

**Załącznik nr 2**

# **AUTOREFERAT**

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

**dr Agnieszka Wolińska**

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



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

**LUBLIN 2018**

**1. Imię i nazwisko: Agnieszka Wolińska**

**Adres służbowy:** Katedra Biochemii i Chemii Środowiska

Instytut Biotechnologii

Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

ul. Konstantynów 1 i, 20-708 Lublin

tel. 81 454 54 60, fax.: 81 445 46 11

e-mail: awolin@kul.pl

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

**19.06.2001** – tytuł **magistra ochrony środowiska** uzyskany na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. Studia zakończone wynikiem bardzo dobrym. Tytuł pracy magisterskiej: **„Wpływ wilgotności gleb na gęstość strumienia tlenu”**. Promotorem pracy był dr Andrzej Bieganowski, konsultantem śp. prof. dr hab. Ryszard Walczak, członek korespondencyjny PAN.

**28.09.2009** – tytuł **doktora nauk biologicznych w zakresie biologii**, uzyskany na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II. Tytuł rozprawy doktorskiej: **„Aktywność dehydrogenazowa mikroorganizmów glebowych i dostępność tlenu w procesie reoksydacji wybranych, mineralnych gleb Polski”**. Promotorem był śp. dr hab. Riccardo Bennicelli, prof. KUL, a recenzentami: dr hab. Mieczysław Błaszczuk, prof. SGGW oraz prof. dr hab. Korneliusz Miksch (Politechnika Śląska)

**3. Informacje o przebiegu pracy naukowej**

---

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

---

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**"Biologiczne i metagenomiczne badania różnorodności bakterii gleb Lubelszczyzny w poszukiwaniu nowych wyznaczników ich biologicznej degradacji"**

**a. autorzy, tytuły publikacji, rok wydania**

**A1. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Rekosz-Burlaga Hanna, Goryluk-Salmonowicz Agata, Błaszczuk Mieczysław, Stępniewska Zofia. 2015. Bacterial abundance and dehydrogenase activity in selected agricultural soils from Lublin region. Polish Journal of Environmental Studies, 24 (6), 2677–2682.

**IF<sub>2015</sub> 0,790; IF<sub>5 letni</sub>: 0,888; punktacja MNiSW: 15; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 5**

**A2. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Stępniewska Zofia, Pytlak Anna. 2015. The effect of environmental factors on total soil DNA content and dehydrogenase activity. Archives of Biological Sciences, 67(2), 493–501.

**IF<sub>2015</sub> 0,718; punktacja MNiSW: 15; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 11**

**A3. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Szafranek-Nakonieczna Anna, Banach Artur, Błaszczuk Mieczysław, Stępniewska Zofia. 2016. The impact of agricultural soil usage on activity and abundance of ammonifying bacteria in selected soils from Poland. Springer Plus, 5: 565, doi: 10.1186/s40064-016-2264-8.

**IF<sub>2016</sub> 0,982; punktacja MNiSW: 25; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 3**

---

✉ autor korespondencyjny

**A4. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Górniak Dorota, Zielenkiewicz Urszula, Goryluk-Salmonowicz Agata, Kuźniar Agnieszka, Stępniewska Zofia, Błaszczuk Mieczysław. 2017. Microbial biodiversity in arable soils is affected by agricultural practices. *International Agrophysics* **31**(2): 259–271.

**IF<sub>2016</sub> 0,967; IF<sub>5 letni</sub>: 1,197; punktacja MNiSW: 25; liczba cytowań** (wg bazy Web of Science): **2**

**A5. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Kuźniar Agnieszka, Zielenkiewicz Urszula, Banach Artur, Izak Dariusz, Stępniewska Zofia, Błaszczuk Mieczysław. 2017. Metagenomic analysis of some potential nitrogen-fixing bacteria in arable soils at different formation process. *Microbial Ecology*, **73**, 162–176. doi 10.1007/s00248-016-0837-2. (opublikowana online 31.08.2016)

**IF<sub>2016</sub> 3,630; IF<sub>5 letni</sub>: 3,752; punktacja MNiSW: 35; liczba cytowań** (wg bazy Web of Science): **0**

**A6. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Kuźniar Agnieszka, Zielenkiewicz Urszula, Izak Dariusz, Szafranek-Nakonieczna Anna, Banach Artur, Błaszczuk Mieczysław. 2017. *Bacteroidetes* as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by culture independent approach. *Applied Soil Ecology*, **119**, 128–137. doi 10.1016/j.apsoil.2017.06.009.

**IF<sub>2016</sub> 2,768; IF<sub>5 letni</sub>: 3,224; punktacja MNiSW: 35; liczba cytowań** (wg bazy Web of Science): **1**

**A7. Wolińska Agnieszka**<sup>✉</sup>, Frąc Magdalena, Oszust Karolina, Szafranek-Nakonieczna Anna, Zielenkiewicz Urszula, Stępniewska Zofia. 2017. Microbial biodiversity of meadows under different modes of land use: catabolic and genetic fingerprinting. *World*

---

<sup>✉</sup> autor korespondencyjny

Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(8), 154. doi 10.1007/s11274-017-2318-2.

**IF<sub>2016</sub> 1,658; punktacja MNiSW: 20; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 0**

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **11,513** i/lub **12,419** (uwzględniając IF<sub>5 letni</sub>)

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **170**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science): **22**

**b. omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi 7 prac opublikowanych w latach 2015–2017, ujętych pod wspólnym tytułem "**Biologiczne i metagenomiczne badania różnorodności bakterii gleb Lubelszczyzny - w poszukiwaniu nowych wyznaczników ich biologicznej degradacji**". Wspomniane prace są efektem realizacji w latach 2014–2016 projektu SONATA finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Metagenomy glebowe wskaźnikiem degradacji bioróżnorodności mikroorganizmów w glebach użytkowanych rolniczo na Lubelszczyźnie” (DEC-2013/09/D/NZ9/02482), w którym pełniłam funkcję kierownika.

Ze względu na fakt, że środowisko glebowe stanowi najbardziej różnorodny i najbardziej liczny rezerwuar mikroorganizmów na Ziemi, wykorzystując najnowsze narzędzia biologii molekularnej, podjęłam badania związane z wyznaczeniem metagenomów glebowych, mogących stać się indykatorami degradacji biologicznej gleb rolniczo użytkowanych. Pomimo, że badania bioróżnorodności w glebach prowadzone są od dawna, to jednak wciąż wiążą się ze sporymi trudnościami metodycznymi. Wiadomo już, że metody oparte na hodowli bakterii na sztucznych podłożach w laboratorium, mimo że wzbogaciły wiedzę mikrobiologiczną, to jednak nie stanowią pełnego obrazu bioróżnorodności świata bakterii glebowych (Badura 2006), limitując sferę poznawczą do 1–3% bakterii hodowalnych, podczas gdy większość

bakterii glebowych (97–99%) pozostaje niehodowalna w warunkach laboratoryjnych. Nie mniej jednak, dzięki szybkiemu w ostatnich 10–15 latach rozwojowi metod metagenomicznych, możliwe stało się pominięcie najbardziej nieefektywnego poznawczo etapu hodowli laboratoryjnych i pozyskanie nieosiągalnej do niedawna informacji na temat ogromnej populacji bakterii niehodowanych (z ang. *VBNC, Viable But Not Cultivable*), zasiedlających środowiska glebowe.

Dane literaturowe wskazują, że o ile w glebach nieuprawianych (nieużytkach, pastwiskach, łąkach) znajdują się tysiące genomów różnych bakterii, to w glebach poddawanych wieloletniej uprawie ich liczba ulega znacznemu ograniczeniu (Tschardt i in., 2012; Bender i in., 2016; Zhang i in., 2017). Redukcja grup filogenetycznych bakterii na skutek działalności rolniczej powoduje, że gleby te zawierają zwykle znacznie mniej grup taksonomicznych przy dużej liczebności komórek. Ograniczenie różnorodności sprawia zaś, że gleby rolnicze nie podlegają cyklowi pełnej regeneracji i nie przywracają swojej żywności na dostatecznie wysokim poziomie. Z tego punktu widzenia określenie aktywności drobnoustrojów glebowych wraz z dokładnym opisaniem istniejących w danej glebie taksonów bakteryjnych jest szczególnie ważne.

Waga tego problemu została rozpoznana już przez 10 krajów UE (Niemcy, Wielka Brytania, Francja, Holandia, Szwajcaria, Nowa Zelandia, Czechy, Rosja, Austria, Włochy), w których analizy stanu mikrobiologicznej degradacji gleb są systematycznie prowadzone. Wytypowano do tego celu szereg wskaźników mikrobiologicznych, pozwalających uzyskać adekwatną odpowiedź, świadczącą o biologicznej degradacji środowisk glebowych, w wyniku stosowanych praktyk rolniczych. Wskaźniki rekomendowane przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD, ang. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) obejmują ustalenie: aktywności respiracyjnej, biomasy mikroorganizmów, poziomu enzymów glebowych (dehydrogenaz, aktywności argininy), procesy amonifikacji i nityfikacji, analizy bioróżnorodności z wykorzystaniem technik DGGE i/lub Biolog, liczebność bakterii i/lub grzybów.

Należy w tym miejscu podkreślić, że w Polsce analizy metagenomiczne gleb rolniczych nie były dotąd prowadzone. Stąd, wyniki **uzyskane w toku realizacji kierowanego przeze mnie projektu stanowią pierwsze tak kompleksowe zbadanie bioróżnorodności gleb rolniczo użytkowanych w naszym kraju.**

Obszarem prowadzenia moich badań stała się Lubelszczyzna, stanowiąca jeden z największych i najważniejszych areałów rolniczych Polski, w którym reprezentowane są wszystkie, podstawowe i dominujące w Polsce jednostki glebowe. Materiał glebowy został pogrupowany w 3 główne grupy gleb z uwagi na genezę ich powstania:

- I. **autogeniczne** – wytworzone na utworach lessowych, reprezentowane przez gleby płowe typowe, płowe zerodowane i czarnoziemy, stanowiące 77,5% województwa lubelskiego i obejmujące ok. 85% obszaru Polski.
- II. **hydrogeniczne** – powstałe pod wpływem stagnującej wody, reprezentowane przez gleby murszowe, mady rzeczne i czarne ziemie, stanowiące 5% powierzchni województwa lubelskiego i ok. 13% obszaru Polski.
- III. **litogeniczne** – wytworzone na podłożu wapiennym, reprezentowane przez rędziny (czarnoziemne i brunatne), stanowiące 17,5% powierzchni województwa i ok. 2% obszaru Polski.

