

AUTOREFERAT
w postępowaniu habilitacyjnym
w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie ochrona i kształtowanie środowiska

dr Agata Borowik

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Katedra Mikrobiologii

Olsztyn, 2018 r.

Spis treści

1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
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 i tytule w zakresie sztuki ..	4
4a) Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	4
4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	21
5a) Przed doktoratem.....	22
5b) Po doktoracie.....	25
5c) Podsumowanie	36
5c1. Najważniejsze pozostałe osiągnięcia naukowe, niewchodzące w skład cyklu prac przedstawionych, jako osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym.....	36
5c2. Informacje naukometryczne	38

Agata Borowik
Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Katedra Mikrobiologii
Pl. Łódzki 3
10-727 Olsztyn

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: **Agata Borowik**

Miejsce pracy: Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii.

Dane kontaktowe: tel. 89 523 35 53

e-mail: agata.borowik@uwm.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.

09.07.2007 uzyskanie **tytułu magistra**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk Technicznych, Kierunek: Wychowanie techniczne (5-letnie studia magisterskie).

17.02.2011 uzyskanie stopnia naukowego **doktora nauk rolniczych w zakresie kształtowania środowiska**, specjalność: **mikrobiologia środowiskowa**. Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *”Studia nad czynnikami kształtującymi aktywność biologiczną gleby”*.

Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Wyszowska

Recenzenci: prof. dr hab. Elżbieta Jolanta Bielińska
dr hab. Zofia Filipkowska, prof. UWM

01.10.2010 r. - 30.03.2011 r. – sześciomiesięczny kurs *„Doskonalenie pedagogiczne nauczycieli akademickich”*, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk Społecznych.

01.04.2013 r. - 30.04.2013 r. - staż zawodowy w Przedsiębiorstwie Wodociągów i Kanalizacji Sp. z o.o. w Olsztynie.

20.02.2017 r. - 24.03.2017 r. - staż naukowy w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzyńskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Zakładu Badań Systemu Gleba-Roślina.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 1.09. - 30.10.2005 r. – umowa zlecenie, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii.
- 10.07. - 3.09.2006 r. – umowa zlecenie, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii.
- 1.10.2006 r. - 30.08.2007 r. – **technik**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii.
- 1.09.2007 r. - 31.08.2011 r. – **technolog**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii.
- 1.09.2011 r. - do chwili obecnej – **asystent, pracownik naukowo-dydaktyczny**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Mikrobiologii.

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 i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.):

4a) Tytuł osiągnięcia naukowego – cyklu publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Ocena oddziaływania zanieczyszczenia olejem napędowym na mikrobiologiczne i biochemiczne właściwości gleby oraz możliwości przywracania jej do stanu równowagi”

4b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

Jako podstawę osiągnięcia naukowego wybrano 6 oryginalnych publikacji naukowych powiązanych ze sobą tematycznie, których sumaryczny *Impact Factor*, według roku publikacji, wynosi **10,292**, a liczba punktów według wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - **135** (zgodnie z rokiem wydania publikacji). Są to następujące publikacje:

- B.1.** Borowik A. (80%), Wyszowska J., Wyszowski M. 2017. *Resistance of aerobic microorganisms and soil enzyme response to soil contamination with Ekodiesel Ultra fuel*. Environmental Science and Pollution Research. 24: 24346-24363.

IF₂₀₁₇ = 2,800

30 pkt MNiSW (wg zał. z dnia 09.12.2016)

- B.2.** Borowik A. (80%), Wyszowska J., Oszust K. 2018. *Changes in the functional diversity of bacterial communities in soil contaminated with diesel oil*. Journal of Elementology. 23(3): 1099-1117.

IF₂₀₁₇ = 0,684 15 pkt MNiSW (wg zał. z dnia 09.12.2016)

- B.3.** Borowik A. (80%), Wyszowska J., Oszust K. 2017. *Functional diversity of fungal communities in soil contaminated with diesel oil*. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-11.

IF₂₀₁₇ = 4,019 35 pkt MNiSW (wg zał. z dnia 09.12.2016)

- B.4.** Borowik A. (90%), Wyszowska J. 2018. *Response of Avena sativa L. and the soil microbiota to the contamination of soil with shell diesel oil*. *Plant Soil and Environment*. 64: 102-107.

IF₂₀₁₇ = 1,421 25 pkt MNiSW (wg zał. z dnia 09.12.2016)

- B.5.** Borowik A. (90%), Wyszowska J. 2018. *Remediation of soil contaminated with diesel oil*. *Journal of Elementology*. 23: 767-788.

