

Załącznik 3

## **AUTOREFERAT**

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

**dr Anna Pytlak**

**Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego**

**Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk**

Lublin, 2022

## Spis treści

|       |                                                                                                                                                                                  |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Imię i nazwisko .....                                                                                                                                                            | 3  |
| 2.    | Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....                                           | 3  |
| 3.    | Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....                                                                                                            | 3  |
| 4.    | Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm). ....    | 4  |
| 4.1   | Tytuł osiągnięcia naukowego: .....                                                                                                                                               | 4  |
| 4.2   | Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego .....                                                                                                                         | 4  |
| 4.3   | Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....                                                                   | 6  |
| 4.3.1 | Wprowadzenie .....                                                                                                                                                               | 6  |
| 4.3.2 | Omówienie wyników badań.....                                                                                                                                                     | 10 |
| 4.3.3 | Podsumowanie osiągnięcia naukowego .....                                                                                                                                         | 20 |
| 5.    | Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej ..... | 21 |
| 5.1   | Pierwsze osiągnięcia naukowe .....                                                                                                                                               | 21 |
| 5.2   | Tematyka pracy doktorskiej .....                                                                                                                                                 | 22 |
| 5.3   | Badania realizowane po uzyskaniu stopnia doktora .....                                                                                                                           | 23 |
| 6.    | Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....                                                                                       | 26 |
| 7.    | Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....                                                                                                                                 | 27 |
| 8.    | Podsumowanie aktywności naukowej .....                                                                                                                                           | 28 |
| 9.    | Literatura .....                                                                                                                                                                 | 29 |

**1. Imię i nazwisko**

Anna Pytlak

Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk

ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

e-mail: a.pytlak@ipan.lublin.pl

tel.: (81) 744 50 61, fax: (81) 744 50 67

**2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2006 - magister ochrony środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, tytuł pracy magisterskiej: „Okrzemki jako wskaźnik zasolenia i saprobii rzeki Świnki”, promotor: prof. dr hab. Władysława Wojciechowska, dyplom z wyróżnieniem.

2011 - doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, tytuł rozprawy: „Aktywność metanotroficzna i identyfikacja metanotrofów zamieszkujących skały przywęglowe w kopalni Bogdanka”, promotor: prof. dr hab. Z. Stępniewska, dyplom z wyróżnieniem.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

01.10.2006 – 30.09.2013 **asystent**, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

01.10.2013 – 15.12.2019 **adiunkt**, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

16.12.2019 – obecnie **adiunkt**, Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego, Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm).****4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Mikrobiologiczne układy syntezy i utleniania metanu w złożach węgla brunatnych i kamiennych.”

**4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl 6 oryginalnych prac naukowych opublikowanych w latach 2014-2021. Badania będące podstawą publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego finansowane były w ramach projektów:

- badania własne, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW), N N305 326939: Rozpoznanie aktywności i próba identyfikacji bakterii metanotroficznych zasiedlających skały przywęglowe kopalni Górnośląskiego Zagłębia Węglowego, realizowany w latach 2010-2013, moja rola w projekcie - redaktor, wykonawca.

- OPUS, Narodowe Centrum Nauki (NCN), 2015/17/B/NZ9/01662: Naturalna i stymulowana aktywność metanogeniczna polskich węgla kopalnych, realizowany w latach 2016-2020, moja rola w projekcie – redaktor, wykonawca.

- MINIATURA, NCN, 2018/02/X/NZ9/01107: Analiza społeczności mikroorganizmów występujących w utworach nadkładowych kopalni węgla brunatnego w ujęciu metagenomicznym i biomarkerów lipidowych - badania wstępne”, realizowany w latach 2018-2019, moja rola w projekcie – redaktor, kierownik, wykonawca.

Wskazana dla każdej publikacji wartość współczynnika Impact Factor (IF) jest zgodna z rokiem publikacji, na podstawie Journal Citation Reports (JCR). W przypadku publikacji, które ukazały się w 2021 przyjęto wartości z roku poprzedniego. Podstawą prezentowanej punktacji był Komunikat Ministra Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 21 grudnia 2021 r.

**Publikacja 1 (P1)**

---

Stępniewska, Z., **Pytlak, A.**, Kuźniar, A., 2014. Distribution of the methanotrophic bacteria in the Western part of the Upper Silesian Coal Basin (Borynia-Zofiówka and Budryk coal mines). International Journal of Coal Geology, 130, 70–78, <https://doi.org/10.1016/j.coal.2014.05.003>.

IF 4,21; MEiN pkt. 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń i analiz, interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.

#### **Publikacja 2 (P2)**

---

**Pytlak, A.**, Sparkes, R., Goraj, W., Szafranek-Nakonieczna, A., Banach, A., Akhmetkaliyeva, S., Słowakiewicz, M., 2021. Methanotroph-derived bacteriohopanepolyol signatures in sediments covering Miocene brown coal deposits. *International Journal of Coal Geology*, 242, 103759, <https://doi.org/10.1016/j.coal.2021.103759>.

IF 6,806; MEiN pkt. 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części doświadczeń (analizy fizyko-chemiczne), analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.

#### **Publikacja 3 (P3)**

---

**Pytlak, A.**, Sujak, A., Szafranek-Nakonieczna, A., Grządziel, J., Banach, A., Goraj, W., Gałązka, A., Gruszecki, W.I., Stępniewska, Z., 2020. Water-induced molecular changes of hard coals and lignites. *International Journal of Coal Geology*, 224, 103481, <https://doi.org/10.1016/j.coal.2020.103481>.

IF 6;806; MEiN pkt. 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części doświadczeń (przygotowanie eksperymentów inkubacyjnych, analizy chromatograficzne, izolacje DNA), analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

#### **Publikacja 4 (P4)**

---

**Pytlak, A.**, Szafranek-Nakonieczna, A., Goraj, W., Śnieżyńska, I., Krężala, A., Banach, A., Ristović, I., Słowakiewicz, M., Stępniewska, Z. (2021)., A survey of greenhouse gases production in central European lignites. *Science of the Total Environment* 800, 149551, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149551>.

IF 7,963; MEiN pkt. 200

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części doświadczeń (przygotowanie eksperymentów inkubacyjnych, analizy chromatograficzne), analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.

#### **Publikacja 5 (P5)**

---

Szafranek-Nakonieczna, A., **Pytlak, A.**, Grządziel, J., Kubaczyński, A., Banach, A., Górski, A., Goraj, W., Kuźniar, A., Gałązka, A., Stępniewska, Z., 2019. Changes in the Substrate Source Reveal Novel Interactions in the Sediment-Derived Methanogenic Microbial Community, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4415, <https://doi.org/10.3390/ijms20184415>.

IF 4,556; MEiN pkt. 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części doświadczeń (przygotowanie eksperymentów inkubacyjnych, analizy chromatograficzne, izolacje DNA), analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu części manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.

#### **Publikacja 6 (P6)**

**Pytlak, A.**, Szafranek-Nakonieczna, A., Sujak, A., Grządziel, J., Polakowski, C., Kuźniar, A., Proc, K., Kubaczyński, A., Goraj, W., Gałązka, A., Gruszecki, W.I., Bieganski, A., Stępniewska, Z., 2020. Stimulation of methanogenesis in bituminous coal from the upper Silesian coal basin. *International Journal of Coal Geology*, 231, 103609, <https://doi.org/10.1016/j.coal.2020.103609>.

IF 6,806; MEiN pkt. 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części doświadczeń (przygotowanie eksperymentów inkubacyjnych, analizy chromatograficzne, izolacje DNA), analizie i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam autorem korespondencyjnym tej publikacji.

#### **Sumaryczne wskaźniki bibliometryczne dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

Impact Factor (IF) = 37.147

punkty MEiN = 900

liczba cytowań wg Web of Science = 11

### **4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **4.3.1 Wprowadzenie**

Eksploatacja węgla, będącego jednym z podstawowych surowców wykorzystywanych w produkcji energii elektrycznej i ciepła, jest formą aktywności antropogenicznej w ogromnym stopniu ingerującą w środowisko naturalne. Najbardziej widoczne są bezpośrednie konsekwencje naruszania górotworów związane z przeobrażeniem powierzchni Ziemi - subsydencje i zwałowiska skał płonnych. Niekorzystny wpływ górnictwa przejawia się także w zanieczyszczeniu pyłowo-gazowym powietrza, obniżeniu

zwierciadła wód gruntowych czy zwiększonym zasoleniu wód powierzchniowych (w skutek zrzutu silnie zmineralizowanych wód głębinowych). Niezauważalna gołym okiem ale jednocześnie bardzo istotna, w odniesieniu do oddziaływania na środowisko, jest jednak emisja gazów, w szczególności metanu ( $\text{CH}_4$ ). W odróżnieniu od wymienionych wcześniej następstw korzystania z węgla kopalnych, niebezpieczeństwo płynące ze strony metanu ma wymiar zarówno lokalny (wynikający z wyrzutów gazu i jego wybuchów) jak i globalny. Metan emitowany z kopalni powiększa bowiem pulę gazów szklarniowych przyczyniając się tym samym do przyspieszenia postępujących zmian klimatu.

W 2020 średnie globalne stężenie  $\text{CH}_4$  w atmosferze wynosiło 1879 ppbv (Długokencky, 2022). Pomimo stosunkowo niskiego stężenia, gaz ten efektywnie pochłania promieniowanie podczerwone. Według ostatnich szacunków, potencjał tworzenia efektu szklarniowego przez metan jest niemal 30-sto krotnie wyższy niż  $\text{CO}_2$ , przez co  $\text{CH}_4$  jest jednym z najważniejszych czynników kształtujących klimat Ziemi (IPCC, 2021). Współczesne atmosferyczne stężenie metanu jest kilkukrotnie wyższe niż w czasach przedindustrialnych, a za jedną z przyczyn takiego stanu uznaje się uwolnienie metanu zgromadzonego w pokładach węgla. Według danych pochodzących z analizy składu pęcherzyków gazu uwięzionego w lodach Arktyki i Grenlandii, na przestrzeni ostatnich 650 tys. lat naturalne stężenie  $\text{CH}_4$  w atmosferze Ziemi zawierało się w przedziale 350-790 ppbv. Badania wskazują, że jeszcze w drugiej połowie XVIII w. poziom atmosferycznego  $\text{CH}_4$  wynosił 1060 ppbv. W ciągu ostatnich 200 lat nastąpił gwałtowny wzrost zawartości tego gazu w atmosferze. Rejestrowane obecnie wartości niemal dwukrotnie przewyższają stężenia odpowiadające czasom preindustrialnym. Wpływ człowieka na globalny bilans metanu jest zatem znaczący (IPCC, 2021). Za stwierdzeniem tym przemawia m. in. fakt, iż w latach 90-tych zaobserwowano przejściowo spowolnienie wzrostu stężenia  $\text{CH}_4$  w atmosferze. Zjawisko to przypisywano m. in. ograniczeniu wydobycia węgla kamiennego w krajach byłego bloku wschodniego (Thompson i in., 2018).

Metan może stanowić powyżej 90% v/v gazu występującego w porach sfosylizowanej materii organicznej. Jego ilość zależy od stopnia uwęglenia, głębokości zalegania złoża i lokalnych czynników geologicznych, np. przepuszczalności skał nadkładowych. W związku z wielopłaszczyznowym, negatywnym oddziaływaniem kopalni na środowisko naturalne oraz zwiększającymi się problemami z eksploatacją (m. in. rosnącą wraz z głębokością temperaturą i ilością zaadsorbowanego w pokładach metanu) narasta zainteresowanie alternatywnymi sposobami zagospodarowania złóż węgla kopalnych poprzez wykorzystanie występującego w nich metanu do produkcji energii. W wielu miejscach na świecie metan pokładów węgla jest już eksploatowany (Liang i in., 2021), jednak jedynie z utworów o wysokiej metanonośności. Jednym z pomysłów na wykorzystanie pozostałych zasobów węgla jest zwiększenie ilości występującego w pokładach metanu na drodze biologicznego zgazowania zdeponowanej w nich materii organicznej. Rozwiązanie to mogłoby być zastosowane w zamykanych kopalniach jak również w złożach,

których eksploatacja z wykorzystaniem tradycyjnych metod jest niemożliwa lub nieuzasadniona ekonomicznie.