Niezwykle ważnym pozostaje fakt, że każda z wykorzystanych lokalizacji pobierania prób glebowych do badań nie była przypadkowa ani dowolna. Każda z nich została bowiem skatalogowana w Banku Próbek Glebowych, utworzonym w 1991 r. i należącym do Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie (Gliński i in. 1991). Historia dokumentacji, typologii i uprawy tych gleb obejmuje 27 lat, można zatem już wnioskować o ich „zmęczeniu”. Tym samym stanowiły one dobrą matrycę do poszukiwania wskaźników, świadczących o postępującej w nich biologicznej degradacji, jako efekt długoletnich zabiegów uprawowych. Materiał kontrolny stanowiły gleby nieuprawiane, sąsiadujące bezpośrednio ze stanowiskami Banku Gleb i należącymi do tego samego typu co gleby rolnicze.

Biorąc pod uwagę informacje przedstawione powyżej, podejmując badania sformułowałam **hipotezę**, że skład ilościowy i jakościowy wspólnoty mikroorganizmów zasiedlających gleby (określany mianem bioróżnorodności, liczebnością operacyjnych jednostek taksonomicznych - OTU [*ang. Operational Taxonomic Unit*]) na terenach użytkowanych rolniczo może być odmienny niż w glebach naturalnych (nierolniczych).

Zasadnicze **cele badawcze** postawione w moich badaniach naukowych dotyczyły:

- zbadania zależności pomiędzy czynnikami środowiskowymi a aktywnością enzymatyczną i liczebnością bakterii w glebach rolniczych i nieuprawianych [**A1, A2, A3, A4, A5, A6**]

- rozpoznania aktualnego stanu bioróżnorodności bakterii w glebach poddawanych od wielu lat zabiegom uprawowym na tle gleb nieuprawianych rolniczo, tak by pozyskać wiedzę na temat ewentualnej degradacji wspólnoty bakterii gleb rolniczych powodowanej przez zabiegi uprawowe [A4, A5, A6, A7],
- wyznaczenia nowych wskaźników metagenomicznych, świadczących o biologicznej degradacji i zmęczeniu gleb rolniczo użytkowanych oraz indykatorów bakterii, wykazujących odporność na zabiegi uprawowe [A5, A6, A7]
- wykazania zróżnicowania metabolicznego i genetycznego gleb o różnym sposobie ich użytkowania [A7]

Wyznaczone cele badawcze doskonale wpisały się w przyjętą przez Unię Europejską na lata 2011–2020 „Strategię Bioróżnorodności”.

Weryfikację postawionej hipotezy rozpoczęłam od wyznaczenia wpływu rolniczego użytkowania gleb na parametry najszybciej reagujące na biologiczną degradację, tj.: całkowitą liczebność bakterii hodowalnych, liczebność kopio-i oligotrofów, a także ich aktywność dehydrogenazową (AD) [A1], tak by potwierdzić, że właściwości biologiczne gleb rolniczych i nieużytków są odmienne. Do badań wstępnych wybrałam cztery jednostki glebowe (znajdujące się w momencie pobrania pod uprawą owsa – by wyeliminować efekt rodzaju uprawy na właściwości biologiczne), reprezentujące gleby autogeniczne (płowa typowa, płowa zerodowana), hydrogeniczne (gleba murszowa) oraz litogeniczne (rędzina czarnoziemna). Wyznaczyłam ponadto odczyn gleb (pH) oraz ich zasobność w węgiel całkowity (TC). Już sama analiza wspomnianych wyżej dwóch parametrów chemicznych wykazała zróżnicowanie między stanowiskami rolniczo użytkowanymi a kontrolnymi. Gleby rolnicze cechowały się niższymi wartościami pH (4,85–5,58) i niższą zasobnością w węgiel (0,98–2,69%), podczas gdy w glebach kontrolnych pH oscyloowało w zakresie 5,30–7,40, zaś TC wynosił 1,8–4,35%. Zróżnicowanie w chemizmie gleb pociągnęło za sobą różnice w ich właściwościach biologicznych, wyrażonych AD i ogólną liczebnością mikroorganizmów. Niezależnie od typu gleby potwierdziłam niższą (średnio o 75%) liczebność bakterii i niższą (o ok. 25%) aktywność dehydrogenaz w glebach pochodzących ze stanowisk rolniczych w porównaniu do gleb nieuprawianych [A1]. Wykazałam także, że w badanych glebach dominują hodowalne bakterie oligotroficzne (o niskich wymaganiach pokarmowych), których liczebność była o 30–53% wyższa w porównaniu do liczebności hodowalnych



kopiotrofów. Wyznaczone wartości współczynnika równowagi biologicznej, wyrażone stosunkiem O:C (Oligotrofy:Kopiotrofy), pozwoliły na klasyfikację gleb pod względem ich podatności na biologiczną degradację powodowaną przez zabiegi rolnicze. Niższe wartości O:C (0,81–1,53) odnotowałam w stosunku do gleb rolniczych, podczas gdy wyższe (1,02–2,40) cechowały gleby kontrolne. Spośród badanych typów gleb najbardziej podatną na biologiczną degradację okazała się gleba płowa zerodowana (z grupy gleb autogenicznych), co potwierdziła najniższa wartość współczynnika O:C (0,81), natomiast gleba murszowa (z grupy gleb hydrogenicznych) okazała się najbardziej odporna na biologiczną degradację, o czym świadczy najwyższa wartość współczynnika O:C (1,53). W omawianej pracy [A1] przeanalizowałam też wpływ odczynu i zawartości węgla na biologiczne właściwości gleb, wyznaczając dodatnie korelacje między badanymi parametrami (za wyjątkiem współzależności AD i pH, której przypisano ujemną korelację). Jak wiadomo, dehydrogenazy należą do wewnątrzkomórkowych enzymów, wykazujących optimum w warunkach pH zbliżonych do obojętnego (Włodarczyk 2000), stąd w odniesieniu do badanych gleb wykazujących odczyn kwaśny wyznaczona współzależność miała odwrotnie proporcjonalny charakter. W omawianej pracy potwierdziłam też ścisłą współzależność między AD i liczebnością mikroorganizmów ( $r=0,928^{***}$ ), bezsprzecznie wskazując na mikrobiologiczny charakter dehydrogenaz, stanowiących miarę aktywności żywych mikroorganizmów w środowisku glebowym.

Kontynuacją badań związanych z AD w roli czułego indykatora wrażliwości gleb na zabiegi uprawowe była analiza wpływu potencjału wodnego (pF) i zasobności gleb w węgiel organiczny (TOC) zarówno na aktywność enzymatyczną, jak i zawartość w nich glebowego DNA [A2]. Glebą użytą w doświadczeniu była czarna ziemia (z grupy gleb hydrogenicznych), powszechnie uznawana za jedną z najżyźniejszych gleb Polski, którą pobrałam z trzech warstw profilu glebowego: 0–20 cm, 20–40 cm i 40–60 cm. Zróżnicowanie głębokości profilu czarnej ziemi miało na celu sprawdzenie czy zasadne jest poszukiwanie indykatorów biologicznej degradacji gleb poza jej warstwą powierzchniową. W celu wykazania dużej wrażliwości dehydrogenaz na sposób użytkowania gleb wybrałam dwa stanowiska badawcze, pozornie bardzo do siebie podobne. Pierwsze, obejmowało glebę poddaną umiarkowanym zabiegom rolniczym, pobraną z terenu łąki koszonej (dwa razy w roku), nawożonej (N, P, K) i używanej głównie do wypasu bydła. Drugie stanowisko, sąsiadujące bezpośrednio z pierwszym, obejmowało glebę pozbawioną ingerencji człowieka, pobraną z terenu łąki niekoszonej

i nienawożonej, stanowiącej nieużytek. W warunkach laboratoryjnych określiłam retencję wodną badanych profili glebowych, doprowadzając je do wilgotności w zakresie pF 0 – pF 2.0, odpowiadającej ilości wody bezpośrednio dostępnej dla korzeni roślin (czyli najbardziej użytecznej). Zróżnicowanie wilgotności gleb pozwoliło na określenie jej wpływu na AD oraz zawartość DNA glebowego. AD osiągnęła maksimum przy pełnej pojemności wodnej (pF 0) na obu badanych obiektach, wykazując o 55,5% wyższy poziom w glebie nieużytkowanej rolniczo. Zaobserwowałam także znaczący (92–95%) spadek aktywności enzymatycznej wraz ze wzrostem głębokości profilu czarnej ziemi, co potwierdziło zasadność prowadzenia dalszych badań biologicznych w ograniczeniu do warstw powierzchniowych gleb. Podobny trend zmian odnotowałam w odniesieniu do zawartości DNA, którego stężenie również podlegało wpływowi wilgotności (optymalny okazał się punkt pF 1.0, odpowiadający wilgotności 40% v/v) oraz głębokości gleby. Zawartość DNA malała wraz ze wzrostem głębokości profilu glebowego czarnej ziemi, niezależnie od sposobu jej użytkowania. Także zasobność w TOC okazała się najwyższa w warstwach powierzchniowych (21–22,5%) i w sposób statystycznie istotny malała w głębszych warstwach profili, osiągając minimalne wartości (0,2–0,9%) na poziomie 40-60 cm. Konsekwencją opisanych zmian stało się wyznaczenie bliskich, statystycznie istotnych współzależności między AD, DNA, pF, TOC i sposobem użytkowania gleb. Potwierdziłam tym samym wysoką wrażliwość AD i DNA na zabiegi uprawowe, wykazując różnice w ich poziomie na obiektach pozornie do siebie podobnych. Oba parametry biologiczne wykazywały istotnie wyższe wartości w odniesieniu do czarnej ziemi, nie poddawanej żadnej ingerencji człowieka. Wyznaczona, istotna współzależność DNA i AD ponownie (jak w pracy **A1**) potwierdziła mikrobiologiczny charakter dehydrogenaz. Ponadto, wykazałam dużą wrażliwość tego testu enzymatycznego na nawet umiarkowane zabiegi uprawowe, co potwierdza wyższy o 51,3% poziom AD odnotowany w powierzchniowej warstwie gleby nieuprawianej w porównaniu do analogicznej warstwy czarnej ziemi umiarkowanie użytkowanej rolniczo.

