



**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE**

Małgorzata Majewska

*Zakład Mikrobiologii Środowiskowej
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii*

**Udział mikroorganizmów i składników glebowych
w transformacjach kadmu zakumulowanego
w korzeniach roślin trawiastych**

Lublin 2018

dr Małgorzata Majewska
Zakład Mikrobiologii Środowiskowej
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
majewska@poczta.umcs.lublin.pl
tel. (081) 537-59-20, fax. (081) 537-59-59

AUTOREFERAT

I. Imię i Nazwisko: Małgorzata Majewska

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

1996 Dyplom magistra biologii - specjalność mikrobiologia

Wydany przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
(od roku 2011 Wydział Biologii i Biotechnologii)
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Tytuł pracy: Bioremediacja in situ gleby skażonej produktami ropopochodnymi
(przemywanie profili glebowych)

Promotor: prof. dr hab. Ewa Kurek

2003 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii

Nadany Uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi
(od roku 2011 Wydział Biologii i Biotechnologii)
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Tytuł pracy: Rola mikroorganizmów w procesach sorpcji i desorpcji kadmu
w glebie

Promotor: prof. dr hab. Ewa Kurek

Studia podyplomowe

2007 Świadectwo ukończenia podyplomowych studiów rolniczych dla absolwentów
kierunków nierolniczych wydane przez Wydział Rolniczy Akademii Rolniczej w
Lublinie (Obecnie Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie)

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.04.1996 — 31.03.1997

asystent stażysta
w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

01.04.1997 — 29.02.2004

asystent
w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

01.03.2004 — 30.09.2016

adiunkt
w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

od 01.10.2016

asystent
w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Tytuł magistra biologii (specjalność mikrobiologia) otrzymałam 20 lutego 1996 roku. Pracę magisterską zatytułowaną „Bioremediacja *in situ* gleby skażonej produktami ropopochodnymi (przemywanie profili glebowych)” wykonałam w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej pod kierunkiem prof. dr. hab. Ewy Kurek. Badania prowadzone w ramach pracowni specjalizacyjnej i magisterskiej stanowiły istotną część projektu realizowanego przez Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Okręgową Dyрекcję Centrali Produktów Naftowych w Lublinie pt. „Modyfikacja środowiska glebowego zanieczyszczonego produktami ropopochodnymi sprzyjająca intensywnej degradacji tych produktów przez natywną mikroflorę (na przykładzie gleby skażonej w ZGPN nr 1 w Zawadówce)”. Obiektem badań były dwa profile glebowe sięgające do lustra wód podziemnych pobrane na terenie stacji przeładunkowej ropy i produktów naftowych w Zawadówce koło Chełma (teren dawnego ZGPN nr 1). Oba profile były przemywane płynami o zmieniającym się w trakcie przemywania stężeniu związków odżywczych (od 0 do 0,05% NH_4NO_3 i K_2HPO_4) i związków powierzchniowo czynnych (od 0 do 0,01% detergentu). Stwierdzono postępującą w czasie biodegradację produktów ropopochodnych i zmiany ilościowe i jakościowe w zespole mikroorganizmów degradujących węglowodory. Procesowi bioremediacji

towarzyszyło uwalnianie węglowodorów uprzednio scementowanych przez składniki glebowe i ich przemieszczanie do górnych części profilu glebowego. Migrację skażenia zwiększała obecność detergentu w płynie przemywającym a efektem transformacji wprowadzonych związków azotu był wzrost stężenia nitrozoamin i jonów azotynowych w odciekach. Perkolacja profili glebowych spowodowała również ubytek jonów Ca i Mg w oczyszczanej glebie. Udowodniłam, że przemywanie skażonej gleby było skuteczną metodą bioremediacji, jednak wymagającą nieprzerwanego monitoringu. Uzyskaniu pozytywnego efektu, jakim była biodegradacja węglowodorów, towarzyszyło powstawanie podczas przemian mikrobiologicznych toksycznych azotynów i nitrozoamin oraz ich wypłukiwanie do wód gruntowych równocześnie z jonami Mg i Ca.

W roku 1996 zrealizowałam zadanie badawcze pt. „Uwalnianie Cd ze składników glebowych wysyconych Cd *in vitro* po wprowadzeniu ich do gleby” będące częścią projektu nr 6 P205 036 07 (grant KBN 1994-96). Na podstawie wyników tych badań udowodniłam, że zarówno *in vitro* jak i w warunkach glebowych, kadm zimmobilizowany przez kwasy huminowe powstające w glebie podczas humifikacji skażonych kadmem resztek roślinnych był stabilniejszy (w mniejszym stopniu poddający się ekstrakcji 0,02M EDTA) w porównaniu do Cd zimmobilizowanego przez montmorylonit, preparat handlowy kwasów huminowych oraz biomasę bakteryjną (*Arthrobacter* sp. LII). Kadm unieruchomiony przez w/w składniki glebowe dodany do gleby nie wpływał negatywnie na wzrost sałaty głowiastej (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). Chociaż akumulacja kadmu w korzeniach roślin nie była zależna od formy w jakiej metal został wprowadzony do gleby, to jednak jego translokacja z korzeni do części nadziemnych była istotnie najniższa u roślin hodowanych na glebie uzupełnionej żywymi komórkami *Arthrobacter* sp. LII wysyconymi Cd. Wyniki tych badań przedstawiłam na sympozjum naukowym, którego temat przewodni brzmiał „Drobnoustroje a życie gleby” (1) oraz w publikacji naukowej wydanej w 1998 roku (2).

Badania prowadzone przeze mnie w kolejnych latach dotyczyły immobilizacji i mobilizacji kadmu w środowisku glebowym a także wpływu na te procesy aktywności mikrobiologicznej. Oprócz składników glebowych takich jak montmorylonit, kwasy huminowe oraz biomasę *Arthrobacter* sp. LII zastosowałam także krystaliczny i amorficzny (świeżo wytrącony $\text{Fe}(\text{OH})_3$) getyt oraz żywą i martwą grzybnię *Trichoderma koningii* (szczep Tk3Ag0) i *Fusarium culmorum* (szczep Fc1). Szczepy tych grzybów, jak również szczep *Arthrobacter* sp. LII, zostały wyizolowane z ryzosfery rośliny zbożowej (żyta) i znajdują się w kolekcji mikroorganizmów Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej. Wykonywałam zadania badawcze realizowane w ramach działalności statutowej Wydziału

Biologii i Biotechnologii (do roku 2011 Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi) oraz byłam głównym wykonawcą projektu nr 6 P04C 045 21 (grant KBN 2001-2004) pt. „Rola mikroorganizmów w procesach sorpcji i desorpcji kadmu w glebie”.

W badaniach prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora (lata 1998-2003):

1. określiłam zdolności sorpcyjne składników glebowych (biomasy *Arthrobacter* LII, *Trichoderma koningii* oraz montmorylonitu, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, getytu i kwasów huminowych) w układzie jedno- i wieloskładnikowym;
2. wyznaczyłam izotermę adsorpcji Cd na powyższych składnikach glebowych w zależności od czasu inkubacji, temperatury i pH roztworu inkubacyjnego;
3. porównałam mobilizację Cd ze składników glebowych (*in vitro*) przez:
 - a. roztwory soli obojętnych (NaNO_3 , CaCl_2),
 - b. roztwór związku kompleksującego (EDTA),
 - c. wodny wyciąg glebowy wzbogacony i nie wzbogacony zewnątrzkomórkowymi metabolitami mikroorganizmów glebowych;
4. określiłam biodostępność Cd oraz wpływ aktywności mikroorganizmów glebowych (analizy gleb pozbawionych aktywnych mikroorganizmów i gleb sterylnych szczepionych zawiesiną glebową zawierającą naturalny dla tej gleby zespół mikroorganizmów) na dystrybucję Cd wprowadzonego w formie zimmobilizowanej przez składniki glebowe oraz jonowej pomiędzy frakcje o różnej mobilności (sekwencyjna ekstrakcja skażonych gleb);
5. prześledziłam zmiany ogólnej liczebności mikroorganizmów a także zmiany w zespole mikroorganizmów glebowych na podstawie wskaźników ekofizjologicznych tj. indeks CD (*ang.* colony development index), indeks EP (*ang.* ecophysiological index) oraz metodą Hattori’ego, w zależności od formy wprowadzonego metalu (CdCl_2 lub zimmobilizowany);
6. wyznaczyłam wydajność desorpcji Cd ze skażonych gleb (gleba nawożona osadem ściekowym, superfosfatem oraz pochodząca z terenu Huty Cynku w Miasteczku Śląskim) przez wyciągi glebowe i jego sorpcji przez składniki glebowe.

Wyniki uzyskane podczas realizacji powyższych zadań (punkty 1-5) były przedmiotem rozważań zawartych w mojej rozprawie doktorskiej pt. „Rola mikroorganizmów w procesach sorpcji i desorpcji kadmu w glebie” obronionej 12 listopada 2003 roku.

Powadzone przeze mnie badania wykazały, że wydajność immobilizacji Cd przez biomasę mikroorganizmów glebowych była wyższa niż przez składniki abiotyczne. Jednak ze względu na większy procentowy udział elementów abiotycznych w fazie stałej gleby mogły one immobilizować więcej Cd niż składniki biotyczne. Zatem, faza stała gleby zapewnia szybką immobilizację kadmu oraz odpowiada za ustalenie równowagi między procesami

sorpcji i desorpcji kationów. Na ilość kadmu ulegającego desorpcji z biotycznych i abiotycznych składników glebowych, zarówno w badaniach *in vitro* jak i po ich wprowadzeniu do gleby, miały wpływ: reakcje wymiany jonowej, chelatowanie jonów kadmu przez związki rozpuszczone w roztworze glebowym oraz pośrednio mikroorganizmy modyfikujące skład roztworu glebowego. Udowodniłam, że stężenie Cd biodostępnego w glebie było kontrolowane przede wszystkim przez frakcję tlenków oraz wodorotlenków Fe i Mn a aktywność mikroorganizmów istotnie obniżała procentowy udział frakcji Cd biodostępnego w glebie uzupełnionej Cd w formie zimmobilizowanej przez testowane składniki glebowe lub CdCl_2 . Mikroorganizmy modyfikowały skład roztworu glebowego (spadek stężenia Cd), odczyn gleby (wzrost wartości pH) oraz funkcjonowały jako biosorbenty (fakt ten wykazano w badaniach *in vitro*). Kadm niezależnie od tego, czy został wprowadzony do gleby w formie jonowej, czy zimmobilizowanej przez składniki glebowe był pobierany przez rośliny. Zanieczyszczenie gleby kadmem w stężeniu $10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ nie obniżyło istotnie statystycznie ogólnej liczebności mikroorganizmów glebowych, ale spowodowało obniżenie różnorodności fizjologicznej zespołu bakterii zasiedlających glebę wyznaczonej metodą Hattori'ego. Większość komórek wykazywała stan spoczynkowy (wygaszony metabolizm) lub przejściowy (umożliwiający rozpoczęcie proliferacji). Podatność zespołu oligotrofów na oddziaływanie kadmu w tym stężeniu była istotnie mniejsza niż koptotrofów. Ustaliłam, że w zespole mikroorganizmów zasiedlających skażoną glebę ($10 \mu\text{g Cd} \cdot \text{g}^{-1}$) dominowały bakterie wolno rosnące, wykazujące strategię życia typu K.

Część wyników uzyskanych w latach 1998-2003, poza rozprawą doktorską, została przedstawiona w dziesięciu komunikatach zjazdowych (od 3 do 7 - konferencje międzynarodowe, od 8 do 12 - konferencje krajowe). W tym czasie przygotowałam również pracę przeglądową (13) oraz byłam współautorem rozdziału w monografii (14).