IF₂₀₁₇ = 0,684 15 pkt MNiSW (wg zał. z dnia 09.12.2016)

- B.6.** Borowik A. (90%), Wyszowska J. 2018. *Bioaugmentation of soil contaminated with diesel oil*. *Journal of Elementology*. 23(4): 1161-1178.

IF₂₀₁₇ = 0,684 15 pkt MNiSW (wg zał. z dnia 09.12.2016)

Niezależnie od powyższego zestawienia, wykaz i kopie cyklu publikacji powiązanych ze sobą tematycznie, stanowiące osiągnięcie naukowe oraz oświadczenia współautorów i moje, określające wkład w powstanie tych publikacji, zamieszczono w Załączniku 5.

Wymienione powyżej prace wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego omówiono poniżej (pkt. 4c), zgodnie z nadaną im numeracją [B.1 - B.6]. Cytowane w tekście piśmiennictwo zamieszczone zostało na końcu punktu 4c.

4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Szeroko rozpowszechniona eksploatacja i zużycie ropy naftowej zwracają uwagę opinii publicznej na losy węglowodorów produktów ropopochodnych w środowisku, które mogą w sposób niekontrolowany przedostawać się do wód i gleby. W ciągu jednego roku do środowiska przedostaje się od 0,10 do 0,25% wykorzystywanych produktów naftowych

(GARCIA-LOR i in. 2012). Według INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (2016) w pierwszym kwartale 2016 r., światowe zapotrzebowanie na ropę naftową w ciągu doby wyniosło 95 mln baryłek. World Energy Outlook UE (WEO 2017) przewiduje, że do 2030 roku wzrośnie zapotrzebowanie na ropę o 3,4%, a tym samym bardzo intensywnie wzrośnie zużycie paliw płynnych, a to niesie za sobą potencjalne zagrożenia dla środowiska naturalnego. Również Komisja Europejska, Komitet Ekonomiczno-Społeczny oraz Komitet Regionów (COM 2006) dużą uwagę zwracają na WWA, jako związki powodujące degradację gleb. W Europie spośród wszystkich siedlisk zanieczyszczonych aż 45% stanowią tereny, które były poddane presji węglowodorów ropopochodnych (MASY i in. 2016). W związku z tym zanieczyszczenie środowiska produktami przetwórstwa ropy naftowej jest obecnie przedmiotem troski, zarówno w krajach uprzemysłowionych, jak i rozwijających się (GLOBAL ENVIRONMENT OUTLOOK GEO₅).

Produkty ropopochodne stanowią mieszaninę węglowodorów o niskiej biodostępności. Te organiczne związki są uznawane często za potencjalnie rakotwórcze i mutagenne. Są one toksyczne i niebezpieczne dla komponentów środowiska przyrodniczego, ze szczególnym uwzględnieniem gleby, która jest głównym rezerwuarem ich gromadzenia (SOUZA i in. 2014; COVINO i in. 2016; MARCHAND i in. 2017). Ich duży potencjał do migracji i rozprzestrzeniania się w środowisku zaobserwowała KHALILOVA (2015). Produkty ropopochodne mogą prowadzić do stopniowej degradacji gleb w wielu rejonach świata (ALBERT i in. 2011), a niekiedy do trwałego zniszczenia gleby, utraty jej żyzności i zaniku szaty roślinnej. Gleba zanieczyszczona węglowodorami traci swoją strukturę, zaburzeniu ulegają warunki powietrzno-wodne, właściwości chemiczne i fizyczne (KUCHARSKI i JASTRZĘBSKA 2005, KUPPUSAMY i in. 2017) oraz zmniejsza się różnorodność biologiczna takiej gleby (SOUZA i in. 2014; NWAICHI i in. 2015; GLOBAL ENVIRONMENT OUTLOOK GEO₅).