Wyniki uzyskane w pracy **A3** pokazały, że adekwatnym indykatorem biologicznej degradacji gleb rolniczych jest wyznaczenie NPL (najbardziej prawdopodobnej liczby) bakterii amonifikacyjnych oraz ich aktywności amonifikacyjnej, wyrażonej szybkością metabolizowania argininy. W tej pracy przeanalizowałam dziesięć jednostek glebowych, reprezentujących pięć typów gleb (płowa typowa, płowa zerodowana,

czarna ziemia, mada rzeczna, rędzina) i taką samą liczbę gleb kontrolnych (nieuprawianych). Charakterystyka stanowisk badawczych obejmowała wyznaczenie: wilgotności, odczynu, węgla całkowitego (TC), węgla łatwo-degradowalnego; tj. bezpośrednio dostępnego dla mikroorganizmów (POXC, *ang. Permanganate Oxidizable Carbon*) oraz biogennych form azotu ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ). Wyniki badań (analogicznie do prac **A1** i **A2**) potwierdziły, że chemizm gleb poddawanych długoletniej uprawie rolniczej jest odmienny od stanowisk kontrolnych (nie poddawanych ingerencji człowieka), co wskazuje na fakt, że działalność rolnicza jest zasadniczym czynnikiem wpływającym nie tylko na skład konsorcjum bakterii i ich aktywność, ale również zabiegiem silnie modyfikującym jej wskaźniki chemiczne. Gleby rolnicze cechowały się kwaśnym pH i niższą zasobnością w węgiel całkowity ( $8,3\text{--}19,6 \text{ g kg}^{-1}$ ) aniżeli gleby nieuprawiane ( $14\text{--}34,9 \text{ g kg}^{-1}$ ). Jakkolwiek, przedstawiona powyżej zasobność gleb w TC nie oznacza, że w takiej ilości jest on dostępny dla mikroorganizmów. Dzięki oznaczeniu formy POXC wiadomo, że zaledwie niewielka jego pula jest bezpośrednio dostępna i wynosi  $0,49\text{--}0,76 \text{ g kg}^{-1}$  w glebach rolniczych i  $0,55\text{--}1,10 \text{ g kg}^{-1}$  w glebach nieuprawianych. Zarówno spadek pH w kierunku kwaśnym jak i zubożenie w węgiel stanowią przesłanki do wnioskowania o degradacji gleb rolniczych w wyniku działalności człowieka. Analiza form biogennych azotu pozwoliła na stwierdzenie, że dominującą jego formą w glebach jest azot azotanowy, którego ilość była o ponad 50% wyższa w glebach rolniczo użytkowanych, a więc i systematycznie nawożonych. Z kolei zawartość azotu amonowego i azotynowego była istotnie wyższa w glebach kontrolnych. Warto podkreślić w tym miejscu, że zbyt intensywne nawożenie azotowe pogłębia zakwaszenie gleb rolniczych (Guo i in., 2010) i w konsekwencji przyspiesza ich degradację. Amonifikacja argininy (AA), stanowiąca miarę aktywności amonifikacyjnej bakterii, była znacznie niższa w glebach rolniczych ( $1,8\text{--}18 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ s m godz}^{-1}$ ) aniżeli w kontrolnych ( $6,9\text{--}47 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ s m godz}^{-1}$ ). Konsekwencją różnic w AA stała się odpowiedź NPL bakterii amonifikacyjnych, która w porównaniu ze stanowiskami kontrolnymi była niższa nawet o 93–98% w glebach rolniczo użytkowanych. Bliska współzależność parametrów biologicznych (AA i NPL amonifikatorów) została potwierdzona testami statystycznymi. W pracy **A3** wykazałam ponadto, że liczebność bakterii amonifikacyjnych w glebach rolniczych jest zależna od pH, wilgotności, puli węgla zawartego w podłożu oraz azotu azotynowego.

Rozpoznanie aktualnego stanu bioróżnorodności bakterii w glebach poddawanych od wielu lat zabiegom uprawowym na tle gleb nieuprawianych rolniczo rozpoczęłam od techniki DGGE (ang. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), której wyniki zamieściłam w pracy **A4**. Analizom poddanych zostało 16 jednostek glebowych rolniczo użytkowanych oraz odpowiadające im gleby kontrolne. Dodatkowo przeprowadzono analizy PCA (ang. *Principal Component Analysis*), CCA (ang. *Canonical Correspondence Analysis*) oraz wyliczono wskaźniki: bioróżnorodności Shannona–Weavera ( $H'$ ), dominacji ( $1/D$ ) oraz różnorodności ( $D$ ) Simpsona. Wynikiem analizy DGGE stała się bezsprzeczna separacja prób na 2 klastry: gleby uprawiane (zmęczone) oraz nieuprawiane (kontrolne), co stanowiło wyraźną weryfikację postawionej hipotezy badawczej. Ponadto analiza profili DGGE wykazała znaczące różnice w strukturze dominujących fylotypów badanych gleb. W glebach nieuprawianych (kontrolnych) stwierdzono wyższą liczbę dominujących OTU (65), aniżeli w glebach długotrwale użytkowanych rolniczo (47), co wskazuje na fakt, że w próbach gleb poddanych zabiegom agrotechnicznym następuje zmniejszenie liczby dominujących OTU o blisko 30% [**A4**]. Analiza bioróżnorodności dominujących fylotypów dla poszczególnych ścieżek DGGE oceniana wskaźnikiem Shannona–Weavera wykazała co prawda nieznacznie wyższą bioróżnorodność fylotypów bakterii w glebach uprawianych ( $H'=5,10$ ) w porównaniu do gleb kontrolnych ( $H'=4,87$ ). Jednak analiza wykonana z użyciem wskaźnika różnorodności Simpsona ( $D$ ) potwierdziła, że w glebach rolniczych występuje wyraźnie więcej dominujących społeczności w porównaniu do gleb kontrolnych, gdzie fylotypów o dużych liczebnościach było mniej. Szczególnie zjawisko to uwidocznił wyliczony dla wszystkich ścieżek DGGE wskaźnik dominacji Simpsona ( $1/D$ ), opisujący „odczuwalną” liczbę gatunków (ang. „*Appreciable*” *the Number of Species*”), który w glebach uprawianych wynosił 1,22, podczas gdy w glebach pobranych ze stanowisk kontrolnych był blisko trzykrotnie wyższy (3,38) [**A4**].

Poddanie produktów uzyskanych w analizie DGGE klonowaniu i sekwencjonowaniu pozwoliło na wstępne rozpoznanie różnic w strukturze bakterii zasiedlających gleby uprawiane i nie poddawane zabiegom uprawowym. W pracy **A4** zamieściłam tylko te sekwencje, które wykazywały podobieństwo na poziomie 99–100% z sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI. W glebach rolniczych ze 100% podobieństwem stwierdziłam dominację niehodowalnych przedstawicieli bakterii, należących do rzędu *Myxococcales*, jak również reprezentujących rodzaj

*Mucilaginibacter*. Obecność rodziny *Xanthomonadaceae* a także rodzajów: *Gammaproteobacterium*, *Sphingomonas*, *Rhodanobacter*, *Arthrobacter* i *Bradyrhizobium* została wykazana z 99% podobieństwem. Z kolei w glebach nieuprawianych dominowały bakterie należące do typów *Firmicutes* (100%) i *Gemmatimonadetes* (99%) oraz przedstawiciele rodzin *Acidobacteriaceae* (100%) i *Hyphomicrobiaceae* (99%). Potwierdziłam także obecność niehodowanych bakterii z rzędu *Caulobacterales* (99%) oraz reprezentujących rodzaje: *Alphaproteobacterium*, *Rhodoplanes*, *Mesorhizobium* (99%). Niektóre typy bakterii (np. *Firmicutes*, *Acidobacteria*) okazały się być wspólnymi typami, występującymi zarówno w glebach rolniczych jak i kontrolnych. Dzięki analizie CCA wyznaczono wpływ najważniejszych parametrów środowiskowych (wilgotności, pH, Eh, TC, biogennych form N i P) na wspólnoty mikroorganizmów, wykazując, że ich oddziaływanie nierozzerwalnie łączy się ze sposobem użytkowania gleb. W glebach rolniczych największy wpływ na bioróżnorodność odgrywają: potencjał oksydoredukcyjny i azot azotanowy, zaś w glebach kontrolnych: wilgotność, pH, TC i biogenne formy azotu azotanowego i azotynowego oraz fosforu.

Zagadnienie związane z formami azotu i ich zasobnością w glebach rozwinęłam w pracy **A5**, w której również dzięki zastosowaniu narzędzi metagenomicznych, scharakteryzowałam bakterie potencjalnie wiążące azot (PNF – *ang. Potential Nitrogen-Fixing*), zasiedlające gleby Lubelszczyzny i mogące stanowić nowy indyktor ich biologicznej degradacji. Sekwencjonowanie Następnej Generacji (*ang. Next Generation Sequencing*) wykonane zostało w technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania Ion Torrent<sup>PGM</sup> (Life Technologies) w wyspecjalizowanych pracowniach IBB w Warszawie. Ponadto w pracy podjęłam próbę wyznaczenia współzależności czynników chemicznych gleb i OTU, odpowiadających grupie bakterii PNF. Odnotowana zaś zasobność gleb w poszczególne formy azotu odnosi się do jego puli pozostałej po poprzednim roku wegetacyjnym (2013), albowiem próby do badań metagenomicznych pobrano wczesną wiosną 2014 r., przed ich wiosennym nawożeniem. Wszelkie rozważania odnośnie zawartości azotu w glebach są niezwykle ważne, gdyż pozwalają na zoptymalizowanie ich wymagań pod względem nawożenia. Wyniki prezentowane w pracy **A5** jasno pokazują, że w rolniczo wykorzystywanych glebach autogenicznych (płowych, czarnoziemnych), czyli tych, które dominują w Polsce, w wyniku zabiegów rolniczych następuje znaczący (ok. 60%,  $p=0,0000$ ) wzrost azotu azotanowego w porównaniu z glebami nieuprawianymi oraz blisko 3-krotnie

spadek formy azotu azotynowego i amonowego. W glebach hydrogenicznych (czarnych ziemiach, madach, murszowych) również notowano wzrost azotu azotanowego i amonowego w porównaniu z odpowiadającymi im glebami kontrolnymi, jakkolwiek zmiany te nie miały charakteru istotności statystycznej ( $p > 0,05$ ). Sposób użytkowania silnie modyfikował zasobność w azot gleb litogenicznych (rędzin), które cechowały się o około 80% wyższym poziomem azotu azotanowego i amonowego w porównaniu ze stanowiskami kontrolnymi.

