

Załącznik nr 3

AUTOREFERAT

**przedstawiający osiągnięcie naukowe, zgłaszane jako przedmiot
postępowania habilitacyjnego, życiorys naukowy wnioskodawcy
oraz pozostałe osiągnięcia naukowe**

dr Anna Szafranek-Nakonieczna

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku
Katedra Biochemii i Chemii Środowiska



WYDZIAŁ
BIOTECHNOLOGII
I NAUK O ŚRODOWISKU | **KUL**

LUBLIN 2019

Spis treści

1. Prezentacja danych ogólnych dotyczących habilitantki	3
1.1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
2. Informacje o przebiegu pracy naukowej.....	3
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. 2017 r. poz. 1789):.....	4
3.1. Publikacja wchodzące w skład osiągnięcia naukowego; autorzy, tytuły publikacji, rok wydania	4
3.2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
3.2.1. Wprowadzenie	5
3.2.2. Cel badań	9
3.2.3. Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe.....	9
3.2.4. Wnioski.....	17
3.2.5. Literatura	17
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	18
5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora.....	18
5.2. Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora (nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego).....	21
5.3. Działalność dydaktyczna i organizacyjna na rzecz Uniwersytetu.....	28
6. Podsumowanie dorobku naukowego i dane bibliometryczne	30
6.1. Publikacje i konferencje	30
6.2. Cytowania i indeks Hirscha.....	30

1. Prezentacja danych ogólnych dotyczących habilitantki

Imię i nazwisko: Anna Szafranek-Nakoneczna

Adres służbowy: Katedra Biochemii i Chemii Środowiska

Instytut Biotechnologii

Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

ul. Konstantynów 1 I, 20-708 Lublin

1.1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

19.06.2001 – tytuł **magistra ochrony środowiska** uzyskany na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. Studia zakończone wynikiem bardzo dobrym. Tytuł pracy magisterskiej: „**Emisja NO_x i SO₂ w pobliżu pasma jezdni w cyklu dobowym**”. Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej.

28.10.2009 – stopień **doktora nauk biologicznych w zakresie biologii**, uzyskany na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Wpływ warunków środowiskowych na aktywność metanogenów i metanotrofów w wybranych złożach torfu Poleskiego Parku Narodowego**”. Promotorem rozprawy był śp. dr hab. Riccardo Paolo Bennicelli, prof. KUL.

2. Informacje o przebiegu pracy naukowej

2001 – 2010	Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy (obecnie Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku), Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, asystent naukowo-dydaktyczny
2010 – do chwili obecnej	Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, adiunkt naukowo-dydaktyczny

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. 2017 r. poz. 1789):

"Konwersja materii organicznej z udziałem metanogenów i metanotrofów"

3.1. Publikacja wchodzące w skład osiągnięcia naukowego; autorzy, tytuły publikacji, rok wydania

A1. Szafranek-Nakonieczna Anna[✉], Stępniewska Zofia, Aerobic and anaerobic respiration in profiles of Polesie Lubelskie peatlands, International Agrophysics, 2014, 28, 2, 219-229. DOI: <https://doi.org/10.2478/intag-2014-0011>.

IF₂₀₁₃ 1,142; IF_{5 letni}:1,167; punktacja MNiSW₂₀₁₄: 25; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 14

A2. Szafranek-Nakonieczna Anna[✉], Stępniewska Zofia, The influence of the aeration status (ODR, Eh) of peat soils on their ability to produce methane, Wetlands Ecology and Management, 2015, 23:665–676, DOI 10.1007/s11273-015-9410-x.

IF₂₀₁₄ 1,274; IF_{5 letni}:1,886; punktacja MNiSW₂₀₁₅: 30; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 6

A3. Szafranek-Nakonieczna Anna[✉], Zheng Yanhong., Słowakiewicz Mirosław, Pytlak Anna, Polakowski Cezary, Kubaczyński Adam, Bieganowski Andrzej, Banach Artur, Wolińska Agnieszka, Stępniewska Zofia, Methanogenic potential of lignites in Poland, International Journal of Coal Geology, 2018, 196, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2018.07.010>.

IF₂₀₁₇ 4,130; IF_{5 letni}:5,451; punktacja MNiSW₂₀₁₆: 40; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 1

A4. Szafranek-Nakonieczna Anna[✉], Stępniewska Zofia, Pytlak Anna, Potencjalna możliwość wykorzystania metanogenów torfowiskowych w zgazowywaniu materiałów o różnym stopniu uwęglenia – rozdział w monografii „Energia i środowisko w produkcji, zarządzaniu i logistyce – wybrane problemy, Lublin 2016, 93-102.

IF₂₀₁₅ --; IF_{5 letni}: --; punktacja MNiSW₂₀₁₆: 2,5; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 0

A5. Szafranek-Nakonieczna Anna[✉], Wolińska Agnieszka, Zielenkiewicz Urszula, Kowalczyk Agnieszka, Stępniewska Zofia, Błaszczuk Mieczysław, Activity and identification of methanotrophic bacteria in arable and no-tillage soils from Lublin region (Poland). *Microbial Ecology*, 2019, 77, 701-712. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1248-3> (opublikowana online 01.10.2018).

IF₂₀₁₇ 3,614; IF_{5 letni}:3,710; punktacja MNiSW₂₀₁₆: 35; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 0

A6. Pytlak Anna[✉], Stępniewska Zofia, Kuźniar Agnieszka, **Szafranek-Nakonieczna Anna**, Wolińska Agnieszka, Banach Artur, Potential for aerobic methane oxidation in Carboniferous coal measures, *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31 (8), 737-747. DOI: 10.1080/01490451.2014.889783

IF₂₀₁₃ 1,804; IF_{5 letni}:2,166; punktacja MNiSW₂₀₁₄: 30; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 5

✉ - autor korespondencyjny

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **11,964** i/lub **14,380** (uwzględniając IF_{5 letni})

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **162,5** (zgodnie punktacją obowiązującą w roku 2016: **152,5**)

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, **stan na dzień 24.04.2019** (wg bazy Web of Science): **26**

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego udokumentowano w **Załączniku nr 7**.

3.2. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi 6 prac opublikowanych w latach 2014–2019, pod wspólnym tytułem: **"Konwersja materii organicznej z udziałem metanogenów i metanotrofów"**

3.2.1. Wprowadzenie

Materia organiczna jest jednym z podstawowych komponentów skorupy ziemskiej, składającym się z obumarłych szczątków roślin i zwierząt, a także produktów ich rozkładu,

a więc zawierającym związki węgla pochodzenia organicznego. Pod względem chemicznym są to węglowodany, tłuszcze, woski, taniny, ligniny, białka i aminokwasy (Thormann, 2011). Zależnie od warunków aeracyjnych panujących w środowisku, w którym zachodzi odkładanie materii organicznej, może być ona magazynowana lub efektywnie rozkładana. W środowisku gleb mineralnych, zwłaszcza uprawnych materia organiczna ulega dynamicznym przekształceniom, które powodują, że tylko jej niewielka część pozostaje w glebie. Odmierna sytuacja ma miejsce w ekosystemach, które kształtują się na nieprzepuszczalnym podłożu, sprzyjającym retencji wody. W warunkach dużej wilgotności pojawiają się deficyty tlenu, co w znacznym stopniu ogranicza mineralizację materii organicznej. Takimi ekosystemami są gleby torfowe, w których obumierające szczątki roślin stają się kolejną warstwą torfu i biotopem dla pozostających we wzajemnych relacjach organizmów: bakterii, archeonów, grzybów, nicieni, roztoczy i roślin (Kamal i Varma 2008). Przy sprzyjających warunkach klimatycznych, tj. utrzymywaniu się dużej wilgotności w miejscu powstawania torfowiska, proces odkładania może trwać tysiące lat, jak ma to miejsce w przypadku torfowisk z obszaru Polesia Lubelskiego (Dobrowolski i in., 2009).

Torf jest prekursorem węgla kopalnych. Anaerobowa transformacja torfowej materii organicznej, zgromadzonej w pradawnych torfowiskach, głównie za przyczyną mikroorganizmów, doprowadziła do powstania kwasów humusowych z ligniny i celulozy, a w dalszej kolejności do ich maceracji i zagęszczenia, czemu towarzyszył proces biologicznego formowania metanu (CH_4). W kolejnym etapie przemian substancji węglotwórczej, które przebiegało z chwilą przykrycia torfowiska, nastąpiło odwodnienie i zmniejszenie porowatości zgromadzonego materiału pod wpływem temperatury i ciśnienia, czyli procesów geologicznych i geochemicznych, co doprowadziło do wykształcenia węgla brunatnego. W porównaniu z torfem węgiel brunatny charakteryzuje się wzrostem zawartości C oraz zmianą struktury związków chemicznych, polegającą na przemianach w łańcuchach bocznych i ich rozkładzie (dehydratacja, dekarboksylacja). W wyniku dalszych przemian, wywołanych intensyfikacją czynników geologicznych (ciśnienia i temperatury) następowała kondensacja pierścieni aromatycznych. Każda z kolejnych przemian prowadziła do powstania bardziej złożonych produktów, które tworzą tzw. szereg węglowy: torf → węgiel brunatny → węgiel kamienny → antracyt → grafit (Keppeler 2006, Probierz 2012). Na każdym z etapów wspomnianego szlaku węglowego wydzielany był metan, początkowo będący efektem procesów o naturze biologicznej, a następnie procesów termicznych.

Przekształcenie złożonych związków organicznych do prostszych organicznych (metanu) i nieorganicznych (dیتlenku węgla) z udziałem mikroorganizmów odgrywa kluczową rolę w globalnym cyklu węgla. W zależności od struktury chemicznej, związki jakie tworzą materię organiczną rozkładane są szybko (cukry, skrobie i białka), wolno (celuloza, tłuszcze, woski i żywice) lub bardzo wolno (lignina, inne związki pierścieniowe). Prędkość rozkładu zależy zatem od jakości materii/związków organicznych, parametrów fizykochemicznych środowiska, a przede wszystkim od obecności mikroorganizmów i ich zdolności do rozkładania poszczególnych grup związków organicznych. Jednym z najważniejszych czynników determinujących tempo rozkładu materii organicznej jest dostępność tlenu. Reakcje, w których tlen jest ostatecznym akceptorem elektronów są znacznie bardziej korzystne energetycznie, przez co rozkład w warunkach aerobowych jest znacznie szybszy niż w warunkach anaerobowych, a jego głównym produktem jest dیتlenek węgla (CO_2). Przy ograniczonej dostępności tlenu w środowisku, w następstwie np. dużej wilgotności, mikroorganizmy wykorzystują inne akceptory elektronów (np. azotany, siarczany), które są mniej efektywne z punktu widzenia termodynamiki procesu. W warunkach tych rozkład materii organicznej zachodzi mniej intensywnie a w jego efekcie powstaje głównie metan (Mesle i in., 2013).