Publikacje i doniesienia konferencyjne przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Kurek E., **Majewska M.**, 1997, Biodostępność kadmu zimmobilizowanego przez składniki glebowe. Ogólnopolskie Sympozjum – Drobnoustroje a życie gleby, 4-6 września, Kraków, str. 30
2. Kurek E., **Majewska M.**, 1998, The release of Cd-immobilized by soil constituents and its bioavailability. *Toxicological and Environmental Chemistry* 67:237-249).

IF₁₉₉₈ = 0

IF₂₀₁₆ = 0,795

MNiSW₂₀₁₆ = 15 pkt.

3. Kurek E., **Majewska M.**, 1999, Distribution of cadmium fraction introduced to soil as immobilized by biotic and abiotic soil constituents. International Conference & Congress of the Polish Society of Soil Science – Role of soil in functioning of ecosystems. 7-10 September, Lublin, p. 238
4. Kurek E., **Majewska M.**, 2000, Sensitivity of fungi isolated from rye rhizosphere to cadmium and immobilization of this metal from culture medium. III Conference on Trace Metals – Effects on organisms and environment. 6-8 June, Sopot, p. 219
5. Kurek E., **Majewska M.**, 2001, Fungi – a factor affecting Cd sorption/desorption processes between soil phase and soil solution. 15th International Symposium on Environmental Biogeochemistry. Biogeochemical Processes and Cycling of Elements in the Environment, 11-15 September, Wrocław, p. 285-286
6. Kurek E., **Majewska M.**, 2003, Tlenki Fe i Mn regulatorem zawartości puli biodostępnego Cd w glebie. The 38th International Microbiological Symposium – Effective Microorganisms (EM) in sustainable Agriculture and Environmental Protection., 1-4 September, Warszawa-Rogów k/Łodzi, pp. 63-64
7. Kurek E., **Majewska M.**, 2004, Microbial activity – a factor affecting Cd retention in soil. Geophysical Research Abstracts, Vol. 6, 06736; European Geosciences Union, 1st General Assembly, 25-30 April, Nice, France, Sref-ID: 1607-7962/gra/EGU04-A-06736
8. Kurek E., **Majewska M.**, 1998, Biodostępne frakcje Cd uwolnione ze składników glebowych w procesach biotycznych i abiotycznych. Ogólnopolskie Sympozjum – Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby, 6-9 wrzesień, Poznań-Kiekrz, str. 16
9. Kurek E., **Majewska M.**, 2000, Wzrost grzybów izolowanych z ryzosfery żyta w obecności kadmu i jego immobilizacja z roztworu. 35 Sympozjum Mikrobiologiczne, Drobnoustroje środowiska glebowego – aspekty fizjologiczne, biochemiczne i genetyczne. 6-8 września, Toruń-Bachotek
10. Kurek E., **Majewska M.**, 2001, Aktywność mikrobiologiczna jako czynnik modyfikujący zawartość frakcji resztkowej kadmu w glebie. Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne, Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach, 6-8 września, Kraków, str. 47-48
11. Kurek E., **Majewska M.**, 2001, Zmiany zawartości „biodostępnej” frakcji kadmu w glebie jako rezultat aktywności mikrobiologicznej. Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne, Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach, 6-8 września, Kraków, str. 48-49
12. Kurek E., **Majewska M.**, 2002, Sorpcja Cd przez biotyczne i abiotyczne składniki glebowe. 37 Sympozjum Mikrobiologicznego, Rola drobnoustrojów w kształtowaniu środowiska, 4-6 września, Olsztyn-Waplewo, str. 76-77
13. **Majewska M.**, Kurek E., 2002, Mikroorganizmy – czynnikiem modyfikującym stężenia kadmu w roztworze glebowym. Postępy Nauk Rolniczych 1/295, 3-13
14. Kurek E., Francis A.J., Bollag J.-M., Czaban, Kaczorowska R., Ochal M., Puacz E., Patkowska E. **Majewska M.**, 2000. Soil constituents – factors modulating the cadmium toxicity and bioavailability. [in] Mechanisms of cadmium activity. Ecology of the Polish-Ukrainian Border Area. Polish Academy of Science, Branch in Lublin, str. 34-50

MNiSW₂₀₁₆ = 5 pkt

IV. 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

Udział mikroorganizmów i składników glebowych w transformacjach kadmu zakumulowanego w korzeniach roślin trawiastych

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- H1. Majewska M., Kurek E., Rogalski J. 2007**
Microbiologically mediated cadmium sorption/desorption processes in soil amended with sewage sludge. *Chemosphere* 67: 724-730
IF₂₀₀₇ = **2,739** IF₂₀₁₆ = **4,208** MNiSW₂₀₁₆ = **35**
- H2. Majewska M., Kurek E., Słomka A. 2011**
Effect of plant growth on total concentrations of Zn, Pb, and Cd, and their distribution between operational fractions in the upper layer of a 100-year-old zinc-lead waste heap. *Polish Journal of Environmental Studies* 20(3):591-597
IF₂₀₁₁ = **0,508** IF₂₀₁₆ = **0,793** MNiSW₂₀₁₆ = **15**
- H3. Majewska M., Kurek E. 2011**
Effect of Cd concentration in growth media on *Secale cereale* roots and Cd interaction with rhizosphere microorganisms originated from different parts of the grain. *European Journal of Soil Biology* 47:95-101
IF₂₀₁₁ = **1,578** IF₂₀₁₆ = **2,445** MNiSW₂₀₁₆ = **30**
- H4. Kurek E., Majewska M. 2012**
Microbially mediated transformations of heavy metals in rhizosphere. A. Zaidi, P.A. Wani, M.S. Khan (eds), *Toxicology of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*, Springer-Verlag, Wien, pp. 129-146
IF₂₀₁₂ = **0** IF₂₀₁₆ = **0** MNiSW₂₀₁₆ = **5**
- H5. Majewska M., Słomka A. 2016**
Levels of organic compounds, number of microorganisms and cadmium accumulation in *Festuca ovina* hydroponic culture. *Polish Journal of Microbiology* 65(2):191-200
IF₂₀₁₆ = **0,745** MNiSW₂₀₁₆ = **15**
- H6. Majewska M., Jaroszuk-Ścisiel J. 2017**
Mobilization of cadmium from *Festuca ovina* roots and its simultaneous immobilization by soil in a root-soil-extractant system (*in vitro* test). *International Journal of Phytoremediation*, 19(8):701-708
IF₂₀₁₆ = **1,770** MNiSW₂₀₁₆ = **25**
- H7. Majewska M. 2017**
Mobilization of cadmium from *Festuca ovina* roots and its distribution between operational fractions in soil. *Polish Journal of Soil Science*, 50(2):141-154
IF₂₀₁₆ = **0** MNiSW₂₀₁₆ = **14**

- c) Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Kadm oraz inne metale ciężkie występują w glebie w różnych formach chemicznych i określenie całkowitego ich stężenia nie jest wystarczające, aby ocenić ich toksyczność, mobilność oraz biodostępność (Conesa i in. 2010, Bolan i in. 2014). Na podstawie siły wiązania metali przez składniki fazy stałej gleby wyodrębniono siedem geochemicznych frakcji różniących się mobilnością i biodostępnością (Conesa i in. 2010, Stritsis i in. 2014). Frakcje te, zaczynając od najłatwiej pobieranej przez organizmy, można uszeregować w następujący sposób: frakcja wodna (metale obecne w roztworze glebowym w formie jonowej lub skompleksowanej), frakcja jonowymienna (metale zaadsorbowane przez cząstki glebowe), frakcja węglanowa (metale powierzchniowo związane lub współstrącone z solami węglanowymi), frakcja metalu związana z tlenkami manganu, frakcja metalu związana z krystalicznymi i amorficznymi tlenkami żelaza, frakcja organiczna (metale skompleksowane i wbudowane w próchnicę) oraz metale obecne w strukturze minerałów glebowych (tzw. frakcja resztkowa). Specjacja chemiczna metali ustalona w danych warunkach glebowych nie jest zjawiskiem stałym i możliwa jest ich redystrybucja pomiędzy wymienionymi frakcjami (Majewska i Kurek 2007, Kabata-Pendias 2011, Oves i in. 2012). Ilość metalu obecnego w roztworze glebowym (faza ciekła gleby) zależy od równowagi pomiędzy procesami mobilizacji i immobilizacji metali, natomiast te są kontrolowane przez właściwości fizykochemiczne gleby (np. pH, pojemność wymiany kationów, rozmiar cząstek, zawartość i rodzaj materii organicznej gleby), aktywność i różnorodność mikroorganizmów glebowych oraz wzrost i rozwój roślin (Bolan i in. 2014, Stritsis i in. 2014; Li i in. 2016).

W glebie istnieje ciągła wymiana (tzw. dynamiczna równowaga) pomiędzy jonami wolnymi (kationy proste lub jony kompleksowe metali obecne w fazie wodnej) i zaadsorbowanymi na składnikach fazy stałej gleby. Zatem skład roztworu glebowego jest zmienny i ulega ciągłym modyfikacjom (Laudicina i in. 2013). Wydzieliny korzeniowe mogą być źródłem substancji odżywczych dla mikroorganizmów ryzosferowych, które w tej strefie gleby są liczniejsze i bardziej aktywne (efekt ryzosferowy) niż w glebie wolnej od korzeni (Massaccesi i in. 2015). Mikroorganizmy glebowe mineralizują rozpuszczone w roztworze glebowym substancje odżywcze (Hütsch i in. 2002), ale też wydzielają własne metabolity (np. kwasy organiczne, siderofory, biosurfaktanty) tworzące z metalami kompleksy o różnej stabilności i mobilności (Li i in. 2016; Tahervand i Jilali 2016; Karimzadeh i in. 2017). Od

liczebności mikroorganizmów, typu i ich aktywności zależą właściwości roztworu glebowego mającego wpływ na procesy sorpcji/desorpcji w glebie oraz na ilość metalu akumulowanego w tkankach roślin. Bakterie ryzosferowe, ulegając selekcji w kierunku tolerujących skażenie (Kao i in. 2006), mogą działać jako bariera ochronna ograniczająca dostęp toksyny do korzenia (Amabilis-Sosa i in. 2015), produkować analogi hormonów wzrostu, precypitować toksyczny metal, ułatwiać pobieranie związków Fe P, K i w rezultacie podnosić plon oraz zdolność kiełkowania nasion (Lebeau i in. 2011).

Akumulację metali ciężkich w tkankach roślin (fitoekstrakcja) lub stabilizację w ich ryzosferze (fitostabilizacja) wykorzystuje się do rekultywacji zanieczyszczonego środowiska. Fitostabilizacja jest efektywna w przypadku terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi i może być stosowana jako dopełnienie remediacji tradycyjnymi metodami fizyko-chemicznymi, bądź w tych miejscach, gdzie dopuszczalny jest wyższy poziom zanieczyszczenia, ale w formie nieprzyswajalnej (Sarwar i in. 2017). Technika ta może być też wykorzystywana do odtworzenia szaty roślinnej na terenach, gdzie nastąpił jej zanik w wyniku wysokich stężeń metali ciężkich w powierzchniowej warstwie gleby i do przywrócenia naturalnego piękna danego terenu. Rośliny wykazują pewien stopień tolerancji na różne skażenia (Lange i in. 2017), dlatego mogą być stosowane w miejscach, gdzie nagromadzenie metali jest w granicach tolerowanych przez daną roślinę oraz gdy są zapewnione warunki sprzyjające wzrostowi rośliny (Sarwar i in. 2017). Z tego względu przed wprowadzeniem roślin na teren skażony metalami ciężkimi korzystne jest stosowanie zabiegów przygotowawczych typu: wapnowanie w celu ustalenia pH na poziomie wyższym niż 5, immobilizacja metali poprzez aplikację kompostu (uzyskanego z osadów ściekowych lub frakcji organicznej odpadów komunalnych), tlenków i wodorotlenków Fe i Mn, glinokrzemianów, ilów, zeolitów, hydroksyapatytów, poprawianie jakości gleby poprzez nawożenie mineralne i organiczne. Zabiegi te wzmacniają kolonizację terenu przez odpowiednie rośliny. Uprawa różnych gatunków traw i roślin bobowatych jest zdolna przywrócić żyzność gleby i rozszerzyć sukcesję ekologiczną (Lange i in. 2017; Sarwar i in. 2017; Sobariu i in. 2017).