W wyniku NGS, wykonanego na 31 próbach glebowych i po ich dokładnej obróbce bioinformatycznej otrzymano 358,289 odczytów łącznie w glebach rolniczych i nieuprawianych. Analizy metagenomiczne pozwoliły potwierdzić postawioną hipotezę, iż skład ilościowy i jakościowy wspólnoty mikroorganizmów, zasiedlających gleby na terenach użytkowanych rolniczo jest odmienny niż w glebach naturalnych. Otrzymano bowiem

21,366 OTU w odniesieniu do mikrobiomu gleb rolniczych oraz 22,664 OTU w odniesieniu do mikrobiomu gleb nieuprawianych (kontrolnych). W badanych glebach zidentyfikowano następujące typy bakterii: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Elusimicrobia*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Spirochaeta* i *Verrucomicrobia*.

Spośród całości otrzymanych danych bioinformatycznych, stanowiących o bioróżnorodności badanych gleb wybrałam te OTU, które można sklasyfikować jako grupę bakterii PNF, mogących stać się nowym indykatorem biologicznej degradacji gleb rolniczo użytkowanych. Analizując wyniki NGS w całym zbiorze badanych gleb zidentyfikowałam osiem rodzajów bakterii grupy PNF, spośród których cztery zdecydowanie dominowały: *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* i *Cupriavidus*. Subdominantami były bakterie PNF z rodzajów: *Rhizobium*, *Microvirga*, *Methylobacterium* oraz *Phyllobacterium*. Co istotne, wyższą liczebność bakteryjnych OTU z rodzajów: *Burkholderia*, *Cupriavidus* i *Microvirga* stwierdziłam na stanowiskach rolniczo użytkowanych, co wskazuje na ich oporność na zabiegi uprawowe (Indykatory Oporności Rolniczej, ang. *Agricultural Resistance Indicators*). Z kolei zdecydowany spadek OTU, należących do rodzajów: *Devosia* i *Methylobacterium* w glebach rolniczych wskazuje na ich wrażliwość na działalność rolniczą człowieka i sugeruje, że mogą stać się metagenomami rekomendowanymi jako indykatory biologicznej degradacji i zmęczenia gleb rolniczych. Bakterie z rodzajów *Mesorhizobium* i *Rhizobium* cechowała podobna liczebność zarówno na stanowiskach

uprawowych, jak i kontrolnych. Obecność zaś rodzaju *Phyllobacterium* stwierdzono tylko w glebach nieuprawianych, co wskazuje na jego wrażliwość na działalność rolniczą i klasyfikuje do nowych indykatorów biologicznej degradacji gleb rolniczych.

W pracy **A5** wykazałam również, że struktura bakterii PNF zależy nie tylko od sposobu użytkowania gleb ale również od genezy jej powstania. Gleby autogeniczne stanowiły środowisko najchętniej zasiedlane przez bakterie PNF. Na drugim miejscu znalazły się gleby hydrogeniczne, zaś najmniej preferowaną niszą ekologiczną bakterii PNF okazały się być gleby litogeniczne. Preferencje bakterii w zasiedlaniu gleb o różnej genezie formowania znalazły odzwierciedlenie w ich wrażliwości na zabiegi uprawowe, bowiem bakterie PNF zasiedlające gleby hydrogeniczne i litogeniczne były szczególnie wrażliwe na zabiegi uprawowe, co potwierdzały spadki OTU w stosunku do odpowiadających im stanowisk kontrolnych. Z kolei mikroorganizmy należące do *β-Proteobacteria* i *Cyanobacteria*, zasiedlające głównie gleby autogeniczne okazały się wskaźnikami oporności bakterii na rolnicze użytkowanie, jako że liczba ich OTU była wyższa na stanowiskach użytkowanych rolniczo w porównaniu z ich kontrolami. Wyznaczone współzależności parametrów chemicznych z OTU bakterii PNF pozwoliły na określenie ich wymagań środowiskowych. Wykazałam, że bakterie PNF preferują gleby: o pH obojętnym lub lekko alkalicznym; przewodnictwie elektrolitycznym (EC) na poziomie przynajmniej około 0,08 mS cm<sup>-3</sup> oraz dostępności węgla (EDC) >1300 mg kg<sup>-1</sup>. Wymiernym efektem pracy **A5** jest również wykazanie potrzeby dodatkowego nawożenia azotowego gleb litogenicznych w których liczba OTU PNF bakterii była najniższa.

Wpływ genezy gleb na bioróżnorodność bakterii przedstawiłam w pracy **A6**, w której rekomendowałam również typ *Bacteroidetes* jako nowy indykator rolniczego użytkowania gleb i tym samym ich biologicznego zmęczenia. Podobnie jak we wcześniej wspomnianych pracach, również w tej przeanalizowałam wpływ parametrów środowiskowych na OTU należące do *Bacteroidetes*. Wykazałam, że *Bacteroidetes* stanowią subdominujący typ w strukturze bakterii w glebach rolniczych i kontrolnych Lubelszczyzny, znajdując się na drugim miejscu po dominującym w środowisku glebowym typie *Proteobacteria*. Trzecie miejsce w strukturze bakterii należało do typu *Actinobacteria*. W wyniku analiz metagenomicznych otrzymano 2516 OTU sklasyfikowanych jako typ *Bacteroidetes* w glebach kontrolnych oraz 1568 (czyli o 37,67% mniej) w glebach rolniczych. Analogicznie do grupy bakterii PNF [**A5**], również w odniesieniu do *Bacteroidetes* wykazałam ich preferencję do zasiedlania gleb

autogenicznych, następnie hydrogenicznych zaś najmniej preferowanym środowiskiem życia okazały się być gleby litogeniczne. W obrębie typu *Bacteroidetes* dominującym rodzajem w glebach Lubelszczyzny było *Flavobacterium*, którego liczebność plasowała się na istotnie niższym (średnio o 30–40%) poziomie w glebach uprawianych ( $p < 0.05$ ), co wskazuje, że może stanowić on indyktor świadczący o zmęczeniu gleb rolniczych. Co ciekawe, rodzaj *Flavobacterium* kojarzony bywa głównie ze środowiskiem wodnym (Stevens i in., 2005; Thomas i in., 2011), podczas gdy analizy metagenomiczne wykonane na glebach Lubelszczyzny, jednoznacznie wskazują, że rodzaj ten stanowi ok. 20% wszystkich bakteryjnych glebowych OTU. Podobny trend zmian (redukcja liczebności w glebach rolniczych) wykazały dwa subdominujące rodzaje: *Pedobacter* i *Mucilaginibacter*, jakkolwiek notowany spadek ich liczebności nie miał charakteru istotnego statystycznie ( $p > 0.05$ ). W pracy [A6] opisano także wyniki analizy beta-różnorodności *Bacteroidetes*, w celu wykazania ilości wspólnych i różnicujących OTU zarówno w glebach uprawianych, jak i stanowiących ich kontrole. Ilość OTU wspólnych plasowała się na poziomie (6,67–17,91%) średnio 12,6%, co potwierdza postawioną hipotezę badawczą, iż mikrobiom gleb użytkowanych rolniczo jest odmienny od mikrobiomu gleb nie poddawanych zabiegom uprawowym (naturalnych).

Ponadto wykazałam, że poza rolniczym użytkowaniem i genezą gleb również parametry chemiczne stanowią istotny czynnik w odniesieniu do analizowanej grupy bakterii. Badane gleby rolnicze cechowało pH w zakresie odczynu kwaśnego, wyższe przewodnictwo elektrolityczne i zawartość azotu azotanowego w porównaniu do stanowisk kontrolnych. Jednocześnie gleby rolnicze wykazywały niższą w porównaniu z kontrolami zawartość węgla i azotu azotynowego. Spośród analizowanych pierwiastków stwierdziłam, że Fe (21–30 mg kg<sup>-1</sup>), K (17–25 mg kg<sup>-1</sup>) i Na (3–16 mg kg<sup>-1</sup>) występują w najwyższych stężeniach, zaś najmniej gleby Lubelszczyzny były zasobne w Mg (0,2–2 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (<0,25 mg kg<sup>-1</sup>) oraz Cu (<0,1 mg kg<sup>-1</sup>). Dodatkowo korelacje wyznaczyłam pomiędzy ogólną liczbą OTU *Bacteroidetes* oraz rodzajami: *Flavobacterium* i *Pedobacter* a przewodnictwem elektrolitycznym (EC) oraz zasobnością w Na w glebach hydrogenicznych. Zasadniczo gradację analizowanych czynników chemicznych pod względem ich wpływu na bakterie typu *Bacteroidetes* można przedstawić następująco: EC > pH > Na > Zn > Mn > Ca > PO<sub>4</sub>-P, jakkolwiek wpływ parametrów chemicznych jest ściśle zależny od genezy gleby. Jako, że środowiskowe *Bacteroidetes* są uważane za typ bakterii wyspecjalizowanych w degradacji materii organicznej w tym: licznych związków polimerycznych, pestycydów,



insektycydów (Church 2008; Thomas i in., 2011) oznaczanie ich liczebności w glebach rolniczych jest uzasadnione, tym bardziej, że jednocześnie dostarczy informacji na temat ich biologicznej degradacji. Natomiast stwierdzony istotny spadek liczby ich OTU w następstwie długoletnich praktyk rolniczych jednoznacznie wskazuje, że typ *Bacteroidetes* jest wrażliwym indykatorem zmęczenia biologicznego gleb rolniczych.