Za proces formowania CH_4 odpowiedzialne są metanogeny, wyjątkowa grupa autotroficznych, anaerobowych mikroorganizmów, posiadających unikalną wśród żywych organizmów zdolność wytwarzania metanu, jako jednego z produktów procesu metabolicznego. Taksonomicznie metanogeny zgrupowane zostały w 5 klasach: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia*, *Methanopyri* oraz *Thermoplasmata* należące do typu *Euryarchaeota*, domeny *Archaea*. Według ostatnich doniesień, na podstawie analiz metagenomicznych postuluje się, że również niektórzy przedstawiciele typów *Bathyarchaeota* i *Verstraetearchaeota* posiadają zdolność wytwarzania metanu (Evans i in., 2015; Vanwonterghem i in., 2016). Metanogeny to mikroorganizmy zróżnicowane pod względem wymagań środowiskowych. Są zdolne do wzrostu w warunkach skrajnie ekstremalnych temperatur, pH, zasolenia czy ciśnienia. Od bakterii różnią się m.in. budową ściany i błony komórkowej, a także wymaganiami substratowymi. Warunkami koniecznymi do zaistnienia procesu metanogenezy są: ograniczony dostęp światła, siarki, azotanów, występowanie właściwego substratu węglowego, niski potencjał oksydoredukcyjny, ale przede wszystkim warunki anaerobowe. W obecności tlenu następuje bowiem degradacja enzymów uczestniczących w szlaku metanogenicznym, takich jak np. reduktaza metylo-koenzymu M (MCR), a w konsekwencji całkowite zahamowanie wzrostu i aktywności metanogenów (Nagle i Wolfe 1983, Cedervall i in., 2010). Metanogeny, podobnie jak wszystkie archeony ograniczają

się do wykorzystywania prostych związków jako źródła węgla i energii. Główne szlaki metaboliczne metanogenicznych *Archaea* to: metanogeneza hydrogenotroficzna (substratami są ditlenek węgla i wodór), acetotroficzna (octany) i metylotroficzna (związki metylowane, jak: metanol, metyloaminy, metylosiarczki) (Jones i in. 2008, Buran 2018). Ponieważ większość metanogenów nie jest w stanie metabolizować związków węgla zawierających więcej niż jeden atom tego pierwiastka, a materia organiczna zbudowana jest z szerokiej gamy związków chemicznych dlatego też konwersja materii organicznej do CH₄ jest możliwa tylko dzięki kooperacji metanogenów i bakterii. Bakterie te (głównie z rodzaju *Clostridium*, *Bacteroides* i *Acetobacterium*) wstępnie rozkładają duże molekuly organiczne, np. celulozę do prostych substancji (w procesie hydrolizy, acidogenezy i acetogenezy) (Demirel i Scherer 2008).

Ze względu na to, że CH₄ jest gazem cieplarnianym (o ponad 28-krotnie większej wydajności w zatrzymywaniu promieniowania cieplnego w porównaniu z CO₂) bardzo ważny jest również proces jego usuwania z atmosfery (Esson i in., 2016). Znaczna część atmosferycznego CH₄ jest usuwana w troposferze na drodze reakcji fotochemicznych z rodnikiem hydroksylowym (OH[•]). Drugim ważnym elementem decydującym o stężeniu CH₄ w atmosferze są bakterie metanotroficzne, dla których metan jest źródłem zarówno węgla jak i energii (Sabrekov i in., 2016). Proces biologicznego utleniania metanu zachodzi już bezpośrednio w środowisku jego powstawania (np. w natlenionych warstwach torfowisk), dzięki czemu dochodzi do ograniczenia, jednak nie całkowitej eliminacji, emisji CH₄ do atmosfery. Atmosferyczny metan może być również utleniany przez metanotrofy zasiedlające ekosystemy, które mają kontakt z powietrzem atmosferycznym, np. powierzchniowe poziomy gleb (Sengupta i Dick, 2017).

Tlenowe bakterie metanotroficzne to podgrupa bakterii metylotroficznych, należących do klas: *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* i *Verrucomicrobia* (Kravchenko i Sukhacheva, 2017). W oparciu o szlaki asymilacji węgla, filogenezę, chemotaksonomię i strukturę błon wewnętrznych, metanotrofy zostały podzielone na dwa typy (I i II). Typ I skupia metanotrofy charakteryzujące się niskim powinowactwem do metanu (stężenie metanu powyżej 40 ppm), dominujące w środowiskach zasobnych w CH₄ i składniki odżywcze lecz ubogich w tlen. Typ II metanotrofów, to przede wszystkim metanotrofy o wysokim powinowactwie do metanu (zdolne do utleniania CH₄ w stężeniu poniżej 40 ppm), występujące głównie w środowiskach ubogich w metan i azot, ale bogatych w tlen (Ho i in., 2013). Do typu I zalicza się przedstawicieli rodziny *Methylococcaceae* (klasa *Gammaproteobacteria*), podczas gdy typ II obejmuje przedstawicieli rodzin *Methylocystaceae* i *Beijerinckiaceae* z klasy *Alphaproteobacteria* (Serrano-Silva i in., 2014; Sengupta i Dick, 2017). Utlenianie metanu w

warunkach aerobowych jest katalizowane przez monooksygenazę metanową (MMO), która może występować w formie cząsteczkowej (pMMO) lub rozpuszczonej (sMMO), w zależności od dostępności miedzi w środowisku (Ghashghavi i in., 2017).

Metan jest również cennym substratem energetycznym, dlatego też zjawisko metanogenezy jest wykorzystywane w biogazyfikacji różnego rodzaju odpadów organicznych. W ostatnich latach trwają na całym świecie intensywne badania nad możliwością gazyfikacji węgla kopalnych do czystszej formy energii jaką jest biogaz. Ze względu na strukturę związków chemicznych, wchodzących w skład węgla: kondensację, dużą zawartość związków pierścieniowych, jest to trudny substrat dla mikroorganizmów, zwłaszcza w warunkach beztlenowych, które muszą być zapewnione dla wzrostu metanogenów.

3.2.2. Cel badań

Konwersja materii organicznej w warunkach anaerobowych, w różnych środowiskach prowadzi do wytworzenia metanu, który jeśli nie zostanie utleniony i wzbogaci atmosferę będzie potęgował efekt cieplarniany. Z tego względu rozpoznanie dynamiki procesów metanogenezy i metanotrofii oraz uwarunkowań środowiskowych jest niezwykle ważne i stanowi przedmiot moich zainteresowań naukowych.

Celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było:

- ✓ wyznaczenie wydajności anaerobowej konwersji materii organicznej o różnym stopniu przekształcenia do metanu [publikacje: **A1, A2, A3**],
- ✓ wyznaczenie parametrów warunkujących zjawiska metanogenezy i metanotrofii w różnych środowiskach [publikacje: **A2, A3, A4, A5, A6**],
- ✓ wykazanie i porównanie wydajności mikroorganizmów w utlenianiu metanu w środowiskach: glebowym i głębokiej biosferze [publikacje: **A5, A6**],
- ✓ analiza możliwości zastosowania konsorcjów mikroorganizmów torfowych w gazyfikacji węgla kopalnych [**A4**].

3.2.3. Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe

Biologiczne wytwarzanie CH₄ jest unikalną właściwością metanogenicznych *Archaea*, które jednak nie byłyby do tego zdolne bez udziału bakterii. To właśnie dzięki aktywności bakterii rozkładane są wielkocząsteczkowe struktury, tworzące materię organiczną do prostszych związków, jak: H₂ i CO₂, octany, związki metylowane, które stanowią odpowiednie substraty dla metanogenów. Obecność bakterii tlenowych, mikroaerofilnych oraz fakultatywnie tlenowych prócz udziału w dekompozycji materii organicznej, zapewnia odpowiednie warunki do aktywności metanogenów poprzez wykorzystanie obecnego w środowisku tlenu. Poznanie

powiązań pomiędzy poszczególnymi parametrami a mikroorganizmami jest kluczem do zrozumienia cyklu biogeochemicznego węgla w glebach torfowych.

Miarą aktywności ogółu mikroorganizmów zasiedlających dane środowisko jest ich aktywność respiracyjna (RA, ang. respiration activity), dlatego też realizację postawionych przeze mnie celów badawczych rozpocząłam od wyznaczenia RA w materiale torfowym. Korzystając, z unikalnej w skali kraju, różnorodności obszaru Polesia Lubelskiego (w regionie tym znajduje się około 800 torfowisk) do badań wybrałam torfowiska reprezentujące typy charakterystyczne dla obszaru Polski oraz Europy Środkowej. Typy te wydzielane są w oparciu o sposób zasilania torfowisk w wodę, wynikający z ukształtowania podłoża na którym się one rozwijają oraz ich lokalizacji, determinujący rodzaj roślinności porastającej torfowiska, która po obumarciu tworzy kolejne jego pokłady. Były to torfowiska: (1) niskie zasilane wodami gruntowymi oraz spływającymi z okolicznych terenów, z roślinnością zdominowaną przez turzycę; (2) wysokie zasilane wodami opadowymi, porośnięte głównie przez mchy torfowce oraz (3) przejściowe wykazujące cechy zarówno torfowiska niskiego jak i wysokiego [A1].

Wybrane do badań torfy różniły się parametrami fizykochemicznymi, takimi jak: pH, stopień rozkładu materii organicznej, wilgotność, zawartość węgla organicznego (TOC, ang. total organic carbon), przewodnictwo elektrolityczne (EC, ang. electrolytic conductivity) oraz zawartość biogennych form azotu. Ponieważ w torfowiskach możliwe jest czasowe natlenienie, na skutek obniżenia poziomu wód gruntowych związanych z warunkami pogodowymi, dlatego też inkubację torfów prowadziłam w warunkach aerobowych (AE, ang. aerobic, powietrze atmosferyczne) oraz anaerobowych (AN, ang. anaerobic, atmosfera helu) w temperaturze od 5 do 20°C. Badaniami objęłam profile o porównywalnej miąższości (0-80 cm) z podziałem na strefy (20 cm każda). Wykazałam RA w każdym z badanych torfów, w zakresie 0,018-0,497 oraz 0,013-0,227 g CO₂ kg s.m.⁻¹ d⁻¹, odpowiednio w warunkach aerobowych i anaerobowych. Dostępność tlenu statystycznie istotnie modyfikowała RA ($p < 0,05$). Brak tlenu jako ostatecznego akceptora elektronów powodował obniżenie RA nawet o 77%, jednak w niektórych przypadkach wyznaczono porównywalne wartości RA w obydwu wariantach jak np. w torfie z poziomu 0-20 cm, z torfowiska wysokiego inkubowanym w temperaturze 20°C lub nawet niższe w warunkach aerobowych, jak miało to miejsce w głębszych poziomach tego torfowiska. Może to świadczyć o dostosowaniu mikrobiomu do warunków aeracyjnych *in situ*. Mikroorganizmy zasiedlające torf niski i przejściowy były bardziej wrażliwe na wzrost temperatury w warunkach AE, wartości współczynnika Q₁₀ (ang. temperature quotient) (od 4,15 do 8,72) były średnio dwukrotnie wyższe niż w warunkach AN (1,17-5,54), natomiast

w torfowisku wysokim wyznaczono porównywalne wartości w obydwu wariantach (średnia dla profilu to ok. 5,4). Współczynnik RQ (ang. respiratory quotient) wyznaczony w aerobowej części doświadczenia przyjmował wartości zbliżone do 1, co świadczy o utlenianiu kwasów organicznych (np. fulwowych, huminowych) (Brzezińska 2006). Wykazałam ponadto, że położenie w profilu oraz stopień rozkładu materii organicznej negatywnie wpływały na RA, zarówno w warunkach aerobowych, jak i anaerobowych, podczas gdy w przypadku EC oraz stężenia azotu w formie azotynowej wpływ był pozytywny.