Ścisły związek ze strukturą i funkcją gleby mają procesy mineralizacji zanieczyszczeń organicznych. Prawidłową strukturę gleby i jej żyzność, warunkuje między innymi aktywność mikrobiologiczna. Wszelkie zmiany właściwości gleby mogą przyczyniać się do zmian liczebności, różnorodności składu gatunkowego, różnorodności funkcjonalnej i genetycznej oraz aktywności enzymatycznej gleby. Niezmiernie ważne jest zatem porównywanie i rozpoznawanie składu zespołów mikroorganizmów, ich funkcjonalnej różnorodności, zmian aktywności enzymów (ADAM i in. 2017; NIEPCERON i in. 2013), jak i składu chemicznego roślin oraz właściwości chemicznych i fizykochemicznych gleby (KUPPUSAMY i in. 2017). Zmiany żyzności i struktury gleb związane są także ze składem chemicznym substancji

ropopochodnych, który jest modyfikowany przez dodatki uszlachetniające, przeciwkorozyjne i bójcze, demulgujące oraz przeciw pienne. Wymienione dodatki mogą wzmacniać niekorzystne oddziaływanie produktów ropopochodnych na biocenozę mikrobiologiczną i w zależności od ich zawartości w paliwach mogą różnicować oddziaływanie poszczególnych rodzajów zanieczyszczeń ropopochodnych na funkcję gleby (COMBER i in. 2016; RAMKUMAR i KIRUBAKARAN 2016).

Usuwanie produktów ropopochodnych metodami mechanicznymi i chemicznymi wiąże się z wysokimi kosztami. Jedną z tańszych metod remediacji jest fitoremediacja. Układ rośliny – mikroorganizmy w glebach zanieczyszczonych, może już w strefie ryzosfery wykazywać zdolność degradacji substancji zanieczyszczających - ryzodegradacja. Zanieczyszczenia mogą być wytrącone lub zaadsorbowane na powierzchni korzeni - ryzofiltracja lub przemieszczane do różnych organów rośliny (LIU i in. 2012; LIU i in. 2014; MOUBASHER i in. 2015). W bioremediacji kluczową rolę odgrywają mikroorganizmy heterotroficzne biorące udział w transformacji organicznych zanieczyszczeń, dla których są one donorami elektronów i źródłem węgla (SHANAHAN 2004). Bioremediacja polega na wytwarzaniu energii w reakcji redoks w komórkach drobnoustrojów. Reakcje te obejmują oddychanie i inne funkcje biologiczne potrzebne do utrzymania i reprodukcji komórek. Aby mogły one sprawnie przebiegać w środowisku musi zachodzić pewna równowaga między donorami elektronów, akceptorami elektronów i zawartością składników odżywczych. W bioremediację mogą być zaangażowane różne typy akceptorów elektronów, np. tlen, azotany, mangan, żelazo (III), siarczany lub ditlenek węgla i ich odpowiednie potencjały redoks (ADAMS i in. 2015). Z powyższego wynika, że o efektywności bioremediacji będą decydowały właściwości fizyczne i chemiczne środowiska glebowego, skład zespołów mikroorganizmów oraz rodzaj i ilość zanieczyszczeń. W przypadku bioremediacji produktów ropopochodnych dochodzi jeszcze jedna komplikacja. Mianowicie, ten sam rodzaj paliwa, w zależności od producenta, może zawierać różną zawartość dodatków uszlachetniających, które mogą modyfikować wpływ poszczególnych produktów ropopochodnych na jakość gleby (COMBER i in. 2016; RAMKUMAR i KIRUBAKARAN 2016). Określenie skali oddziaływania produktów ropopochodnych na środowisko przyrodnicze jest wciąż trudne do zdefiniowania. Trudności wynikają nie tylko ze składu chemicznego paliw płynnych, ale również z faktu, że wiedza dotycząca różnorodności mikroorganizmów, zwłaszcza grzybów, występujących w środowiskach zanieczyszczonych, tymi produktami jest niepełna i fragmentaryczna (JIANG i in. 2016; MARCHAND i in. 2017). W takich glebach może dochodzić do zmiany proporcji między liczebnością drobnoustrojów szybko rosnących i drobnoustrojów wolno rosnących

(KUCHARSKI i JASTRZĘBSKA 2005; WYSZKOWSKA i KUCHARSKI 2005), a sukcesja drobnoustrojów jest warunkiem efektywnego oczyszczania gleb z produktów ropopochodnych. Tym bardziej, że WWA zawarte w produktach ropopochodnych mogą stanowić doskonale źródło energii dla niektórych drobnoustrojów (SUN i in. 2010).