W celu znalezienia innych metagenomicznych wyznaczników degradacji gleb oraz wykazania różnic w ich profilu zarówno genetycznym, jak i metabolicznym, w kolejnej pracy [A7] powróciłam do dwóch stanowisk badawczych, pozornie do siebie bardzo podobnych (łąki koszonej i umiarkowanie nawożonej oraz niekoszonej, nienawożonej i traktowanej jako pastwisko), analizowanych w pracy A2. Łącząc ze sobą dwie nowoczesne techniki: metagenomiczną: 454–pirosekwencjonowania (Illumina) z różnorodnością funkcjonalną bakterii: Biolog EcoPlate™ uzyskałam kompleksowy obraz bioróżnorodności bakterii w powierzchniowej warstwie czarnej ziemi o różnym sposobie jej użytkowania. Technika NGS zaowocowała uzyskaniem 31 368 odczytów w odniesieniu do próby glebowej (czarnej ziemi), pochodzącej z łąki niekoszonej (NK) oraz 24 062 odczyty sekwencji w odniesieniu do próby pobranej z łąki koszonej (K). Wszystkie odczyty należały do domeny *Bacteria*. Zarówno liczba otrzymanych OTU, jak i wyznaczone współczynniki różnorodności (ACE, Chao1,  $H'$ ,  $1/D$ ) potwierdziły wyższą bioróżnorodność w glebie nie poddawanej żadnym zabiegom uprawowym (NK) aniżeli w glebie umiarkowanie użytkowanej rolniczo (K) [A7]

Analizując strukturę bakterii wykazałam na obu stanowiskach dominację typu *Proteobacteria*, w obrębie którego najwyższa liczebność cechowała przedstawicieli klasy *Alphaproteobacteria* (52 i 38% sekwencji w odniesieniu do K i NK,  $p < 0,05$ ) oraz *Gammaproteobacteria* (26 i 22% sekwencji, odpowiednio w próbie K i NK,  $p < 0,05$ ). Bakterie należące do klas *Beta-* i *Deltaproteobacteria* pozostawały na podobnym poziomie (10% w odniesieniu do K i 17–20% w odniesieniu do NK,  $p < 0,05$ ). Wyniki analizy na poziomie taksonomicznym klas *Proteobacteria* wskazały na bezsprzeczny wpływ sposobu użytkowania gleby na jej bioróżnorodność, albowiem *Alpha-* i *Gammaproteobacteria* dominowały na obszarze K, podczas gdy wyższa liczebność OTU *Beta-* i *Deltaproteobacteria* wystąpiła na terenie NK. Subdominującymi typami bakterii były *Acidobacteria* (18–20%) oraz *Actinobacteria* (7–8%), których liczebność wyższa ( $p > 0,05$ ) była na stanowisku NK. Sekwencje przypisane do typu *Bacteroidetes* i *Gemmatimonadetes* stanowiły ok. 5%, zaś *Planctomycetes* 3%. Liczebność *Chloroflexi* pozostawała na poziomie 1–2%, podczas gdy *Chlorobi*, *Firmicutes* i *Verrucomicrobia*

nie przekroczyły 1%. Porównując strukturę bakterii między stanowiskami K i NK wykazałam, że najwyższe zróżnicowanie wywołane sposobem użytkowania gleb dotyczy *Delta-* i *Betaproteobacteria*, a ponadto także *Firmicutes*, *Chlorobi*, *Actinobacteria* i *Chloroflexi*.

Poszukując wskaźników szybko reagujących na rolnicze użytkowanie gleb bądź wykazujących tolerancję i oporność wobec stosowanych zabiegów uprawowych przeanalizowałam niższy poziom taksonomiczny – rzędy bakterii [A7]. Zaobserwowałam, że indykatorów biologicznej degradacji gleb niekoniecznie trzeba poszukiwać wśród dominujących rzędów bakterii, bowiem liczebność nie zawsze świadczy o wrażliwości na zabiegi uprawowe. Spośród *Alphaproteobacteria* wskaźnikiem wrażliwym na rolnicze użytkowanie gleb okazał się być najmniej licznie (3% wszystkich bakteryjnych sekwencji) reprezentowany rząd *Rickettsiales*, zaś spośród *Gammaproteobacteria* rząd *Pseudomonadales*. Wrażliwość na zabiegi uprawowe (określoną istotnym spadkiem OTU na stanowisku K *versus* NK) wykazały również następujące bakteryjne rzędy: *Desulfuromonadales* i *Bdellovibrionales* (z *Deltaproteobacteria*), *Nitrosomonadales* (z *Betaproteobacteria*); bakteryjni reprezentanci *Holophagae* i subgrupy 22 (z *Acidobacteria*), *Anaerolineae* (z *Chloroflexi*), przedstawiciele rodziny *Cytophagaceae* (z *Bacteroidetes*) oraz rzędu *Flavobacteriales* (z *Bacteroidetes*), *Selenomonadales* i *Erysipelotrichales* (z *Firmicutes*) oraz bakterie z grupy OPB35 (z *Verrucomicrobia*).

Przeprowadzona analiza metagenomiczna [A7] pozwoliła również na zarekomendowanie indykatorów świadczących o oporności bakterii na rolnicze użytkowanie gleb (w tym przypadku notowano wzrost liczby OTU na stanowisku K *versus* NK). Metagenomy, które mogą być rekomendowane jako wskaźniki oporności na zabiegi uprawowe to przedstawiciele rzędów: *Legionellales* (z *Gammaproteobacteria*), *Desulfobacterales* (z *Deltaproteobacteria*), *Burkholderiales* (z *Betaproteobacteria*), *Sphingobacteriales* i *Paludibacter* (z *Bacteroidetes*), *Chlorobiales* i *Ignavibacteriales* (z *Chlorobi*), *Clostridiales* i *Bacillales* (z *Firmicutes*) oraz *Chthoniobacterales* (z *Verrucomicrobia*). Podobny trend zmian (wzrost OTU na stanowisku K) wykazali bakteryjni przedstawiciele *Actinobacteria* i *Thermoleophilia*, *Ktedonobacteria* (z *Chloroflexi*), *Planctomycetacia* i *Phycisphaerae* (z *Planctomycetes*).

Opisane powyżej różnice w strukturze bakterii między stanowiskiem K i NK znalazły odzwierciedlenie w różnorodności metabolicznej, wyznaczonej w systemie BIOLOG<sup>®</sup>, wykorzystującym zasadę tzw. „metabolicznego odcisku palca” (ang.

"*metabolic fingerprint*"). Bakterie wykazują bowiem zróżnicowanie w szybkości i intensywności asymilacji różnych substratów węglowych (Gryta i in. 2013). Analizy w systemie Biolog EcoPlate™ pozwoliły mi stwierdzić, że bakterie zasiedlające czarną ziemię (K) cechują się szybszym tempem degradacji źródeł węgla w porównaniu z mikroflorą bakteryjną ze stanowiska NK. Wykazałam, że spośród pięciu dostępnych na płytce Biolog źródeł węgla (węglowodanów, kwasów karboksylowych, aminokwasów, amin i amidów, polimerów) bakterie glebowe najbardziej preferowały aminokwasy, zaś najmniej chętnie metabolizowały węglowodany. Kolejność wykorzystania źródeł węgla była następująca: aminokwasy > kwasy karboksylowe > polimery > aminy i amidy > węglowodany. Przeprowadzone badania [A7] udowodniły, że nawet umiarkowane zabiegi rolnicze znajdują odzwierciedlenie w składzie konsorcjum bakterii i ich aktywności metabolicznej. Uzasadnione są zatem badania nakierowane na poszukiwanie nowych wskaźników metagenomicznych, świadczących, z jednej strony, o zmęczeniu gleb rolniczych, z drugiej zaś strony, wykazujących odporność na zabiegi uprawowe.

#### **Podsumowanie:**

W pracach A1–A7 włączonych do osiągnięcia naukowego potwierdziłam postawioną hipotezę badawczą, iż mikrobiom gleb użytkowanych rolniczo jest odmienny od mikrobiomu gleb nie poddawanych zabiegom uprawowym (naturalnych). Wykazałam, że działalność rolnicza jest zasadniczym czynnikiem silnie modyfikującym chemizm gleb i wpływającym na ich właściwości biologiczne.

Za najważniejsze osiągnięcia ww. prac uważam:

- Kompleksowe zbadanie, po raz pierwszy w Polsce, różnorodności taksonomicznej wspólnot bakterii gleb rolniczych i naturalnych z wykorzystaniem najnowszych narzędzi metagenomicznych, pozyskując tym samym dotąd nieosiągalną informację na temat ogromnej (97–99%) grupy tzw. żywych ale niehodowanych bakterii glebowych.
- Wykazanie, że konsekwencją różnic w chemizmie gleb rolniczych i nieuprawianych jest obniżenie ich właściwości biologicznych (aktywności enzymatycznej, liczebności bakterii), co świadczy o postępującym w glebach rolniczo użytkowanych procesie degradacji biologicznej i w konsekwencji ich zmęczeniu.

- Wykazanie, że najbardziej podatne na biologiczną degradację są: gleby płowe zerodowane (O:C 0,81) > rędziny brunatoziemne (O:C 1,27) > gleby płowe typowe (O:C 1,40) > gleby murszowe (O:C 1,53).
- Udokumentowanie mikrobiologicznego charakteru dehydrogenaz glebowych, ich ścisłej korelacji z ekstrahowanym z gleb DNA oraz wskazaniem, że stanowią czuły wskaźnik wrażliwy na rolnicze użytkowanie gleb i ich zmęczenie.
- Wykazanie wrażliwości grupy bakterii potencjalnie wiążących azot (PNF) wraz z rozpoznaniem ich struktury oraz bakterii amonifikacyjnych wraz z ich aktywnością wyrażoną tempem amonifikacji argininy na rolnicze użytkowanie gleb.
- Wyznaczenie wpływu najważniejszych parametrów środowiskowych (wilgotności, pH, Eh, TC, biogenych form N i P) na wspólnoty mikroorganizmów, wykazując, że ich oddziaływanie nierozzerwalnie łączy się ze sposobem użytkowania gleb i ich genezą.
- Zaproponowanie nowych wskaźników metagenomicznych świadczących o zmęczeniu gleb rolniczych, reprezentowanych przez: typ *Bacteroidetes* wraz z rzędem *Flavobacteriales* i rodzajem *Flavobacterium*; rodzaje bakterii: *Devosia*, *Methylobacterium* i *Phyllobacterium* (z grupy bakterii PNF); bakterie z rzędów: *Rickettsiales*, *Pseudomonadales*, *Desulfuromonadales*, *Bdellovibrionales*, *Selenomonadales*, *Erysipelotrichales*, *Nitrosomonadales*; bakterijni reprezentanci *Holophagae* i subgrupy 22; przedstawiciele rodziny *Cytophagaceae* oraz bakterie z grupy OPB35.
- Zaproponowanie nowych wskaźników metagenomicznych, świadczących o oporności bakterii na zabiegi uprawowe, reprezentowanych przez: rząd *Burkholderiales* wraz z rodzajami: *Burkholderia*, *Cupriavidus* i *Microvirga* (z grupy bakterii PNF); *Legionellales*, *Sphingobacterales*, *Paludibacter*, *Chlorobiales*, *Ignavibacteriales*, *Clostridiales*, *Desulfobacterales*, *Bacillales*, *Chthoniobacterales*, *Actinobacteria*, *Thermoleophilia*, *Ktedonobacteria*, *Planctomycetacia* i *Phycisphaerae*.