Główny cel fitostabilizacji, jakim jest przeprowadzenie metali w formę nierozpuszczalną (wyeliminowanie ich z roztworu glebowego), nie jest jednak skutecznym rozwiązaniem problemu, ponieważ metal pozostaje nadal w podłożu. Nieustannie zachodzące procesy mineralizacji obumierających korzeni oraz części nadziemnych roślin uwalniają do środowiska nie tylko makro- i mikroelementy ale również wcześniej pobrane przez rośliny pierwiastki toksyczne (Van Nevel i in. 2014). W uruchamianie zimmobilizowanego metalu

mogą być zaangażowane również związki mineralne i organiczne powstające w wyniku wcześniejszej lub aktualnej aktywności mikroorganizmów ryzosferowych. Intensywny wzrost i rozwój mikroorganizmów może być przyczyną wystąpienia nagłego uruchomienia wcześniej zimmobilizowanego metalu. W związku z tym nasuwa się pytanie: jak trwała jest immobilizacja metalu przez rośliny oraz kiedy i w jakich warunkach może dojść do uruchomienia zanieczyszczenia?

Opierając się na danych bibliograficznych oraz badaniach prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej, które wskazują na bardzo ważny udział mikroorganizmów w stabilizacji kadmu w glebie wolnej od korzeni opracowałam plan badań, który - jak założyłam - pozwoli mi znaleźć odpowiedź na postawione powyżej pytanie.

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie:

- szybkości i wydajności uruchamiania kadmu uprzednio zimmobilizowanego w biomasy korzeni dwóch gatunków roślin (*Festuca ovina* i *Secale cereale*) przez wodne wyciągi glebowe oraz jego immobilizacji przez składniki fazy gleby (publikacje **H3**, **H5**, **H6**)
- dystrybucji kadmu w glebie pomiędzy frakcje wyznaczone metodą sekwencyjnej ekstrakcji po jego uwolnieniu z biomasy korzenia: testy *in vitro* z wykorzystaniem systemu wielokomorowego (publikacja **H6**) oraz *in vivo* – hodowle doniczkowe (publikacja **H7**).
- efektywności stabilizacji Cd w glebie: (1) nawożonej osadem ściekowym (publikacja **H1**), (2) spod uprawy trawy *Festuca ovina* (publikacja **H7**) oraz (3) pochodzącej z obszaru składowania odpadów poflotacyjnych z kopalni rudy Zn-Pb porośniętego roślinnością oraz pozbawionego szaty roślinnej (publikacja **H2**).

Nowatorskim rozwiązaniem prowadzonych przeze mnie badań było zastosowanie układu wielokomorowego składającego się z 3 lub 7 połączonych komór (odpowiednio do potrzeb eksperymentu), pomiędzy którymi umieszczono membrany o średnicy porów 0,4µm, umożliwiające wymianę fazy ciekłej a zatrzymujące migrację cząstek stałych. Tego typu układ dał mi możliwość stworzenia warunków symulujących, choć w pewnym stopniu, dynamikę procesów równoczesnej sorpcji i desorpcji jakie zachodzą w naturalnym środowisku. Użycie układu wielokomorowego umożliwiło: (1) przeanalizowanie

oddziaływania aktywności mikrobiologicznej na zmiany pH i stężenia związków organicznych (metabolitów mikrobiologicznych i rozpuszczalnej glebowej substancji organicznej) w fazie ciekłej, (2) określenie wpływu tych czynników na uruchamianie Cd wprowadzonego do gleby jako element zanieczyszczający osad ściekowy lub z korzenia *Festuca ovina* oraz (3) porównanie resorpcji uwolnionego Cd przez wybrane składniki glebowe mające kontakt z metalem w tym samym czasie (przemieszczanie się Cd obecnego w fazie ciekłej krążącej pomiędzy naczyniami połączonymi).

Pierwsze badania wyjaśniające mechanizmy kontrolujące immobilizację kadmu w środowisku glebowym zrealizowałam w ramach pracy doktorskiej zatytułowanej „Rola mikroorganizmów w procesach sorpcji i desorpcji kadmu w glebie”. Określiłam pojemność sorpcyjną biomasy *Arthrobacter* sp. i *Trichoderma koningii* oraz porównałam je z pojemnością sorpcyjną geosorbentów takich, jak: montmorylonit, getyt, świeżo wytrącony Fe(OH) oraz kwasy huminowe (składnik próchnicy glebowej). Wyznaczyłam izotermę sorpcji kadmu dla wybranych biotycznych i abiotycznych składników glebowych przy różnych wartościach pH i temperatury. Określiłam również stabilność kadmu unieruchomionego przez wybrane składniki glebowe w warunkach *in vitro* (metodą ekstrakcji roztworami zawierającymi w swym składzie związki obecne w roztworze glebowym) oraz w warunkach glebowych. Wykazałam istotne różnice w aktywności i różnorodności mikrobiologicznej, jak również różnice w dystrybucji kadmu pomiędzy frakcje o różnej mobilności w glebie, która została uzupełniona jego różnymi formami (Cd zimmobilizowany przez w/w geosorbenty, biomasę mikrobiologiczną oraz CdCl₂).

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej pomijały biomasę korzeni roślin będącą istotnym elementem fazy stałej gleby (Ping i in. 2010). Korzenie są stabilizatorem powierzchni gleby a wraz ze swoim mikrobiomem są istotnym absorbentem i adsorbentem metali ciężkich. Korzenie roślin jednorocznych zamierają pod koniec sezonu wegetacyjnego i stanowią biomasę, która staje się substratem dla procesu humifikacji. Korzenie roślin wieloletnich również zamierają a ich obumieranie może być intensywniejsze w środowisku skażonym. Taka sytuacja powoduje, że oprócz biogenów, makro- i mikroelementów w obieg pierwiastków włączane są również metale ciężkie uprzednio zimmobilizowane w korzeniach roślin (Van Nevel i in. 2014).

Wykonany przy moim współudziale przegląd bibliografii (Kurek i Majewska 2012, H4) stanowi zbiór informacji na temat: (1) ryzosfery i mikroorganizmów ją zasiedlających, (2) efektu ryzosferowego, (3) toksyczności metali ciężkich dla roślin jak i mikroorganizmów glebowych, (4) immobilizacji, biodostępności i mobilności metali ciężkich w ryzosferze oraz

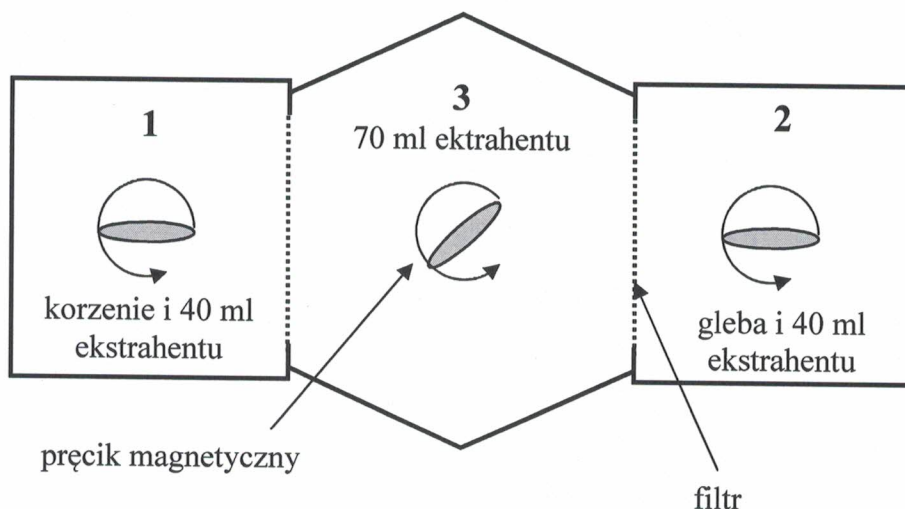
(5) roli mikroorganizmów w procesie fitoremediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. W przedstawionym opracowaniu (*Kurek i Majewska 2012, H4*) zwróciłam uwagę na znaczenie różnorodności i wielokierunkowości procesów biologicznych, fizycznych i chemicznych zachodzących w glebie ryzosferowej oraz wzajemnych interakcji roślin i mikroorganizmów dla wydajności fitoremediacji. W tej pracy opisałam również rolę metabolitów mikrobiologicznego pochodzenia (np. witaminy, fitohormony, kwasy, chelatory i czynniki indukujące odporność roślin na stres) pozytywnie oddziałujących na wzrost i rozwój roślin, mających pośrednie, ale równie istotne znaczenie dla efektywności zabiegów remediacyjnych. Zwróciłam uwagę na wzajemne i zrównoważone oddziaływania mikroorganizm—roślina—gleba, które są szczególnie pożądane podczas zabiegów fitoremediacyjnych, ponieważ procesy sorpcji i desorpcji zachodzące w tym trójelementowym systemie decydują o wielkości puli mobilnego i/lub biodostępnego metalu a przesunięcie równowagi w kierunku jednego z nich decyduje, czy fitoremediacja zostanie uzyskana w wyniku fitostabilizacji, czy raczej fitoekstrakcji.

