserwacji półpłynnego lub płynnego materiału, zwłaszcza biologicznego. Autorzy: **Woźnica A.**, Bernaś T.

Punkty MNiSW = 10 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

2. **2016 - Y1 068854:** Komora mikroinkubacyjna do perfuzji i obserwacji półpłynnego lub płynnego materiału, zwłaszcza biologicznego. Autorzy: **Woźnica A.**, Bernaś T.

Punkty MNiSW = 10 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

3. **2016 - Y1 068708:** Klatka do prowadzenia monitoringu stanu zdrowia zwierząt i eksperymentów, zwłaszcza na rybach w mezokosmach. Autorzy: Augustyniak M., Migula P., **Woźnica A.**, Mańka R., Sabatowski P. (**wdrożony w GPW S.A. w Katowicach do kontroli obecności geosmin w wodach**)

Punkty MNiSW = 10 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

Zgłoszenia patentowe:

1. **2017 - PCP/PL2017/050034** "Method of waterbody measurements and a set for conducting waterbody measurements". Autorzy: **Woźnica A.**, Łozowski B., Pasierbiński A., Karpiński J.

Punkty MNiSW = 2 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

2. **2016** – „Sposób przygotowania próby do badania mikrotomograficznego i metoda obrazowania morfologii i struktury wewnętrzne”. Autorzy: **Woźnica A.**, Karcz J., Binkowski M., Karczewski J.

Punkty MNiSW = 2 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

3. **2016** - UPRP „Sposób pomiaru akwenów i zestaw do pomiaru akwenów”. Autorzy: **Woźnica A.**, Łozowski B., Pasierbiński A., Karpiński J.

Punkty MNiSW = 2 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

4. **2013** - UPRP: **A1 P.404131** – „System oraz sposób szacowania liczebności ryb w zbiornikach wodnych”. Autorzy: Koprowski R., Łozowski B., **Woźnica A.**, Migula P., Wróbel Z., Karczewski J., Piasecki M.

Punkty MNiSW = 2 (wg Rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.)

8. Projekty badawcze krajowe i międzynarodowe

1. **2018** – Polimerowe nanowarstwy funkcjonalne i technologia modyfikowania puchu w aspekcie konstruowania odzieży ekstremalnej (**członek zespołu, koordynator i wykonawca analiz biologicznych**). Inkubator Innowacyjności Plus: przyznane finansowanie (60 tys.pln).
2. **2018** – Kompleksowa analiza stanu zbiornika Rogoźnik I z przedstawieniem propozycji ewentualnych rozwiązań naprawczych (**kierownik projektu**). Podpisana umowa na realizację, finansowanie: gmina Bobrowniki (100 tys. PLN).
3. **2016** - Ocena stanu ekologicznego Jeziora Paprocany wraz z opracowaniem programu naprawczego i wytycznych do jego wdrożenia (**kierownik projektu**). Projekt rozliczony, finansowanie Gmina Miasta Tychy Tychy (245 tys. PLN).
4. **2016 - 2019** - **Interreg Central Europe, Environmental and cultural resources: PROLINE-CE** partner – przygotowanie wniosku aplikacyjnego, (**wykonawca**, w trakcie realizacji. koordynator: prof. Dr hab. Andrzej Witkowski).
5. **2015** - Waloryzacja stanu ekologicznego zbiornika Sosina w Jaworznie wraz z wytycznymi do projektu jego rekultywacji (**koordynator**). Projekt rozliczony, finansowanie Gmina Miasta Jaworzno (150 tys. PLN).
6. **2014-2018** - Utrzymanie trwałości i wdrożenie produktów Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego POIG 01.01.02-24-078/09 (**koordynator**, w trakcie realizacji).
7. **2010 – 2014** - Zintegrowany system wspomagający zarządzaniem i ochroną zbiornika zaporowego POIG 01.01.02-24-078/09 (**z-ca koordynatora**). Projekt rozliczony (w trakcie utrzymania trwałości projektu), (19,6 mln. PLN).

PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Dane bibliometryczne i dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora i po uzyskaniu stopnia doktora. Dane według bazy Web of Science z dnia 11 kwietnia 2018 roku.

Okres	Rodzaj publikacji/dorobku naukowego	Liczba	Wskaźnik IF ₁ */IF ₅	Punkty MNiSW	Liczba cyt./autocyt. (WoS)
Przed doktoratem	Publikacje artykułów z listy JCR (zał. 3, A.1.)	3	1,237	13	-
	Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt A (zał. 3, B.1.)	4	-	-	-
	Sumaryczny IF ₁ wg listy JCR	-	1,237	-	-
	Suma punktów MNiSW	-	-	13	-
	Liczba cytowań publikacji wg Web of Science (WoS)	-	-	-	0
Po doktoracie	Artykuły (4) i patent (1) stanowiące osiągnięcie naukowe (zał. 3, I.A)	5	12,023/ 14,516	156	27/6
	Inne artykuły z listy JCR (zał. 3, II.A.2.)	7	10,735/ 12,365	155	39/1
	Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt A (zał. 3, II.B.2.)	12	-	61	-
	Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe (zał. 3, II.C)	3	-	80	-
	Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych i krajowych wystawach oraz targach (zał. 3, II.D)	7	-	38	-
	Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych oraz ekspertyzy (zał. 3, II.E)	8	-	-	-
	Sekwencje nukleotydowe opublikowane w bazie National Center for Biotechnology Information (GenBank) (zał. 3, II.F)	6	-	-	-
	Wdrożenia i aplikacje (zał. 3, II.G)	37	-	50**+20	-
	Sumaryczny IF wg listy JCR	-	23,995/ 26,881	-	-
	Suma punktów MNiSW (zał. 3, I)	-	-	573	-
	Liczba cytowań publikacji wg Web of Science (WoS) (zał. 3, J)	-	-	-	66/7
	Indeks Hirscha (zał. 3, K)		5		

JCR – Journal Citation Reports, Thomson Reuters, * - Sumaryczny wskaźnik Impact Factor publikacji naukowych według listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania); ** 50 punktów za komercjalizację wyniku z przeliczenia 1 pkt za 10 tys PLN uzyskanych w wyniku wdrożenia, 20 pkt wynika z wdrożenia wzorów użytkowych (2 wdrożenia po 10 pkt).

Katowice, dnia 22 maja 2018 r.

Andrzej Woźnica