## LITERATURA

Badura L. 2006. Rozważania nad rolą mikroorganizmów w glebach. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu 546: 13–23.

- Bender S.F., Wagg C., van der Heijden M.G.A. 2016. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in Ecology & Evolution* 31(6): 440–452.
- Church M.J. 2008. Resource control of bacterial dynamics in the sea, in: *Microbial Ecology of the Oceans*, 2<sup>nd</sup> Ed, D. L. Kirchman (Hoboken, NJ: Wiley & Sons), 335–382.
- Gliński J., Ostrowski J., Stępniewska Z., Stępniewski W. 1991. Bank próbek glebowych reprezentujących gleby mineralne Polski. *Problemy Agrofizyki* 66: 1–61.
- Gryta A., Frąc M., Oszust K., Bilińska N. 2013. Wykorzystanie systemu Biolog EcoPlate do monitorowania stanu ekotoksykologicznego osadów ściekowych. *Acta Agrophysica* 20(3): 385–397.
- Stevens H., Stubner M., Simon M., Brinkhoff T., 2005. Phylogeny of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiology and Ecology* 54, 351–365.
- Thomas F., Hehemann J.H., Rebuffet E., Czjzek M., Michel G. 2011. Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection. *Frontiers in Microbiology* 2 (93), 1–16.
- Tscharntke T., Clough Y., Wanger T.C., Jackson L., Motzke I., Perfecto I., Vandermeer J., Whitbread A. 2012. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biological Conservation* 151: 53–59.
- Włodarczyk T. 2000. Some aspects of dehydrogenase activity in soils. *International Agrophysics* 14(3): 365–376.
- Zhang H, Wang R, Chen S, Qi G, He Z, Zhao X. 2017. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. *Scientific Reports* 7: 39911.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora**

W latach 1996–2001 studiowałam Ochronę Środowiska na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim Jana Pawła II. Pracę magisterską pt: „Wpływ wilgotności gleb na gęstość strumienia tlenu” wykonałam w Instytucie Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie pod kierunkiem dr Andrzeja Bieganowskiego i śp. prof. dr hab. Ryszarda Walczaka – w roli konsultanta merytorycznego. Efektem realizacji pracy magisterskiej była moja pierwsza publikacja naukowa przygotowana wspólnie z promotorem pracy dr Andrzejem Bieganowskim [**Zał. 4: A33**], w której określono wartości wilgotności krytycznej w glebie płowej i ilastej przy której następuje zerwanie błonki wodnej na powierzchni elektrody platynowej, co stanowi czynnik limitujący aplikacyjność metod woltamperometrycznych.

Po ukończeniu studiów i uzyskaniu tytułu magistra ochrony środowiska w 2001 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta naukowo–dydaktycznego w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska kierowanej przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską. Początkowo kontynuowałam tematykę badawczą związaną z wykonaną pracą

magisterską, a więc rozpoznaniem efektu powodowanego przez zróżnicowany potencjał wodny na dostępność tlenu dla korzeni roślin i mikroorganizmów, wyrażoną współczynnikiem ODR (ang. *Oxygen Diffusion Rate*). Wyniki moich badań opublikowałam w pracach [Zał. 4: A35, A36, A41] rozpoznając optymalną strefę natlenienia i uwilgotnienia dla korzeni roślin w różnych typach gleb oraz zaprezentowałam je na międzynarodowej konferencji we Freiburgu [Zał. 4: IIIB3].

Równolegle włączałam się w badania zapoczątkowane już wcześniej w Katedrze przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską, związane z odpowiedzią aktywności enzymatycznej (dehydrogenazowej, fosfatazowej i katalazowej) na zanieczyszczenie gleb związkami chromu (III i VI) oraz pestycydami [Zał. 4: A8, A10, A32, A37–A39, A42]. Wykazałam inhibicję aktywności enzymatycznej pod wpływem związków Cr. Inhibicja ta była silniejsza w przypadku Cr (III), powszechnie uważanego za mniej szkodliwą formę aniżeli kancerogeny Cr (VI), jednak w środowisku glebowym to Cr (III) jest łatwiej akumulowany i z reguły występuje w wyższych stężeniach aniżeli Cr (VI). Wyniki te zaprezentowałam również w formie referatu ustnego na Ogólnopolskiej Konferencji w Polańczyku [Zał. 4: IIK1], jak również w formie posterów na konferencjach międzynarodowych na Węgrzech – w Debreczynie i Budapeszcie oraz we Włoszech – w Viterbo [Zał. 4: IIIB1, IIIB2, IIIB7]. Również pestycydy (fonofos i glifosat) skutkowały obniżeniem aktywności dehydrogenazowej o średnio 5–44% (fonofos) i 16–80% (glifosat). Tematykę tę zaprezentowałam na konferencji międzynarodowej we Lwowie [Zał. 4: IIIB4]. Badając wpływ pestycydów na emisję gazów cieplarnianych z gleb [Zał. 4: A8, A44], wykazałam wzrost emisji N<sub>2</sub>O i CO<sub>2</sub> w następstwie stosowania pestycydów w glebie torfowo–murszowej oraz madzie rzecznej.

Znajomość techniki Atomowej Spektrometrii Absorpcyjnej (ang. *Atomic Absorption Spectrometry*) pozwoliła mi na zajęcie się badaniami dotyczącymi wyznaczenia zawartości metali ciężkich w różnych próbach środowiskowych. Dzięki tej technice analitycznej określiłam zawartość chromu na poddanym rekultywacji terenie dawnego składowiska odpadów garbarskich w Sernikach k/Lubartowa [Zał. 4: A43], badając tym samym skuteczność zastosowanych zabiegów rekultywacyjnych, jak również wyznaczyłam zawartość metali ciężkich w zerodowanych glebach płowych, pochodzących z doliny rzeki Ciemięgi [Zał. 4: A9]. Wyniki uzyskanych badań zaprezentowałam też na międzynarodowym sympozjum w Kazimierzu Dolnym [Zał. 4: IIIB6].

Włączając się w inną tematykę Katedry realizowaną przez prof. dr hab. Riccardo Bennicelli, związaną z badaniami nad potencjałem paprotki wodnej *Azolla caroliniana* do usuwania metali ciężkich ze ścieków wyznaczałam ich zasobność w Pb i Cd (techniką FAAS, ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*), potwierdzając tym samym jej zdolności fitoremediacyjne. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach [Zał. 4: A31, A40].

Zdobyte doświadczenie w oznaczaniu aktywności enzymatycznej gleb jak również określaniu mikrodyfuzji tlenu (ODR) umożliwiło mi przygotowanie kilku podrzdziałów metodycznych do podręcznika pt. „Wybrane metody badań gleboznawczych, wydane dla studentów Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego KUL [Zał. 4: A34].

Efekt moich zainteresowań naukowych związanych z zagadnieniami aktywności enzymatycznej gleb oraz ich aeracją i potencjałem wodnym doprowadził do wyłonienia tematu pracy doktorskiej, w której skoncentrowałam się na udowodnieniu hipotezy, iż aktywność dehydrogenazowa (AD) mikroorganizmów glebowych może być zastosowana jako swoisty indykator zarówno niedoboru tlenu w glebie (hipoksja i anoksja glebowa), jak również powrotu do stanu normoksji, a więc optymalnego natlenienia. Autorem wspomnianych pojęć, opisujących stan aeracyjny w środowisku glebowym był promotor mojej pracy doktorskiej śp. prof. dr hab. Riccardo Bennicelli. Poprzez obserwacje zmian zachodzących w glebie w szerokim zakresie uwilgotnienia – od jej pełnej pojemności wodnej (pF 0), do punktu będącego miarą wody dostępnej dla korzeni roślin – pF 3,2, możliwe stało się rozpoznanie w obrębie zjawiska reoksydacji gleb. Badania tego typu w literaturze z reguły opisywano jako „odporność oksydoredukcyjną gleb”, jednakże bez włączenia udziału mikroorganizmów w tworzeniu tej odporności. Realizacja badań była możliwa dzięki uzyskaniu finansowania podjętego tematu przez MNiSW w ramach grantu promotorskiego (N 305 009 32/0514).

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

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam moje zainteresowania w zakresie badania procesu reoksydacji gleb i zmian jakie zjawisko to powoduje w ich właściwościach biologicznych. Wyniki uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej

opublikowałam w formie monografii naukowej [Zał. 4: A25] oraz zaprezentowałam na konferencjach międzynarodowych, m.in. w Wiedniu i Bari [Zał. 4: IIB8, IIB11].

Podczas procesu reoksydacji w naturalny sposób zmianie ulegają wartości parametrów glebowych, opisujących jej stan aeracyjny (potencjał oksydoredukcyjny – Eh, dostępność tlenu dla mikroorganizmów i korzeni roślin – ODR, porowatość powietrzna – Eg). Znajomość tych zmian pozostaje niezwykle istotna w aspekcie rozpatrywania stresów wodnych i ich skutków w środowisku glebowym, jak również w rozpoznaniu optymalnych warunków wodno – aeracyjnych wobec mikroflory glebowej [Zał. 4: A16]. Efektem moich badań nad AD, liczebnością bakterii hodowlanych (wyznaczaną początkowo z zastosowaniem hodowli płytkowych) oraz zjawiskiem reoksydacji stało się zebranie wyników połączone z analizą danych literaturowych w formie dwóch rozdziałów w recenzowanych książkach [Zał. 4: A27, A28], w postaci publikacji naukowej [Zał. 4: A12] oraz referatu wygłoszonego na międzynarodowej konferencji w Lublinie [Zał. 4: IIK4].