Transformacja kopalnej materii organicznej do metanu przez mikroorganizmy jest zjawiskiem występującym naturalnie w wielu basenach sedymentacyjnych. Biologiczne pochodzenie gazów towarzyszących węglom potwierdzają liczne badania geochemiczne (Meslé i in., 2013; Strąpoć i in., 2011). Wśród węgla kopalnych, najbardziej dostępne są substraty występujące w torfie oraz węglach brunatnych, reprezentujących wczesne etapy diagenety. Rozciągnięte w czasie oddziaływanie wysokiej temperatury i ciśnienia, których motorem jest głębokie pograżenie osadów, zmieniają strukturę materii organicznej węgla kamiennych, zmniejszając znacząco jej biodostępność. Czynniki te składają się na stadium metamorfizmu, czyli przekształcania węgla brunatnych w kamienne. Teoretycznie, przemiany metamorficzne eliminują możliwość biodegradacji węgla *in situ*. Modele rekonstruujące historie pograżenia wielu formacji węglonośnych wskazują, że osiągały one temperatury przekraczające zdolność przetrwania jakichkolwiek poznanych mikroorganizmów. Pomimo tych oczywistych ograniczeń, skład izotopowy CH<sub>4</sub>, w wielu basenach sedymentacyjnych, wskazuje na jego mieszane, biologiczno - abiogeniczne pochodzenie. Przypuszcza się, iż może to być wynik wtórnej kolonizacji węgla przez mikroorganizmy, których nośnikiem jest woda przemieszczająca się szczelinami lub infiltrująca przez porowate skały stanowiące nadkład pokładów (Strąpoć i in., 2011).

Transformacja materii organicznej do metanu odbywa się wielostopniowo. Wytwarzanie CH<sub>4</sub> przez metanogeniczne *Archaea* poprzedzone jest etapem hydrolizy (wstępnego rozkładu makromolekuł organicznych do prostszych związków), acidogenezy (podczas której z produktów hydrolizy wytwarzane są kwasy karboksylowe, alkohole, aldehydy, ketony oraz ditlenek węgla i wodór) oraz acetogenezy (w czasie której następuje przemiana kwasów organicznych i alkoholi do kwasu octowego, ditlenku węgla i wodoru). Beztlenowy rozkład materii organicznej jest procesem, w który prócz metanogenów zaangażowanych jest wiele bakterii, wśród których wiodącą rolę odgrywają przedstawiciele typów: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* i *Atribacteria*. Mikroorganizmy odpowiedzialne za występowanie metanogenezy w węglach kopalnych (szczególnie kamiennych) są obecnie przedmiotem intensywnych badań naukowych (Akimbekov i in., 2021; Wang i in., 2021).

Działalność człowieka powoduje daleko idące przeobrażenie środowiska geologicznego. W zasięgu wyrobisk kopalni, warunki bytowania mikroorganizmów ulegają zmianie w stosunku do nieeksploatowanych partii złoża. Szczególnie istotna jest zmiana natlenienia, która następuje w wyniku wentylacji (w odniesieniu do kopalni podziemnych) lub usunięcia warstw nadkładowych (w kopalniach odkrywkowych). Nie bez znaczenia jest także zwiększona mobilność wód w obszarze eksploatacji. Przecięcie warstw izolujących poziomy wodonośne może sprzyjać infiltracji złóż węgla przez wody niosące substancje odżywcze i tlen rozpuszczony. Ich obecność sprzyja rozwojowi tlenowych bakterii,



m. in. metanotroficznych. Metanotrofy występują w wielu ekosystemach, praktycznie wszędzie tam, gdzie istnieją stabilne źródła metanu. Szeroko rozpowszechnione są w wodach (podziemnych oraz powierzchniowych), osadach i glebach. Znane są także liczne przykłady metanotroficznych endofitów roślin. Pod względem taksonomii i ekofizjologii, metanotrofy tlenowe stanowią zróżnicowaną grupę. Należą do niej reprezentanci *Gammaproteobacteria* (typ I, z rodzinami *Methylococcaceae* i *Methylothermaceae*), *Alphaproteobacteria* (typ II, z rodzinami *Methylocystaceae* i *Beijerinckiaceae*) oraz *Verrucomicrobia* (czasem określane jako typ III, rodzina *Methylacidiphilaceae*), wykazujący przystosowanie do szerokiej gamy zróżnicowanych warunków środowiskowych (Knief, 2019).

Według różnych szacunków, tlenowe bakterie metanotroficzne odpowiedzialne są za 5-10% całkowitego utleniania atmosferycznego CH<sub>4</sub> (Saunois i in., 2020). Ich rola w kształtowaniu klimatu Ziemi jest w istocie większa, gdyż dane te nie uwzględniają aktywności mikroorganizmów bytujących na granicy stref tlenowej i beztlenowej, jaka występuje w wielu lądowych i wodnych ekosystemach. W rzeczywistości znaczna część metanu produkowanego w środowiskach beztlenowych (tj. np. pola ryżowe czy torfowiska) jest utleniana przez bakterie metanotroficzne jeszcze na etapie transportu, zanim przeniknie do atmosfery. Szacuje się, że w przypadku torfowisk efektywność metanotrofów w eliminacji strumienia emisji CH<sub>4</sub> z warstw podpowierzchniowych może sięgać nawet 90% (Conrad, 2009; Sultana i in., 2022). Jak wykazały przeprowadzone przeze mnie badania, utlenianie metanu może zachodzić także w kopalniach węgla (Pytlak i in., 2012; Stepniewska i in., 2013; Stepniewska i Pytlak, 2008).

Ze względu na izolację węglonośnych utworów geologicznych oraz specyficzne warunki bytowania wymuszające powolne tempo metabolizmu, mikroorganizmy biorące udział w formowaniu i utlenianiu występującego w złożach metanu długo pozostawały słabo rozpoznane. Niepełna wiedza dotycząca bioróżnorodności oraz wpływu czynników środowiskowych na zbiorowiska tych mikroorganizmów były inspiracją do podjęcia badań, których wyniki zostały przedstawione w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe. Pozyskanie wielopłaszczyznowych danych było możliwe dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik badawczych, których znaczny rozwój miał miejsce w ostatniej dekadzie (zarówno w obszarze mikrobiologii – tj. bardziej efektywne metody ekstrakcji i sekwencjonowania kwasów nukleinowych, jak i biogeochemii - m. in. analiza i interpretacja biomarkerów lipidowych).

**Celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było rozpoznanie biologicznego podłoża produkcji i utleniania metanu w złożach węgla brunatnych i kamiennych.**

Realizowana tematyka, chociaż mieszcząca się w zakresie badań podstawowych, dotyczyła bieżących problemów sektora wydobywczego i korespondowała z zachodzącymi w nim zmianami. Tłem prowadzonych badań były zagadnienia związane z bezpieczeństwem pracy, oddziaływaniem kopalni na środowisko naturalne i możliwością alternatywnego wykorzystania złóż węgla. Elementem wspólnym dla tych obszarów jest metan oraz potrzeba pogłębienia wiedzy na temat mikrobiologicznych podstaw jego

produkcji i utleniania w złożach węgla kopalnych. Zasadniczym celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było rozpoznanie biologicznego podłoża tych procesów w złożach węgla brunatnych i kamiennych. W ujęciu szczegółowym, osiągnięcie postawionego celu naukowego wymagało realizacji zadań badawczych obejmujących swym zakresem 2 przeciwstawne procesy: formowanie i utlenianie metanu, t.j.:

- analizę dystrybucji i identyfikację bakterii metanotroficznych występujących w złożach węgla kamiennych i brunatnych (lignitów) (**P1, P2**),
- określenie składu i aktywności społeczności mikroorganizmów biorących udział w transformacji materii organicznej zdeponowanej w złożach węgla kamiennych i brunatnych do CH<sub>4</sub> (**P3, P6**)
- wskazanie czynników determinujących aktywność mikroorganizmów odpowiedzialnych za formowanie i utlenianie metanu w złożach (**P1, P2, P3, P4, P6**),
- określenie możliwości stymulowania metanogenezy w węglu kamiennym z wykorzystaniem allochtonicznych mikroorganizmów (**P5, P6**).

Dążąc do realizacji zaplanowanych tematów nawiązałam współpracę ze specjalistami z zakresu biofizyki, bioinformatyki oraz biogeochemii. Prace składające się na cykl publikacji mają zatem charakter interdyscyplinarny i są współautorskie. W odniesieniu do każdej z prezentowanych prac odpowiadałam za opracowanie koncepcji badań, analizę wyników i przygotowanie manuskryptu, a także częściowo (w zakresie moich kompetencji), za przeprowadzenie doświadczeń.

#### **4.3.2 Omówienie wyników badań**

**Publikacja 1 - Stępniewska Z., Pytlak A., Kuźniar A., 2014. Distribution of the methanotrophic bacteria in Western part of the Upper Silesian Coal Basin (Borynia-Zofiówka and Budryk coal mines). International Journal of Coal Geology 130, 70-78, <https://doi.org/10.1016/j.coal.2014.05.003>**

Celem pierwszego artykułu z cyklu było rozpoznanie rozmieszczenia oraz wstępna identyfikacja tlenowych bakterii metanotroficznych występujących w otoczeniu wybranych pokładów węgla kamiennego Górnośląskiego Zagłębia Węglowego (GZW). Jest to jeden z najintensywniej eksploatowanych obszarów górniczych Europy, w którym pozyskiwany jest zarówno węgiel kamienny jak i metan.

Analizom poddałam skały towarzyszące 9 pokładom zlokalizowanym w zachodniej części GZW. Wykazałam, iż w karbońskich formacjach węglonośnych, bakterie metanotroficzne są szeroko rozpowszechnione. Potwierdziły to przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych (30°C, 10% v/v CH<sub>4</sub>, 100% pełnej pojemności wodnej - PPW) pomiary aktywności metanotroficznej, która mieściła się w zakresie od 0,191 do 2,513 μmol CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Do identyfikacji mikroorganizmów odpowiedzialnych za utlenianie CH<sub>4</sub> wykorzystano zestawy starterów IF/IR oraz IIF/IIR (Chen, 2007) o sekwencjach komplementarnych do genu 16S rRNA, specyficzne dla metanotrofów należących odpowiednio do klas

*Gamma-* i *Alphaproteobacteria*. Analiza sekwencji uzyskanych fragmentów 16S rDNA wykazała, iż występujące w formacjach węglonośnych metanotrofy wykazują największe podobieństwo do przedstawicieli rodzajów *Methylobacter*, *Methylococcus* i *Methylocaldum*. W materiale zasiedlonym przez *Methylocaldum* utlenianie metanu było najbardziej efektywne. Za możliwą przyczynę tego zjawiska uznano fakt, iż bakterie należące do *Methylocaldum* są zdolne do asymilacji  $N_2$ , co jest szczególnie istotne w formacjach węglonośnych, gdzie dostępność  $N-NO_3$ , preferowanego źródła azotu dla metanotrofów, jest bardzo niska. W takich warunkach metanotrofy są zmuszone do pozyskiwania azotu z  $N_2$  lub wykorzystywania  $N-NH_4$ . Asymilacja tego ostatniego jednak znacznie osłabia utlenianie metanu poprzez hamowanie kluczowego enzymu w szlaku asymilacji węgla - monooksygenazy metanowej (MMO). Metanotrofy należące do *Methylococcaceae* (w tym *Methylocaldum*) w warunkach mikroaerofilnych wiążą  $N_2$ , przez co wydają się lepiej dostosowane do warunków panujących w złożach węgla.