Wiedza na temat losów produktów ropopochodnych w glebie ma ogromne znaczenie dla poprawnego gospodarowania zasobami środowiska naturalnego, szczególnie w dobie wzrastającego ich zużycia w Krajach Unii Europejskiej (MASY i in. 2016; MA i YOU 2016). Dlatego też bardzo ważna jest dokładna ocena zmian zachodzące w glebach poddanych presji tych substancji. Zatem konieczne są kompleksowe badania ujmujące zarówno mikrobiom, właściwości biochemiczne, chemiczne i fizykochemiczne gleby oraz plonowanie i skład chemiczny roślin. W badaniach własnych skupiono się na oddziaływaniu oleju napędowego na wymienione parametry. Bowiem właściwa ocena ryzyka gleb zanieczyszczonych jest niezbędna dla zrozumienia i zarządzania takimi ekosystemami (PINEDO i in. 2012). Ponadto rozpoznanie odpowiedzi metabolicznej gleb na zanieczyszczenie olejem napędowym może ułatwić ich biotechnologiczną remediację. Wybór metody remediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi należy rozpatrywać nie tylko pod względem ekonomicznym, ale również środowiskowym i to w ujęciu nie tylko lokalnym czy regionalnym, ale przede wszystkim globalnym. W ostatnich latach Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA 2017) zwraca uwagę na innowacyjne technologie remediacji środowisk zanieczyszczonych. Było to inspiracją do przeprowadzenia badań, opisanych w poszczególnych publikacjach [B.1 - B.6] powiązanych ze sobą tematycznie, będących podstawą osiągnięcia naukowego.

Hipoteza badawcza

W badaniach będących podstawą osiągnięcia naukowego założono, że:

- 1) mikrobiom gleby zanieczyszczonej olejem napędowym zmienia się, a zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów mogą decydować o efektywności usuwania WWA z gleby;
- 2) nawożenie węglem drzewnym oraz słomą stymuluje rozwój drobnoustrojów i aktywność enzymów glebowych;
- 3) skuteczność bioremediacji zależy od jej typu oraz od wprowadzonych do gleby sorbentów.

Powyższe hipotezy badawcze były weryfikowane w doświadczeniach laboratoryjnych oraz wegetacyjnych wazonowych.

Celem główny badań było określenie zmian w zespołach mikroorganizmów, interakcji między nimi, enzymami glebowymi, składem chemicznym gleby i roślin rosnących na glebie zanieczyszczonej olejem napędowym oraz wskazanie najbardziej efektywnej metody bioremediacji w przywracaniu równowagi biologicznej gleby zanieczyszczonej olejem napędowym.

Cel główny realizowano w oparciu o następujące cele pomocnicze:

- 1) rozpoznanie zależności między właściwościami fizyko-chemicznymi gleby zanieczyszczonej olejem napędowym a aktywnością enzymów i mikroorganizmami tlenowymi [B.1];
- 2) określenie różnorodności funkcjonalnej drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym [B.2; B.3];
- 3) ocena skuteczności bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym i wskazanie najbardziej efektywnej metody w usuwaniu węglowodorów tego produktu [B.4; B.5; B.6].

Metody badań

Badania przeprowadzono w hali wegetacyjnej w doświadczeniach wazonowych wegetacyjnych oraz w modelowych doświadczeniach laboratoryjnych. W glebie niezanieczyszczonej oraz zanieczyszczonej olejem napędowym określano:

- metodą rozcieńczeń liczebność bakterii: organotroficznych, oligotroficznych, oligotroficznych przetrwalnikujących, koptotroficznych, koptotroficznych przetrwalnikujących, immobilizujących azot, amonifikacyjnych, celulolitycznych, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* oraz promieniowców i grzybów;
- profil kataboliczny bakterii i grzybów przy użyciu MicroStation ID (semi automated system) firmy Biolog - wykorzystując płytki ECO Plate[®] z 31 źródłami węgla, natomiast grzybów FF Plates[®] z 95 źródłami węgla (<http://www.biolog.com>);
- metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF MS opartej na desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganiej wykorzystaniem matrycy oraz analizatora czasu przelotu jonów zidentyfikowano bakterie i grzyby glebowe;