Dokładny pomiar AD jest też niezwykle istotny z punktu widzenia biotechnologii, gdyż test z wykorzystaniem sztucznego substratu chlorku 2,3,5–trifenylotetrazoliowego (TTC) stanowi szybki i adekwatny wyznacznik ogólnej aktywności mikrobiologicznej gleb, stanowiących potencjalne źródło mikroorganizmów, mogących znaleźć biotechnologiczne zastosowanie. Podczas wykonywania testu na AD, który potwierdza obecność żywych mikroorganizmów w badanym środowisku, modyfikujące działanie na wynik oznaczenia może wywierać zjawisko sorpcji zarówno substratu – TTC (2,3,5–chlorku trifenylotetrazoliowego), jak i produktu reakcji – TPF (1,3,5–trifenylformazanu) na koloidach glebowych. Wspomniane zagadnienie wciąż nie zostało dokładnie rozpoznane w literaturze. Podobnie jak nadal niewiele wiadomo na temat optymalnej dawki TTC, która warunkuje taką jego koncentrację, by związek mógł wnikać do wewnątrzkomórkowych struktur mikroorganizmów, wykazujących aktywność dehydrogenazową a jednocześnie by nie działał jeszcze toksycznie na mikroorganizmy i nie powodował zbędnych zakłóceń podczas analiz. Dlatego też nasuwa się zalecenie, by nie stosować jednego stężenia TTC do wszystkich rodzajów gleb. Podjęłam więc próbę oszacowania poziomu redukcji TTC, zachodzącej na drodze chemicznej, która może znacznie zakłócić wyniki biologicznego testu na aktywność mikrobiologiczną środowiska glebowego. Na przykładzie sześciu typów gleb: czarnej ziemi, gleby brunatnej, biellicowej, torfowej, lessowej oraz mady rzecznej wyznaczyłam



optymalne dawki substratu (TTC) [Zał. 4: A53]. Eksperymentalnie wykazałam, że AD wyznaczana w warunkach laboratoryjnych jest w ponad 93% pochodzenia biologicznego, tworzą ją żywe mikroorganizmy i stanowi ona rzetelny test na wykazanie ich obecności w materiale glebowym. Zakres zaś chemicznej redukcji substratu (TTC) wynosi ok. 2,3–7,6% i jest uzależniony od typu gleby.

Równoległe z wyznaczaniem AD, analizowałam aktywność respiracyjną (AR) mikroorganizmów glebowych, która stanowi wrażliwy indykator stresów środowiskowych (w tym stresu wodnego). Dlatego też wyznaczyłam jej zmiany zachodzące w następstwie zjawiska reoksydacji w trzech profilach glebowych: czarnoziemie, glebie płowej i torfowo-murszowej [Zał. 4: A14]. Wykazałam maksimum aeracji w warstwach powierzchniowych gleb (0–30 cm) i ich spadek o ok. 65–98% w warstwach podpowierzchniowych (30–60 cm) i podglebiu (60–100 cm). Potwierdziłam też bezpośredni wpływ parametrów aeracyjnych (pF, ODR, Eh, Eg) na AR.

Ponadto w ramach badań nad zjawiskiem reoksydacji zajmowałam się rozpoznaniem struktury bakterii zasiedlających gleby przechowywane w stanie powietrznie suchym (19 lat), które następnie nawodniono i doprowadzono do wilgotności w zakresie pF 0 – pF 3,2 [Zał. 4: A17]. Stwierdziłam odrodzenie się życia biologicznego i aktywację bakterii ze stanu uśpiania. Molekularna identyfikacja bakterii wskazała, że w pierwszej kolejności uaktywniają się rodzaje bakterii, takie jak: *Pseudomonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira* i *Delftia* (z klasy  $\beta$ -*Proteobacteria*) oraz *Clostridium* i *Ruminococcus* (z *Firmicutes*).

Ważnym aspektem moich badań były też analizy molekularne bakterii glebowych poprzedzone trudnym etapem efektywnego wyekstrahowania DNA z gleby. Gleba, ze względu na swoją heterogenność stanowi jednocześnie najbardziej fascynujące (ogromna bioróżnorodność) ale też najtrudniejsze (obecność zanieczyszczeń i inhibitorów) środowisko do badań. Początkowo efektywna izolacja glebowego DNA był praktycznie niemożliwa do przeprowadzenia. Otrzymywany izolat glebowy zawierał bowiem zbyt wiele zanieczyszczeń, co uniemożliwiało poprawne przeprowadzenie reakcji PCR. Przegląd technik molekularnych, dedykowanych analizom prób glebowych, jak również sposobów izolacji glebowego DNA, zawierający również moje doświadczenia i obserwacje laboratoryjne zawarłam w monografii

anglojęzycznej [Zał. 4: A26] oraz w polskojęzycznym rozdziale w monografii [Zał. 4: A29].

Moje zainteresowanie naukowe objęło również aspekt współzależności wyizolowanego z gleby DNA z innymi jej cechami biologicznymi: biomasą mikroorganizmów [Zał. 4: A45], aktywnością dehydrogenazową i cechami fizykochemicznymi (pF, ODR, Eh, TOC, Mg, Ca) [Zał. 4: A46] oraz obecnością zanieczyszczeń w postaci metali ciężkich [Zał. 4: A50], czy sposobem użytkowania gleby [Zał. 4: A48]. Potwierdziłam bliską, wprost proporcjonalną współzależność DNA zarówno z biomasą mikroorganizmów (BM) glebowych, jak i ich AD. W celu wykazania zależności stężenia izolowanego bezpośrednio z gleby DNA od parametrów fizykochemicznych przeanalizowałam profil (0–80 cm) gleby lessowej, co pozwoliło jednocześnie rozpoznać rozmieszczenie DNA na różnych głębokościach profilu glebowego. Zawartość glebowego DNA malała wraz ze wzrostem głębokości (o ok. 63%), analogicznie do przestrzennej stratyfikacji mikroorganizmów w glebach i ich preferencji do zasiedlania warstw powierzchniowych bogatych w substrat węglowy. Tematyka ta została też przeze mnie zaprezentowana w formie referatów podczas międzynarodowych konferencji [Zał. 4: IIK2, IIK3, IIK5].

Kontynuowałam także tematykę związaną z wyznaczaniem zawartości metali ciężkich techniką AAS. W ramach współpracy z Katedrą Biologii Komórki Instytutu Ochrony Środowiska KUL (obecnie Pracownia Stresu Oksydacyjnego Interdyscyplinarnego Centrum Badań Naukowych) wyznaczałam zawartość wanadu i chromu we krwi szczurów metodą GFAAS (ang. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*), co zaowocowało wspólną publikacją [Zał. 4: A11] oraz przyczyniło się do rozpoznania wpływu wspomnianych metali na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Wykazałam też utrzymujące się stężenie Cr w glebach, wodach i roślinach pobranych z terenu nie eksploatowanego już od wielu lat składowiska odpadów garbarskich, co wskazało na niedostateczną skuteczność przeprowadzonej rekultywacji terenu [Zał. 4: A47] oraz Mn w glebach torfowych [Zał. 4: A13]. Określiłam również wpływ metali ciężkich (Pb, Cd, Zn, Cr, Fe, Cu) na aktywność biologiczną i zawartość DNA w glebie pochodzącej z otoczenia huty metali Szopienice na Śląsku [Zał. 4: A23, A50], identyfikując również bakterie metalofilne, reprezentujące klasę *β-Proteobacteria* oraz rodzaje m.in. *Bortadella* i *Acidovorax* (znane z tolerancji Cd); *Rhodoferrax* (redukująca Fe); *Polaromonas*, *Comamonas*,

*Thaurea, Alcaligenes, Azovibrio, Chitinomonas*. Wyniki te zaprezentowałam podczas sesji posterowej na międzynarodowej konferencji w Puławach [Zał. 4: IIB16]. Analizy systemem Biolog Eco Plate umożliwiły rozpoznanie różnic w aktywności metabolicznej bakterii metalofilnych, zasiedlających gleby skażone metalami ciężkimi [Zał. 4: A23].

Zaangażowałam się także w główną tematykę badawczą realizowaną w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej, związaną z określaniem aktywności metanotroficznej i identyfikacją bakterii metanotroficznych zasiedlających skały przywęglowe, jak również skały pobrane z Kopalni Soli w Wieliczce. Włączając się w prace identyfikacyjne metanotrofów wykonałam analizę FISH (*ang. Fluorescence in Situ Hybridization*) z prób skał pochodzących z kopalni Jastrzębie-Moszczenica [Zał. 4: A15] oraz scharakteryzowałam parametry fizykochemiczne materiału skalnego z Górnosląskiego i Lubelskiego Zagłębia Węglowego [Zał. 4: A18] oraz z Kopalni Soli w Wieliczce [Zał. 4: A22]. Uzyskane wyniki zaprezentowałam na międzynarodowej konferencji mikrobiologicznej w Maastricht (Holandia) [Zał. 4: IIB27]. Prowadząc hodowle bakterii metanotroficznych na dedykowanym im podłożu NMS (*ang. Nitrate Mineral Salt*) określiłam jego zasobność w składniki pokarmowe oraz przeanalizowałam preferencje metanotrofów do pobierania tych składników z podłoża [Zał. 4: A21, A30].