Omawiana praca była kontynuacją i jednocześnie rozwinięciem mojej tematyki doktorskiej, w której analizowałam zbliżone zagadnienia w odniesieniu do Lubelskiego Zagłębia Węglowego (LZW). Badania prowadzone przeze mnie na etapie doktoratu wykazały, że warunki panujące w karbońskich skałach, stanowiących otoczenie pokładów węgla kamiennego są dalekie od optimum, a głównym czynnikiem limitującym wzrost bakterii metanotroficznych w przewietrzanych partiach górotworu jest niska wilgotność (Stepniewska i in., 2013). Ograniczenie to występowało również w utworach GZW, których wilgotność wynosiła maksymalnie 3.5 %. Pomimo to, stwierdzono, iż w badanych lokalizacjach istnieje negatywna zależność pomiędzy ilością występującego w złożu metanu (tzw. metanonośnością), a potencjalną (wyznaczoną w warunkach optymalnej wilgotności) aktywnością metanotroficzną. Biorąc pod uwagę warunki panujące w górotworze stwierdziłam, iż aktualnie biologiczne utlenianie metanu jest w nim zahamowane, a występująca zależność jest konsekwencją przeszłych procesów geologicznych. Według Pluta (2005), w badanym regionie GZW, ukształtowane już warstwy węglonośne zostały wyniesione na powierzchnię (o czym świadczy zerodowana powierzchnia warstw karbońskich), a następnie podlegały infiltracji przez wody meteoryczne kilku cykli hydrologicznych. W ich wyniku pierwotne wody górotworu zostały wyparte przez wody meteoryczne, stanowiące potencjalne źródło mikroorganizmów.

Mimo, że aktualnie biologiczne utlenianie metanu w warstwach karbońskich analizowanej części GZW jest zahamowane i nie wydaje się mieć wpływu na bezpieczeństwo w kopalniach czy ilość emitowanego metanu, należy proces ten brać pod uwagę planując operacje górnicze, których wynikiem będzie przemieszczanie natlenionych wód w górotworze (np. prace dążące do biologicznego zgazowania węgla). Stymulowana w ten sposób aktywność bakterii metanotroficznych może rzutować np. na efektywność pozyskiwania metanu ze złóż węgla, szczególnie tych zasiedlonych przez metanotrofy zdolne do asymilacji  $N_2$ .

**Publikacja 2 - Pytlak A., Sparkes R., Goraj W., Szafranek-Nakonieczna A., Banach A., Akmetkaliyeva S., Słowakiewicz M. 2021. Methanotroph-derived bacteriohopanepolyol signatures in sediments covering Miocene brown coal deposits. International Journal of Coal Geology 242, 103759, <https://doi.org/10.1016/j.coal.2021.103759>**

---

Artykuł ten stanowi kontynuację badań nad rolą bakterii metanotroficznych w utlenianiu CH<sub>4</sub> w formacjach geologicznych (opisywanych już w **P1**) - w tym przypadku związanych z węglami brunatnymi (lignitami). Rozpatrywane jako środowisko życia mikroorganizmów, złoża węgla brunatnych biegunowo różnią się od złóż węgla kamiennych. Główną tego przyczyną jest brak wywołanej głębokim pograżeniem kompresji oraz zawansowanej ewolucji termicznej osadów, ponadto, zalegając na mniejszych głębokościach, złoża lignitów utrzymują ciągłość hydrologiczną z wodami powierzchniowymi, a zdeponowana w pokładach materia organiczna podlega diagenecie, w toku której formowany jest metan. Ilość wydzielanego gazu z czasem maleje, jednak badania prowadzone w wielu basenach sedymentacyjnych potwierdziły występowanie w nich metanogenezy, pomimo upływu milionów lat (Strąpoć i in., 2011).

W omawianej pracy, przyjęto założenie, iż dyfundujący w kierunku atmosfery gaz przyczynia się do wzrostu bakterii metanotroficznych w otaczających węgiel warstwach osadów, które stanowią swoisty bufor ograniczający emisję CH<sub>4</sub> do atmosfery. Narzędziem umożliwiającym określenie, które warstwy geologiczne występujące w profilu złóż lignitu odgrywają największą rolę w eliminacji CH<sub>4</sub> są biomarkery lipidowe - bakteriohopanoidy (BHP) (van Winden i in., 2012). Związki te syntetyzowane są przez wiele mikroorganizmów, a w komórkach stanowią integralną część błony cytoplazmatycznej, nadając jej wytrzymałość i kontrolując transport jonów. Pod względem chemicznym, BHP należą do triterpenoidów pentacyklicznych, które w odróżnieniu od kwasów nukleinowych, wykazują dużą trwałość w środowisku, także po śmierci komórki. Charakterystyczne struktury BHP oraz produkty ich degradacji są zachowane w zapisie geologicznym wielu formacji. Obecność łańcuchów bocznych i grup funkcyjnych pozwala na rozróżnienie BHP pochodzących od różnych grup mikroorganizmów, zatem dynamika zmian stężenia biomarkerów w poszczególnych warstwach profilu geologicznego jest miarą intensywności zachodzących w nich procesów, począwszy od okresu formowania po teraźniejszość (Cappellini i in., 2018; Talbot i in., 2014).

Metanotrofy syntetyzują wiele różnych BHP. Najbardziej charakterystyczne dla tych mikroorganizmów są struktury zawierające grupy aminowe - aminobakteriohopany (NH-BHP) bądź metylowane w pozycji C3 (C3-BHP) (Rush i in., 2016). Do najważniejszych NH-BHP należą: 35-aminobacteriohopane-30,31,32,33,34-pentol (aminopentol), syntetyzowany niemal wyłącznie przez metanotrofy typu I (*Gammaproteobacteria*), 35-aminobacteriohopane-31,32,33,34-tetrol (aminotetrol) oraz 35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol (aminotriol), które stwierdzić można w komórkach prawie

wszystkich metanotrofów typu I i II (*Alphaproteobacteria*) z wyjątkiem *Methylocella*. Obecność specyficznych dla metanotrofów BHP w złożach lignitów sygnalizowały wcześniejsze prace (Inglis i in., 2015; Talbot i in., 2016).

W prezentowanej pracy analizowano dystrybucję i specjację BHP w osadach otaczających pokłady węgla brunatnych w rejonie Turowa i Bełchatowa. Specyficzne dla metanotrofów BHP, obecne były we wszystkich próbach, przy czym, co zaskakujące, w obu basenach sedymentacyjnych, największe ich stężenia stwierdzono w samych węglach brunatnych. Warstwy mineralne zawierały kilkadziesiąt razy mniej BHP. Pośród badanych parametrów środowiskowych (pH, EC, N-NO<sub>3</sub>, P-PO<sub>4</sub>, TOC, IC) jedynie TOC korelował w sposób istotny ze stężeniami specyficznych dla metanotrofów BHP. Sugeruje to, iż w pokładach węgla brunatnych, podobnie jak we współczesnych torfowiskach, mikroorganizmy odpowiedzialne za procesy metanotrofii i metanogenezy występowały w bezpośredniej bliskości, a kierunek przemian CH<sub>4</sub> determinowany był przez dynamikę warunków natlenienia mikrohabitatów. Jednocześnie należy zauważyć, że w osadach o charakterze mineralnym, w których stwierdzono bardzo niskie stężenie BHP, struktury charakterystyczne dla metanotrofów stanowiły ich znaczący odsetek (do 32%). Wysoki udział NH-BHP potwierdza iż pokłady węgla wywierały istotny wpływ na skład społeczności mikroorganizmów w otaczających go utworach geologicznych, w których dzięki emitowanemu z węgla CH<sub>4</sub>, dominującą strategią metaboliczną była metanotrofia.

Biorąc pod uwagę iż ekstrakcja BHP obejmuje związki pochodzące zarówno od współcześnie żyjących jak i przeszłych mikroorganizmów (bez możliwości ich rozróżnienia), płynąca z tej pracy implikacja dla dalszych badań polega na zwróceniu uwagi na pokłady węgla (nie tylko - jak dotychczas - skały nadkładowe), jako możliwe miejsce biologicznego utleniania CH<sub>4</sub> z udziałem metanotrofów.

**Publikacja 3 - Pytlak A., Sujak A., Szafranek-Nakoneczna A., Grządziel J., Banach A., Goraj W., Gałązka A., Gruszecki W. I., Stępniewska Z., 2020. Water-induced molecular changes of hard coals and lignites. International Journal of Coal Geology 224, 103481. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2020.103481>**

Wnioski płynące z wyników opisanych w pracach **P1** oraz **P2** oraz doniesienia literaturowe sugerujące istnienie luk w wiedzy na temat ekofizjologii bakterii metanotroficznych (przede wszystkim dotyczących możliwości ich przetrwania w warunkach beztlenowych), wskazują, iż transformacja CH<sub>4</sub> w środowiskach geologicznych jest procesem dalece bardziej złożonym niż przypuszczano.

Mając na względzie możliwą koegzystencję mikroorganizmów odpowiedzialnych za formowanie i utlenianie metanu w złożach węgla oraz wpływ działalności ludzkiej na panujące w nich warunki hydrologiczne, podjęłam badania nad wpływem wilgotności na skład społeczności mikroorganizmów (w oparciu o sekwencjonowanie amplikonów 16S rDNA w technologii Illumina), strukturę materii

organicznej (z wykorzystaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni - FTIR) i formowanie gazów szklarniowych ( $\text{CH}_4$  i  $\text{CO}_2$ ) w wybranych węglach kamiennych i brunatnych.

Prace prowadzono na materiałach pochodzących z najważniejszych obszarów eksploatacji paliw kopalnych w Polsce. Węgle kamienne pozyskano z GZW i LZW natomiast brunatne z kopalni Turów i Bełchatów, będących głównymi dostawcami lignitu w Polsce. Eksperyment symulujący warunki zalania węgla wodą (które w kopalniach następuje po zakończeniu eksploatacji lub w wyniku przzerwania występujących w złożu barier hydrologicznych) prowadzono przez 450 dni, w atmosferze  $\text{N}_2$ . Czas ten był wystarczający aby w badanych materiałach, pod wpływem autochtonicznej mikrobioty, nastąpiły zmiany struktury materii organicznej. Przejawiały się one zmianą przebiegu widm FTIR w zakresach:  $3724 - 2555 \text{ cm}^{-1}$  i  $1900 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . Reorganizacja polegała m. in. na spadku aromatyczności i stopnia kondensacji, które ujawniły się we wszystkich materiałach. Znaczący był również zanik piku w obszarze charakterystycznym dla drgań rozciągających grupy  $-\text{COOH}$ . Obserwacje te pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi, które wskazują, iż C pochodzący z grup karboksylowych jest stosunkowo łatwo włączany do szlaków metabolicznych mikroorganizmów bytujących w węglu. Wynika to z faktu, iż energia dysocjacji grupy  $-\text{COOH}$  jest niższa niż wymagana do rozerwania wiązań występujących w strukturach aromatycznych i alifatycznych (Strąpoć i in., 2011).

Głównym gazowym produktem rozkładu węgla w trakcie doświadczenia był  $\text{CO}_2$  (maks.  $150 \text{ nmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ doba}^{-1}$ ). Jego uwalnianie było ściśle związane z dojrzałością materii organicznej i kilkakrotnie wyższe w poddawanych hydratacji węglach brunatnych niż w kamiennych. Wskazuje to na większą aktywność respiracyjną mikroorganizmów, występujących w młodszych i mniej przekształconych termicznie materiałach, co jest zgodne z obserwacjami prezentowanymi w literaturze. Tempo emisji metanu z badanych materiałów było wielokrotnie mniejsze niż  $\text{CO}_2$  i bardzo zróżnicowane. Największą produkcję  $\text{CH}_4$  ( $0.1 \text{ nmol CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ doba}^{-1}$ ) odnotowano w węglu brunatnym z kopalni Bełchatów. Ilości metanu emitowanego z węgla pozyskanego z kopalni Turów oraz z obu węgla kamiennych były kilkakrotnie mniejsze.