- metodą 16S rRNA bakterie i porównywano je za pomocą bazy BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) z sekwencjami dostępnymi w GenBanku NCBI (National Center of Biotechnology Information);
- metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) techniką MiSeq (Illumina) - bakterie;
- aktywność dehydrogenaz (substrat TTC), katalazy (substrat H₂O₂), ureazy (substrat CO(NH₂)₂), fosfatazy kwaśnej i fosfatazy alkalicznej (substrat PNPNa), β-glukozydazy (substrat PNG) i arylosulfatazy (substrat PNS);
- właściwości fizykochemiczne gleby: pH_{KCl}, kwasowość hydrolityczną, sumę zasadowych kationów wymiennych, stopień wysycenia gleby zasadowymi kationami wymiennymi;
- właściwości chemiczne gleby: zawartość azotu całkowitego, węgla organicznego, przyswajalnego fosforu, potasu i magnezu;
- zawartość w glebie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych: naftalenu, fenantrenu, antracenu, fluorantenu, benzo(a)antracenu, chryzenu, benzo(a)fluorantenu, benzo(a)pirenu i benzo(ghi)perylenu oraz benzyn (C₆-C₁₂), oleju mineralnego (C₁₂-C₃₅) i lotnych węglowodorów aromatycznych (C₆-C₈) - na chromatografie gazowym Agilent 7890A sprzężonym ze spektrometrem mas Agilent 5975C wyposażonym w źródło jonów EI/CI;
- w materiale roślinnym, po mineralizacji w stężonym H₂SO₄ z perhydrolem - zawartość azotu ogółem metodą Kjeldahla, fosforu – metodą wanadowo-molibdenową, potasu, wapnia i sodu – metodą emisyjnej spektrometrii atomowej (ESA), a magnezu – metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej - ASA. Określono również zawartość Pb, Cd, Cr, Ni, Mn, Zn, Cu, Fe i Co metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS).

Do biostymulacji naturalnej mikrobioty glebowej zastosowano: słomę z jęczmienia jarego i węgiel drzewny, a do wspomagania bioremediacji użyto: sita molekularnego, alginitu, sepiolitu i sorbentu Ikaorb 1850. W bioaugmentacji wykorzystano biopreparat BIO ACTIV HGS kod 208 oraz konsorcjum bakterii wyizolowane z gleby zanieczyszczonej olejem napędowym, w skład którego wchodziły bakterie: *Arthrobacter pascens* – 12%, *Rhizobium petrolearium* – 10%, *Rhodococcus erythropolis* – 13%, *Streptomyces atratus* – 13%, *Bacillus aryabhata* – 12%, *Gordonia amicalis* – 15%, *Ochrobactrum intermedium* – 12%, *Pseudomonas plecoglossicida* – 13%.

W celu sprecyzowania oddziaływania oleju napędowego na stan gleby w publikacjach posługiwano się następującymi wskaźnikami:

- rozwoju kolonii (CD) bakterii organotroficznych, promieniowców i grzybów:

$$CD = [N1/1 + N2/2 + N3/3 \dots N10/10] \cdot 100$$

N1, N2, N3, ... N10 – suma ilorazów liczby kolonii mikroorganizmów zidentyfikowanych w poszczególnych dniach (1, 2, 3, ... 10) i sumy wszystkich kolonii z całego okresu badań;

- ekofizjologicznej różnorodności (EP) bakterii organotroficznych, promieniowców i grzybów:

$$EP = -\sum(\pi_i \cdot \log_{10} \pi_i)$$

π_i – iloraz liczby kolonii mikroorganizmów z poszczególnych dni i sumy kolonii z całego okresu badań;

- wskaźnik oporności mikroorganizmów (RS):

$$RS = 1 - \frac{2 | D_0 |}{C_0 + | D_0 |}$$

C_0 – wartość badanego parametru dla gleby kontrolnej,

P_0 – wartość badanego parametru dla gleby zanieczyszczonej,

$$D_0 = C_0 - P_0$$

- biochemicznej aktywności gleby (BA):

$$BA = Deh + Kat + Pal + Pac + Ure + Glu + Aryl$$

Deh – aktywność dehydrogenaz ($\mu\text{mol TFF kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$),

Kat – aktywność katalazy ($\text{mol O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$),

Ure – aktywność ureazy ($\text{mmol N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$),

Glu – aktywność β -glukozydazy ($\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$),

Pac – aktywność fosfatazy kwaśnej ($\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$),

Pal – aktywność fosfatazy alkalicznej ($\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$),

Aryl – aktywność arylosulfatazy ($\text{mmol PNP kg}^{-1} \text{ s.m. h}^{-1}$).

- wpływu oleju napędowego oraz zastosowanych dodatków na mikrobiom gleby:

$$IF_{DO} (IF_R) = (P_0 - C_0) / C_0$$

IF_{DO} – wpływ oleju napędowego, IF_R – wpływ substancji remediujących,

P_0 – liczebność mikroorganizmów lub aktywność enzymów w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym;

C_0 – liczebność mikroorganizmów lub aktywność enzymów w glebie niezanieczyszczonej olejem napędowym;

- Average Well-Color Development (AWCD):

$$AWCD = \sum(C-R)/n$$

C – absorbancja źródła węgla w każdej studziencie;

R – absorbancja w studziencie kontrolnej;

n – liczba źródeł węgla;

- Shannon-Weaver (H):

$$H = -\sum p_i(\ln p_i)$$

p_i – iloraz absorbancji źródła węgla z każdej studzienki i absorbancji wszystkich źródeł węgla;

Wszystkie wyniki badań opracowano statystycznie wykorzystując pakiet Statistica.