Nawiązanie współpracy z dr hab. Mieczysławem Błaszczkiem z Samodzielnego Zakładu Biologii Mikroorganizmów SGGW w Warszawie zaowocowało przygotowaniem projektu naukowego SONATA, związanego z rozpoznanem różnic w mikrobiomie gleb użytkowanych rolniczo z mikrobiomem gleb nieuprawianych. Na podstawie otrzymanych w toku realizacji projektu wyników (wyłączając prace omówione jako cykl publikacji habilitacyjnych), potwierdziłam biologiczną degradację gleb rolniczo użytkowanych [Zał. 4: A49], jak również zasugerowałam, że rolę biologicznego wskaźnika wrażliwości gleb na zabiegi uprawowe, a jednocześnie wskazującego na tzw. mikrobiologiczne „*hot spot*”, może pełnić forma węgla łatwoodegradowalnego (*ang. Easily Degradable Carbon – EDC*) [Zał. 4: A24]. Wpływ rośliny uprawowej (pszenica, owies) na aktywność biologiczną gleb przedstawiłam w odrębnej pracy [Zał. 4: A52], wykazując że uprawa pszenicy korzystniej wpływa na utrzymanie właściwości biologicznych aniżeli uprawa owsa, co potwierdziły wyższe wskaźniki: AD, AR, MB i DNA odnotowane na stanowiskach gdzie uprawiano pszenicę. Ponadto stwierdziłam, że uprawa pszenicy w porównaniu z uprawą owsa

sprzyja utrzymywaniu się w glebach wyższych wartości odczynu i wyższej zasobności w węgiel i pierwiastki biogenne (N i P). Tematyka ta przedstawiona została przeze mnie na międzynarodowym kongresie mikrobiologicznym, odbywającym się w Maastricht w Holandii [Zał. 4: **IIIB25**]. Przeanalizowałam także wpływ rolniczego użytkowania gleb na ich zasobność w fosfor [Zał. 4: **A51**], który stymuluje ukorzenianie się roślin, zwiększa aktywność biologiczną gleby, powodując lepsze wykorzystanie innych składników pokarmowych. Zwiększa też mrozoodporność a także odporność roślin na niedobory wody i na choroby.

Kolejny temat związany z biotechnologicznym wykorzystaniem gleb, który wzbudził moje zainteresowanie naukowe obejmował zastosowanie zasiedlających glebę mikroorganizmów do konstrukcji tzw. Mikrobiologicznych Ogniw Paliwowych (MOP), generujących bioenergię. Dodając do gleby różne źródła węgla (glukozę, słomę) oraz modyfikując wilgotność gleb (pełna pojemność wodna, zalanie) skonstruowałam cztery różne kombinacje MOP [Zał. 4: **A19**]. Zaobserwowałam, że różnice w pozyskaniu bioenergii zależą zarówno od zastosowanego substratu, jak i poziomu uwilgotnienia gleby. Wykonanie obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) pozwoliło na uwidocznienie zasiedlających MOP mikroorganizmów i wykazało istnienie swoistej „siatki połączeń” między nimi, która umożliwia transport elektronów. Opublikowanie tej pracy zaowocowało nawiązaniem współpracy z prof. Claudio Avignone Rossa z Uniwersytetu w Survey w Wielkiej Brytanii, który włączył mnie do tworzonego konsorcjum naukowego na potrzeby projektu pt. „*Bio-electrochemical systems for product recovery from spent solid coffee waste*” i powierzył kierownictwo naukowe wyodrębnionego zadania badawczego [Zał. 4: **IIIA2**].

Nowy obszar moich zainteresowań stanowi także zmienność mikroflory autochtonicznej, zasiedlającej gleby zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi (benzyną, olejem napędowym, olejami samochodowymi). Wstępne rozpoznanie struktury bakterii przeprowadzone po inkubacji gleb z wprowadzonymi do nich substancjami ropopochodnymi wykazało obecność licznej mikroflory, zdolnej do wykorzystania zanieczyszczeń jako źródła węgla [Zał. 4: **A20**]. Struktura bakterii determinowana była rodzajem substancji ropopochodnej. W kombinacjach zanieczyszczonych benzyną bezołowiową i olejem napędowym (dieslem) dominowały bakterie z rodzaju *Rhodococcus*. Kombinacja z dodatkiem fabrycznie nowego oleju samochodowego zasiedlona była przez bakterie z rodzajów: *Micrococcus* i

*Mesorhizobium*, podczas gdy w kombinacji z dodatkiem oleju przepracowanego (po przebiegu 10 000 km) stwierdziłam obecność rodzajów: *Bacillus* i *Paenibacillus*.

W trakcie mojej pracy naukowej podjęłam współpracę z Zakładem Badań Systemu Gleba–Roślina oraz Zakładem Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie; Zakładem Mikrobiologii Rolniczej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach; Katedrą Nauk o Środowisku Glebowym oraz Samodzielnym Zakładem Biologii Mikroorganizmów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; Zakładem Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie oraz Zakładem Mikrobiologii Uniwersytetu Warmińsko–Mazurskiego w Olsztynie [szczegóły **Zał. 4**].

Byłam kierownikiem 1 projektu i wykonawcą w 5 projektach naukowych [**Zał. 4: II I**]. Potwierdzeniem aktywności naukowej jest też mój czynny udział w licznych (43) konferencjach naukowych, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych, gdzie prezentowałam wyniki badań w formie referatów i posterów [szczegóły **Zał. 4**]. Jestem współorganizatorem 2 Sympozjów Naukowych pt. "Metagenomy różnych środowisk", zaś w czerwcu 2018 organizuję III Sympozjum z tego cyklu na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim Jana Pawła II. Współorganizowałam konferencję naukową pt. „Biotechnologia - energia jutra” (19–20.10.2017). Byłam też włączona do dwóch Komitetów Naukowych [szczegóły **Zał. 4**].

Będąc asystentem na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Instytutu Ochrony Środowiska w latach 2001–2009 opracowywałam i prowadziłam szereg ćwiczeń i wykładów dla studentów Ochrony Środowiska [szczegóły **Zał. 4**]. Od 2009 r. prowadzę zajęcia (wykłady i ćwiczenia) dla studentów Biotechnologii (I i II stopnia) w nowo utworzonym Instytucie Biotechnologii na Wydziale Biologii i Nauk o Środowisku KUL [szczegóły **Zał. 4**].

Jestem promotorem 4 prac licencjackich, wykonanych na seminarium i pracowni dyplomowej z Bioprocusów środowiskowych prowadzonej przeze mnie w latach 2011/12 i 2012/13. Byłam opiekunem studentów Biotechnologii (lata 2011–2016), obecnie (od bieżącego roku akademickiego 2017/18) jestem opiekunem I roku studentów Biotechnologii w języku angielskim.

Pełniłam funkcję recenzenta w 19 pracach licencjackich oraz 17 magisterskich. Zrecenzowałam ponadto 72 publikacje naukowe, w tym 31 z listy A czasopism MNiSW, m.in. International Journal of Plant and Soil Sciences, Journal of Agricultural Sciences and Technology, Polish Journal of Microbiology, Frontiers in Microbiology, Ecological Engineering, Applied Microbiology and Biotechnology, Letters in Applied Microbiology, Biology and Fertility of Soils, Water Air and Soil Pollution [szczegóły **Zał. 4**].

Oprócz działalności naukowo-dydaktycznej angażowałam się również w prace na rzecz Uniwersytetu i Wydziału. W latach 2013–2016 uczestniczyłam w pracach Uniwersyteckiej Komisji Dyscyplinarnej ds. Studentów i Doktorantów, zaś w roku akademickim 2016/17 byłam przedstawicielem Wydziału do Uniwersyteckiej Komisji ds. Jakości Kształcenia. Jestem też członkiem Wydziałowej Komisji ds. Jakości Kształcenia a także brałam czynny udział w opracowywaniu efektów kształcenia oraz programu studiów Biotechnologii I i II stopnia w ramach uczestnictwa w pracach Komisji ds. Programu i Efektów Kształcenia. Jestem także ekspertem w Zespole Opiniodawczo-Doradczym Rektora do spraw zwiększania skuteczności w pozyskiwaniu grantów naukowo-badawczych [szczegóły **Zał. 4**].

Od 2011 roku biorę czynny udział w Lubelskim Festiwalu Nauki, łącznie zrealizowałam 18 projektów, jak również włączam się (od 2014 roku) w Noc Biologów, gdzie przedstawiłam 14 projektów. W latach 2015–16 prowadziłam też zajęcia dla dzieci w ramach Uniwersytetu Otwartego KUL, gdzie zaprezentowałam 5 pokazów połączonych z wykładami multimedialnymi. W ramach promocji kierunku Biotechnologia w 2011 roku wzięłam udział w nagraniu programu pt. "Kolory Biotechnologii", realizowanym przez TVP3 Lublin [szczegóły **Zał. 4**].

Należę do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Polskiego Towarzystwa Gleboznawczego (pełnię funkcję członka zarządu oddziału lubelskiego) oraz Międzynarodowej Unii Towarzystw Gleboznawczych.

## 6. Podsumowanie dorobku i dane bibliometryczne

### 6.1. Publikacje i konferencje

Typ publikacji	1. Przed doktoratem			2. Po doktoracie				Suma (1+2)			
	Liczba	IF <sub>rok publikacji</sub>	Punkty MNiSW	Liczba	IF <sub>rok publikacji</sub>	IF 5 letni	Punkty MNiSW	Liczba	IF <sub>rok publikacji</sub>	IF 5 letni	Punkty MNiSW
Recenzowane czasopisma z bazy JCR <sup>1</sup>	3	2,754	22	22	25,866	27,639	431	25	28,620	30,515	453
Recenzowane czasopisma spoza listy JCR <sup>2,3</sup>	11		52	9	4,465 <sup>3</sup>		56	20	4,465 <sup>3</sup>		108
Rozdziały w książkach	1		5	2			14	3			19
Monografie				2			50	2			50
Rozdziały w monografii	2		10	1			5	3			15
<b>RAZEM</b>	<b>17</b>	<b>2,754</b>	<b>89</b>	<b>36</b>	<b>25,866</b>	<b>27,639</b>	<b>531</b>	<b>53</b>	<b>28,620</b>	<b>30,515</b>	<b>645</b>
IF (WoS+Google based)					30,331			33,085			
Konferencje międzynarodowe	8			17				25			
Konferencje krajowe	2			16				18			
<b>RAZEM</b>	<b>10</b>			<b>33</b>				<b>43</b>			

<sup>1</sup> – czasopisma z listy A, <sup>2</sup> – czasopisma z listy B, <sup>3</sup> – czasopisma spoza listy MNiSW publikujące IF (Google-based) na swoich stronach internetowych (szczegóły znajdują się w Załączniku nr 4)

### 6.2. Cytowania\* i indeks Hirscha

	Web of Science	Scopus	Google Scholar	Research Gate
Ilość cytowań*	125/114 <sup>#</sup>	171	358	314
Indeks Hirscha**	6	7	10	8 <sup>#</sup>

\* ilość cytowań dla każdej publikacji przedstawiona jest w Załączniku nr 4

<sup>#</sup> bez autocytowań

\*\* stan na dzień 13.03.2018

Agnieszka Wolińska