Wyniki analiz dotyczących gazowych produktów przemiany materii organicznej zawartej w węglach korespondowały ze składem społeczności mikroorganizmów. Udział metanogenicznych *Archaea* był w nich bardzo niski, a zwiększenie wilgotności symulujące zalanie zaowocowało ich zwiększoną reprezentacją (maks. do 3%) jedynie w najmłodszym, a zarazem charakteryzującym się najmniejszym stopniem karbonifikacji węgla brunatnym z rejonu Bełchatowa. Na uwagę zasługuje obecność w badanych węglach bakterii metanotroficznych. Szczególnie licznie reprezentowane były bakterie z rodzaju *Methylocystis* oraz *Methylomicrobium* w społecznościach zasiedlających węgle brunatne. Ich obecność wskazuje na możliwość biologicznej utylizacji metanu *in situ* i współgra z wnioskami przedstawionymi w publikacji **P2**, w której wykazano, iż w tego typu węglach występują wysokie stężenia charakterystycznych dla metanotrofów biomarkerów lipidowych (BHP).

Uzyskane wyniki poszerzają stan wiedzy na temat występowania bakterii metanotroficznych oraz są zgodne z doniesieniami wskazujących na występowanie metanotrofów należących do klas *Alpha-* i *Gammaproteobacteria* w środowiskach geologicznych i beztlenowych (Farhan Ul Haque i in., 2018; Kotelnikova, 2002; Mills i in., 2010). W świetle opublikowanych niedawno badań, należy zweryfikować m. in. przekonanie nt. *stricte* tlenowego metabolizmu metanotrofów typu I i II. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że część tlenowych metanotrofów jest w istocie fakultatywnie beztlenowa. Przykładem jest opisany przez van Grinsven (2021), należący do rodziny *Methylococcaceae* szczep (wyizolowany z anoksyicznej warstwy kolumny wody jeziornej), który wykazuje wzrost i efektywnie utylizuje CH<sub>4</sub> z wykorzystaniem jako akceptorów elektronowych zarówno O<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> jak i SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Co więcej, analiza genomu ww. szczepu ujawniła jego adaptacje do ograniczonej dostępności tlenu, a także szlaki fermentacji mieszanej kwasów i produkcji H<sub>2</sub>. Również metanotrofy należące do rodziny *Methylocystaceae* (obecne m. in w węglach) wykazują dużą elastyczność środowiskową: mogą wykorzystywać metan w szerokim zakresie stężeń (Baani i Liesack, 2008), wzrastać na octanach (Belova i in., 2011) i etanolu (Vorobev i in., 2014). Wykazano też, że niektóre szczepy rodzaju *Methylocystis* utrzymują aktywność komórkową w warunkach beztlenowych poprzez fermentacyjny metabolizm polihydroksyalkanolanów (Vecharskaya i in., 2009).

Na uwagę zasługuje także fakt, iż pomimo że ścieżki transformacji zawartej w węglu materii organicznej były zbliżone, zasiedlające je społeczności mikroorganizmów wykazywały duże zróżnicowanie, zarówno pod względem składu taksonomicznego jak i bioróżnorodności. W badanych materiałach wyodrębniono od 192 do 1277 unikalnych ASVs (*amplicon sequence variants* - wariantów sekwencji amplikonów). Również kierunek przemian składu mikrobioty w trakcie doświadczenia był specyficzny dla każdej z próbkowanych lokalizacji. Wyniki te wskazują na istotną rolę warunków *in situ*, w tym antropogenicznej transformacji warunków hydrologicznych, w kształtowaniu składu społeczności mikroorganizmów zasiedlających złoża węgla kopalnych i w konsekwencji w ilości i jakości emitowanych gazów szklarniowych (GHG) (CO<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub>).

**Publikacja 4 - Pytlak A., Szafranek-Nakoneczna A., Goraj W., Śnieżyńska I., Krężala A., Banach A., Ristović I., Słowakiewicz M., Stępniewska Z. 2021., a survey of greenhouse gases production in central European lignites. Science of the Total Environment, 800, 149551, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149551>**

Mając na względzie opisane w pracach P2 i P3 duże zróżnicowanie składu i aktywności mikroorganizmów odpowiedzialnych za transformację CH<sub>4</sub> w złożach lignitów, kolejny etap badań polegał na analizie biologicznego potencjału formowania tego gazu (a także innych GHG) w utworach występujących w wybranych złożach Europy Środkowej. Zagadnienie to ma duże znaczenie praktyczne. Prognozuje się, iż zmiany zachodzące na rynku energii doprowadzą wkrótce do zaprzestania wydobywania

węgla brunatnego (Alves Dias i in., 2018). Jest to równoznaczne z zalaniem wodą zasobów pozostałych w wyrobiskach większości kopalni. Emisje GHG będące konsekwencją tego zdarzenia, są trudne do oszacowania ponieważ wiedza na temat wpływu warunków hydrologicznych na proces biologicznego formowania metanu w złożach jest szczątkowa. Ponadto w odniesieniu do kopalni odkrywkowych węgla brunatnego nie ma opracowanych metod wyznaczania emisji GHG (Buendia i in., 2019). Biorąc pod uwagę postępujące zmiany klimatu podjęcie próby uzupełniania luk w wiedzy w tym zakresie wydaje się być zasadne.

Próbki węgla brunatnych pobrano z 5 kopalń zlokalizowanych w Europie Środkowej: Bełchatów, Turów i Konin (Polska) - które łącznie odpowiadają za ok. 95% produkcji węgla brunatnego w Polsce, Kolubara (Serbia) - która dostarcza blisko 75% krajowego węgla brunatnego w Serbii oraz Velenje (Słowenia) – o mniejszym znaczeniu strategicznym lecz unikalnej, ze względu na rzadko stosowaną w odniesieniu do lignitów metodę eksploatacji podziemnej. Z wyjątkiem ostatniej, wszystkie kopalnie mają charakter odkrywkowy. W każdej lokalizacji pobrano próby reprezentujące aktualnie eksploatowane pokłady węgla. W sumie badaniami objęto 9 materiałów zróżnicowanych pod względem wieku (Miocen i Pliocen) i litologii (węgle ksylitowe, detroksylitowe i detrytusowe). W warunkach laboratoryjnych, przeprowadzono serię doświadczeń mających na celu zbadanie właściwości fizyczno-chemicznych oraz tempa emisji GHG z zalanych węgla brunatnych, w wyniku ich biologicznego rozkładu przez autochtoniczną mikrobiotę.

Uzyskane wyniki były w dużej mierze zgodne z prezentowanymi wcześniej, dla wybranych złóż z terenu Polski (**P3**). Głównym produktem gazowym emitowanym z lignitów był ditlenek węgla. Dzienna produkcja CO<sub>2</sub> w badanych materiałach była bardzo zmienna. Najwyższą produkcję odnotowano w węglu detroksylitowym ze złoża kopalni Konin (402 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> doba<sup>-1</sup>), a najniższą w ksylitowym pobranym z kopalni Kolubara (20 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> doba<sup>-1</sup>). Produkcja metanu była wielokrotnie niższa i równie zróżnicowana jak CO<sub>2</sub>. Wyróżniającym się materiałem był węgiel detrytusowy, pozyskany z kopalni podziemnej Velenje, w którym formowanie metanu odbywało się z prędkością 66 nmol CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> doba<sup>-1</sup>. Wartość była kilkadziesiąt razy większa niż w pozostałych lignitach. Stwierdzono, że jednym z kluczowych czynników, determinujących aktywność mikroorganizmów degradujących węgiel były warunki oksydacyjno-redukcyjne (Eh) panujące w złożu. Produkcja CO<sub>2</sub> była skorelowana pozytywnie z wartościami Eh natomiast w odniesieniu do CH<sub>4</sub> relacja ta była odwrotna. Opisane zależności odpowiadają ekofizjologii mikroorganizmów biorących udział w transformacji GHG. Wysoką metanogeniczność węgla z podziemnej kopalni Velenje można przypisać ograniczonej ekspozycji materiału (i jego autochtonicznej mikrobioty) na tlen atmosferyczny (w porównaniu z materiałami pochodzącymi z kopalni odkrywkowych). Odpowiedzialne za formowanie metanu *Archaea* są bowiem wrażliwe na stres oksydacyjny.



Drugim istotnym czynnikiem wpływającym na produkcję GHG był litotyp węgla brunatnego. Najmniejszy wpływ na środowisko, mierzony jako sumaryczny GWP badanych gazów -  $3,91 \times 10^{-4}$  tona<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup>, wykazał węgiel ksylicowy (Kolubara). Węgłe zawierające komponent detrytusowy uwalniały znacznie więcej GHG (do  $1,5 \times 10^{-2}$  tona<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup>). Ta dysproporcja wydaje się być związana z niską podatnością węgla ksylicowych na biologiczną degradację. Utwory tego typu składają się głównie z ligniny oraz macerałów ligninopochodnych, które stanowią najtrudniejszą w degradacji frakcję biomasy roślinnej i jednocześnie „wąskie gardło” wielu procesów biologicznych.

Wnioski płynące z przeprowadzonych badań wskazują, iż jeśli już konieczna jest eksploatacja węgla brunatnego to w obecnie lepiej jest skoncentrować się na wydobywaniu węgla detrytusowych. Wydaje się, iż pozostawione w wyrobiskach kopalni i w przyszłości (po zamknięciu zakładów) zalane, mogą one stanowić większe źródło emisji gazów cieplarnianych niż węgle ksylicowe.

**Publikacja 5 – Szafranek-Nakonieczna A., Pytlak A., Grządziel J., Kubaczyński A., Banach A., Górski A., Goraj W., Kuźniar A., Gałązka A., Stępniewska Z., 2019. Changes in the Substrate Source Reveal Novel Interactions in the Sediment-Derived Methanogenic Microbial Community. International Journal of Molecular Sciences 20(18): 4415. <https://doi.org/10.3390/ijms20184415>**

**Publikacja 6 - Pytlak A., Szafranek-Nakonieczna A., Sujak A., Grządziel J., Polakowski C., Kuźniar A., Proc K., Kubaczyński A., Goraj B., Gałązka A., Gruszecki W.I., Bieganski A., Stępniewska Z. 2020. Stimulation of methanogenesis in bituminous coal from the upper Silesian coal basin. International Journal of Coal Geology, 231, 103609. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2020.103609>**

---

Zmiany następujące na rynku energii wskazują iż w przyszłości, węgle kopalne nie będą wykorzystane bezpośrednio jako źródło energii. Jedną z metod ich przetwarzania, redukującą stopień oddziaływania na środowisko jest biologiczne zgazowanie do CH<sub>4</sub>. Niemniej, wyniki zaprezentowane w pracach **P3** i **P4**, a także dane literaturowe z różnych rejonów świata wskazują, iż biologiczna transformacja materii organicznej do metanu, zarówno w złożach węgla brunatnych jak i kamiennych odbywa się w bardzo ograniczonym tempie. Obecnie, w wielu ośrodkach na świecie trwają intensywne prace mające na celu stymulację tego procesu. W artykułach **P5** i **P6** zaprezentowałam wyniki badań dotyczących bioaugmentacji węgla allochtoniczną społecznością mikroorganizmów w celu stymulacji biologicznej produkcji metanu. Wydajność produkcji CH<sub>4</sub> zależy bowiem zarówno od dostępności substratów (co wykazano w **P3** i **P4**) jak i od składu mikrobioty determinującej rozkład materii organicznej (**P3**). Poszukiwania społeczności mikroorganizmów zdolnych do stymulacji metanogenezy w węglach kopalnych były przedmiotem wielu badań. Do tego celu stosowano pożywki mineralne oraz inokulaty mikroorganizmów pochodzących np. z układu pokarmowego termitów, gleb torfowych, gleb z pól ryżowych, odchodów przeżuwaczy czy wód kopalnianych (Gupta i Gupta, 2014; Jones i in., 2010;

Opara i in., 2012). W każdym z wymienionych przypadków wykazano pozytywny wpływ zaszczipiania mikroorganizmami na generowanie metanu, jednak z reguły nie uwzględniano faktu, iż wraz z inokulatem, do węgla wprowadzano pozostałości medium, które w pierwszej kolejności mogły być wykorzystane przez mikroorganizmy do formowania  $\text{CH}_4$ . Należy także wziąć pod uwagę iż węgle występujące w różnych basenach sedymentacyjnych różnią się pod względem genezy (np. rodzaju roślin, które dały im początek) i stopnia przekształcenia. Trudno jest zatem ekstrapolować znane z literatury rezultaty na nieprzebadane dotychczas złoża, a na gruncie polskim tematyka biologicznego zgazowania węgla nie doczekała się dotychczas opracowania. Celem badań opisanych w pracach **P5** i **P6** było pozyskanie społeczności mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania metanu w oparciu o węgiel jako jedyny substrat.