W prowadzonych przeze mnie badaniach udowodniłam, że liczebność i różnorodność zespołu mikroorganizmów, jak również jego adhezyjność do powierzchni korzeni jest bardzo istotna dla procesu fitostabilizacji Cd (*Majewska i Kurek 2011, H3*). Korzenie roślin zasiedlone przez liczniejszy i bardziej zróżnicowany zespół mikroorganizmów stabilizowały kadm efektywniej niż korzenie roślin uzyskanych z nasion jałowionych powierzchniowo. Zaobserwowałam, że w warunkach stresu kadmowego ($10 \mu\text{g Cd ml}^{-1}$ płynnego podłoża) korzenie żyta (*Secale cereale*) wyhodowanego z nasion niesterylizowanych były zasiedlone przez około 4 razy liczniejszy zespół mikroorganizmów (inokulum stanowiły zarówno bakterie zasiedlające wnętrze jak i powierzchnię nasion) a z ich powierzchni ekstrahowałam 2 razy więcej związków kompleksujących w porównaniu do korzeni roślin uzyskanych z nasion sterylizowanych powierzchniowo zasiedlonych jedynie przez mikroorganizmy pochodzenia endofitycznego. Stwierdziłam również, że w hydroponicznych hodowlach roślin uzyskanych z nasion powierzchniowo sterylizowanych proporcje pomiędzy liczebnością mikroorganizmów zawieszonych podłożu wzrostu roślin a liczebnością mikroorganizmów zasiedlających powierzchnię korzeni (średnio 7:1) były odwrócone w porównaniu do hodowli roślin uzyskanych z nasion niesterylizowanych (średnio 1:12). Uważam zatem, że w mocniej zróżnicowanym zespole mikroorganizmów występowały interakcje ułatwiające bakteriom zasiedlanie powierzchni korzeni. Uruchamianie metalu metodą ekstrakcji z korzeni roślin zasiedlonych przez zespół bakterii pochodzących od drobnoustrojów zasiedlających wnętrze jak i powierzchnię nasion oraz pokrytych przez związki organiczne pochodzenia

mikrobiologicznego i roślinnego było istotnie mniej wydajne niż z korzeni roślin pozbawionych tak różnorodnej powierzchniowej bariery ochronnej (Majewska i Kurek 2011, H3). Bardzo istotnym dla zabiegów fitoremediacyjnych wydaje się również fakt, że rośliny skolonizowane przez mieszany zespół mikroorganizmów osiągnęły większą biomasę niż rośliny o uboższym mikrobiomie (Majewska i Kurek 2011, H3). Badania prowadzone na innym obiekcie (trawa, *Festuca ovina* var. Bornito) potwierdziły stymulację wydzielania do podłoża i odkładania na powierzchni korzeni różnych związków organicznych w wyniku działania stresu kadmowego. Z korzeni roślin hodowanych w obecności $10 \mu\text{g Cd ml}^{-1}$ podłoża ekstrahowałam zarówno wodą, jak i $0,1\text{M NaNO}_3$ (roztwór symulujący siłę jonową roztworu glebowego) istotnie więcej: (1) Cd w formie jonowej (oznaczenie wykonane elektrodą kadmową) i metalu związanego z rozpuszczalnymi związkami organicznymi (różnica pomiędzy całkowitym stężeniem Cd a stężeniem Cd^{+2}), (2) komórek bakterii, (3) chelatorów żelaza (np. sideroforów hydroksamowych i katecholowych), (4) białek i (5) cukrów redukujących niż z korzeni roślin hodowanych w obecności $1 \mu\text{g Cd ml}^{-1}$ (Majewska i Słomka 2016, H5). Wnioskuje zatem, że również w przypadku *F. ovina* zwiększenie odkładania ryzodepozytów w efekcie stresu kadmowego stymulowało wzrost i rozwój mikroorganizmów, które łącznie z nimi pokrywały korzeń ograniczając bioakumulację i toksyczność tego metalu (Majewska i Słomka 2016, H5).

Kolejną serię badań przeprowadziłam z zastosowaniem specjalnie w tym celu opracowanego układu trójkomorowego (układ 3 naczyń połączonych: (1) korzeń, (2) gleba zawieszona w ekstrahencie oraz (3) naczynie zawierające jedynie ekstrahent, rozdzielonych filtrem o średnicy porów $0,4 \mu\text{m}$). Taki układ zapewniał swobodny ruch ekstrahentu a zatrzymywał przemieszczanie się cząstek stałych do innych przedziałów układu niż wyznaczony. Udowodniłam, że metal uprzednio zimmobilizowany przez korzeń jest stopniowo uwalniany przez wyciąg glebowy a w krążącym medium brak formy jonowej kadmu (formy o najwyższej toksyczności dla organizmów). Fakt ten tłumaczę wiązaniem przez składniki mineralne i/lub organiczne obecne w wyciągu glebowym oraz uwalnianiem z korzenia Cd w formie skompleksowanej (Majewska i Jaroszek-Ścisła 2017, H6). Zastosowanie w tych badaniach układu naczyń połączonych pozwoliło także na przeanalizowanie efektywności mobilizacji kadmu z korzenia z równocześnie zachodzącą jego immobilizacją przez glebę. Dzięki tak zaplanowanemu doświadczeniu (Majewska i Jaroszek-Ścisła 2017, H6) udowodniłam korelację między składem roztworu ekstrahującego a ilością Cd immobilizowanego przez frakcję organiczną gleby. Im ekstrahent zawierał więcej różnorodnych związków organicznych, tak jak np. wyciąg glebowy, tym większą

stwierdzałam pulę Cd stabilizowaną przez glebową substancję organiczną (próchnicę). Ten rodzaj immobilizacji Cd uznałam za trwały, ponieważ metal zawarty w tej frakcji został uwolniony dopiero po chemicznej mineralizacji substancji organicznej (roztwór 0,02 M HNO_3 w 30% H_2O_2 , temperatura 85°C). Zatem stosowanie nawożenia organicznego (obornik, kompost, osad ściekowy, resztki poźniwne) umożliwia zwiększenie ilości próchnicy, czynnika wydajnie immobilizującego metale w glebie.



Schemat układu trójkomorowego

Wiadomym jest, że osad ściekowy często stosowany jest jako kondycjoner glebowy poprawiający jej właściwości biologiczne i fizyko-chemiczne, jednak może on też być źródłem toksycznych metali. W badaniach dotyczących desorpcji i resorpcji kadmu w glebie uzupełnionej osadem ściekowym zastosowałam zmodernizowany system naczyń połączonych, w którym liczba komór bocznych została zwiększona do sześciu (1 – gleba, 2 – biomasa bakteryjna, 3 – biomasa grzybowa, 4 – kwasy huminowe, 5 – montmorylonit, 6 – getyt). Metal uwolniony z gleby znajdującej się w naczyniu nr 1 przez krążący w tym systemie wyciąg glebowy był transportowany do naczyń sąsiednich i immobilizowany przez umieszczone w nich sorbenty. Przeprowadzone przeze mnie badania udowodniły, że Cd zawarty w osadzie ściekowym, którym 6 miesięcy wcześniej uzupełniłam glebę (donice były inkubowane w warunkach naturalnych od 15 września do 15 marca), był intensywnie uruchamiany przez wyciąg glebowy wzbogacony glukozą w ilości równoważącej ilość wydzielin korzeniowych (*Majewska i in. 2007, H1*). Wyciąg ten w trakcie 48-godzinnej inkubacji obniżył całkowitą zawartość Cd w glebie o około 35-40% a uruchomiony metal

pochodził ze wszystkich testowanych frakcji (metoda sekwencyjnej ekstrakcji). Istotnie obniżyła się ilość Cd biodostępnego (rozpuszczonego i sorbowanego jonowymiennie), Cd związanego z tlenkami Fe i Mn, Cd związanego z substancją organiczną oraz Cd resztkowego. Wykazałam bardzo wyraźną dodatnią korelację pomiędzy wzrostem aktywności mikroorganizmów zasiedlających glebę ($r = 0,98$), wzrostem stężenia sideroforów hydroksamowych ($r = 0,97$), kwasu cytrynowego i octowego - związków uznawanych za mobilizujące metale ($r = 0,73$) oraz istotną ujemną korelację pomiędzy wartością pH wyciągu glebowego ($r = -0,95$) a ilością kadmu uruchomionego z gleby nawożonej osadem ściekowym. Badania te wykazały, że w zmodyfikowanych przez mikroorganizmy warunkach najwydajniejszym sorbentem były kwasy huminowe (istotny składnik próchnicy glebowej) oraz biomasa grzybowa (*Majewska i in. 2007, H1*).

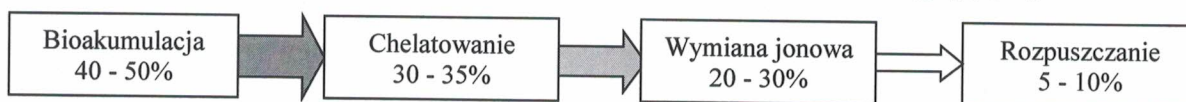
Wykonana przeze mnie sekwencyjna ekstrakcja gleb industrioziemnych ekstremalnie skażonych metalami ciężkimi (282-342 mg Cd kg⁻¹, 3 225-5 382 mg Pb kg⁻¹, 43 690-51 687 mg Zn kg⁻¹ suchej masy) pobranych z warstw powierzchniowych (0-15 cm) obszaru pokrytego gęstą murawą roślin, jak również pozbawionego roślinności (hałdy odpadów przemysłowych, Bolesław koło Olkusza) wykazała, że (1) stężenie biodostępnej formy każdego z metali nie przekraczało 0,5% całkowitej ilości danego metalu, (2) stężenie metali we frakcji zimmobilizowanej przez substancję organiczną wynosiło maksymalnie 2%, (3) pozostała część metali nadal pozostawała w formie unieruchomionej przez minerały: tlenki Fe i Mn oraz inne minerały nie ulegające redukcji i rozpuszczeniu w obecności hydroksyloaminy (*Majewska i in. 2011, H2*). Opierając się jedynie na dystrybucji metali pomiędzy frakcje wyznaczone metodą sekwencyjnej ekstrakcji można byłoby mówić o braku istotnego udziału glebowej substancji organicznej w obniżaniu mobilności metali. Zaobserwowałam jednak znaczące różnice w zawartości węgla organicznego (wskaźnik zawartości glebowej substancji organicznej), liczebności mikroorganizmów (bakterie i grzyby), aktywności wybranych enzymów glebowych (dehydrogenaza, ksylanaza, celulaza) między glebami pochodzącymi z miejsc pokrytych i niepokrytych roślinnością (*Majewska i in. 2011, H2*). Uważam, że gromadzenie resztek roślinnych bogatych w metale ciężkie, ich mikrobiologiczna degradacja i procesy humifikacji sprzyjają akumulacji próchnicy, a tym samym stabilizacji metali ciężkich w wyniku adsorpcji, kompleksowania i heteropolikondensacji (Semenov i in. 2013) w powierzchniowej warstwie gleb zasiedlonych przez rośliny. W warstwie powierzchniowej gleb pochodzących z miejsc pokrytych gęstą murawą stwierdziłam o 18% wyższe stężenie Zn, o 21% wyższe stężenie Cd oraz o 67% wyższe stężenie Pb niż warstwie powierzchniowej gleb pochodzących z miejsc bez roślinności (*Majewska i in. 2011, H2*).

Badania te rozwinęłam przeprowadzając dwuetapową hodowlę trawy *Festuca ovina*: (1) hodowla hydroponiczna w podłożu skażonym Cd w trakcie, której rośliny zakumulowały metal i (2) hodowla doniczkowa tych roślin przeniesionych z hydroponika do gleby wolnej od kadmu (*Majewska 2017, H7*). Tak zaplanowane doświadczenie pozwoliło mi prześledzić losy Cd uwolnionego z korzeni „skażonych” roślin. Udowodniłam, że metal uwolniony z biomasy korzeni w trakcie wzrostu roślin (mikrobiologiczna degradacja związków powierzchniowych korzenia oraz zamierających korzeni) ulegał w glebie dystrybucji pomiędzy frakcje o różnej mobilności (frakcje wyznaczone metodą sekwencyjnej ekstrakcji). Po 2 miesiącach hodowli roślin pula Cd związanego jonowymiennie (biodostępnego) stanowiła 16% a związanego z tlenkami Fe i Mn 75% metalu obecnego w glebie. Po zakończeniu 12-miesięcznej hodowli zawartości Cd w tych frakcjach zmniejszyła się, odpowiednio do 5% i 53%. Natomiast w tym samym okresie, frakcja metalu związanego z substancją organiczną zwiększyła się z 6% do 43%. Frakcja resztkowa przez cały okres uprawy roślin stanowiła maksymalnie 2% metalu obecnego w glebie. Podczas uprawy trawy stwierdziłam śladowe ilości węgla organicznego (C_{org}) rozpuszczalnego w wodzie, natomiast istotnym zmianom ulegało stężenie C_{org} ekstrahowanego roztworem 0,1M NaOH (C kwasów huminowych) i C_{org} pozostającego w glebie po tej ekstrakcji. Po zakończeniu uprawy roślin zaobserwowałam istotny wzrost (o około 23%) zawartości C_{org} niezwiązanego z frakcją kwasów huminowych, na co wskazuje brak ekstrakcyjności 0,1M NaOH. Dlatego uważam, że przyrost zawartości stabilnej substancji organicznej odpornej na ekstrakcję 0,1M NaOH oraz wzrost zawartości Cd oznaczonego w ekstraktach H_2O_2 (frakcja organiczna metalu wyznaczona metodą sekwencyjnej ekstrakcji) wskazuje na stabilizację metalu w glebowej substancji organicznej (*Majewska 2017, H7*). Uwolniony z korzenia metal w pierwszych miesiącach uprawy trawy mógł być immobilizowany przez substancję organiczną w wyniku reakcji wymiany jonowej i łatwo uwalniany podczas ekstrakcji 0,1M $NaNO_3$, a dopiero od 10. do 12. miesiąca następowało trwalsze unieruchamianie Cd przez próchnicę (np. w wyniku heteropolikondensacji). Wnioskuje na podstawie tych wyników, że fitostabilizacja metali w glebach skażonych rozumiana jako unieruchomienie metali w tkankach korzenia i ryzosferze jest procesem czasowym. Jednak ten rodzaj fitoremediacji nierozzerwalnie łączy się z procesem humifikacji, podczas którego zachodzi stabilizacja, nie tylko glebowej substancji organicznej, ale też metali ciężkich (*Majewska 2017, H7*).