Obliczono:

- współczynnik η^2 metodą analizy wariancji – Anova, określający udział poszczególnych zmiennych niezależnych w kształtowaniu zmiennych zależnych;
- grupy jednorodne - testem Tukey'a;
- PCA (principal component analysis), stosując analizy wielowymiarowe i eksploracyjne.

Wyniki badań

1. Rozpoznanie zależności między właściwościami fizyko-chemicznymi gleby zanieczyszczonej olejem napędowym a aktywnością enzymów i mikroorganizmami tlenowymi [B.1].

W badaniach przeanalizowano wrażliwość hodowlanych drobnoustrojów oraz enzymów glebowych na działanie oleju napędowego Ekodiesel Ultra (DO). Obiektem badań był piasek gliniasty oraz glina piaszczysta, które w stanie naturalnym zostały zaklasyfikowane do podtypu: 3.1.1 Gleby brunatne eutroficzne typowe. Glebę zanieczyszczano DO w ilości 0, 5 oraz 10 cm³ kg⁻¹. Stwierdzono różnice w oporności poszczególnych grup lub rodzajów drobnoustrojów na zanieczyszczenie DO w piasku gliniastym (LS) i glinie piaszczystej (SL). W piasku gliniastym najbardziej opornymi były bakterie oligotroficzne przetrwalnikujące, a w glinie piaszczystej bakterie koptotroficzne przetrwalnikujące. Oporność drobnoustrojów na zanieczyszczenie DO była większa w LS niż SL. Zmniejszała się ona wraz z czasem narażenia mikroorganizmów na działanie DO. Indeks wpływu (IF_{DO}) na aktywność poszczególnych enzymów był zróżnicowany. W przypadku dehydrogenaz, ureazy, arylosulfatazy i β -glukozydazy przyjmował on wartości ujemne, a w przypadku katalazy –

dotadnie, natomiast był bliski 0 u fosfatazy kwaśnej. Dobrą miarą oddziaływania oleju napędowego na aktywność biochemiczną gleby był wskaźnik biochemicznej aktywności gleby (BA). W obydwu glebach notowano tym niższy wskaźnik biochemicznej aktywności gleby (BA) im wyższe było zanieczyszczenie DO. Również dodatnia zależność wystąpiła między stopniem zanieczyszczenia gleby a zawartością w niej WWA. W piasku gliniastym pod wpływem 5 cm³ oleju napędowego kg⁻¹ s.m. gleby nastąpił 94% przyrost sumy WWA, a pod wpływem 10 cm³ kg⁻¹ aż 248%, natomiast w glinie piaszczystej zanieczyszczonej mniejszą ilością oleju napędowego spowodowało przyrost zawartości WWA o 65%, a większą - o 214%. Pomimo znacznego zwiększenia zawartości węglowodorów aromatycznych w glebach, w wyniku zanieczyszczenia olejem napędowym, zawartość żadnego z węglowodorów nie przekraczała dopuszczalnych norm. Oddziaływanie zanieczyszczenia na właściwości fizykochemiczne było niewielkie. Zarówno w piasku gliniastym, jak i w glinie piaszczystej w obiektach zanieczyszczonych zwiększała się ilość węgla organicznego. Nie zmieniała się pula azotu ogółem i potasu przyswajalnego, a zawartość przyswajalnego fosforu i magnezu zmniejszyła się tylko w piasku gliniastym. Stabilny był odczyn gleby oraz kwasowość hydrolityczna.