Ponieważ metanogeny to mikroorganizmy anaerobowe, a obecność tlenu w środowisku jest dla nich toksyczna, w dalszej części badań wyznaczyłam graniczne parametry aeracyjne, przy których występowała aktywność metanogeniczna [A2]. Do badań tych wybrałam glebę pochodzącą z profilu (0-80 cm) torfowiska niskiego (ten typ torfowisk dominuje na obszarze Polski), charakteryzującą się najmniejszym spośród badanych przeze mnie gleb torfowych [A1], stopniem rozkładu materii organicznej, a zatem dużą dostępnością związków węgla. Jako wskaźniki stanu natlenienia zastosowałam (1) potencjał oksydoredukcyjny (Eh), który jest wypadkową procesów utleniania i redukcji w środowisku oraz (2) wydatek dyfuzji tlenu (ODR, ang. oxygen diffusion rate), który pozwala określić ilość dostępnego w glebie tlenu cząsteczkowego (pierwotnie stosowany do pomiaru dostępności tlenu dla korzeni roślin). Były to pierwsze badania, w których w warunkach laboratoryjnych, zastosowano ODR jako wskaźnik metanogenezy. Doświadczenie prowadziłam w dwóch wariantach: aerobowym (AE) oraz anaerobowym (AN), w zakresie temperatur 5-20°C. Wykazałam, że zastosowane wskaźniki stanu aeracji: Eh i ODR były ściśle powiązane z wytwarzaniem metanu przez metanogeniczne społeczności mikrobiologiczne. Aktywność metanogeniczna (MGA, ang. methanogenic activity) wyznaczona w wariancie AN mieściła się w przedziale 20,3-71860 $\mu\text{g CH}_4 \text{ kg s.m.}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, podczas gdy w wariancie AE sięgała maksymalnie 15610 $\mu\text{g CH}_4 \text{ kg s.m.}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Otrzymane wyniki sugerują zatem, że metanogeny zamieszkujące naturalne torfy mogą przetrwać warunki czasowego natlenienia ($\text{ODR} > 60 \mu\text{g O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\text{Eh} > +400 \text{ mV}$). Wartość graniczna Eh ustalona dla procesu metanogenezy w badanym torfie wynosiła +240 mV, natomiast w przypadku ODR było to $20 \mu\text{g O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Wyznaczone wartości Eh są wyższe niż wcześniej opisane dla gleb torfowych (poniżej -75mV) z innych regionów świata. Wykazałam ponadto, że temperatura ma znaczący wpływ na wartości wskaźników natlenienia wymaganych do zaistnienia metanogenezy. Wraz z obniżeniem się temperatury (z 20 do 10 i do 5°C), niższe wartości wskaźników natlenienia były wymagane aby wystąpiła metanogeneza. Czas potrzebny do wytworzenia, w układach doświadczalnych, warunków odpowiednich do produkcji metanu (stwierdzenia obecności CH_4) wahał się od 3 do 259 dni,

w zależności od temperatury i głębokości w profilu, z którego pochodził badany torf. Stres tlenowy w połączeniu z niską temperaturą (5°C) skutecznie zahamował proces metanogenezy w obrębie całego badanego profilu torfowego (0-80 cm). W ciągu 300 dni trwania eksperymentu nie stwierdzono obecności metanu w atmosferze nad inkubowanymi próbkami torfu. W pozostałych wariantach temperaturowych (10 i 20°C), w następstwie stresu oksydacyjnego, zaobserwowano spadek MGA o 28 - 99% w stosunku do warunków anaerobowych. Aktywność metanogeniczna zmieniała się wraz z głębokością w profilu torfowym. Około czterokrotnie wyższa MGA charakteryzowała poziom wierzchni (0-40 cm) w porównaniu z głębszą strefą (40-80 cm). Rozkład aktywności metanogenicznej w profilu jest zgodny z wykazaną wcześniej przeze mnie (w pracy **A1**) wydajnością mikroorganizmów w degradacji materii organicznej, która była zdecydowanie wyższa w strefie 0-40 cm niż 40-80 cm.

Wyniki moich badań potwierdziły, że ODR może być stosowany jako wskaźnik metanogenezy w glebach organicznych. Wykazałam bowiem statystycznie istotne, odwrotnie proporcjonalne zależności pomiędzy ODR i produkcją metanu, analogicznie jak w przypadku Eh, a także ścisłą zależność pomiędzy ODR i Eh ($p < 0,001$). Wyznaczone korelacje wskazują na możliwość włączenia tych wskaźników (Eh, ODR) jako czynników w modelowaniu emisji metanu z gleb torfowych. Ponadto stosunkowo wysokie wartości zarówno Eh jak i ODR, przy których stwierdzono efektywny proces metanogenezy, mogą świadczyć o istnieniu mechanizmów chroniących metanogeny przed stresem tlenowym. Może być to wynikiem niejednorodnej struktury gleby i istnienia obok siebie mikrosiedlisk natlenionych i anaerobowych lub występowania metanogenów w konsorcjum z bakteriami, które chronią komórki archeonów przed bezpośrednią ekspozycją na tlen.

Badanie aktywności metanogenicznej kontynuowałam na węglach brunatnych, które stanowią następne ogniwo w szeregu węglowym po torfach. Skupiłam się na wyznaczeniu naturalnego potencjału metanogenicznego dwu głównych złóż węgla brunatnego w Polsce (Bełchatów i Turów), które wytworzyły się w okresie od paleocenu do późnego miocenu [**A3**]. Mikrobiologiczne zgazowanie węgla cieszy się w ostatnich latach dużym zainteresowaniem ze względu na konieczność opracowania bardziej przyjaznych dla środowiska metod produkcji energii. Właściwe określenie aktualnego potencjału metanogenicznego węgla wymaga wielopłaszczyznowego podejścia. Pierwszy problem dotyczy odróżnienia gazu pochodzącego z procesów biologicznych (metanogenezy) od formowanego w skorupie ziemskiej gazu geogenicznego. W tym celu przeprowadzono analizę frakcjonowania stabilnych izotopów

węgla $\delta^{13}\text{C}$ w CO_2 i CH_4 , która potwierdziła biologiczne pochodzenie gazów występujących we wszystkich z badanych węgli.

Kolejny problem stanowiła naturalna zdolność węgla do retencji formowanego gazu. Rozróżnienie metanogenezy od fizycznej desorpcji gazów wymagało zastosowania kontroli biologicznych zawierających sulfonian 2-bromoetanu (BES), który jest inhibitorem metanogenezy. Potencjał metanogeniczny wyznaczony został w oparciu o długoterminowe inkubacje węgla, pochodzących z górnej i dolnej strefy złóż Kopalni Węgla Brunatnego Bełchatów (złóże o miąższości 44 m, badane próbki pochodziły odpowiednio z głębokości 112 i 156 m poniżej powierzchni gruntu) i Turów (złóże o miąższości 85 m, badane próbki pochodziły odpowiednio z głębokości 170 i 255 m poniżej powierzchni gruntu), w temperaturze od 10 do 40 °C. Wydzielanie CH_4 potwierdziłam we wszystkich badanych próbkach węgla brunatnego, niezależnie od zastosowanej kombinacji (z lub bez BES), co wskazuje, że następowało jednak uwalnianie CH_4 przez desorpcję z porowatej matrycy węglowej. Jedynym węglem brunatnym, w którym występowała wyraźna dominacja ilości gazu uwolnionego z węgla brunatnego w porównaniu z kontrolą (z dodatkiem BES) był węgiel pochodzący z górnej części pokładu kopalni Bełchatów (BCB-W1), gdzie produkcja CH_4 w 30°C osiągnęła 0,064 ng g⁻¹ dzień⁻¹ i była prawie trzykrotnie wyższa niż w kontroli. Występowanie metanogenezy w innych badanych węglach brunatnych nie może być całkowicie wykluczone, ponieważ $\delta^{13}\text{C}$ wskazuje na biogenne pochodzenie gazu we wszystkich próbkach, jednak tempo metanogenezy może być w nich zbyt powolne, aby można to było stwierdzić w stosowanych eksperymentalnych ramach czasowych (340 dni).

W pracy tej [A3] podjęłam się również rekonstrukcji warunków paleośrodowiskowych, w celu wyjaśnienia, w jaki sposób środowisko formowania złóż węgla brunatnego wpływało na proces metanogenezy. Jako wskaźniki wybrałam biomarkery lipidowe: tetraetery izoprenoidowe (iGDGT, z ang. isoprenoid glycerol dialkyl glycerol tetraether) i rozgałęzione (brGDGT, ang. branched glycerol dialkyl glycerol tetraether). Cząsteczki te stanowią „archiwum” informacji na temat różnorodności i przeszłej aktywności mikroorganizmów występujących w określonej warstwie osadów. Wykazałam, że we wszystkich lignitach zawartość GDGT-0 (lipidów pochodzących od metanogenów) stanowiła minimalnie 57% ogółu iGDGT, a najwyższą ich zawartością (ponad 66%) charakteryzował się węgiel pobrany z górnych partii pokładu węgla brunatnego z kopalni Bełchatów (BCB-W1, z głębokości 112 m poniżej powierzchni gruntu). Dominującymi w ogólnej puli lipidów były formy brGDGT pochodzenia bakteryjnego, z wyjątkiem węgla BCB-W1, w którym to przeważały lipidy wytwarzane przez *Archaea*. Dodatkowo, rekonstrukcja warunków klimatycznych,

przeprowadzona poprzez obliczenie wskaźników: pH oraz średniej rocznej temperatury (MAAT, ang. mean annual air temperature), na podstawie GDGT, wykazała że formowanie się węgla zachodziło przy pH 4,9-6,99, w temperaturze 14,3-20,3°C. Mimo, że w każdym z węgla wykazano obecność markerów lipidowych pochodzących od metanogenów, to aktywność metanogeniczną potwierdziłam jedynie w węglu BCB-W1, który charakteryzował się największym udziałem GDGT-0 w puli GDGT oraz którego formowanie zachodziło w obojętnym pH (6,99), najbardziej odpowiednim dla rozwoju metanogenów.