W pracy (**P5**) opisano izolację społeczności mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania metanu z osadu dennego hipertroficznego zbiornika „Szczecin”. Występujące w nim zakwity glonów stanowią źródło materii organicznej, która stanowi substrat do intensywnej produkcji metanu *in situ*. Wysoka bioróżnorodność (ponad 2500 unikalnych ASVs) wskazuje na duży potencjał biotechnologiczny zamieszkującej osad mikrobioty. Pobrany z dna zbiornika materiał wykorzystano do założenia hodowli kultur mieszanych na podłożach zawierających różne źródła węgla (trypton, ekstrakt drożdżowy, octany,  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ ). W kolejnych etapach hodowli (na świeżych podłożach) monitorowano skład mikrobioty (z wykorzystaniem sekwencjonowania ampikonów 16S rDNA) i szybkość produkcji metanu przez mikroorganizmy. Wykazano, iż  $\text{CH}_4$  był najefektywniej formowany (do  $12.8 \text{ mg CH}_4 \text{ dm}^{-3} \text{ doba}^{-1}$ ) w hodowli z tryptonem, ekstraktem drożdżowym i w atmosferze zawierającej  $\text{CO}_2/\text{H}_2$ .

Zróżnicowanie warunków hodowli mikroorganizmów pozwoliło na prześledzenie interakcji między mikroorganizmami tworzącymi społeczność. Analiza zbiorowisk, które rozwinęły się na różnych źródłach węgla, rzuciła m. in. nowe światło na ekofizjologię opisanego niedawno typu bakterii *Caldiserica* (dawniej „*Candidate phylum* OP5”) oraz metanogenicznych *Archaea* reprezentujących rodzaje *Methanomassiliicoccus* i *Methanothrix*. W oparciu o uzyskane wyniki i analizę danych literaturowych postawiono hipotezę, że przedstawiciele *Caldiserica* mogą wywierać pozytywny wpływ na aktywność metanogenów wykorzystujących szlak hydrogenotroficzny, poprzez wydzielanie  $\text{H}_2$  na drodze dysproporcjonowania tiosiarczuanu. Biorąc pod uwagę, iż biologiczna degradacja węgla przez autochtoniczną mikrobiotę prowadzi do wydzielania  $\text{CO}_2$  (**P3**, **P4**) (który jest substratem hydrogenotroficznej metanogenezy), uznano, iż ich bioaugmentacja mikroorganizmami wyizolowanymi z osadu zbiornika zapadliskowego „Szczecin” mogłaby sprzyjać formowaniu biogazu w pokładach węgla.

Z tego względu dalsze moje badania, opisane w pracy **P6** skoncentrowane były na zbadaniu możliwości stymulacji procesu biologicznego formowania  $\text{CH}_4$  w węglu kamiennym pochodzącym z GZW (**P6**). Do bioaugmentacji węgla wykorzystano społeczność mikroorganizmów wyizolowane z osadu zbiornika „Szczecin” oraz, dla porównania, z charakteryzującego się intensywną metanogenezą torfu

(z torfowiska otaczającego jezioro „Moszne” na Pojezierzu Łęczyńsko-Włodawskim). Wnioskowania prowadzono w oparciu o wyniki analiz chromatograficznych (ilościowe oznaczenia CO<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub>), spektrometrii masowej stabilnych izotopów (IRMS) (skład stabilnych izotopów C w gazowych produktach przemiany materii), FTIR (transformacja materii organicznej) oraz sekwencjonowanie amplikonów 16S rDNA (skład mikrobioty).

Przeprowadzone badania wykazały, że społeczności mikroorganizmów pochodzące zarówno z torfu, jak i osadów dennych zbiornika „Szczecin” są zdolne do degradacji węgla do metanu, jednakże zdecydowanie większe tempo formowania gazu występowało w materiale zaszczipionym inokulatem pochodzącym z osadu (do 18 nmol CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> doba<sup>-1</sup>). Na podstawie modyfikacji w przebiegu widm FT-IR ustalono, że analizowane społeczności różnią się także pod względem sposobu wykorzystania sfosylizowanej materii organicznej. Organizacja makromolekuł węgla po inkubacji z mikrobiotą wyizolowaną z osadu sugeruje mniejszy udział struktur aromatycznych w porównaniu do materiału wyjściowego. Jednocześnie, wykazana w próbce produkcja metanu (najwyższa spośród badanych) sugeruje, że pierścienie aromatyczne zostały nie tylko przegrupowane, ale także skutecznie przekształcone w jednowęglowe substraty gazowe (CO<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub>). W węglu inokulowanym społecznością pochodzącą z torfu natomiast większą rolę wydaje się mieć reorganizacja struktur alifatycznych, na co wskazuje spadek wartości indeksu CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> implikujący pękanie łańcuchów węglowych w trakcie inkubacji. Również frakcjonowanie stabilnych izotopów węgla sugeruje, iż obecny w fazie gazowej inkubacji CH<sub>4</sub> mógł powstać w wyniku odrębnych procesów (różnica wartości δ<sup>13</sup>C wynosiła około 20 ‰). Poziom frakcjonowania <sup>13</sup>C-CH<sub>4</sub> stwierdzony w próbkach węgla bioaugmentowanego mikroorganizmami pochodzącymi z osadu lub torfu był niższy niż np. w badaniach kultur metanogenicznych (Penning i in., 2005) lub mieszanych kultur izolowanych z gleb (Galand i in., 2010). Czynnikiem, który mógł mieć na to wpływ były trudne warunki panujące w węglu. Frakcjonowanie C-CH<sub>4</sub> w procesach biologicznych uzależnione jest bowiem od stanu fizjologicznego komórek i mogło przebiegać w sposób mniej intensywny w społecznościach mikroorganizmów rozwijających się na granicy przetrwania (Penger i in., 2012). Ponadto, w świetle niedawnych badań wpływ na frakcjonowanie izotopowe C-CH<sub>4</sub> mają także stężenie gazu i dynamika procesów sorpcji/desorpcji gazu na powierzchni węgla (Niemann i Whiticar, 2017).

W węglach bioaugmentowanych mikroorganizmy wprowadzone wraz z inokulatami dominowały nad społecznością autochtoniczną węgla. W odniesieniu do metanogenów, najliczniej reprezentowane były archeony z klasy *Methanobacteria*, wykorzystujące hydrogenotroficzną ścieżkę formowania CH<sub>4</sub>. Jak opisano wcześniej (P5), wyizolowane z osadu jeziornego mikroorganizmy mogły stymulować ich aktywność. Niemniej wydaje się, iż tempo metanogenezy było przede wszystkim uzależnione od potencjału metabolicznego występujących w społeczności bakterii, odpowiedzialnych za hydrolizę makromolekuł węgla. Zwróciłam uwagę na to, iż w społeczności zasiedlającej węgiel bioaugmentowany

mikroorganizmami wyizolowanymi z osadu zbiornika „Szczecin”, licznie (powyżej 50%) reprezentowany był rząd *Rhodocyclales*, którego przedstawiciele (np. *Thauera aromatica*) (Ding i in., 2008) wykazują zdolność do wzrostu w oparciu o związki o charakterze aromatycznym. Wyniki te korespondują z ujawnioną przez FT-IR dearomatyzacją węgla i zdają się potwierdzać, iż wysokie, w porównaniu z próbkami węgla inokulowanymi pozostałymi wariantami doświadczenia, tempo metanogenezy jest konsekwencją aktywności tej właśnie grupy mikroorganizmów. Dearomatyzacja jest jedną z krytycznych przeszkód podczas degradacji węgla, dlatego też wyizolowane z osadu społeczności mikroorganizmów ma duży potencjał biotechnologiczny.

Jednocześnie, w składzie społeczności zasiedlających badany węgiel kamienny, zarówno bezpośrednio po pobraniu z pokładu jak i po bioaugmentacji potwierdzono obecność bakterii metanotroficznych należących do rodzajów *Methylobacterium*, *Methyломicrobium*, *Methyломonas*, *Methylocystis*, co współgra z wynikami zaprezentowanymi w pracach **P1** i **P3**.

#### 4.3.3 Podsumowanie osiągnięcia naukowego

W pracach składających się na osiągnięcie naukowe wykazałam, iż:

- w złożach węgla kopalnych występują zróżnicowane społeczności mikroorganizmów zdolnych do utleniania metanu. Metanotrofy obecne są w pokładach węgla (**P2**, **P3**) jak i warstwach mineralnych stanowiących ich otoczenie (**P1**, **P2**). Zarówno markery genetyczne (sekwencje fragmentów genu 16S rRNA) jak i geochemiczne (bakteriohopanoidy) wskazują na obecność w środowiskach geologicznych zarówno metanotrofów typu I (klasa *Gammaproteobacteria* – rodzaje *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methyломicrobium* i *Methylocaldum*) jak i II (klasa *Alphaproteobacteria* – rodzaj *Methylocystis*).
- pomimo ograniczeń (przede wszystkim w dostępności tlenu i wilgoci (Pytlak i in., 2014; Stępniewska i in., 2013)), bakterie metanotroficzne są szeroko rozprzestrzenione w formacjach węglonośnych (**P1**, **P2**, **P3**). Dodatkowo, udowodniłam, iż w złożach węgla kopalnych, mikroorganizmy te preferują warstwy geologiczne o charakterze organicznym. Wskazują na to wysokie stężenia specyficznych dla metanotrofów biomarkerów lipidowych (BHP) w węglach, w porównaniu do warstw mineralnych (**P2**) oraz wysoki udział metanotrofów w społecznościach wyizolowanych z węgla (**P3**). Ponadto wykazałam obecność w złożach węgla bakterii metanotroficznych należących do klas *Alpha*- i *Gammaproteobacteria*, co wskazuje na ich wysoką elastyczność metaboliczną i zdaje się potwierdzać pojawiające się w literaturze informacje sugerujące iż mikroorganizmy te nie są w istocie ściśle tlenowe i poza CH<sub>4</sub> są zdolne do wykorzystania alternatywnych szlaków asymilacji węgla i pozyskiwania energii (**P2**, **P3**).
- społeczności mikroorganizmów występujące w złożach węgla cechuje duże zróżnicowanie pod względem składu taksonomicznego i bioróżnorodności (**P3**, **P6**). Jednocześnie, kierunki przemian zawartej w węglach materii organicznej pod wpływem autochtonicznej mikrobioty wykazują szereg podobieństw. Zarówno w węglach kamiennych, jak i brunatnych następuje dearomatyzacja i

- dekondensacja struktur materii organicznej (P3). Wykazałam, iż we wszystkich badanych materiałach, głównym gazowym produktem przemiany materii, jest CO<sub>2</sub> (P3, P4), a zdolność autochtonicznych społeczności do wytwarzania CH<sub>4</sub> jest ograniczona (P3, P4, P6). Ponadto potwierdziłam, iż węgle brunatne były bardziej podatne na degradację struktur materii organicznej niż kamienne, na co wskazują wyższe wartości zarówno aktywności respiracyjnej jak i metanogenicznej (P3, P4). Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały także istotną rolę panujących w złożu warunków oksydacyjno-redukcyjnych (Eh) - produkcja CH<sub>4</sub> była ujemnie skorelowana z wartościami Eh (P4). Co istotne, przeprowadzone przeze mnie badania po raz pierwszy wykazały iż w grupie węgla brunatnych istotnym czynnikiem wpływającym na wymiar produkcji CH<sub>4</sub> i CO<sub>2</sub> jest także litotyp, a negatywny wpływ na biodegradację węgla ma zawartość macerałów ksylitowych (powstałych z lignin).
- istnieje możliwość stymulowania metanogenezy w węglu kamiennym (P5, P6). Wykazałam, iż inokulacja węgla kamiennego allochtonicznymi mikroorganizmami (wyizolowanymi z torfu i osadu jeziornego (P5)), prowadzi do intensyfikacji biologicznego formowania CH<sub>4</sub>. Wskazałam także, że w zależności od składu introdukowanej społeczności, leżąca u podstaw metanogenezy degradacja materii organicznej, może przebiegać w różny sposób (rozpad pierścieni aromatycznych lub degradacja łańcuchów alifatycznych) (P6). Niemniej, pomimo potwierdzonej biodegradacji zawartej w węglu materii organicznej i stymulacji procesu formowania CH<sub>4</sub> (w stosunku do węgla nieinokulowanego) ilość uzyskanego produktu wskazuje na ograniczone możliwości praktycznego zastosowania tej technologii (P6).
  - utlenianie CH<sub>4</sub> *in situ*, przez występujące w złożach bakterie metanotroficzne, jest jedną z możliwych przyczyn niskiej produktywności węgla w odniesieniu do formowania biogazu (P1, P3, P4, P6).