Podsumowanie wyników badań stanowiących osiągnięcie naukowe

1. Różnorodny zespół mikroorganizmów zasiedlający korzenie roślin (endofity i mikroorganizmy ryzoplany) wspólnie z nagromadzonymi związkami organicznymi (białka, cukry, specyficzne i niespecyficzne chelatory) obniżają toksyczność Cd w stosunku do rośliny, jednocześnie zwiększając jego stabilność na powierzchni korzenia. Liczebność oraz zróżnicowanie mikrobiomu ma również decydujący wpływ na plon roślin (**H3, H5**). Mikroorganizmy ryzosferowe wspomagające wzrost roślin stymulują produkcję biomasy a tym samym akumulację metali. Bardzo ważne w zabiegach fitoremediacyjnych jest, aby wybrać gatunki roślin i szczepy mikroorganizmów tolerujące dany rodzaj i dawkę skażenia (**H4**).

2. Wydajność i stabilność Cd zimmobilizowanego przez korzenie traw (*S. cereale* i *F. ovina*) są zależne od współdziałania procesów rozpuszczania, wymiany jonowej, chelatowania i bioakumulacji (**H3, H5**). Sekwencyjna ekstrakcja Cd z korzeni pozwoliła uszeregować te procesy pod względem istotności ich udziału w stabilizacji Cd w następujący sposób:



3. Kadm był uwalniany z powierzchni korzeni roślin w formie jonowej oraz jako związany z rozpuszczalnymi związkami organicznymi (**H5, H6**). Obecność gleby (heterogennego materiału sorbującego) w systemie ekstrakcyjnym istotnie zwiększyła (średnio o 25%) wydajność uruchamiania Cd z korzeni. Desorpcja metalu z biomasy korzenia była stymulowana jego niemal równoczesną resorpcją przez składniki fazy stałej gleby tj. tlenki i wodorotlenki Mn/Fe oraz glebowa substancja organiczna (**H6**).

4. Wzrost aktywności i różnorodności mikroorganizmów zasiedlających gleby (stymulowany związkami organicznymi będącymi dla nich łatwo dostępnym źródłem węgla i energii), wzrost stężenia sideroforów i kwasów organicznych o niskich masach cząsteczkowych, jak również obniżenie wartości pH były czynnikami istotnie podnoszącymi wydajność uruchamiania Cd z korzeni trawy (**H6**) lub z gleby nawożonej osadem ściekowym (**H1**) bez ograniczenia jego resorpcji przez glebę (**H6**) lub przez odseparowane od siebie wybrane składniki fazy stałej gleby (**H1**). Elementami fazy stałej gleby preferencyjnie stabilizującymi uwolniony Cd były kwasy huminowe oraz grzybnia *T. koningii* (**H1**).

5. Ilość i różnorodność związków organicznych tj. chelatory, kwasy organiczne o niskich masach cząsteczkowych, białka, cukry oraz inne niezdefiniowane związki obecne w wyciągu glebowym zastosowanym jako roztwór mobilizujący sprzyjała resorpcji metalu przez organiczne składniki gleby. Brak tych związków w krążącym płynie spowodował przesunięcie resorpcji Cd w kierunku tlenkowych minerałów Fe i Mn obecnych w glebie (H6).
6. Kadm uwolniony do gleby z biomasy korzeni *F. ovina* był translokowany do frakcji o różnej stabilności i podatności na ekstrakcję: rozpuszczalnej i jonowymiennej, tlenkowej, organicznej i resztkowej. Dystrybucja metalu w ryzosferze pomiędzy testowane frakcje ulegała istotnym zmianom. Nastąpiło obniżenie ilości Cd we frakcji biodostępnej (rozpuszczalnej i jonowymiennej) i tlenkowej na rzecz frakcji organicznej (H7). Przyrost ilości Cd wiążanego do glebowej substancji organicznej pozytywnie korelował z przyrostem zawartości stabilnej substancji organicznej - nie ekstrahowanej roztworami zasadowymi (H7).
7. Wzrost i rozwój roślin zasiedlających gleby industrioziemne ekstremalnie skażone metalami ciężkimi pozytywnie oddziaływał na akumulację glebowej substancji organicznej i procesy humifikacji resztek roślinnych. W miejscach pokrytych gęstą murawą roślin następowało zagęszczenie Pb, Cd i Zn w warstwie powierzchniowej, bogatej w zhumifikowany materiał organiczny w porównaniu do miejsc bez roślinności, których warstwa o tej samej miąższości była uboższa w próchnicę (H2).

Bibliografia

1. Bolan N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham M.B., Scheckel K., 2014. Remediation of heavy metals(loid)s contaminated soils – To mobilized or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, 266:141–166, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>
2. Conesa H.M., Wieser M., Gasser M., Hockmann K., Evangelou M.W.H., Studer B., Schulin R., 2010. Effects of three amendments on extractability and fractionation of Pb, Cu, Ni and Sb in two shooting range soils. *Journal of Hazardous Materials*, 181:845–850, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.090>
3. Stritsis C., Steingrobe B., Claassen N., 2014. Cadmium fractions in an acid sandy soil and in soil solution as affected by plant growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177:431–437, DOI: 0.1002/jpln.201200627
4. Majewska M., Kurek E., 2007. Microbially mediated cadmium sorption/desorption processes in soil amended with sewage sludge. *Chemosphere*, 67:724–730, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.051>
5. Kabata-Pendias A., 2011. Trace elements in soil and plants. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton USA
6. Oves M., Khan M.S., Zaidi A., Ahmad E., 2012. Soil contamination, nutritive values, and human health risk assessment of heavy metals: An overview. In: A Zaidi, PA Wani, MS Khan (eds.), *Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation*. Springer Verlag, Wien, pp. 1–27, DOI 10.1007/978-3-7091-0730-0_1
7. Li Z., Jia M., Christie P., Luo Y., 2016. Changes in metals availability, desorption kinetics and speciation in contaminated soils during repeated phytoextraction with the Zn/Cd hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*. *Environmental Pollution*, 209:123–131, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.015>
8. Laudicina V.A., Palazzolo E., Badalucco E.L., 2013. Natural organic compounds in soil solution: potential role as soil quality indicators. *Current Organic Chemistry*, 17:2991–2997
9. Massaccesi L., Benucci G.M.N., Gigliotti G., Cocco S., Corti G., Agnelli A., 2015. Rhizosphere effect of three plant species of environment under periglacial conditions (Majella Massif, central Italy). *Soil Biology & Biochemistry*, 89:184–195, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.010>
10. Hütsch B.W., Augustin J., Merbach W., 2002. Plant rhizodeposition – an important source for carbon turnover in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165:397–407
11. Tahervand S., Jalali M., 2016. Sorption, desorption, and speciation of Cd, Ni, and Fe by four calcareous soils as affected by pH. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188:322, DOI: 10.1007/s10661-016-5313-4
12. Karimzadeh L., Nair S., Merkel B.J., 2013. Effect of microbial siderophore DFOB on Pb, Zn, and Cd sorption onto zeolite. *Aquatic Geochemistry*, 19:25–37, DOI:10.1007/s10498-012-9176-1
13. Kao P.-H., Huang C.-C., Hseu Z.-Y., 2006. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid. *Chemosphere* 64:63–70, DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.11.039
14. Amabilis-Sosa L.E., Siebe C., Moeller-Chávez G., Durán-Domínguez-de-Bazúa M.C., 2015. Accumulation and distribution of lead and chromium in laboratory-scale constructed wetlands inoculated with metal-tolerant bacteria. *International Journal of Phytoremediation*, 17:1090–1096, DOI:10.1080/15226514.2015.1021953
15. Lebeau T., Jesequel K., Braud A., 2011. Bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal-contaminated soils: state of the art and future prospects. In: I. Ahmad et al. (eds) *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. Springer, New York. DOI: 10.1007/978-1-4419-7931-5_10
16. Sarwar N., Imran M., Shaheen M.R., Ishaque W., Kamran M.A., Matloob A., Rehman A., Hussain S., 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171: 710–721, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>
17. Lange B., van der Ent A., Baker A.J.M., Echevarria G., Mahy G., Malaisse F., Meerts P., Pourret O., Verbruggen N., Faucon M.-P., 2017. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytologist*, 213: 537–551, DOI: 10.1111/nph.14175
18. Sobariu D.L., Fertu D.I.T., Diaconu M., Pavel I.V., Hlihor R.-M., Dragoi E.N., Curteanu S., Lenz M., Corvini P.F.-X., Gavrilescu M., 2017. Rhizobacteria and plant symbiosis in heavy metal uptake and its implications for soil bioremediation. *New Biotechnology*, 39:125–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.09.002>
19. Van Nevel L.V., Mertens J., Demey A., De Schrijver A., De Neve S., Tack F.M.G., Verheyen K., 2014. Metal and nutrient dynamics in decomposing tree litter on a metal contaminated site. *Environmental Pollution*, 189: 54–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.009>
20. Ping X., Zhou G., Zhuang Q., Wang Y., Zou W., Shi G., Lin X., Wang Y., 2010. Effect of sample size and position from monolith and core methods on the estimation of total root biomass in a temperate grassland ecosystem in Inner Mongolia. *Geoderma*, 155:262–268, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.12.009>
21. Semenov V.M., Tulina A.S., Semenova N.A., Ivannikova L.A., 2013. Humification and nonhumification pathways of the organic matter stabilization in soil: A review. *Eurasian Soil Science*, 46:355–368, DOI: 10.1134/S106422931304011X

Główne osiągnięcia wynikające z realizacji badań oraz możliwość ich wykorzystania

1.

Wykazałam, że rośliny trawiaste, np. *S. cereale* i *F. ovina*, mogą być wykorzystane jako fitostabilizatory kadmu zanieczyszczającego gleby, ponieważ akumulują ten metal w korzeniach i charakteryzują się niską translokacją Cd do części nadziemnych.

2.

Wykazałam, że wewnątrzkomórkowa akumulacja oraz chelatowanie kadmu są najistotniejszymi procesami w stabilizacji Cd przez korzenie *S. cereale* i *F. ovina*.

3.