Potwierdziłam też, że inaktywacja szlaków metanogenicznych przez BES powodowała stymulację wydzielania CO₂, co sugeruje obecność aktywnej społeczności bakteryjnej, przypuszczalnie zaangażowanej w rozkład lignin.

Ponieważ naturalny potencjał metanogeniczny węgla brunatnych jest stosunkowo niewielki, dlatego należy rozważyć możliwość biostymulacji tego procesu przez allochtoniczne konsorcja mikroorganizmów. W artykule przeglądowym [A4] zawarłam rozpoznanie literaturowe na temat rezultatów biostymulacji metanogenezy węgla kopalnych z innych regionów świata (Australia, USA, Chiny). Wysunęłam wnioski, iż aby uniknąć wprowadzania wraz z allochtonicznym konsorcjum obcej materii organicznej (co może dawać fałszywie pozytywne wyniki) wskazana jest stymulacja konsorcjami, które można hodować w warunkach laboratoryjnych, co pozwala też na zoptymalizowanie warunków ich wzrostu. Na podstawie dostępnych danych literaturowych wskazałam, że obok źródła węgla, zasadniczymi komponentami, wspierającymi rozwój metanogenów są związki nieorganiczne, takie jak: NH₄Cl, KH₂PO₄, K₂HPO₄, KCl, MgCl₂, CaCl₂, sole metali: Mn, Fe, Co, Zn, Cu, Al, Mo, a także związki organiczne takie jak np. peptydy, aminokwasy, puryny, pirymidyna, cukry i witaminy z grupy B (Jones i in. 2008, 2010; Han i in., 2012).

Dotychczasowe badania potencjału mikroorganizmów, zasiedlających torfy z różnych regionów świata, potwierdzają ich dużą wydajność metanogeniczną, podobnie jak wykazałam to w przypadku torfowisk Polesia Lubelskiego [A2, A4]. Różnorodność gatunkowa metanogenicznych mikroorganizmów torfowych oraz możliwość ich hodowli na sztucznych podłożach pozwala na sformułowanie hipotezy, iż mikroorganizmy te mogą stanowić potencjalne źródło inokulatów efektywnych w rozkładzie węgla kopalnego do metanu.

W mojej pracy badawczej metan zajmował ważne miejsce także ze względu na fakt, iż jego obecność w atmosferze przyczynia się do pogłębiania efektu cieplarnianego, co ma swoje konsekwencje w obserwowanych zmianach klimatu. W tym kontekście biologiczne utlenianie jest ważnym, naturalnym procesem przeciwdziałającym wzrostowi stężenia metanu w atmosferze.

Zjawisko metanotrofii dotychczas zostało dosyć dobrze rozpoznane w środowiskach lądowych, charakteryzujących się dużą zasobnością w materię organiczną, jak np. torfowiska, uprawy ryżowe czy tereny podmokłe. Potencjał metanotroficzny torfowisk Polesia Lubelskiego był między innymi, przedmiotem moich wcześniejszych badań [Zał. 4; II. A17, A23]. Znacznie mniej wiadomo na temat procesu utleniania CH_4 w glebach mineralnych, w szczególności uprawnych, poddawanych zabiegom agrotechnicznym. Właściwa ocena wpływu użytkowania rolniczego na zdolność gleb do utleniania metanu jest możliwa tylko przy odpowiednim doborze prób, uwzględniającym tak ważny aspekt jak zróżnicowanie genetyczne gleb. W celu uniknięcia błędnej interpretacji zaproponowałam, aby jako kontrole do gleb uprawnych wybrać gleby od wielu lat nieuprawiane, stanowiące nieużytki, reprezentujące ten sam rząd i typ. Dlatego też do swoich badań [A5] wytypowałam gleby reprezentatywne dla obszaru Lubelszczyzny, zgodnie z międzynarodową klasyfikacją FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations) reprezentujące następujące rzędy gleb: płowoziemne (*Luvisols*, typ *Albic Luvisol*), rdzawoziemne (*Arenosols* typ *Brunic Arenosol*), czarnoziemne (*Chernozems*, typ *Haplic Chernozem*) oraz brunatnoziemne (*Cambisols*, typ *Calcaric Cambisol*). Badając aktywność metanotroficzną tych gleb wykazałam, że utlenianie CH_4 zachodziło w szerokim zakresie stężenia dostępnego metanu, od 0,002 do 10% v/v oraz temperatur (10-30°C), we wszystkich badanych rzędach glebach, z wyjątkiem gleby płowoziemnej uprawianej. Wyznaczona aktywność metanotroficzna (MTA) mieściła się w zakresie 0,05 - 3200 $\mu\text{Mol CH}_4 \text{ kg s.m.}^{-1} \text{ d}^{-1}$, zależnie od typu badanej gleby oraz wariantów eksperymentu. Wśród badanych gleb najwyższym potencjałem utleniania metanu, ponad 3200 oraz 1550 $\mu\text{Mol CH}_4 \text{ kg s.m.}^{-1} \text{ d}^{-1}$ charakteryzowała się gleba czarnoziemna, odpowiednio nieuprawiana i uprawiana, podczas gdy najniższy potencjał wyznaczono dla gleb brunatnoziemnych, 99 i 53 $\mu\text{Mol CH}_4 \text{ kg s.m.}^{-1} \text{ d}^{-1}$ odpowiednio w glebie kontrolnej i uprawianej. Biorąc pod uwagę cały zbiór uzyskanych danych wykazałam negatywny wpływ uprawy gleb na ich aktywność metanotroficzną. W glebach uprawianych MTA była średnio 2-krotnie niższa niż w glebach kontrolnych lub nie została stwierdzona jak w przypadku gleby płowoziemnej uprawianej. Analiza danych wykazała, że MTA w sposób statystycznie istotny była modyfikowana przez uprawę gleby, dostępność substratu, typ gleby oraz temperaturę ($p < 0,05$). Badając wpływ temperatury za pomocą współczynnika Q10 wykazałam większą wrażliwość metanotrofów na wzrost temperatury z 10 na 20°C, niż przy wzroście temperatury z 20 do 30°C. Maksymalna wartość współczynnika Q10 sięgała 9,7. W dalszej części badań wykazałam, że MTA w optymalnych warunkach (30°C i 10% CH_4 v/v) była silnie stymulowana przez wzrost pH, Eh, TOC, wilgotności i stężenia N- NO_2 . W oparciu o sekwencjonowanie

następnej generacji (NGS, ang. next-generation sequencing), wykonane dla wszystkich badanych gleb, bakterie metanotroficzne zidentyfikowano jako przynależne do rodzaju *Methylocystis*. Mikroorganizmy te stanowiły maksymalnie 0,1% społeczności mikroorganizmów glebowych. Warto podkreślić, że bakterie z tego rodzaju posiadają dwa typy monooksygenazy metanowej (pMMO), tj. pMMO1 i pMMO2, które umożliwiają wzrost bakterii odpowiednio w środowiskach o wysokiej i niskiej koncentracji metanu, co wyjaśnia wykazaną aktywność metanotroficzną w tak szerokim zakresie stężenia CH₄. Ma to również duże znaczenie ekologiczne w kontekście zmian i ochrony klimatu.

W mojej pracy badawczej wykazałam również, że zdolność do utleniania metanu nie jest wyłącznie cechą ekosystemów związanych z powierzchnią Ziemi, ale również z głęboką biosferą [A6]. Potwierdziłam to wyznaczając MTA w skałach towarzyszących aktywnie wydobywanym pokładom węgla (pokłady 328, 329, 348), pochodzących ze stropu i spągu, z Kopalni Węgla Kamiennego Krupiński (Górnośląskie Zagłębie Węglowe - GZW). Węgłe te charakteryzowały się dość wysoką metanonośnością (do 7 m³ CH₄ t węgla⁻¹). Inkubacje w temperaturze 30 °C (wybranej na podstawie wcześniejszych badań jako optymalna), przy wilgotności 100% i koncentracji metanu 10% v/v wykazały, że każda ze skał charakteryzowała się zdolnością do utleniania metanu, sięgającą od 100 do 2200 μMol CH₄ kg s.m.⁻¹ d⁻¹. Były to wartości porównywalne do wyznaczonych analogicznie aktywności w skałach towarzyszących węglom z Kopalni Węgla Kamiennego Bogdanka (Lubelskie Zagłębie Węglowe - LZW). Dalsza analiza wykazała, że badane skały różniły się między sobą optymalnymi warunkami dla MTA. W skałach z kopalni Krupiński była to wilgotność 50% oraz 10% CH₄ v/v z tendencją do obniżania MTA wraz ze wzrostem wilgotności, podczas gdy w skałach z kopalni Bogdanka wilgotność 100%, stężenie CH₄ wynoszące 20% v/v oraz wzrost MTA wraz ze wzrostem stężenia metanu. Zastosowanie kontroli w postaci autoklawowanych próbek węgla potwierdziło biologiczny charakter utleniania metanu. W każdym z materiałów wykazano ponadto wartości Eh powyżej 300 mV, które we wcześniejszych badaniach wskazano jako sprzyjające rozwojowi bakterii metanotroficznych.

Biorąc pod uwagę warunki w jakich kształtowały się węgle kamienne można wnioskować, że obecność metanotrofów może być związana z genezą węgla i przekształcaniem pokładów torfowych, w których za sprawą metanogenicznych *Archaea* zachodziło wydzielanie metanu, dzięki czemu mogły rozwijać się bakterie metanotroficzne. Inne prawdopodobne wyjaśnienie obecności bakterii metanotroficznych może być związane z filtracją złoża przez wody opadowe, które mogły transportować metanotrofy z gleb położonych nad złożem. Rekonstrukcja warunków tworzenia węgla w kopalni Krupiński wskazuje, że w procesie

katagenezy przypuszczalna temperatura oscylowała pomiędzy 120-160°C, a zatem nie pozwalała na przetrwanie pierwotnych mikroorganizmów podczas gdy w kopalni Bogdanka było to możliwe ponieważ prawdopodobna temperatura w tym okresie wahała się pomiędzy 50-60°C. Obecność tlenowych bakterii metanotroficznych w głębokiej biosferze może świadczyć o ich adaptacji do trudnych warunków środowiskowych.