2. Określenie różnorodności funkcjonalnej drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym [B.2; B.3].

Produkty ropopochodne prowadzą do stopniowej degradacji ekosystemów glebowych, gdyż posiadają duży potencjał do akumulacji w środowisku, w którym destabilizują mikrobiom glebowy. Zatem rozpoznanie zmian zachodzących w mikrobiomie gleby zanieczyszczonej olejem napędowym jest niezwykle istotne z punktu widzenia przeprowadzania efektywnej bioremediacji. W związku z powyższym podjęto badania zmierzające do określenia w piasku gliniastym o pH_{KCl} 5,2, zanieczyszczonym olejem napędowym Ekodiesel Ultra w ilości 50 cm³ kg⁻¹ s.m., liczebności i różnorodności funkcjonalnej zbiorowisk bakterii [B.2] i grzybów [B.3], opartych na analizie profilu metabolicznego. Wymienione zagadnienie rozpatrywano pod kątem czasu oddziaływania (od 7 do 270 dni) oleju napędowego na zbiorowiska bakterii i grzybów. Określono dynamikę degradacji lotnych węglowodorów (BETX) [B.2] i WWA [B.3] przez drobnoustroje glebowe. W ocenie posiłkowano się również aktywnością wybranych enzymów, tj. ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, β-glukozydazy i arylosulfatazy [B.2] oraz dehydrogenaz i katalazy [B.3].

W wyniku badań stwierdzono, że zanieczyszczenie gleby olejem napędowym Ekodiesel Ultra wywiera na środowisko glebowe długotrwałe działanie, gdyż niektóre grupy związków organicznych wchodzących w skład DO są stosunkowo odporne na biodegradowalność. Najszybciej i w największych ilościach był usuwany z gleby benzen, a w najmniejszych ilościach olej mineralny (C₁₂-C₃₅) oraz m-, p-, o-ksyleny (C₈). Po 270 dniach w glebie było mniej benzenu (C₆) o 94%, toluenu (C₇) o 76%, etylobenzenu (C₈) o 39%, izomerów ksylenu o 29% i oleju mineralnego o 28%. Pomimo stosunkowo dużej dysproporcji w tempie degradacji między pojedynczymi węglowodorami, to rozpatrując jednocześnie wszystkie węglowodory monoaromatyczne (BTEX), należy przyznać, że są one stosunkowo trwałe. Po 270 dniach zawartość BTEX zmniejszyła się zaledwie o 39% [B.2]. Po 270 dniach degradacji uległo tylko 64% WWA czteropierścieniowych, 28% - pięciopierścieniowych, 21% - 2-3 pierścieniowych i 16% - sześciopierścieniowych [B.3]. Olej napędowy zwiększał liczebność większości grup bakterii [B.2] i grzybów oraz aktywność dehydrogenaz, katalazy [B.3], ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, β-glukozydazy i arylosulfatazy, ale negatywnie oddziaływał na bakterie z rodzaju *Artrrobacter* [B.2]. Profil kataboliczny bakterii ustalono z wykorzystaniem systemu „Biolog” na płytkach EcoPlate zawierających 31 źródeł węgla, a grzybów na płytkach FF Plate z 95 źródłami węgla. Identyfikację mikroorganizmów przeprowadzono metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF MS. Uzyskane wyniki dowodzą, że olej napędowy powoduje zmiany w strukturze bakterii [B.2] i grzybów [B.3]. Zmniejsza się ich różnorodność oraz zmieniają się wzajemne relacje między mikroorganizmami strategii r i mikroorganizmami strategii K. W glebie zanieczyszczonej olejem napędowym istotnie zwiększył się wskaźnik rozwoju kolonii grzybów (CD), a zmniejszył się wskaźnik ich różnorodności (EP) [B.2, B.3]. Wskaźnik rozwoju kolonii (CD) w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym zmieniał się w czasie trwania doświadczenia. W przypadku bakterii koptotroficznych największy był w 7. i 30. dniu (42,05 i 40,05), a najmniejszy w 270. dniu (31,75); bakterii organotroficznych - w 30. i 60. dniu (42,12; 41,78), a najmniejszy w 270. dniu (30,68); bakterii z rodzaju *Pseudomonas* - w 60. i 90. dniu (36,17; 34,65), a najmniejszy w 270. dniu (31,26), natomiast bakterii z rodzaju *Artrrobacter* i promieniowców największy był w 7. dniu i wynosił odpowiednio 32,60 i 26,53. Ekofizjologiczny wskaźnik różnorodności bakterii (EP) układał się odwrotnie niż wskaźnik CD [B.2]. Przeciętna wartość CD grzybów izolowanych z gleby zanieczyszczonej, niezależnie od terminu badań, wynosiła 44,30, a grzybów izolowanych z gleby kontrolnej – 37,60. Odwrotnie kształtowała się wielkość wskaźnika EP, który dla grzybów izolowanych z gleby kontrolnej wynosił 0,55, a dla

grzybów pochodzących z gleby zanieczyszczonej wynosił, przeciętnie niezależnie od terminu badań, 0,38 [B.3].