Ustaliłam, że stres kadmowy stymuluje ryzodepozycję związków organicznych (potencjalne źródło łatwo degradowalnych związków węgla i azotu) a efektem tego zjawiska jest stymulacja proliferacji odpornej na ten metal grupy mikroorganizmów, które kolonizują powierzchnię korzenia *S. cereale* i *F. ovina* tworząc barierę ochronną.

4.

Udowodniłam, że Cd zimmobilizowany przez korzeń jest łatwo z niego uwalniany w wyniku procesów abiotycznych (np. desorpcja w warunkach aseptycznych) i biotycznych (np. mikrobiologiczna degradacja martwych tkanek) a końcowe stężenie metalu w roztworze glebowym jest uzależnione od szybkości jego uruchamiania i ponownej sorpcji przez mineralne i organiczne składniki fazy stałej gleby.

5.

Przedstawiłam dowody na to, że rośliny w ścisłej interakcji z własnym mikrobiomem kontrolują skład chemiczny i pH roztworu glebowego decydując tym samym o kierunku i tempie krążenia Cd pomiędzy rośliną, roztworem glebowym i fazą stałą gleby a przesunięcie równowagi procesów w kierunku pobierania metalu z fazy ciekłej gleby przez rośliny (bioakumulacja) bądź bioprecypitacji i biosorpcji w ryzosferze zwiększy wydajność fitostabilizacji kadmu.

6.

Udokumentowałam fakt tworzenia stabilnej próchnicy i unieruchamiania Cd w wyniku humifikacji resztek roślinnych podczas hodowli *F. ovina* (doświadczenie doniczkowe).

7.

Dowiodłam, że w przypadku trawy *F. ovina* utrata stabilności kadmu zimmobilizowanego w jej korzeniach była równoważona wbudowywaniem Cd w strukturę próchnicy. Fakt ten należy rozpatrywać jako istotny element fitoremediacji, ponieważ przyrost zawartości próchnicy glebie jest stymulowany przez rośliny i mikroorganizmy.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Równolegle do badań stanowiących moje główne osiągnięcie naukowe przedstawione do oceny w postępowaniu habilitacyjnym, prowadziłam lub uczestniczyłam pracach naukowych, wyniki których zostały przedstawione w pracach opublikowanych:

- w czasopismach znajdujących się w bazie **Journal Citation Reports (JCR)**

1. Kurek E., **Majewska M.**, 2004, In vitro remobilization of Cd immobilized by fungal biomass. *Geoderma* 122(2-4): 235-246

IF₂₀₀₄ 1,345;

IF₂₀₁₄ 4,036;

MNiSW₂₀₁₅ 45 pkt.

Powyższa praca udowodniła, że biomasa grzybowa odgrywa ważną rolę w kontrolowaniu procesów sorpcji i desorpcji Cd w glebie działając jako biosorbent, a także jako producent pozakomórkowych metabolitów wpływających na immobilizowanie tego metalu przez fazę stałą gleby. Pozakomórkowe metabolity grzybów wzbogacające ekstrakty glebowe zwiększały desorpcję Cd. Powyższa praca udowodniła również, że wyciąg glebowy pozbawiony podczas sterylizacji termicznej aktywnych związków uruchamiał istotnie mniej Cd z biomasy grzybowej niż wyciąg glebowy sterylizowany metodą filtracji.

2. **Majewska M.**, Kurek E., Szlachetka D., 2006, Microbial activity – a factor increasing retention of Cd added to soil. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(2A): 127-134

IF₂₀₀₆ 0,353;

IF₂₀₁₄ 0,793;

MNiSW₂₀₁₅ 15 pkt.

Przeprowadzone badania wykazały, że proliferacja mikroorganizmów w glebie zaszczonej po sterylizacji (gleba trzykrotnie autoklawowana) zawiesiną natywnej gleby spowodowała wzrost pH o 0,5 - 1,0 jednostki. Po 6-tygodniowym okresie inkubacji procentowy udział frakcji Cd ekstrahowanego 0,1M NaNO₃ w glebie aktywnej mikrobiologicznie był istotnie niższy niż w glebie sterylnej. Obserwacje te pozwalają sądzić, że w aktywnej mikrobiologicznie glebie następuje redystrybucja Cd do frakcji o większej stabilności, co należy łączyć z wyższym pH gleby aktywnej mikrobiologicznie i efektywnym wiązaniem metalu przez namnażającą się biomasę mikroorganizmów w porównaniu do gleby sterylnej.

3. Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkolazka A., Jaroszuk-Ścisł J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., **Majewska M.**, 2015, Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31:1823–1844

IF₂₀₁₅ 1,532;IF₂₀₁₅ 1,658;MNI_{SW}₂₀₁₅ 20 pkt.

Podrozdział mojego autorstwa w powyższej pracy przeglądowej opisuje mechanizmy biosorpcji metali przez zewnątrzkomórkowe substancje polimeryczne (np. EPS) oraz ich rolę w tworzeniu bariery ochronnej na powierzchni komórki. Substancje te posiadają liczne i różnorodne grupy funkcyjne, które mogą koordynować z jonami metali (kompleksowanie). Obecność licznych i różnorodnych grup funkcyjnych (np. aminowa, fosforanowa, hydroksylowa, karboksylowa, hydroksylowa) kontroluje również wielkość ładunku ujemnego zgromadzonego na powierzchni komórki, co zwiększa możliwość unieruchamiania metalu w wyniku wymiany jonowej. Udowodniono, że w warunkach stresowych mikroorganizmy syntetyzują EPS o większej różnorodności grup reaktywnych w porównaniu z mikroorganizmami bytującymi w warunkach optymalnych. Grzybowe EPS charakteryzujące się wysoką wydajnością biosorpcji, dużą zdolnością regeneracji i względną stabilnością mogą być tak skutecznymi biosorbentami jak biomasa grzybowa i mogą być wykorzystywane do usuwania metali ciężkich ze ścieków. Poza tym flokulująca aktywność niektórych EPS może przyspieszać sedymentację metali ciężkich po ich unieruchomieniu za pomocą mineralnych lub organicznych cząstek koloidalnych a EPS zintegrowane ze specyficznymi enzymami (np. peroksydazy, lakkazy) mogą być zastosowane do degradacji toksycznych związków organicznych.

- w rozdziałach monografii

1. Zavalniuk A., **Majewska M.**, 2015, Wykorzystanie metody ditizonowej do określania akumulacji kadmu w częściach nadziemnych *Festuca ovina*. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-4-9, str. 289-292

2. Malinowski R., **Majewska M.**, 2015, Zastosowanie ditizonu do określania immobilizacji kadmu w korzeniach *Festuca ovina*. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-4-9 str. 293-296

W powyższych pracach udowadniamy, że szybka i prosta metoda ditizonowa może być stosowana do oznaczenia stężeń Cd zakumulowanego w korzeniach i częściach nadziemnych roślin po uprzednim ich zmineralizowaniu wrzącym kwasem azotowym. Odchylenie standardowe dla każdej serii prób mieściło się w granicach od 5% do 25% wartości średniej. Jest to z pewnością metoda mniej dokładna niż absorpcyjna spektrometria atomowa (ASA), ale może być polecana do zastosowania we wstępnych badaniach monitorujących efekty fitoakumulacji

3. Pąg J., Majewska M., 2015, Wydajność fitoekstracji cynku z gleby zanieczyszczonej ZnO w hodowli wazonowej traw z rodzaju *Festuca*. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-4-9 str. 297-300

Komercyjnie dostępna mieszanka traw *Festuca rubra* i *Festuca ovina* z domieszką *Lolium perenne* i *Poa pratensis* była hodowana na glebie zanieczyszczonej ZnO ($500 \text{ mg Zn kg}^{-1}$). Po 3-miesięcznej hodowli zebrana biomasa zakumulowała około 0,7% metalu wprowadzonego do gleby. Rośliny te modyfikowały pH gleby w kierunku odczynu zasadowego, co sprzyja stabilizacji metali w ryzosferze. Zatem zastosowana mieszanka traw powinna być rekomendowana do zastosowania podczas zabiegów fitostabilizujących cynk w podłożu niż fitoekstrakcyjnych.

4. Jońca J., Majewska M., 2015, Wpływ ołowiu na stężenie związków kompleksujących żelazo w hodowli płynnej *Trichoderma koningii*. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-4-9 str. 301-304

Przeprowadzone badania udowodniły, że szczep *Trichoderma koningii* tolerujący ołów w stężeniu $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ podłoża i produkujący związki kompleksujące Fe(III), w tym siderofory hydroksamowe, może być brany pod uwagę jako czynnik uruchamiający żelazo z jego nierozpuszczalnych związków mineralnych oraz jako czynnik zwiększający fitoprzyswajalność żelaza. Zastosowanie tego szczepu jako składnika biopreparatu wspomagającego wzrost roślin w środowisku skażonym metalami ciężkimi wymaga jednak dalszych badań.

5. Dudka K., **Majewska M.**, Jaroszuk-Ściśel J., **2016**, Zróżnicowanie aktywności dehydrogenazy w glebach skażonych kadmem określone metodą spektrofotometryczną. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-8-7 str. 19-22

Aktywności dehydrogenazowa jest uznawana za wskaźnik ogólnej aktywności mikrobiologicznej gleby. Zatem ten enzym został wybrany, aby ocenić zmiany aktywności zespołu mikroorganizmów zasiedlających gleby skażone Cd w stężeniu od 1 do 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.m. gleby. Porównywalna aktywność dehydrogenaz we wszystkich próbach w 8. dniu inkubacji niezależnie od stężenia Cd prawdopodobnie wskazuje na adaptację i/lub selekcję mikroorganizmów opornych na ten metal.

6. Malinowski R., Zawalniuk A. **Majewska M.**, Jaroszuk-Ściśel J. **2016**, Wybrane właściwości metaboliczne szczepu z rodzaju *Arthrobacter*. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-8-7 str. 26-29

Udowodniono, że szczep *Arthrobacter* rozpuszczał fosforany z jednoczesnym zakwaszaniem środowiska oraz intensywnie degradował białko. Szczep ten również syntezował i wydzieliał do podłoża siderofory oraz inne związki kompleksujące Fe(III). Kadm ($1-10 \mu\text{g ml}^{-1}$) wprowadzony do podłoża wzrostu bakterii nie miał wpływu na zmiany stężenia sideroforów katecholowych w płynie pohodowlanym, natomiast indukował syntezę sideroforów hydroksamowych i związków fenolowych. Metal ten negatywnie oddziaływał na syntezę i pozakomórkowe wydzielanie niespecyficznych związków kompleksujących Fe(III) oraz białek. Można sądzić, że Cd-tolerancyjny szczep *Arthrobacter* biorący udział w transformacjach związków organicznych (np. proteoliza) i nieorganicznych (np. upłynnianie minerałów Fe i P) może być zastosowany w procesach fitoremediacyjnych.

7. Król K. Szmajda M., **Majewska M.**, **2017**, Immobilizacja kadmu przez wybrane składniki glebowe. D. Kołodyńska (red.) Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, ISBN 978-83-939465-9-4 str. 184-187

Biotyczne składniki glebowe tj. żywa biomasa *T. koningii* (ŻG) i *Chryseobacterium* sp. (ŻB) były efektywniejsze w immobilizowaniu Cd niż składniki abiotyczne tj. montmorylonit (MT), kwasy huminowe (KH), getyt (GT), wodorotlenek żelaza. Najlepszym sorbentem Cd była martwa biomasa bakteryjna (MB) natomiast najslabszym martwa grzybnia (MG).

Testowane sorbenty ze względu na ilość unieruchomionego Cd można uszeregować w następujący sposób: MB > ŻB = ŻG > Fe(OH)₃ > MT = KH > GT = MG.