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

Moje dotychczasowe zainteresowania i aktywność naukowa koncentrowały się na aspektach związanych z mikrobiologią środowiskową, biotechnologią oraz z szeroko rozumianą ochroną środowiska. W latach 2006-2019 badania realizowałam w Katolickim Uniwersytecie Lubelskim Jana Pawła II a od roku 2019 w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN.

### 5.1 Pierwsze osiągnięcia naukowe

W trakcie studiów na kierunku Ochrona Środowiska na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim Jana Pawła II uczestniczyłam w seminarium z ekologii zespołów wodnych i wodno-lądowych. Moja praca magisterska pt.: „Okrzemki jako wskaźnik zasolenia i saprobii rzeki Świnki”, wykonana pod kierownictwem prof. dr hab. Władysławy Wojciechowskiej, dotyczyła wpływu zrzutu zasolonych wód z kopalni węgla kamiennego Lubelski Węgiel „Bogdanka” S.A. na ekosystem rzeczny. Celem prowadzonych badań była konfrontacja wyników parametrów fizyko-chemicznych z bioindykatorami mikrobiologicznymi. Przeprowadzone przeze mnie analizy wykazały, iż antropopresja powoduje gruntowną przebudowę zbiorowiska glonów

bentosowych, będących podstawą piramidy troficznej ww. ekosystemu. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy:

*Pasztaleniec, a and Połec, A. 2006. Distribution of benthic diatoms in the Świnka River (Polesie Region) in relation to salinity. International Journal of Oceanography and Hydrobiology, 35: 227–236*

## 5.2 Tematyka pracy doktorskiej

Po ukończeniu studiów, motywem przewodnim moich prac było badanie wpływu czynników środowiskowych na skład i aktywność metaboliczną mikrobiomów, ze szczególnym naciskiem na mikroorganizmy biorące udział w formowaniu i utlenianiu metanu. W 2006 roku, podjęłam pracę w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II gdzie kontynuowałam badania nad wpływem górnictwa na środowisko naturalne. Pod kierownictwem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej, w latach 2009-2011, realizowałam projekt promotorski (N N305 111336: Aktywność metanotroficzna i identyfikacja metanotrofów zasiedlających skały przywęglowe w różnych wyrobiskach górniczych kopalni Bogdanka). W mojej pracy doktorskiej (obronionej z wyróżnieniem na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym KUL) badałam dystrybucję metanotrofów w złożu kopalni, wpływ właściwości fizycznych i chemicznych skał na ich aktywność, a także dokonałam ich wstępnej identyfikacji. Interdyscyplinarny charakter tematyki mojej pracy doktorskiej zaowocował doświadczeniem w zakresie stosowania technik analitycznych w badaniach środowiskowych oraz oceny aktywności mikroorganizmów. W tym czasie zdobyłam także pierwsze doświadczenia w obszarze biotechnologii i biologii molekularnej. Wyniki mojej pracy doktorskiej stanowiły kanwę następujących publikacji:

*Stępniewska Z., Pytlak A., Kuźniar A., 2013. Methanotrophic activity in Carboniferous coalbed rocks. International Journal of Coal Geology 106, 1-10.*

*Pytlak A., Kuźniar A., Stępniewska Z., 2012. pmoA based detection of methanotrophic bacteria in coal-bed rocks of the Lublin Coal Basin. Acta Agrophysica 19(2), 403-413.*

*Stępniewska Z., Pytlak A., Wołoszyn A., 2010. Perspektywy dla biofiltracji metanu przy użyciu skał przywęglowych kopalni Lubelski Węgiel „Bogdanka” SA, Energia niekonwencjonalna i zagospodarowanie odpadów. Monografia, Polskie Towarzystwo Inżynierii Ekologicznej, Lublin*

*Stępniewska Z., Bennicelli R., Pytlak A., 2009. Wykorzystanie bakterii w procesie odmetanowania kopalń, Szkoła Eksploatacji Podziemnej 2009, Materiały Konferencyjne, Sympozja i konferencje nr 74, Kraków, 16-20 lutego 2009.*

*Stępniewska Z., Pytlak A.. Methanotrophic activity of coalbed rocks from „Bogdanka” coal mine (south-east Poland), Archives of Environmental Protection, 34(3), 2008, 183-191.*

*Stępniewska Z., Pytlak A., 2008. Distribution of methanotrophic activity of carbonaceous rocks from different seams of „Bogdanka” coal mine, Polish Journal of Environmental Studies 17(3A), 550-554.*

### 5.3 Badania realizowane po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, zdobyte wcześniej doświadczenie wykorzystałam podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „Rozpoznanie aktywności i próba identyfikacji bakterii metanotroficznych zasiedlających skały przywęglowe kopalni Górnośląskiego Zagłębia Węglowego” (N N305 326939, którego byłam współautorem). W projekcie podjęłam próbę weryfikacji odkryć dokonanych w Lubelskim Zagłębiu Węglowym w oparciu o materiały pochodzące z kopalni Górnego Śląska. Najważniejsze wyniki zostały opublikowane m. in. w artykułach:

**Pytlak A.,** Stępniewska Z., Kuźniar A., Szafranek-Nakonieczna A., Wolińska A., Banach A., 2014. *Potential for Aerobic Methane Oxidation in Carboniferous Coal Measures. Geomicrobiology Journal* 31, 737-747.

Stępniewska Z., **Pytlak A.,** Kuźniar A., 2014. *Distribution of the methanotrophic bacteria in Western part of the Upper Silesian Coal Basin (Borynia-Zofiówka and Budryk coal mines). International Journal of Coal Geology* 130, 70-78.

Wolińska A., **Pytlak A.,** Stępniewska Z., Kuźniar A., Piasecki C., 2013. *Identification of methanotrophic bacteria community in the Jastrzebie-Moszczenica coal mine by Fluorescence in situ Hybridization and PCR Techniques. Polish Journal of Environmental Studies. Polish Journal of Environmental Studies* 22(1), 275-282.

W kolejnych latach rozwijałam tematykę obecności bakterii metanotroficznych w otoczeniu pokładów węgla, sięgając po nowe narzędzia badań (analizę biomarkerów lipidowych – bakteriohopanoidów (BHP) oraz sekwencjonowanie amplikonów 16S rDNA). Na potrzeby realizowanego przeze mnie projektu pt. „Analiza społeczności mikroorganizmów występujących w utworach nadkładowych kopalni węgla brunatnego w ujęciu metagenomicznym i biomarkerów lipidowych - badania wstępne” (Miniatura, NCN, 2018/02/X/NZ9/01107, zakończony w 2019 r.) nawiązałam współpracę naukowcami z Department of Natural Sciences, Manchester Metropolitan University (MMU).

Równolegle brałam udział w badaniach nad biologicznym utlenianiem metanu w innych niż geologiczne ekosystemach, m. in. w glebach mineralnych, torfowiskach, złożach soli kamiennej, a także układach endofitycznych (roślina-bakteria). Efektem tych prac były m. in. artykuły:

Stępniewska Z., Kuźniar A., **Pytlak A.,** Szymczycha J., 2013. *Detection of methanotrophic endosymbionts in Sphagnum sp. originating from Moszne peat bog (East Poland). African Journal of Microbiology Research* 7(15), 1319-1325.

Stępniewska Z., Goraj W., Kuźniar A., Szafranek-Nakonieczna A., Banach A., Górski A., **Pytlak A.,** Urban D., 2018. *Methane Oxidation by Endophytic Bacteria Inhabiting Sphagnum sp. and Some Vascular Plants. Wetlands* 38: 411-422. <https://doi.org/10.1007/s13157-017-0984-3>.

Goraj W., Szafranek-Nakoneczna A., Grządziel J., Polakowski C., Słowakiewicz M., Zheng Y., Gałązka A., Stępniewska Z., **Pytlak A.** 2021. *Microbial Involvement in Carbon Transformation via CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in Saline Sedimentary Pool. Biology* 10(8), 792. <https://doi.org/10.3390/biology10080792>.

Ponadto, mając na względzie wysoki potencjał w asymilacji C-CH<sub>4</sub> oraz dużą elastyczność metaboliczną bakterii metanotroficznych, prowadziłam badania nad możliwością ich biotechnologicznego zastosowania. Efektem tych prac były m. in. patenty opisujące nowe aspekty procesów biotechnologicznej produkcji biodegradowalnych plastików (polihydroksyalkanolanów - PHA), a także osmoprotektantów (ektoiny) z wykorzystaniem bakterii metanotroficznych wyizolowanych ze skał przywęglowych (numery prawa wyłącznego odpowiednio 220375 oraz 217162) oraz publikacje naukowe i popularnonaukowe:

Kubaczyński A., **Pytlak A.**, Stępniewska Z., 2019. Poli-3-hydroksymaślan jako przykład biopolimeru produkowanego przez bakterie metanotroficzne, *Postępy Mikrobiologii* 58 (3), 329-338.

Stępniewska Z., Kuźniar A., **Pytlak A.**, Ciepielski J., 2014. Ektoina – przeciwstresowa cząsteczka przyszłości. *Kosmos* 1 (302), 25-35.

Stępniewska Z., Goraj W., Kuźniar A., **Pytlak A.**, Ciepielski J., Frączek P., 2014. *Biosynthesis of ectoine by the methanotrophic bacterial consortium isolated from Bogdanka coal mine (Poland). Applied Biochemistry and Microbiology* 50(6), 594-600.

Kolejną odsłonę realizowanej przeze mnie tematyki mikrobiologicznych przemian metanu w środowisku stanowił projekt pt. „Naturalna i stymulowana aktywność metanogeniczna polskich węgla kopalnych” (NCN, 2015/17/B/NZ9/01662, pod kierownictwem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej), którego byłam wykonawcą. Podejmowane zagadnienia dotyczyły m. in. potencjału autochtonicznej mikrobioty do formowania metanu, wpływu czynników abiotycznych jak również możliwości stymulacji tego procesu z wykorzystaniem allochtonicznych mikroorganizmów. Badania te stanowiły uzupełnienie i rozwinięcie tematyki mikrobiologii złóż węgla, którą realizowałam od początku pracy naukowej. W oparciu o uzyskane w projekcie wyniki powstało dotychczas 6 prac spośród których część (**P3 - P6**), wchodzi w skład opisanego wcześniej dzieła.