3.2.4. Wnioski

W pracach **A1–A6** włączonych do osiągnięcia naukowego wykazałam potencjał metanogeniczny i metanotroficzny środowisk dotychczas stosunkowo słabo rozpoznanych (takich jak skały towarzyszące pokładom węgla, węgle brunatne, gleby mineralne) lub o znaczącym udziale w procesie transformacji materii organicznej (gleby torfowe) oraz określiłam czynniki warunkujące te aktywności.

Za najważniejsze osiągnięcia przeprowadzanych badań uważam:

- ✓ Określenie wpływu warunków geologicznych na etapie formowania złoża (na podstawie GDGT) na aktywność mikroorganizmów metanogenicznych występujących w złożach węgla brunatnego;
- ✓ Wskazanie zasadności zastosowania analiz biomarkerów lipidowych (iGDGT, brGDGT) do rozpoznania potencjału biotechnologicznego lignitów w odniesieniu do produkcji biogazu;
- ✓ Potwierdzenie, iż metanogeny wykazują zdolność do przetrwania w warunkach natlenienia mierzonych za pomocą wskaźników Eh i ODR;
- ✓ Wykazanie, że ODR koreluje negatywnie z aktywnością metanogeniczną i może być szybką metodą określania potencjału metanogenicznego gleb organicznych;
- ✓ Potwierdzenie, iż tlenowe bakterie metanotroficzne są zdolne do przetrwania przez długi czas w warunkach anaerobiozy (np. w kopalniach);
- ✓ Wykazanie negatywnego wpływu rolniczego zagospodarowania gleb reprezentujących różne rzędy na obecność i aktywność bakterii metanotroficznych.

3.2.5. Literatura

1. Brzezińska M. (2006) Biological activity and accompanying it processes in organic soils irrigated in treated urban sewage (in Polish). Acta Agrophys., 131(2), 1-176.
2. Cedervall P.E., Dey M., Pearson A.R., Ragsdale S.W., Wilmot C.M. (2010) Structural insight into methylcoenzyme M reductase chemistry using coenzyme B analogues. Biochemistry. 49(35), 7683–7693.
3. Demirel B., Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review, Rev Environ Sci Biotechnol 7: 173.
4. Dobrowolski R., Bałaga K., Rodzik J., Gazda L., 2009. Bottom deposits of Lake Moszne in the Polesie National Park - lithostratigraphy and palaeoenvironmental interpretation, Teka Komisji Ochrony i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego – OL PAN, 6, 51–57.

5. Esson K.C., Lin X., Kumaresan D., Chanton J.P., Murrell J.C., Kostka J.E. (2016) Alpha- and gammaproteobacterial methanotrophs codominate the active methane-oxidizing communities in an acidic boreal peat bog. *Appl Environ Microbiol* 82:2363–2371.
6. Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W. (2015) Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science* 350:434–438
7. Ghashghavi M., Jetten M.S.M., Lüke C. (2017) Survey of methanotrophic diversity in various ecosystems by degenerate methane monooxygenase gene primers. *AMB Express* 7(1):162. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0466-2>
8. Han W., Hai L., Yingbo D., Mengqi S., Yangzi L. (2012) Experiments on the gas production of brown coal degraded by exogenous methanogens. *Petrplum Exploration and Development*, 39(6), 813–817.
9. Ho A., Erens C.H., Mujinya B.B., Boeckx P., Baert G., Schneider B., Frenzel P., Boon N., Ranst E.W. (2013) Termites facilitate methane oxidation and shape the methanotrophic community. *Appl Environ Microbiol* 79(23):7234–7240.
10. Jones E.J.P., Voytek M.A., Warwick P.D., Corum M.D., Cohn A., Bunnell J.E., Clark A.C., Orem W.H., (2008) Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples, *International Journal of Coal Geology*, 76, 138–150.
11. Jones E.J.P., Voytek M.A., Corum M.D., Orem W.H. (2010) Stimulation of methane generation from nonproductive Coal by addition of nutrients or a microbial consortia, *Applied of Environmental Microbiology*, 76(21), 7013–7022.
12. Kamal S., Varma A.: *Peatland Microbiology*, in: *Microbiology of Extreme Soils*, edited by: Dion P., and Nautiyal C. S., *Soil Biology*, Springer Berlin Heidelberg, 177–203, 2008.
13. Keppeler J.G., 2006. Coals, lignite, peat, in Kutz M. (ed), *Mechanical Engineers' Handbook: Energy and Power*, Vol. 4, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc.
14. Kravchenko I., Sukhacheva M. (2017) Methane oxidation and diversity of aerobic methanotrophs in forest and agricultural soddy–podzolic soils. *Appl Soil Ecol* 119:267–274
15. Nagle D.P., Wolfe R.S. (1983) Component A of the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium*: resolution into four components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2121–2155.
16. Probiez K., 2012. Petrologia węgla w rozpoznaniu węgla koksowych rejonu Jastrzębia, *Górnictwo i Geologia*, Tom 7, Zeszyt 3, 87–117.
17. Sabrekov A.F., Glagolev M., Alekseychik P.K., Smolentsev B.A., Terenteva I.E., Krivenok L.A., Maksyutov S.S. (2016) A process-based model of methane consumption by upland soils. *Environ Res Lett* 11(7):075001.
18. Sengupta A., Dick W.A. (2017) Methanotrophic bacterial diversity in two diverse soils under varying land use practices as determined by high throughput sequencing of the *pmoA* gene. *Appl Soil Ecol* 119:35–45
19. Serrano-Silva N., Sarria-Guzmán Y., Dendooven L., Luna-Guido M. (2014) Methanogenesis and methanotrophy in soil: a review. *Pedosphere* 24(3):291–307.
20. Thormann N.M., 2011. In vitro decomposition of Sphagnum-derived acrotelm and mesotelm peat, *Mires and Peat*, Vol. 8, Article 03, 1–12.
21. Vanwonterghem I., Evans P.N., Parks D.H., Jensen P.D., Woodcroft B.J., Hugenholtz P., Tyson G.W. (2016) Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nat Microbiol* 1:16170.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W latach 1996–2001 byłam studentką kierunku Ochrona Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. W roku akademickim 2000/2001 otrzymałam stypendium zakładowe w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska, w ramach którego uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w tej Katedrze, co pozwoliło mi na zdobycie pierwszych doświadczeń związanych z pracami laboratoryjnymi i analitycznymi. Pracę

magisterską pt.: „Emisja NO_x i SO₂ w pobliżu pasma jezdni w cyklu dobowym” wykonałam w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej. Efektem realizacji pracy magisterskiej były moje pierwsze publikacje naukowe przygotowane wspólnie z promotorem pracy [**Zał. 5: II.A30, A31, A33**], które dotyczyły jakości powietrza w obszarze miejskim. W pracach tych określiłam zmiany pH oraz zawartości form azotu w opadach atmosferycznych oraz stężenia tlenków azotu (N₂O, NO, NO₂) w powietrzu atmosferycznym, punktu pomiarowego zlokalizowanego na terenie Lublina, w pobliżu jezdni o dużym natężeniu ruchu samochodowego. W badaniach tych, spośród analizowanych związków azotu, wskazałam NO₂ jako dominującą formę zanieczyszczeń, okresy zimy jako czas o najwyższym poziomie zanieczyszczeń w powietrzu, a także kwasowy charakter opadów atmosferycznych.

Po ukończeniu studiów w 2001 roku i uzyskaniu tytułu magistra ochrony środowiska, rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska kierowanej przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską. Początkowo kontynuowałam tematykę badawczą podjętą w trakcie realizacji pracy magisterskiej. W dalszych badaniach wykazałam typowo cykliczne (w ujęciu rocznym, tygodniowym i dobowym) zmiany stężenia zanieczyszczeń gazowych oraz istnienie ścisłej zależności pomiędzy natężeniem ruchu ulicznego a stężeniem NO_x i SO₂ w powietrzu. Uzyskane wyniki zaprezentowałam w formie referatu, na międzynarodowej konferencji w Lublinie (2005) [**Zał. 5: II.K.2**] oraz w formie posteru na międzynarodowej konferencji w Wilnie (Litwa, 2008) [**Zał. 5: III.B.9**]. Równolegle włączyłam się też w zapoczątkowane w Katedrze, przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską, badania związane z procesami zachodzącymi w glebach organicznych jakimi są gleby torfowe. Obiekty moich badań zlokalizowane były na terenie Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego. W pierwszej kolejności swoją uwagę skupiałam na uwalnianiu fosforanów (związków biogennych), z gleb torfowych o różnym stopniu przekształcenia [**Zał. 5: II.A28**]. Były to torfy z naturalnie funkcjonującego torfowiska, zrenaturalizowanego oraz osuszonego w wyniku melioracji, planowanego do renaturalizacji. Otrzymane wyniki wskazywały na uwalnianie fosforanów w każdym z badanych materiałów glebowych w warunkach wysycenia wodą, jednakże w torfie zrenaturalizowanym oraz zmeliorowanym stężenie fosforanów było ujemnie skorelowane z potencjałem oksydoredukcyjnym (Eh) oraz dodatnio ze stężeniem jonów żelaza (Fe²⁺). Otrzymane wyniki zaprezentowałam również w formie referatu ustnego na ogólnopolskiej konferencji w Polańczyku (2003) [**Zał. 5: II.K.1**].

W kolejnych badaniach skupiłam się na wyznaczeniu emisji metanu z naturalnego, dystroficznego, zasobnego w związku węgla, jeziora Moszne. W trakcie 24-godzinnego monitoringu wykazałam, że badany zbiornik jest znaczącym źródłem emisji CH₄ do atmosfery. W pobranych próbkach gazowych uwolnionych ze strefy jeziora zawartość CH₄ stanowiła do 60% v/v, natomiast emisja z strefy brzegowej jeziora była prawie 60-krotnie niższa. W obu przypadkach wykazałam statystycznie istotny, pozytywny wpływ temperatury na ilość emitowanego metanu. Wyniki te zostały również zaprezentowane na konferencji międzynarodowej w Budapeszcie (Węgry, 2004) [Zał. 5: III.B.1]. W dalszych badaniach określiłam wartości Eh w procesie formowania metanu w profilu torfowisk, w warunkach *in situ*. Badanie te pozwoliły na stwierdzenie, że wydzielanie metanu z gleb następuje przy wartościach Eh poniżej -50mV, a ilość produkowanego CH₄ jest negatywnie skorelowana z wartościami potencjału oksydoredukcyjnego. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w formie rozdziału w monografii [Zał. 5: II.A27] oraz zaprezentowane na międzynarodowych konferencjach w Wiedniu (Austria, 2005) oraz w Kiel (Niemcy, 2007) [Zał. 5: III.B.4 i 7].