8. Nowak A., **Majewska M.**, Jaroszuk-Ściśel J. **2017**, Polimery mikrobiologiczne jako źródło pierwiastków. Trendy i rozwiązania technologiczne – odpowiedź na potrzeby współczesnego społeczeństwa. Tom 1, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp.z o.o., Lublin, ISBN 978-83-65598-58-5, str. 174-186

MNiSW₂₀₁₆ 5 pkt.

Moim zdaniem jest to szczególnie cenna praca przeglądowa, w której zostały zamieszczone informacje na temat polimerów pochodzenia mikrobiologicznego: (1) opisano ich różnorodność, budowę i wydajność tworzenia, (2) skład pierwiastkowy, (3) obecne zastosowania polimerów i perspektywy ich wykorzystania, (4) grupy chemicznych odpowiedzialne za kompleksowanie pierwiastków, w tym metali toksycznych oraz (5) mechanizmy unieruchamiania pierwiastków.

- **Inne osiągnięcia naukowe**

W toku realizowanych badań (wyniki upublicznione w formie ustnych i plakatowych doniesień konferencyjnych) udowodniłam:

- 1. Zależność pomiędzy aktywnością, liczebnością i składem zespołu mikroorganizmów glebowych a stężeniem kadmu w glebie**

Stwierdziłam, że prowadzony do gleby CdO w stężeniu 0, 5, 10, 50, 100 i 300 mg Cd kg⁻¹ nie zmienił ogólnej liczebności bakterii i grzybów w ryzosferze trawy *Festuca ovina*, jednak w 9 i 14 tygodniu trwania hodowli ich różnorodność i aktywność (analiza Ecoplate®Biolog) były istotnie niższe niż w kontroli. Po 18 tygodniach wartość tych parametrów była porównywalna bez względu na stężenie wprowadzonego Cd. Prawdopodobnie że stres wywołany wzrostem stężenia Cd w glebie doprowadził do selekcji mikroorganizmów opornych na ten metal a formułujący się nowy zespół mikroorganizmów w wyniku adaptacji do nowych warunków był w stanie osiągnąć w ciągu 18 tygodni zróżnicowanie metaboliczne zbliżone do tego określonego dla gleby kontrolnej. Również wydzieliny korzeniowe, których stymulowana przez stres kadmowy synteza została udowodniona w warunkach hodowli hydroponicznej (**Majewska i Kurek 2011, H3**), mogły

być czynnikiem stymulującym proliferację komórek mikroorganizmów. W glebie o skażeniu Cd 100 i 300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ zaobserwowałam wyższą aktywność celulolityczną, ksylanolityczną i pektynolityczną (enzymów istotnych w procesie degradacji resztek roślinnych) niż w kontroli i glebie skażonej niższymi dawkami tego metalu (5, 10 i 50 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Fakt ten może wskazywać na selekcję mikroorganizmów zdolnych do degradowania zamierających korzeni uwalniających tym sposobem wcześniej zimmobilizowany w korzeniu metal.

2. **Możliwość zasiedlenia gleb ekstremalnie skażonych metalami ciężkimi przez trawę *Festuca ovina* oraz aktywność i różnorodność mikroorganizmów zasiedlających te gleby**

W materiale organicznym pochodzącym z warstwy powierzchniowej hałdy odpadów pogórnich ekstremalnie skażonym metalami (255 mg Cd kg^{-1} , 4 125 mg Pb kg^{-1} , 60 821 mg Zn kg^{-1} i 50 802 mg Fe kg^{-1} suchej masy) stwierdziłam istotnie wyższą ogólną liczebność bakterii i grzybów, ich różnorodność metaboliczną (analiza Ecoplate®Biolog) oraz aktywność enzymów (dehydrogenazy, celulazy, ksylanazy, fosfatazy alkalicznej oraz deaminazy ACC) niż w warstwie mineralnej o niższym stężeniu tych metali (235, 2 917, 52 347 i 39 511 mg metalu kg^{-1}). Zaobserwowałam również, że na materiale pobranym z warstwy organicznej wykiełkowało i przeżyło 16-dniową hodowlę 90% nasion trawy a na materiale pochodzącym z warstwy mineralnej tylko 55% w porównaniu z serią kontrolą, zawierającą glebę nieskażoną. Uważam zatem, że w środowisku ekstremalnie skażonym metalami ciężkimi tj. hałda odpadów pogórnich, to zawartość substancji organicznej oraz aktywność biologiczna jest czynnikiem kontrolującym efektywność kiełkowania nasion oraz przeżycie siewek.

3. **Rolę szczepu *Arthrobacter* sp. wydajnie immobilizującego kadm (65 μg Cd g^{-1} s.m.) w stabilizacji tego metalu w ryzosferze trawy *Festuca ovina***

Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że *F. ovina* ograniczyła wypłukiwanie kadmu wprowadzonego do gleby jako CdO w stężeniu 100 mg Cd kg^{-1} (doświadczenie kolumnowe z wykorzystaniem roztworu symulującego wodę deszczową, pH 4,7) niezależnie od obecności komórek *Arthrobacter* sp. ($5 \cdot 10^7$ komórek g^{-1} s.m. gleby) w zespole mikroorganizmów glebowych o 80%, natomiast inokulacja tymi bakteriami ograniczała akumulację Cd w biomasie roślin o 30%. Również w obecności roślin zawartość Cd we frakcjach o różnej mobilności nie zmieniła się (0,5% stanowił Cd związany jonowymiennie, 4,5% Cd zimmobilizowany przez substancję organiczną, 75% przez tlenki i wodorotlenki metali a 20% to metal pozostający w glebie jako frakcja resztkowa) zaś wprowadzenie do gleby komórek *Arthrobacter* sp. zmieniło dystrybucję tego metalu. Zwiększyła się do około 80% frakcja

metalów związana przez tlenki i wodorotlenki metali a obniżyła się do około 14% frakcja resztkowa. Zatem można wnioskować, że roślina odpowiada za obniżenie wypłukiwania metalu z gleby a bioaugmentacją jej ryzosfery szczepem wydajnie immobilizującym kadm obniży jego biodostępność.

4. Udział *Trichoderma koningii* 3Ag0 w fitoremediacji gleb skażonych ołowiem, kadm i cynkiem.

Wychodząc z założenia, że fitoremediacja jest ogólnie akceptowaną, biologiczną metodą stosowaną do unieszkodliwiania skażeń podjęłam badania celem których było porównanie akumulacji Cd, Pb i Zn w korzeniach i częściach nadziemnych trawy *Festuca ovina* rosnącej w glebach skażonych tymi metalami oraz szczepionych i nieszczepionych zarodnikami *Trichoderma koningii* 3Ag0. Do tej serii badań wybrałam szczep *T. koningii* znajdujący się w kolekcji Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej, ponieważ w warunkach *in vitro*:

- (1) wydajnie uruchamiał fosfor z nierozpuszczalnego fosforanu wapnia,
- (2) syntezował i wydzielal do podłoża metabolity uznawane za wspomagające wzrost roślin:
 - siderofory hydrokamowe i inne niespecyficzne związki kompleksujące Fe(III),
 - hormon wzrostu roślin (kwas indoliloctowy),
 - deaminazę ACC (enzym degradujący kwas 1-aminoacycyklopropano-1-karboksylowy, który jest prekursorem syntezy etylenu hamującego wzrost i przyspieszającego starzenie się roślin,
- (3) wykazywał właściwości amonifikacyjne, ureolityczne i proteolityczne, celulolityczne, pektynolityczne, amylolityczne (cechy istotne w degradacji resztek roślinnych i krążeniu N i C),
- (4) tolerował Cd, Pb i Zn w stężeniu do 1000 mg kg⁻¹ podłoża agarowego, gdy metal został wprowadzony w formie tlenkowej

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że szczep *T. koningii* wprowadzony do gleby w formie zawiesiny zarodników konidialnych równocześnie z nasionami trawy *F. ovina* przeżył i zasiedlił jej ryzosferę. Po 14-dniowej hodowli roślin stwierdziłam 65% udział propagul *T. koningii* w zespole grzybów glebowych, gdy do gleby wprowadzono 10³ zarodników g⁻¹ gleby. Gdy podniosłam początkową ilość zarodników do 10⁴ zarodników g⁻¹ gleby nie stwierdziłam zwiększenia udziału propagul *T. koningii* w ogólnej liczebności grzybów, jednak wysokość i masa hodowanych roślin w tej serii była wyższa niż w seriach szczepionych inokulum o niższej gęstości. Po wydłużeniu hodowli roślin do 4 miesięcy, w glebach szczepionych zarodnikami w ilości 10⁴ g⁻¹, nadal stwierdzałam 63% udział

propagul *T. koningii* w całym zespole grzybów a wysokość i masa roślin hodowanych w glebach szczepionych zarodnikami *T. koningii* była większa niż w glebach nieszczepionych. W glebach skażonych CdO, ZnO lub PbO obserwowałam 52%, 66% lub 79% udział propagul tego szczepu.

W kolejnym etapie badań wybrane metale wprowadziłam do gleby szczepionej zarodnikami *T. koningii* (10^4 propagul g^{-1} gleby) lub nieszczepionej (kontrola) w formie: (1) $CdCl_2$ lub CdO (100 mg Cd kg^{-1} s.m. gleby), (2) $Zn(NO_3)_2$ lub ZnO (250 mg Zn kg^{-1} s.m. gleby), (3) $Pb(NO_3)_2$ lub PbO (250 mg Pb kg^{-1} SM gleby) i wysiałam około 100 nasion trawy *F. ovina* do każdej doniczki. Po 4-miesięcznej hodowli roślin w warunkach fitotronowych zaobserwowałam, że:

- (1) szczep *T. koningii* wprowadzony do gleb niezanieczyszczonych i zanieczyszczonych Cd, Pb lub Zn zasiedlił ryzosferę *F. ovina* osiągając średnią liczebność $1 \cdot 10^6$ propagul g^{-1} gleby bez negatywnego wpływu na liczebność natywnych bakterii i grzybów.
- (2) szczepienie zarodnikami *T. koningii* stymulowało przyrost masy roślin hodowanych w glebie skażonej Cd lub Pb, czego nie zaobserwowałam w glebie skażonej Zn (niezależnie od formy metalu wprowadzonego do gleby).
- (3) w korzeniach oraz częściach nadziemnych roślin uprawianych w glebie szczepionej *T. koningii* stężenie Cd lub Pb było istotnie niższe a Zn istotnie wyższe niż w roślinach uprawianych w glebie nie szczepionej zarodnikami tego grzyba
- (4) dystrybucja Cd, Pb i Zn między frakcje wyznaczone metodą sekwencyjnej ekstrakcji pomiędzy glebą nieszczepioną i szczepioną zarodnikami *T. koningii* nie różniła się istotnie statystycznie
 - 1% Cd, Pb i Zn wprowadzonego do gleby odzyskiwałam we frakcji potencjalnie biodostępnej (ekstrahowanej 0,1M $NaNO_3$)
 - 97% Cd, 90% Pb i 80% Zn stwierdziłam w stabilnej frakcji tlenków i wodorotlenków Fe i Mn (ekstrahowanej 1M roztworem hydroksyloaminy)
 - 1% Cd, 3% Pb i 9% Zn zostało zimmobilizowane przez glebową substancją organiczną (uruchomiony dopiero po mineralizacji substancji organicznej 30% H_2O_2 w temperaturze 80°C)
 - 1% Cd, 6% Pb i 10% Zn to frakcja resztkowa, która pozostawała w glebie po poprzednich etapach ekstrakcji

Na podstawie powyższych obserwacji wnioskuję, że szczep *T. koningii* 3Ag0 może być zastosowany jako czynnik biologiczny stymulujący wzrost roślin podczas fitostabilizacji Cd i Pb w skażonych glebach. Jednak wprowadzony do gleby skażonej Zn tracił właściwości

organizmu promującego wzrost roślin obserwowane w glebie nieskażonej, ale wzrost akumulacji tego metalu w korzeniach i częściach nadziemnych trawy może być cechą wspomagającą proces fitoekstracji Zn.