Rozwijając tematykę biologicznego formowania i utleniania CH<sub>4</sub> w środowiskach geologicznych nawiązałam współpracę z naukowcami ze State Key Laboratory of Continental Dynamics, Department of Geology, Northwest University (Chiny). W ośrodku tym prowadzona była część badań dotycząca rekonstrukcji warunków paleośrodowiskowych w złożach lignitów z Turowa i Bełchatowa. Badania te prowadzono w oparciu o biomarkery lipidowe (glicerofosfolipidy - GDGT). W odróżnieniu od metanotrofów tlenowych, które syntetyzują bakteriohopanoidy, metanogeniczne *Archaea* i bakterie beztlenowe pozostawiają bowiem po sobie specyficzny ślad w postaci biomarkerów lipidowych o charakterze odpowiednio: tetraeterów izoprenoidowych (iGDGT, z ang. isoprenoid glycerol dialkyl glycerol tetraether) lub tetraeterów rozgałęzionych (brGDGT, ang. branched glycerol dialkyl glycerol tetraether).



Cząsteczki te, podobnie jak bakteriohopanoidy stanowią świadectwo bioróżnorodności i przeszłej aktywności mikrobiologicznej występującej w określonej warstwie osadów, dając możliwość wyjaśnienia, w jaki sposób środowisko ich formowania wpływało na proces metanogenezy.

Ważnym elementem opisanych wyżej badań były analizy składu izotopowego (IRMS) gazów ( $\text{CO}_2$  i  $\text{CH}_4$ ) występujących w formacjach geologicznych. Analizy IRMS prowadzone były w Instytucie Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk (IA PAN).

Rezultatem współpracy z badaczami z Chin oraz IA PAN były publikacje:

*Szafranek-Nakonieczna A., Zheng Y., Słowakiewicz M., **Pytlak A.**, Polakowski C., Kubaczyński A., Bieganowski A., Banach A., Wolińska A., Stępniewska Z., 2018. Methanogenic potential of lignites in Poland, International Journal of Coal Geology 196: 201-210.*

*Goraj W., Szafranek-Nakonieczna A., Grządziel J., Polakowski C., Słowakiewicz M., Zheng Y., Gałzka A., Stępniewska Z., **Pytlak A.** 2021. Microbial Involvement in Carbon Transformation via  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  in Saline Sedimentary Pool. Biology 10(8), 792. <https://doi.org/10.3390/biology10080792>*

Kontynuacją współpracy z badaczami z Chin była wspólna aplikacja w programie grantowym Sheng (NCN) oraz projekt interdyscyplinarny realizowany ze środków KUL, pt.: Odporność biocenozy glebowej na czynniki zewnętrzne na tle badań paleoklimatycznych (realizowany w latach 2019-2022). Uczestniczyłam w opracowaniu jego koncepcji jak i w przeprowadzeniu badań.

Na przestrzeni lat 2014-2019, moja współpraca z IA PAN odbywała się na wielu płaszczyznach. Poza badaniami z zakresu geomikrobiologii, w których wykorzystywana była technika IRMS, dotyczyła ona także m. in. badań mikrobiologicznych, które prowadziłam w ramach tematyki realizowanej w IA PAN. W wyniku wieloletniej współpracy, od grudnia 2019 jestem pracownikiem Zakładu Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego IA PAN. Punktem centralnym podejmowanej przeze mnie tematyki pozostają mikroorganizmy biorące udział w utlenianiu i produkcji metanu. Realizowane zadania badawcze dotyczą m. in. fermentacji metanowej w procesie produkcji biogazu z odpadów rolniczych oraz wpływu zabiegów agrotechnicznych na wymianę gazów szklarniowych ( $\text{CO}_2$  i  $\text{CH}_4$ ) w układzie gleba-atmosfera. W ramach tej tematyki ukazały się następujące prace:

***Pytlak A.**, Kasprzycka A., Szafranek-Nakonieczna A., Grządziel J., Kubaczyński A., Proc K., Onopiuk P., Walkiewicz A., Polakowski C., Gałzka A., Lalak-Kańczugowska J., Stępniewska Z., Bieganowski A. 2020, Biochar addition reinforces microbial interspecies cooperation in methanation of sugar beet waste (pulp), Science of The Total Environment, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138921*

*Kubaczyński A., Walkiewicz A., **Pytlak A.**, Brzezińska M., 2020, New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars, International Agrophysics, 34(3): 355–364; DOI: 10.31545/intagr/126762*

Kubaczyński A., Walkiewicz A., **Pytlak A.**, Grządziel J., Gałzka A., Brzezińska M., 2022, *Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol*, *Science of the Total Environment*, 806; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.151259

oraz powstał patent:

Kubaczyński A., Walkiewicz A., Brzezińska M., Polakowski C., **Pytlak A.**, Bieganowski A., 2021, Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie, numer prawa wyłącznego 237796.

W roku 2021, w ramach konkursu Opus 21 (NCN) uzyskałam grant na realizację projektu pt.: „Wpływ glifosatu na biologiczne utlenianie metanu w glebach rolniczych”. Przesłanką do podjęcia tego tematu był fakt, iż pomimo wagi powyższego zagadnienia, w literaturze brakuje informacji na temat wpływu stosowania ww. herbicydu i jego adjuwantów na występujące w glebach bakterie metanotroficzne. Wypełnienie tej luki jest głównym celem projektu. Na lata 2022-2025 zaplanowano interdyscyplinarne badania z obszaru mikrobiologii, toksykologii i biogeochemii. Prace realizowane będą we współpracy z zespołami badawczymi na KUL, UM (Uniwersytet Medyczny w Lublinie) oraz MMU (Manchester Metropolitan University). Materiał do badań stanowić będą gleby, wyizolowane z nich społeczności mikroorganizmów oraz czyste kultury bakterii metanotroficznych. W efekcie uzyskany zostanie wielowymiarowy obraz wpływu glifosatu i adjuwantów na aktywność metanotroficzną i skład mikrobiomu glebowego oraz wgląd w mechanizmy oddziaływania na bakterie metanotroficzne.

## 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

Od początku mojej pracy naukowej sprawowałam opiekę merytoryczną nad studentami w czasie przeprowadzania badań i pisanie przez nich prac dyplomowych (magisterskich i licencjackich). W sumie brałam udział w przygotowaniu: 14 prac magisterskich i 4 licencjackich na kierunku Ochrona Środowiska oraz 13 prac magisterskich i 13 licencjackich na kierunku Biotechnologia.

W 2019 roku byłam także opiekunem merytorycznym projektu badawczego w dziedzinie geomikrobiologii, realizowanego przez studentów Wydziału Geologii Uniwersytetu Warszawskiego. Owocem tej współpracy było wspólne wystąpienie konferencyjne:

Krażala A., Śnieżyńska I., Słowakiewicz M., **Pytlak A.**: Struktura mikrobiomu węgla brunatnego w świetle warunków depozycji. IV Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „Metagenomy Różnych Środowisk”, 27-28.06.2019, Lublin

Od 2014 do 2019 sprawowałam opiekę nad Kołem Naukowym Biotechnologii, w ramach którego wspierałam aktywność naukową studentów, m. in. pomagając im w realizacji własnych badań i

formułowaniu komunikatów konferencyjnych. Od 2015 do 2019 roku, wraz ze studentami współpracowałam z Fundacją na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, m. in. w zakresie organizacji serii konferencji pt. „Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Metody chromatograficzne w nauce, przemyśle i medycynie” (3 edycje) oraz „Ogólnopolska Konferencja Naukowa KRIMED Metody badawcze w kryminalistyce i medycynie sądowej” (4 edycje).

Uczestniczyłam w licznych konferencjach. W sumie jestem współautorem 79 wystąpień (45 na konferencjach krajowych i 39 międzynarodowych). Konferencje międzynarodowe na których głosiłam referaty to: EGU General Assembly (2011, Wiedeń, Austria), International Scientific Conference Global Environmental Processes (2012, Moskwa, Rosja), IUSS Conference on Soil Functions and Climate Change (2015, Kilonia, Niemcy), IX Międzynarodowy Kongres Górnictwa Węgla Brunatnego (2016, Bełchatów, Polska), IX International Scientific Conference - Current environmental issues (2016, Grodno, Białoruś) oraz 13th International Conference on Agrophysics - Agriculture in changing climate (2021 -online).

Brałam także aktywny udział w organizacji konferencji tj.: „Biotechnologia - energia jutra” (Lublin, 19-20.10.2017r.) oraz „Metagenomy różnych środowisk” (Lublin, 28-29.06. 2018) gdzie byłam odpowiedzialna za organizację, aspekty finansowe i logistyczne, pozyskiwanie sponsorów oraz przygotowanie do druku materiałów konferencyjnych. W przypadku 9 sympozjów, byłam członkiem komitetu naukowego.

Od 2011 roku, biorę także regularnie udział w Lubelskim Festiwalu Nauki. Ponadto, wielokrotnie prowadziłam warsztaty z zakresu podstaw mikrobiologii i biologii molekularnej skierowane do uczniów na różnych szczeblach edukacji. W roku 2019 odbywały się one również w ramach projektu „Otwarcia na sukces”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.

Ponadto, w ramach pełnionych obowiązków, wielokrotnie brałam udział w audycjach radiowych i programach telewizyjnych mających na celu popularyzację nauki.

## **7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej**

W roku 2009 uzyskałam stypendium przyznane w ramach projektu „Stypendia Naukowe dla Doktorantów” realizowanego przez Departament Gospodarki i Innowacji Urzędu Marszałkowskiego Województwa Lubelskiego.

W latach 2014-2018 byłam czterokrotnie nagradzana (indywidualnie i jako członek zespołu) przez Rektora Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II za oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe oraz wybitną działalność organizacyjną i społeczną oraz popularyzację nauki.

Odbyłam też szereg kursów specjalistycznych, obejmujących swą tematyką: analizy statystyczne (2007 – Statsoft, kurs obejmujący korzystanie z oprogramowania naukowego Statistica), nowoczesne

technologie ICT w upowszechnianiu osiągnięć nauki (2010 – KUL, szkolenie w sztuce prezentacji oferty naukowej i badawczej), cytometrię przepływową (2017 – Becton Dickinson Polska, szkolenie teoretyczne i praktyczne z wykorzystaniem aparatu BD FACSCalibur), analizy bioinformatyczne (2017 – Ideas4biology - wprowadzenie do analizy danych RNA-seq, 2019 - Ideas4biology, szkolenie z zakresu analizy danych uzyskanych w sekwencjonowaniu następnej generacji).

## 8. Podsumowanie aktywności naukowej

| Dane bibliometryczne                                                                                                          | Liczba    | IF           | IF <sup>2020</sup> | pkt MNiE    | Number of citations* according to WoS |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------|--------------------|-------------|---------------------------------------|
| Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego                                                                            | 6         | 37.147       | 41.111             | 900         | 11                                    |
| Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie JCR (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) |           |              |                    |             |                                       |
| - przed uzyskaniem stopnia doktora                                                                                            | 3         | 2.212        | 4.887              | 180         | 0                                     |
| - po uzyskaniu stopnia doktora                                                                                                | 15        | 56.581       | 66.764             | 1490        | 70                                    |
| Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych krajowych innych niż znajdujące się w bazie JCR                            |           |              |                    |             |                                       |
| - przed uzyskaniem stopnia doktora                                                                                            | 2         | 0            | 0                  | 5           | 2                                     |
| - po uzyskaniu stopnia doktora                                                                                                | 3         | 0            | 0                  | 40          | 0                                     |
| <b>Sumarycznie</b>                                                                                                            | <b>29</b> | <b>95.94</b> | <b>112.762</b>     | <b>2615</b> | <b>83</b>                             |
| Liczba komunikatów naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych                                     |           |              |                    |             |                                       |
| - przed uzyskaniem stopnia doktora                                                                                            | 4         |              |                    |             |                                       |
| - po uzyskaniu stopnia doktora                                                                                                | 41        |              |                    |             |                                       |
| <b>Indeks Hirsha wg Web of Science *</b>                                                                                      | <b>6</b>  |              |                    |             |                                       |

\* - bez autocytowań

.....  
(podpis wnioskodawcy)