Moje zainteresowania naukowe skupiły się również na wyznaczeniu odpowiedzi mikroorganizmów zasiedlających gleby, na zanieczyszczenia pestycydami, co było mierzone między innymi w oparciu o aktywność respiracyjną (RA, metodą chromatograficzną). Zanieczyszczenie gleby murszowej oraz mady rzecznej glifosatem skutkowało obniżeniem aktywności respiracyjnej o 31-73%, podczas gdy w czarnej ziemi zanotowano wzrost RA o 73% w porównaniu do kontroli. We wszystkich glebach z dodatkiem glifosatu obserwowano natomiast wzrost emisji N₂O nawet o ponad 90% w stosunku do kontroli [Zał. 5: II.A25]. Wprowadzenie fonofosu do gleby torfowo-murszowej oraz czarnej ziemi powodowało inhibicję aktywności mikrobiologicznej, obniżenie RA odpowiednio nawet o 50 i 63%. Ponadto w obu glebach zaobserwowano również redukcję ilości emitowanego N₂O i CH₄ w rezultacie zanieczyszczenia fonofosem [Zał. 5: II.A26]. Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane na międzynarodowych konferencjach naukowych w Viterbo (Włochy, 2007) a także w Lublinie (2005) [Zał. 5: III.B. 6 i 8].

Zdobyte doświadczenie w oznaczaniu składników powietrza atmosferycznego z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej (GC) umożliwiło mi przygotowanie podrozdziału metodycznego w podręczniku pt. „Wybrane metody badań gleboznawczych”, wydanego dla studentów Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego KUL [Zał. 5: II.A32]. Zdobyte umiejętności pozwoliły mi również na włączenie się w tematykę Katedry realizowaną przez dr hab. Riccardo Bennicelli (prof. KUL), związaną z badaniem potencjału paprotki

wodnej *Azolla caroliniana* do usuwania metali ciężkich (Cd, Hg) w połączeniu ze śledzeniem zmian natlenienia podłoża w trakcie tego procesu. Przygotowanie mieszanek gazowych o różnej, ściśle zdefiniowanej zawartości tlenu (pomiar chromatograficzny), którymi następnie wysycano płynne podłoże stosowane do wzrostu paprotki, pozwoliło na porównanie dwóch metod pomiaru natlenienia cieczy: za pomocą elektrody Clarka (DO) oraz poprzez wyznaczenie mikrodyfuzji tlenu (ODR) stosowanej dotychczas w badaniach środowisk glebowych. Działanie to pozwoliło na wskazanie ODR, jako techniki bardziej dokładnej a następnie zastosowanie jej w doświadczeniu, które wykazało pozytywny wpływ *Azolla caroliniana* na natlenienie podłoża, na którym wzrastała. Wyniki tych badań zostały zawarte w publikacji naukowej [Zał. 5: II.A18], a także były prezentowane na międzynarodowej konferencji, w Lublinie (2005) [Zał. 5: III.B.5].

Wstępne badania gleb torfowych pod kątem ich udziału w emisji metanu stały się podstawą do sformułowania tematu pracy doktorskiej, której celem było określenie parametrów środowiskowych (wilgotność, zawartość różnych form węgla, form biogenywnych azotu i fosforu, położenie w profilu torfowym, temperatura, pH, zasolenie, Eh) warunkujących aktywność metanogenów oraz metanotrofów zasiedlających torfowiska. Było to pierwsze opracowanie dotyczące wspomnianych procesów dla wybranych torfowisk z obszaru Polski. Różnorodność i bogactwo obszaru Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego pozwoliły na wytypowanie do badań obiektów o zróżnicowanej genezie, a więc reprezentujących torfowiska niskie, przejściowe i wysokie, które jak potwierdziły przeprowadzane badania, różniły się pod względem zdolności zarówno do tworzenia, jak i utleniania metanu, a także wykazywały zróżnicowane pod względem mikroorganizmów odpowiedzialnych za te procesy. Badania te, ze względu na rozbudowaną część doświadczalną pozwalającą na kompleksowe podejście do zjawisk metanogenezy i metanotrofii w glebach torfowych, wymagały zaplecza finansowego, które zostało zagwarantowane dzięki uzyskaniu finansowania podjętego tematu przez MNiSW w ramach grantu promotorskiego (N 304 102 32/3859, realizowanego w latach 2007-2009) [Zał. 5: II.I.5].

5.2. Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora (nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego)

Po uzyskaniu stopnia doktora w 2009 roku rozwijałam moje zainteresowanie naukowe związane z procesem wytwarzania oraz utleniania metanu w środowisku gleb torfowych. Wiedza zdobyta w trakcie realizacji pracy doktorskiej umożliwiła mi przygotowanie rozdziału, w recenzowanym podręczniku akademickim, który poświęcony był charakterystyce

metanogenów, omówieniu funkcji jakie pełnią one w środowisku oraz metod ich badania i identyfikacji [Zał. 5: II.A24].

Proces biologicznego tworzenia metanu jest nieodzownie związany z jego utlenianiem, dlatego też w miejscu powstawania metanu zachodzi również jego utlenianie. Szczegółowe badania przeprowadzone na torfie pochodzącym z profilu (0-80 cm) torfowiska niskiego (Garbatówka) wskazały na jego wysoką, sięgającą $145 \text{ mg CH}_4 \text{ kg s.m.}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ zdolność utleniania metanu. MTA potwierdziłam w torfie, w każdej z badanych temperatur, ponadto wykazałam pozytywny wpływ temperatury torfu na wydajność utlenienia metanu ($p < 0,001^{***}$). Czynnikiem modyfikującym okazało się być także położenie w profilu torfowym, najgłębszy poziom cechował się najwyższą MTA [Zał. 5: II.A17].

W dalszych badaniach wykazałam, że MTA zależna jest od dostępności metanu w środowisku. 5-krotny wzrost stężenia dostępnego CH_4 (z 1 na 5%) powodował nawet ponad 7-krotny wzrost MTA. Dane zgromadzone w trakcie doświadczeń laboratoryjnych na dwóch kolejnych torfach potwierdziły pozytywny wpływ temperatury (w zakresie $5\text{-}20^\circ\text{C}$) na aktywność metnotrofów zasiedlających te gleby. Wskazałam również, że MTA jest warunkowana genetycznym pochodzeniem torfu. Najwyższa aktywność metanotroficzna charakteryzowała torf wysoki, niższa torf przejściowy, a najmniej wydajnie utlenianie metanu zachodziło w torfie niskim. Utlenianie metanu zaobserwowano zarówno w torfie o odczynie silnie kwaśnym ($\text{pH}=3$), jak i zbliżonym do obojętnego. Cennym uzupełnieniem moich badań była identyfikacja bakterii metanotroficznych odpowiedzialnych za proces utleniania metanu. Ze względu na obecność kwasów humusowych, które silnie wiążą się z DNA jego izolacja z gleb torfowych oraz amplifikacja specyficznych fragmentów DNA jest etapem problematycznym. W dwóch spośród trzech wytypowanych, najaktywniejszych metanotroficznie materiałów torfowych zidentyfikowałam, na podstawie porównania sekwencji genu *pmoA* kodującego podjednostkę enzymu pMMO charakterystycznego dla metanotrofów oraz sekwencji genu kodującego 16S rRNA, metanotrofy z rodzaju *Methylobacter* (torf niski) oraz *Methylocystis* i *Methylosinus* (torf wysoki) [Zał. 5: II.A23]. Otrzymane wyniki zaprezentowałam również w formie referatów oraz prezentacji posterowych na międzynarodowych oraz ogólnopolskich konferencjach naukowych w Lublinie [Zał. 5: II.K.5, 6; III.B.13, 16].

Torfowiska są niezwykle ciekawymi i dynamicznymi obiektami, w których zachodzi szereg procesów biogeochemicznych. Jednym z nich jest uwalnianie Mn, ważnego pierwiastka śladowego, ale również pierwiastka, który przy dużych stężeniach może być toksyczny dla

mikroorganizmów i roślin. Badania wykazały zróżnicowanie pomiędzy torfowiskami pod względem ilości uwalnianego Mn, jednocześnie potwierdziły zależność tego procesu od warunków Eh panujących w złożu torfu [Zał. 5: II.A16].

Właściwości torfu pozwalają śledzić proces rozwoju torfowiska jak również dostarczają informacji o zbiorowiskach roślinnych, które ten torf tworzyły. Zmiany jednej właściwości fizykochemicznej takiej jak np. pH czy dostępność węgla decydują o ilościowej i jakościowej strukturze mikroorganizmów zasiedlających torf. Fluktuacje jednego z komponentów pociągają za sobą modyfikację innych właściwości. Doskonałym obiektem do tego typu badań było torfowisko otaczające jezioro Moszne w Poleskim Parku Narodowym, powstałe poprzez sukcesję roślinności torfotwórczej na taflę jeziora. W efekcie tego procesu, w strefie przybrzeżnej ukształtowało się torfowisko przejściowe, które następnie przechodzi w bór bagienny. Z obszaru torfowiska przejściowego pobrano profile o nienaruszonej strukturze (0-750 cm), które następnie, w warunkach laboratoryjnych, na podstawie analiz mikroskopowych, podzielono na strefy zróżnicowane pod względem stopnia rozkładu zdeponowanej materii organicznej. Następnie oznaczono w każdym z poziomów skład roślinności torfotwórczej, pH, Eh, EC, oraz zawartość form węgla organicznego (TOC), nieorganicznego (IC, ang. inorganic carbon) i rozpuszczonego (ekstrakcja wodna) oraz w materiale torfowym i gytii. Wielopłaszczyznowe podejście, tzn. badanie procesów fizykochemicznych w połączeniu z oznaczaniem makroszczątków roślinnych, było możliwe dzięki współpracy z Instytutem Gleboznawstwa, Inżynierii i Kształtowania Środowiska Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Zróżnicowanie parametrów fizykochemicznych w profilach, pomiędzy poszczególnymi poziomami torfu i gytii wskazywały na wielofazowy proces akumulacji materii organicznej związany z przekształcaniem zbiorowisk torfotwórczych (następowaniem po sobie różnych zespołów roślinności torfotwórczej) w następstwie zmian klimatycznych jak i antropopresji. Dominującą formą węgla w materiale torfowym był węgiel organiczny (TOC) podczas gdy w gytii zaobserwowano wzrost stężenia nieorganicznych związków węgla. Zawartość i stopień rozkładu materii organicznej, które wzrastały z głębokością, wyraźnie wpływały na przewodnictwo elektrolityczne (EC). Wyniki wspólnych badań zostały przedstawione w formie publikacji [Zał. 5: II.A14], były również prezentowane na międzynarodowej konferencji w Bari (Włochy, 2012) [Zał. 5: III.B.15].