Uważam, że opisane powyżej wyniki posłużą opracowaniu preparatu bioremediacyjnego, który będzie testowany w dalszych badaniach szklarniowych i poletkowych a następnie strategii rekultywacji terenów zdegradowanych w wyniku składowania odpadów górniczych i hutniczych.

VI. Obecnie realizowane zadania badawcze

W ramach tematów statutowych rozpoczęłam badania mające na celu określenie czasu koniecznego dla adaptacji całego zespołu oraz wybranych grup mikroorganizmów glebowych do warunków stresu kadmowego. Uważam, że poznanie możliwości adaptacyjnych mieszanych zespołów mikroorganizmów oraz zrozumienie intensywności zmian aktywności w poszczególnych grupach metabolicznych mikroorganizmów bytujących w niekorzystnych warunkach środowiskowych, ułatwi stymulowanie i kontrolowanie procesów bioremediacyjnych.

Aktualnie przeanalizowałam występujące w czasie 16-dniowej inkubacji gleb zanieczyszczonych Cd ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$) w stężeniu 0, 1, 5, 10, 50, 100 i 500 mg kg^{-1} zmiany ogólnej liczebności bakterii i grzybów mezofilnych oraz zmiany aktywności enzymów (dehydrogenaz, celulaz, fosfataz, ureaz, amylaz). Stężenia Cd na potrzeby tego doświadczenia dobrałam kierując się poziomem skażenia tym metalem prób środowiskowych. Najwyższe stężenia Cd (do 460 mg kg^{-1}) stwierdziłam w warstwie organicznej utworzonej na powierzchni ponad 100-letniej hałdy odpadów przemysłowych naturalnie zasiedlonej przez roślinność (Bolesław koło Olkusza), około 140 mg Cd kg^{-1} było w próbach pobranych z hałdy około 30-letniej rekultywowanej poprzez obsadzenie modrzewiem, od 11 do 30 mg Cd kg^{-1} stwierdziłam w próbach pobranych z terenów zielonych usytuowanych wokół Huty Cynku w Miasteczku Śląskim a 5 mg Cd kg^{-1} w glebie nawożonej osadem ściekowym (200 t/ha).

Zaobserwowałam, że ogólna liczebność bakterii zmieniała się zarówno pod wpływem czasu inkubacji jak i pod wpływem stężenia Cd wprowadzonego do gleby, natomiast liczebność grzybów była porównywalna bez względu na zastosowaną dawkę metalu i czas inkubacji. Przyrost liczebności bakterii w glebie kontrolnej oraz glebach uzupełnionych Cd w stężeniu 1 lub 5 mg kg^{-1} był widoczny w 8 dniu inkubacji, w glebach zawierających 10, 50 lub 100 mg Cd kg^{-1} w 4 dniu, natomiast w glebie skażonej 500 mg Cd kg^{-1} dopiero w 16 dniu

inkubacji. Różnorodność metaboliczna (wyznaczona na podstawie testów Biolog EcoPlate®) i aktywność (wyrażona jako aktywność dehydrogenaz) mikroorganizmów zasiedlających gleby zanieczyszczone tym metalem w różnym stężeniu były porównywalne w 8 dniu inkubacji. Po kolejnych ośmiu dniach inkubacji aktywność zwiększyła się a jej przyrost był odwrotnie proporcjonalny do stężenia metalu w glebie. Po stymulowaniu aktywności mikroorganizmów roztworem glukozy (0,05M) już 4 dnia inkubacji zaobserwowałam brak różnic w aktywności mikroorganizmów w glebach zawierających od 0 do 100 mg Cd kg⁻¹, który utrzymywał się do ostatniego dnia inkubacji. Wyjątek stanowiła gleba skażona 500 mg Cd kg⁻¹, w której aktywność mikroorganizmów była najniższa od pierwszego do ostatniego dnia inkubacji.

Zmiany aktywności celulaz, amylaz, fosfataz i ureaz w glebach krótkoterminowo skażonych Cd były spowodowane zarówno długością okresu inkubacji, jak i stężeniem Cd wprowadzonego do gleby. Analiza zmienności wykazała, że czas trwania inkubacji gleby był czynnikiem mocniej oddziałującym na zmiany aktywności analizowanych enzymów niż stężenie Cd wprowadzonego do gleby.

Na tej podstawie wnioskuję, że zespół mikroorganizmów adaptował się do warunków panujących w skażonych glebach w różnym czasie (od 4 do 16 dni) i zależnie od stężenia metalu a wprowadzenie łatwo przyswajalnego źródła węgla przyspieszyło ten proces. Wyższa aktywność mikrobiologiczna i enzymatyczna była nie tylko efektem niższego stężenia metali w glebie, lecz także wynikiem upływu czasu od momentu wprowadzenia toksycznego metalu do gleby (stabilizacja i obniżanie toksyczności metalu przez składniki fazy stałej gleby) oraz adaptacji mikroorganizmów do warunków stresowych.

Pragnę również wspomnieć, że intensywnie współpracuję z innymi zespołami badawczymi Wydziału Biologii i Biotechnologii a efektem tej współpracy są:

- obszerna publikacja na temat otrzymywania i zastosowania polisacharydów wytwarzanych przez grzyby Ascomycota (tematyka Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej) i Basidiomycota (tematyka Zakładu Biochemii).

Osińska-Jaroszuk M, Jarosz-Wilkolazka A., Jaroszuk-Ściśel J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., Majewska M., 2015, Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31:1823–1844

- doniesienia konferencyjne na temat liczebności, aktywności i różnorodności mikroorganizmów zasiedlających gleby Spitsbergenu (współpraca z Zakładem Fizjologii Roślin).

1. Hanaka A., Ozimek E., Jaroszuk-Ściśel J., Słomka A., **Majewska M.**, Plak A., Zagórski P., Rysiak A., Wójcik M., Dressler S., **2017**, Różnorodność mikrobiologiczna a zawartość wybranych pierwiastków (C,N,P,Fe) w glebach Spitsbergenu. XX Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna, Pierwiastki - Środowisko - Zdrowie, 27 maja, Lublin, str. 43
2. Hanaka A., Jaroszuk-Ściśel J., Ozimek E., **Majewska M.**, Słomka A., Plak A., Zagórski P., Wójcik M., Dressler S., **2017**, Grupy fizjologiczne mikroorganizmów gleb ryzosferowych Spitsbergenu. II Ogólnopolska Konferencja Mikrobiologiczna, Metagenomy różnych środowisk, 29-30 czerwca, Lublin, str. 87-88
3. Hanaka A., Jaroszuk-Ściśel J., Ozimek E., Słomka A., **Majewska M.**, Zagórski P., Plak A., Wójcik M., Dressler S., **2017**, Aktywność mikrobiologiczna gleb ryzosferowych Spitsbergenu. XX Naukowa Lubelska Konferencja Magnezologiczna, Pierwiastki - Środowisko - Zdrowie, 27 maja, Lublin, str. 95

- aktualnie przygotowywana publikacja opisująca cechy metaboliczne kadmoopornego szczepu DEM Bc1 zakwalifikowanego na podstawie analizy MLSA (ang. MultiLocus Sequence Analysis) i sekwencji genów metabolizmu podstawowego (*recA*, *rpoB*, *gyrB*) do rodzaju *Chryseobacterium* (wynik współpracy z Zakładem Genetyki i Mikrobiologii Ogólnej).

Wspólnie z pracownikami Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej uczestniczyłam w przygotowaniu pracy przeglądowej pt. „Polimery mikrobiologiczne jako źródło pierwiastków” (Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin, ISBN 978-83-65598-58-5, str.174-186), jak również pracy doświadczalnej pt. „A Comparison of three test (FeCl₃, Csaky and CAS) as universal (screening) methods in the determination of the rhizosphere fungal strain's ability to Fe³⁺ ligands” (wysłanej do redakcji Plant Soil and Environment) dotyczącej opracowanej w ZMŚ metodyki oznaczania sideroforów przystosowanej do badania zasiedlających środowisko glebowe i ryzosferowe grzybów Ascomycota. W recenzji znajduje się także rozdział w monografii „Bioremediacja gleb, bionawożenie i biologiczna ochrona roślin – ważne i wzajemnie uzupełniające się kierunki mikrobiologii środowiska glebowego opisujący dokonania zespołu badawczego ZMŚ na tle badan krajowych i światowych.

VII. Perspektywy badawcze

W przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące technik fitoremediacyjnych. Planuję szczegółowo przeanalizować: (1) interakcje między mikroorganizmami i roślinami zasiedlającymi gleby skażone, (2) tworzenie biofilmu na powierzchni korzeni roślin akumulujących metale ciężkie, (3) różnorodność mikroorganizmów ryzosferowych, endofitycznych i zasiedlających części nadziemne roślin (fylosferę) oraz (4) ich wpływ na kondycję roślin i szybkość fitoremediacji (fitostabilizacji bądź fitoekstrakcji). Uważam również za bardzo istotne poznanie szlaków indukcji odporności roślin uruchamianych w odpowiedzi na obecność metali ciężkich. Pozwoli to na porównanie efektywności i przebiegu

szlaków indukcji odporności uruchamianych przez metale ciężkie z indukcją odporności przez czynniki biotyczne takie jak fitopatogeny, szczepy nie-patogeniczne dla roślin oraz polisacharydy ścienne i zewnątrzkomórkowe (EPS), która jest intensywnie badana w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej. Istotną częścią planowanych badań będzie opisanie mechanizmów stymulacji wzrostu roślin przez ich mikrobiom i szczepionki mikrobiologiczne. Przeanalizowanie zagadnień z ekologii mikroorganizmów np. interakcji mikroorganizm-mikroorganizm, strategii życia i stanu fizjologicznego mikroorganizmów zasiedlających gleby skażone to kolejny temat, poznanie którego daje szansę na stworzenie efektywnego biopreparatu wspomagającego zabiegi fitoremediacyjne. W kolejnych etapach planuję przeanalizować liczebność i aktywność mikroorganizmów zaangażowanych w poszczególne etapy cyklu krążenia węgla, azotu, fosforu i siarki w glebach skażonych.

VIII. Tabelaryczne podsumowanie dorobku naukowego

Typ publikacji	Przed doktoratem (A)			Po doktoracie (B)			Łącznie (A+B)		
	Liczba	IF ₂₀₁₆	Punkty MNIŚW	Liczba	IF ₂₀₁₆	Punkty MNIŚW	Liczba	IF ₂₀₁₆	Punkty MNIŚW
Czasopisma z bazy JCR	1	0.795	15	8	16.448	200	9	17.243	215
Czasopisma spoza bazy JCR	1	0	0	1	0	14	2	0	14
Rozdziały w monografiach w języku angielskim	1	0	5	1	0	5	2	0	10
Rozdziały w monografiach w języku polskim	0	0	0	8	0	5	8	0	5
Podsumowanie	3	0.795	20	18	16.448	224	21	17.243	244

DONIESIENIA KONFERENCYJNE

Konferencje międzynarodowe	4	17	21
Konferencje ogólnopolskie	6	59	65
Podsumowanie	10	76	86

Lublin, 15 stycznia 2018

Małgorzata Majewska
Małgorzata Majewska