## 9. Literatura

- Akimbekov, N., Digel, I., Abdieva, G., Ualieva, P., Tastambek, K., 2021. Lignite biosolubilization and bioconversion by *Bacillus* sp.: the collation of analytical data. *Biofuels* 12, 247–258.  
<https://doi.org/10.1080/17597269.2020.1753936>
- Alves Dias, P., Kanellopoulos, K., Medarac, H., Kapetaki, Z., Miranda-Barbosa, E., Shortall, R., Czako, V., Telsnig, T., Vazquez-Hernandez, C., Arántegui, L., R., Nijs, W., Aparicio, G., Trombetti, M., Mandras, G., Peteves, E., Tzimas, E., 2018. EU coal regions: Opportunities and Challenges Ahead (JRC112593 EUR 29292 EN). Luxembourg.
- Baani, M., Liesack, W., 2008. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10203–10208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702643105>
- Belova, S.E., Baani, M., Suzina, N.E., Bodelier, P.L.E., Liesack, W., Dedysh, S.N., 2011. Acetate utilization as a survival strategy of peat-inhabiting *Methylocystis* spp. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 36–46.  
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00180.x>
- Buendia, C., Kranjc, K., Fukuda, J., Osako, N.S., Shermanau, Y., Federici, P., 2019. 2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories Volume 2 Energy Edited by Task Force on National Greenhouse Gas Inventories.
- Cappellini, E., Prohaska, A., Racimo, F., Welker, F., Pedersen, M.W., Allentoft, M.E., De Barros Damgaard, P., Gutenbrunner, P., Dunne, J., Hammann, S., Roffet-Salque, M., Ilardo, M., Moreno-Mayar, J.V., Wang, Y., Sikora, M., Vinner, L., Cox, J., Evershed, R.P., Willerslev, E., 2018. Ancient Biomolecules and Evolutionary Inference. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 1029–1060. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012002>
- Conrad, R., 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 285–292. <https://doi.org/10.1111/J.1758-2229.2009.00038.X>
- Ding, B., Schmeling, S., Fuchs, G., 2008. Anaerobic Metabolism of Catechol by the Denitrifying Bacterium *Thauera aromatica*—a Result of Promiscuous Enzymes and Regulators? *J. Bacteriol.* 190, 1620.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01221-07>
- Dlugokencky, E.J., 2022. NOAA/GML [WWW Document]. URL [gml.noaa.gov/ccgg/trends\\_ch4/](http://gml.noaa.gov/ccgg/trends_ch4/) (udostępiono 1.14.22).
- Farhan Ul Haque, M., Crombie, A.T., Ensminger, S.A., Baci, C., Murrell, J.C., 2018. Facultative methanotrophs are abundant at terrestrial natural gas seeps. *Microbiome* 6, 1–14.  
<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0500-x>
- Galand, P.E., Yrjälä, K., Conrad, R., Yrjälä, K., Conrad, R., 2010. Stable carbon isotope fractionation during methanogenesis in three boreal peatland ecosystems. *Biogeosciences* 7, 3893–3900.  
<https://doi.org/10.5194/bg-7-3893-2010>

- Gupta, P., Gupta, A., 2014. Biogas production from coal via anaerobic fermentation. *Fuel* 118. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.075>
- Inglis, G.N., Farnsworth, A., Lunt, D., Foster, G.L., Hollis, C.J., Pagani, M., Jardine, P.E., Pearson, P.N., Markwick, P., Galsworthy, A.M.J., Raynham, L., Taylor, K.W.R., Pancost, R.D., 2015. Descent toward the Icehouse: Eocene sea surface cooling inferred from GDGT distributions. *Paleoceanography* 30, 1000–1020. <https://doi.org/10.1002/2014PA002723>
- IPCC, 2021. *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- 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 consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7013–7022. <https://doi.org/10.1128/AEM.00728-10>
- Knief, C., 2019. Diversity of methane-cycling microorganisms in soils and their relation to oxygen. *Curr. Issues Mol. Biol.* 33, 23–56. <https://doi.org/10.21775/CIMB.033.023>
- Kotelnikova, S., 2002. Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Rev.* 58, 367–395. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(01\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00082-4)
- Liang, W., Yan, J., Zhang, B., Hou, D., 2021. Review on Coal Bed Methane Recovery Theory and Technology: Recent Progress and Perspectives. *Energy & Fuels* 35, 4633–4643. <https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFUELS.0C04026>
- Meslé, M., Dromart, G., Oger, P., 2013. Microbial methanogenesis in subsurface oil and coal. *Res. Microbiol.* 164, 959–972. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.07.004>
- Mills, C.T., Amano, Y., Slater, G.F., Dias, R.F., Iwatsuki, T., Mandernack, K.W., 2010. Microbial carbon cycling in oligotrophic regional aquifers near the Tono Uranium Mine, Japan as inferred from  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{14}\text{C}$  values of in situ phospholipid fatty acids and carbon sources. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 3785–3805. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.03.016>
- Niemann, M., Whiticar, M.J., 2017. Stable isotope systematics of coalbed gas during desorption and production. *Geosci.* 7. <https://doi.org/10.3390/geosciences7020043>
- Opara, A., Adams, D.J., Free, M.L., McLennan, J., Hamilton, J., 2012. Microbial production of methane and carbon dioxide from lignite, bituminous coal, and coal waste materials. *Int. J. Coal Geol.* 96–97, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2012.02.010>
- Penger, J., Conrad, R., Blaser, M., 2012. Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7596–7602. <https://doi.org/10.1128/AEM.01773-12>
- Penning, H., Plugge, C.M., Galand, P.E., Conrad, R., 2005. Variation of carbon isotope fractionation in hydrogenotrophic methanogenic microbial cultures and environmental samples at different energy

- status. *Glob. Chang. Biol.* 11, 2103–2113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01076.x>
- Pytlak, A., Kuźniar, A., Stepniewska, Z., 2012. pmoA based detection of methanotrophic bacteria in coalbed rocks of the Lublin Coal basin. *Acta Agrophysica* 19, 403–413.
- Pytlak, A., Stepniewska, Z., Kuźniar, A., Szafranek-Nakonieczna, A., Wolińska, A., Banach, A., 2014. Potential for aerobic methane oxidation in Carboniferous coal measures. *Geomicrobiol. J.* 31, 737–747. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.889783>
- Rush, D., Osborne, K.A., Birgel, D., Kappler, A., Hirayama, H., Peckmann, J., Poulton, S.W., Nickel, J.C., Mangelsdorf, K., Kalyuzhnaya, M., Sidgwick, F.R., Talbot, H.M., 2016. The Bacterioplanepolyol Inventory of Novel Aerobic Methane Oxidising Bacteria Reveals New Biomarker Signatures of Aerobic Methanotrophy in Marine Systems. *PLoS One* 11, e0165635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165635>
- Saunio, M., Stavert, A., Poulter, B., Bousquet, P., Canadell, J., Jackson, R., Raymond, P., Dlugokencky, E., Houweling, S., Patra, P., Ciais, P., Arora, V., Bastviken, D., Bergamaschi, P., Blake, D., Brailsford, G., Bruhwiler, L., Carlson, K., Carrol, M., Castaldi, S., Chandra, N., Crevoisier, C., Crill, P., Covey, K., Curry, C., Etiope, G., Frankenberg, C., Gedney, N., Hegglin, M., Hoglund-Isaksson, L., Hugelius, G., Ishizawa, M., Ito, A., Janssens-Maenhout, G., Jensen, K., Joos, F., Kleinen, T., Krummel, P., Langenfelds, R., Laruelle, G., Liu, L., Machida, T., Maksyutov, S., McDonald, K., McNorton, J., Miller, P., Melton, J., Morino, I., Müller, J., Murguía-Flores, F., Naik, V., Niwa, Y., Noce, S., O'Doherty, S., Parker, R., Peng, C., Peng, S., Peters, G.P., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Regnier, P., Riley, W., Rosentreter, J., Segers, A., Simpson, I., Shi, H., Smith, S., Thornton, B., Tian, H., Tohjima, Y., Tubiello, F., Tsuruta, A., Viovy, N., Voulgarakis, A., Weber, T., Van Weele, M., Van Der Werf, G., Weiss, R., Worthy, D., Wunch, D., Yin, Y., Yoshida, Y., Zhang, W., Zhang, Z., Zhao, Y., Zheng, B., Zhu, Q., Qian, Zhuang, Q., 2020. The Global Methane Budget 2000-2017. *Earth Syst. Sci. Data* 12, 1561–1623. <https://doi.org/10.18160/GCP-CH4-2019>
- Stepniewska, Z., Pytlak, A., 2008. Methanotrophic activity of coalbed rocks from „Bogdanka” coal mine (south-east Poland). *Arch. Environ. Prot.* 34, 183–191.
- Stepniewska, Z., Pytlak, A., Kuźniar, A., 2013. Methanotrophic activity in Carboniferous coalbed rocks. *Int. J. Coal Geol.* 106, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2013.01.003>
- Strapoć, D., Mastalerz, M., Dawson, K., Macalady, J., Callaghan, A. V., Wawrik, B., Turich, C., Ashby, M., 2011. Biogeochemistry of Microbial Coal-Bed Methane. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 39, 617–656. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-040610-133343>
- Sultana, N., Zhao, J., Cai, Y., Rahman, G.K.M.M., Alam, M.S., Faheem, M., Ho, A., J, Z., 2022. Methanotrophy-driven accumulation of organic carbon in four paddy soils of Bangladesh. *Pedosphere* 32, 348–358. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(20\)60030-3](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(20)60030-3)
- Talbot, H.M., Bischoff, J., Inglis, G.N., Collinson, M.E., Pancost, R.D., 2016. Polyfunctionalised bio- and

- geohopanoids in the Eocene Cobham Lignite. *Org. Geochem.* 96, 77–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2016.03.006>
- Talbot, H.M., Handley, L., Spencer-Jones, C.L., Bienvenu, D.J., Schefuß, E., Mann, P.J., Poulsen, J.R., Spencer, R.G.M., Wabakanghanzi, J.N., Wagner, T., 2014. Variability in aerobic methane oxidation over the past 1.2Myrs recorded in microbial biomarker signatures from Congo fan sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 133, 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.02.035>
- Thompson, R.L., Nisbet, E.G., Pisso, I., Stohl, A., Blake, D., Dlugokencky, E.J., Helmig, D., White, J.W.C., 2018. Variability in Atmospheric Methane From Fossil Fuel and Microbial Sources Over the Last Three Decades. *Geophys. Res. Lett.* <https://doi.org/10.1029/2018GL078127>
- van Grinsven, S., Sinninghe Damsté, J.S., Harrison, J., Polerecky, L., Villanueva, L., 2021. Nitrate promotes the transfer of methane-derived carbon from the methanotroph *Methylobacter* sp. to the methylotroph *Methylotenera* sp. in eutrophic lake water. *Limnol. Oceanogr.* 66, 878–891.  
<https://doi.org/10.1002/LNO.11648>
- van Winden, J.F., Talbot, H.M., Kip, N., Reichart, G.J., Pol, A., McNamara, N.P., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Sinninghe Damsté, J.S., 2012. Bacteriohopanepolyol signatures as markers for methanotrophic bacteria in peat moss. *Geochim. Cosmochim. Acta* 77, 52–61.  
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.10.026>
- Vecherskaya, M., Dijkema, C., Saad, H.R., Stams, A.J.M., 2009. Microaerobic and anaerobic metabolism of, a *Methylocystis parvus* strain isolated from, a denitrifying bioreactor. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 442–449. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00069.x>
- Vorobev, A., Jagadevan, S., Jain, S., Anantharaman, K., Dick, G.J., Vuilleumier, S., Semraua, J.D., 2014. Genomic and transcriptomic analyses of the facultative methanotroph *methylocystis* sp. strain SB2 grown on methane or ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3044–3052.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00218-14>
- Wang, B., Ndayisenga, F., Zhang, G., Yu, Z., 2021. Deciphering the initial products of coal during methanogenic bioconversion: Based on an untargeted metabolomics approach. *GCB Bioenergy* 13, 967–978. <https://doi.org/10.1111/GCBB.12824>