Bardzo ważnym czynnikiem mającym wpływ na emisję metanu z torfowisk jest roślinność oraz zasiedlające ją endofityczne bakterie metanotroficzne, dlatego też włączyłam się w badania, których celem było wykazanie wpływu roślin naczyniowych: *Sphagnum* spp.,

Eriophorum vaginatum, *Carex nigra* i *Vaccinium oxycoccos* na emisję CH₄. Badania prowadzono zarówno *in situ* (metoda komorowa) jak również w warunkach laboratoryjnych (inkubacje). W przypadku *Vaccinium* sp. zaobserwowano znacznie niższą emisję niż z powierzchni pozbawionej roślinności. Udział pozostałych roślin w obniżaniu emisji CH₄ był zależny od ich stadium rozwoju. Najbardziej widoczne różnice stwierdzono w przypadku badanych roślin z rodziny *Cyperaceae*, które w okresie letnim przyczyniały się do wzrostu emisji metanu, najprawdopodobniej poprzez jego transport z gleby za pośrednictwem aerenchimy, natomiast jesienią wyraźnie ją obniżały. Endofityczne metanotrofy można znaleźć zarówno w częściach nadziemnych jak również podziemnych, najwyższą aktywność stwierdzono w okresie letnim. Na podstawie przeprowadzonej identyfikacji (w oparciu o sekwencję fragmentu genu kodującego 16S rRNA) wskazano zróżnicowanie metanotrofów zasiedlających badane gatunki roślin. Rośliny z rodzin *Sphagnaceae* i *Cyperaceae* były zasiedlone przez metanotrofy z rodzaju *Methylomonas*, podczas gdy *V. oxycoccos* przez *Methylobacter*. Otrzymane wyniki były prezentowane na międzynarodowej konferencji naukowej w Jeju (Korea, 2014) [Zał. 5: III.B.21] oraz zostały przedstawione w publikacji [Zał. 5: II.A9].

Obecność metanotrofów została potwierdzona w powierzchniowych warstwach gleb, w tkankach roślin. Natomiast niewiele jest danych o ich obecności w głębokiej biosferze, dlatego też uczestniczyłam w badaniach przeprowadzonych na materiale gazowym i skalnym pobranym z otoczenia pokładów soli w Kopalni Soli Wieliczka. Na podstawie tych badań potwierdziłam obecność CH₄ w powietrzu z kopalni, w stężeniu nawet 7-krotnie wyższym niż zwykle mierzone jest w powietrzu atmosferycznym, co świadczy o obecności CH₄ w materiale skalnym i jego uwalnianiu do atmosfery. Badania laboratoryjne wykazały natomiast ubytek metanu z atmosfery w trakcie inkubacji skał. Najbardziej wydajną była skała, w otoczeniu której, w warunkach naturalnych, wykazano najwyższe stężenie metanu, czyli największą dostępność substratu, który jest źródłem węgla dla bakterii metanotroficznych. MTA była ponadto dodatnio skorelowana z dostępnością takich składników odżywczych jak :NH₄⁺, NO₃⁻ ($p < 0,05$) oraz obecnością Mg ($p < 0,05$). Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie publikacji, a także zostały zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych w Grodnie (Białoruś, 2017) [Zał. 5: II.A8; III.B.51, 63].

Zainteresowałam się również procesami jakie zachodzą w glebach mineralnych. Gleby użytkowane rolniczo, zwykle gleby mineralne, stanowią ponad 60% powierzchni kraju. Są to gleby zróżnicowane pod względem parametrów fizykochemicznych jak również

mikrobiologicznym. Mikroorganizmy są ważnym komponentem środowiska glebowego, uczestniczą bowiem w obiegu węgla. Gleba jest zatem dynamicznym układem i znaczącym źródłem emisji CO₂ do atmosfery. Rezultatem aktywności mikrobiologicznej jest powstawanie CO₂, dlatego też wyznaczanie aktywności respiracyjnej (RA) w glebach jest ważnym wskaźnikiem odzwierciedlającym kondycję mikrobiologiczną gleb, podczas gdy iloraz oddechowy (RQ) wskazuje na rodzaj utlenianych substancji i odzwierciedla stan fizjologiczny biomasy mikroorganizmów. W przeprowadzonych badaniach wykazałam różnice w aktywności respiracyjnej pomiędzy glebami reprezentującymi różne typy oraz warstwami w profilu glebowym. Najwydajniejszą RA wyznaczyłam w warstwach powierzchniowych (16,8-91,2 mg CO₂ kg⁻¹ d⁻¹) i była ona zależna, zwłaszcza w głębszych poziomach profilu, od fizykochemicznych parametrów gleb, takich jak: dostępność tlenu (ODR), potencjał oksydoredukcyjny (Eh), wilgotność i dostępność wody w glebie (pF) oraz gęstość gleby ($p < 0,001$). Najwyższe wartości RQ stwierdziłam w poziomach powierzchniowych z tendencją do obniżania wraz z głębokością. W nielicznych przypadkach RQ był wyższy od 1, co może wskazywać m.in. na wykorzystywanie przez bakterie innych niż tlen akceptorów elektronów. Wyniki badań opublikowane zostały w formie artykułu oraz prezentowane na krajowych konferencjach [Zał. 5: II.A15; III.B.12, 44].

Nasilające się obciążenia gleby spowodowane zanieczyszczeniami, zabiegami mającymi na celu intensyfikację produkcji roślinnej, zmianami klimatu wiążą się z modyfikacją mikrobiologicznych właściwości gleb. Parametrami, które mogą być odzwierciedleniem tych zmian jest wspomniana już wcześniej aktywność respiracyjna (RA) mikroorganizmów glebowych oraz analiza zawartości biomasy (MB). Parametry te wykorzystałam zatem jako wskaźnik w badaniu gleb o różnym sposobie zagospodarowania [Zał. 5: II.A7]. Badania przeprowadzone na glebach użytkowanych i nieużytkowanych rolniczo, reprezentujących charakterystyczne dla obszaru Lubelszczyzny typy, pozwoliły na wykazanie znacznych różnic pod względem aktywności respiracyjnej jak również biomasy mikroorganizmów. W przypadku obu tych parametrów wyższe wartości stwierdziłam w glebach nieużytkowanych rolniczo ($p < 0.001$). Otrzymane wyniki potwierdzają zatem mikrobiologiczną degradację gleb powodowaną zabiegami agrotechnicznymi. Poparciem tego wniosku jest również stwierdzona niższa aktywność dehydrogenazowa w glebach uprawianych w porównaniu do nieuprawianych. Porównanie natomiast otrzymanych wyników, określających aktywność mikrobiologiczną z zawartością węgla łatwobiodegradowalnego (ang. easily degradable carbon – EDC), wykazało istnienie istotnych powiązań między RA, MB i ECD (odpowiednio

$\rho = 0,77^*$ oraz $\rho = 0,53^*$). Wykonane analizy wskazują, że zawartość EDC w glebach może stanowić potencjalny indyktor/wskaźnik ich biologicznej degradacji. Wyniki te zostały zaprezentowane podczas międzynarodowej konferencji naukowej w Piranie (Słowenia, 2015) [Zał. 5: III. B.39].

Aktywność respiracyjna oraz biomasa mikroorganizmów były również wykorzystane jako wskaźniki aktywności biologicznej gleb w kontekście uprawy owsa i pszenżyta [Zał. 5: II.A19]. Badania te wykazały, że uprawa pszenżyta korzystniej wpływa na utrzymanie właściwości biologicznych gleb w porównaniu z uprawą owsa. Gleby spod uprawy pszenżyta charakteryzowały się ponadto wyższą aktywnością dehydrogenaz (AD), wyższymi wartościami pH i większą zasobnością w węgiel i pierwiastki biogenne (N i P). Tematyka ta była prezentowana na międzynarodowym kongresie mikrobiologicznym, odbywającym się w Maastricht (Holandia, 2015) [Zał. 5: III.B.29, 30].

Aktywność respiracyjna gleb świadczy nie tylko o aktywności obecnych w niej mikroorganizmów ale także odzwierciedla tempo rozkładu obecnych w niej różnego rodzaju związków, dlatego też, może być wykorzystana jako wskaźnik biodegradacji zanieczyszczeń. Konsekwencją rosnącego rozwoju technologicznego jest zwiększone zapotrzebowanie na energię, co jest powiązane ze zwiększeniem zużycia paliw, takich jak: ropa naftowa i jej pochodne. Wiąże się to ze wzrostem ryzyka zanieczyszczenia środowiska glebowego tymi substancjami. Aktywność respiracyjną wykorzystano zatem jako jeden ze wskaźników oceny wydajności mikroorganizmów autochtonicznych zasiedlających glebę murszastą (*Mollic Gleysol*). Badania wykazały ponad 3-krotny wzrost RA w wyniku zanieczyszczenia gleb przez ropę naftową, olej silnikowy nowy oraz przepracowany (5g zanieczyszczenia na 10 g gleby). Podwojenie dawki zanieczyszczeń skutkowało obniżeniem RA, ale była ona ciągle większa niż w wariancie kontrolnym (gleba bez dodatku zanieczyszczeń). 3-krotny wzrost zanieczyszczenia gleby ropą naftową i olejem silnikowym powodował odpowiednio RA wyższą i porównywalną w stosunku do kontroli. Dla mikroorganizmów glebowych dodane zanieczyszczenia ropopochodne stanowiły dodatkowe źródło węgla. Jedynie w przypadku benzyny zaobserwowano redukcję RA o ponad 50% już przy najmniejszej dawce zanieczyszczeń w stosunku do gleby kontrolnej i dalsze obniżanie RA wraz ze wzrostem dawki zanieczyszczeń. Rezultaty badań wskazują, że RA jest wiarygodnym wskaźnikiem efektywności rozkładu zanieczyszczeń. Otrzymane wyniki pozwalają sądzić, że mikroorganizmy zasiedlające tę glebę, wykazują potencjał w wydajnej biodegradacji zanieczyszczeń, co może mieć biotechnologiczne zastosowanie przy opracowywaniu

skutecznych preparatów w rekultywacji terenów skażonych, bez konieczności genetycznej modyfikacji mikroorganizmów. Analizy molekularne pozwoliły na zidentyfikowanie bakterii glebowych, zdolnych do bytowania w warunkach zanieczyszczeń ropopochodnymi jako reprezentantów rodzajów: *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Bacillus* oraz *Paenibacillus*. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji, a także były prezentowane na konferencjach: międzynarodowej w Gdańsku (2015) oraz ogólnopolskiej w Szczecinie (2015) [Zał. 5: II.A13, III.B.32, 33].

Uczestnicząc w badaniach dotyczących wskazania indykatorów biologicznej degradacji gleb rolniczych wyznaczyłam w nich NPL (najbardziej prawdopodobną liczbę) bakterii amonifikacyjnych oraz ich aktywność amonifikacyjną, wyrażoną szybkością metabolizowania argininy. Porównanie gleb użytkowanych rolniczo z glebami kontrolnymi (nieuprawianymi, reprezentującymi te same typy co gleby uprawiane) pod względem aktywności amonifikacyjnej bakterii wykazało znacznie niższą aktywność w glebach użytkowanych rolniczo. Konsekwentnie NPL bakterii amonifikacyjnych również była znacznie niższa (redukcja o ponad 93%) niż w glebach kontrolnych. Uzyskane rezultaty zostały przedstawione w publikacji naukowej, a także zaprezentowałam je na konferencji we Wrocławiu [Zał. 5: II.A12, III.B.35].

Aktywnie uczestniczyłam również w badaniach mających na celu porównanie mikrobiomu gleb rolniczych i nieużytkowanych rolniczo [Zał. 5: II.A10]. W pierwszej kolejności przyporządkowałam badane typy gleb do rzędów zgodnie z międzynarodową klasyfikacją WRB (World Reference Base for Soil Resources) z zachowaniem podziału gleb zgodnie ze sposobem użytkowania. Następnie przyporządkowałam badanym glebom operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU – ang. Operational Taxonomic Unit) należące do *Bacteroidetes*. Pozwoliło to na wykazanie wrażliwości przedstawicieli tego typu na zabiegi agrotechniczne związane z uprawą gleb, przejawiające się redukcją OTU *Bacteroidetes* w glebach uprawnych nawet o ponad 50% w stosunku do gleb kontrolnych, reprezentujących ten sam rząd. Uzyskane wyniki przedstawiłam na konferencji mikrobiologicznej w Sieniawie. Prezentacja ta została uznana za najlepszą prezentację posterową tej konferencji [Zał. 5: III.B.45; III.D].

Brałam też aktywny udział w badaniach mających na celu porównanie profilu metabolicznego gleby torfowo-murszowej (*Mollic Gleysol*) o różnym sposobie zagospodarowania (łąka naturalna i koszona). W ramach tych badań wykonałam część pomiarów z wykorzystaniem techniki Biolog EcoPlate™. Otrzymane wyniki wskazały na

znacznie szybszą degradację testowanych związków węgla przez mikroorganizmy zasiedlające łąkę koszoną. Efektywność wykorzystania różnych źródeł węgla była następująca: aminokwasy> kwasy karboksylowe> polimery> aminy i amidy> węglowodany. Odzwierciedleniem otrzymanych wyników były różnice w społeczności mikroorganizmów pomiędzy tymi dwoma stanowiskami. Wynik tych badań zostały opracowane w formie publikacji naukowej [Zał. 5: II.A11] oraz zaprezentowane na ogólnopolskiej konferencji w Puławach (2017) [Zał. 5: III.B.56].

W trakcie mojej pracy naukowej podjęłam współpracę z Instytutem Gleboznawstwa, Inżynierii i Kształtowania Środowiska Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Zakładem Badań Systemu Gleba–Roślina oraz Zakładem Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie, Katedrą Nauk o Środowisku Glebowym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Zakładem Mikrobiologii Rolniczej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach, Instytutem Geochemii, Mineralogii i Petrologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Key Laboratory of Continental Dynamics, Department of Geology, Northwest University w Xi'an w Chinach [szczegóły Zał. 5: III.Q.6].

Byłam/jestem wykonawcą w 6 projektach naukowych [Zał. 5: II.I]. Potwierdzeniem aktywności naukowej jest też mój czynny udział w licznych (52) konferencjach naukowych, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych, gdzie prezentowałam wyniki badań w formie referatów (12) i posterów (80) [szczegóły Zał. 5: II.K; III.B]. Korzystałam również z możliwości uczestniczenia w zagranicznych konferencjach ściśle związanych z moimi zainteresowaniami naukowymi (słuchacz) [Zał. 5: III.Q.4]. Byłam współorganizatorem III Sympozjum Naukowego pt. "Metagenomy różnych środowisk" (28–29.06.2018), a także członkiem Komitetów Naukowych 3 konferencji krajowych. Jestem też członkiem Komitetu Naukowego IV sympozjum z cyklu "Metagenomy różnych środowisk", które odbędzie się w bieżącym roku, w terminie 27–28.06.2019, w Lublinie [szczegóły Zał. 5: III.C].

5.3. Działalność dydaktyczna i organizacyjna na rzecz Uniwersytetu

Będąc asystentem na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Instytutu Ochrony Środowiska (lata 2001–2009), a następnie w nowo utworzonym Instytucie Biotechnologii na Wydziale Biologii i Nauk o Środowisku KUL (od 2009 roku), opracowywałam i prowadziłam szereg ćwiczeń i wykładów dla studentów kierunków: Ochrony Środowiska (lata 2001-2013) oraz Architektury Krajobrazu (lata 2002-2015). Od roku 2010 prowadzę zajęcia (wykłady i ćwiczenia) dla studentów Biotechnologii (I i II stopnia) również w języku angielskim [szczegóły Zał. 5: III.I.1].

Od bieżącego roku pełnię funkcję promotora pomocniczego dwóch prac magisterskich realizowanych w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska. Od dnia 01.10.2018 jestem opiekunem studentów II roku Biotechnologii (studia I stopnia).

Pełniłam funkcję recenzenta w 15 pracach licencjackich oraz 15 magisterskich. Zrecenzowałam 28 publikacji naukowych. Byłam redaktorem książki abstraktów III Ogólnopolskiego Sympozjum Mikrobiologicznego „Metagenomy Różnych Środowisk” (ISBN 978-83-948570-1-1) [szczegóły **Zał. 5: III.P**].

Odbyłam dwa staże zagraniczne oraz dwa krajowe [**Zał. 5: III.L.1, 2**]. Doskonaliłam swoje umiejętności zawodowe poprzez uczestnictwo w 3 szkoleniach [**Zał. 5: III.Q.3**].

Oprócz działalności naukowo–dydaktycznej angażowałam się również w prace na rzecz Uniwersytetu i Wydziału. Od 2015 roku jestem członkiem Zespołu do Spraw Opisu Przedmiotów/Sylabusów przy Wydziałowej Komisji ds. Jakości Kształcenia. Od roku 2017 reprezentuję Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku KUL w Zespole ds. Kontroli Realizacji Procesu Dydaktycznego. Od lutego bieżącego roku jestem członkiem Uniwersyteckiej Komisji Rekrutacyjnej w programie „PROM - Międzynarodowa Wymiana stypendialna Doktorantów i Kadry Akademickiej” – KUL. W latach 2017–2018 uczestniczyłam w pracach Uniwersyteckiej Komisji do Spraw Jakości Kształcenia [szczegóły **Zał. 5:III.N, Q1**].

Od 2007 roku biorę czynny udział w Lubelskim Festiwalu Nauki, prowadząc zajęcia dla dzieci, łącznie zrealizowałam 26 projektów. Od 2015 roku, systematycznie przeprowadzam zajęcia dla dzieci i młodzieży w ramach Nocy Biologów (15 projektów). W latach 2015–2017 prowadziłam również zajęcia dla dzieci w ramach Uniwersytetu Otwartego KUL, gdzie zaprezentowałam 8 pokazów połączonych z wykładami multimedialnymi. W trakcie Dni Otwartych KUL w 2015 roku prowadziłam warsztaty połączone ze zwiedzaniem i pokazem laboratoriów Katedry Biochemii i Chemii Środowiska Instytutu Biotechnologii, natomiast w roku 2018 zajęcia laboratoryjne dla młodzieży licealnej [szczegóły **Zał. 5: III.I.2**]. W ramach promocji Instytutu Biotechnologii KUL, w latach 2016-2017 wypowiadałam się na temat zanieczyszczeń powietrza w lokalnej stacji radiowej a także przyczyniłam się do powstania artykułu na ten temat w prasie codziennej. Wzięłam również udział w nagraniu programu z cyklu „Nauka Login” realizowanym przez TVP3 Lublin oraz „Smog w Lublinie – badania na KUL” realizowanego przez TVP KUL. Włączyłam się także w realizację projektu „Otwarcia na sukces” przygotowując i przeprowadzając zajęcia dla dzieci w wieku szkolnym [szczegóły **Zał. 5: III.A.2, I.3**].

Od roku 2015 jestem członkiem 3 towarzystw naukowych: Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Polskiego Towarzystwa Gleboznawczego oraz Międzynarodowej Unii Towarzystw Gleboznawczych [Zał. 5: III.H].

6. Podsumowanie dorobku naukowego i dane bibliometryczne

6.1. Publikacje i konferencje

Typ publikacji	1. Przed doktoratem			2. Po doktoracie				Suma (1+2)			
	Liczba	IF ³	Punkty MNiSW ³ (Punkty MNiSW ⁴)	Liczba	IF ³	IF ³ 5 letni	Punkty MNiSW ³ (Punkty MNiSW ⁴)	Liczba	IF ³	IF ³ 5 letni	Punkty MNiSW ³ (Punkty MNiSW ⁴)
Recenzowane czasopisma z listy JCR ¹	2	1,205 ²	30 (50)	16	25,425	28,919	382 (390)	18	26,630	28,919	412 (440)
Recenzowane czasopisma spoza listy JCR	5	-	22 (71)	3	-	-	13 (22)	8	-	-	35 (93)
Rozdziały w książkach	1	-	5 (5)	1	-	-	4 (4)	2	-	-	9 (9)
Rozdziały w monografii	2	-	10 (10)	3	-	-	12,5 (12,5)	5	-	-	22,5 (22,5)
RAZEM	10	1,205	67 (136)	23	25,425	28,919	411,5 (428,5)	33	26,630	28,919	478,5 (564,5)
Konferencje międzynarodowe	9	-	-	19	-	-	-	28	-	-	-
Konferencje krajowe	2	-	-	22	-	-	-	24	-	-	-
RAZEM	11	-	-	41	-	-	-	52	-	-	-

¹ - czasopisma z listy A,

² - czasopisma w roku publikowania nie posiadały IF_{5-letniego}

³ - zgodnie z rokiem publikacji

⁴ -według punktacji obowiązującej w roku 2016

6.2. Cytowania i indeks Hirscha

	Web of Science	Scopus	Google Scholar	ResearchGate
Ilość cytowań ^{*,a}	80/68 [#]	90	157	133
Indeks Hirscha ^{*,a}	6	7	9	6 [#]

* ilość cytowań dla każdej publikacji przedstawiona jest w Załączniku nr 5, współczynnik obliczony na podstawie artykułów opublikowanych pod nazwiskiem Szafranek (panieńskie) oraz Szafranek-Nakonieczna

[#] bez autocytowań

^a - stan na dzień 24.04.2019

Anna Szafranek-Nakonieczna