Negatywne oddziaływanie DO na różnorodność bakterii i grzybów jest długotrwałe, o czym dowodzą najniższe wartości w 270-tym dniu wskaźników: Average Well-Color Development (AWCD), Substrate Richness (R) i Shannon-Weaver (H) [B.2; B3]. Najlepszym źródłem węgla dla bakterii były węglowodany oraz kwasy karboksylowe i kwas octowy, znacznie gorszym - aminokwasy i polimery, a najgorszym aminy i amidy. Bakterie w największym stopniu użyły D-Mannitol (D2), Pyruvic Acid Methyl Ester (B1), D-Xylose (B2), L-Serine (D4), Tween 80 (D1), L-Asparagine (B4), D-Glucosaminic Acid (F2), Itaconic Acid F3 i 4-Hydroxy Benzoic Acid (D3). Natomiast najmniej degradowane były β -Methyl-D-Glucoside (A2) i D-Galactonic Acid γ -Lactone (A3) [B.2].

Również zdolność grzybów do użycia poszczególnych grup związków organicznych była zróżnicowana. Przez 90 dni w największym stopniu były użyczone kwasy karboksylowe i aminokwasy. W wysokim stopniu grzyby wykorzystywały 11 źródeł węgla, w dobrym stopniu – 53, przeciętnym – 21 i w niskim – 10. Najlepsze źródło węgla stanowiły: Gentobiose (B9), α -Methyl-D-Glucoside (D7), D-Mannitol (D1), D-Melibiose (D4), i-Erythritol (B4), D-Mannose (D2), α -Methyl-D-Galactoside (D5), D-Galactose (B7), D-Glucosamine (B11), L-Frucoze (B6) i D-Fructose (B5), natomiast najgorsze: D-Arabinose (A8), Amygdalin (A7), Adonitol (A6), N-Acetyl-D-Glucosamine (A4), N-Acetyl-D-Galactosamine (A3), L-Arabinose (A9), D-Arabitol (A10), N-Acetyl-D-Mannosamine (A5), Tween 80 (A2) i Arbutin (A11) [B.3].

Analiza profilu białkowego drobnoustrojów i ich porównanie do wzorcowego zestawu białek drobnoustrojów referencyjnych umożliwiła zidentyfikowanie wyizolowanych bakterii do rodzaju i gatunku. Zarówno z gleby niezanieczyszczonej jak i zanieczyszczonej olejem napędowym, wyizolowano bakterie należące do rodzaju: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholder*, *Cupravidus*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* i *Staphylococcus*. Uwagę zwraca fakt, że mimo, iż z obydwu gleb wyizolowano takie same rodzaje, to w glebie zanieczyszczonej DO było znacznie mniej gatunków. Z gleby zanieczyszczonej DO najczęściej wyizolowano bakterii z rodzaju *Arthrobacter* (13%), *Bacillus* (17%), *Pseudomonas* (13%) i *Rhodococcus* (10%) [B.2] oraz grzybów z rodzaju *Fusarium* (38%), *Candida* (14%), *Microsporium* (14%) i *Penicillium* (14%), natomiast w glebie kontrolnej: *Penicillium* (27%), *Microsporium* (21%), *Fusarium* (21%) i *Candida* (16%) [B.3]. Należy zatem przypuszczać, że mogą być one efektywne w biodegradacji związków organicznych wchodzących w skład DO.

Zastosowane metody badawcze pozwoliły na dobre rozpoznanie profilu ekofizjologicznego i katabolitycznego mikroorganizmów przydatnych w optymalizacji biodegradacji oleju napędowego.

3. Ocena skuteczności bioremediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym i wskazanie najbardziej efektywnej metody w usuwaniu węglowodorów tego produktu [B.4; B.5; B.6].

Gleba zanieczyszczona olejem napędowym traci swoją strukturę, zaburzeniu ulegają warunki powietrzno-wodne, właściwości chemiczne, fizyczne, mikrobiologiczne i biochemiczne. Dlatego też należy poszukiwać takich metod remediacji, które są przyjazne dla środowiska. W związku z powyższym podjęto badania, których nadrzędnym celem było określenie skuteczności: biostymulacji autochtonicznej mikrobioty glebowej poprzez nawożenie słomą oraz węglem drzewnym [B.4]; remediacji gleby z wykorzystaniem sita molekularnego, alginitu, sepiolitu i sorbentu Ikasorb 1850 [B.5]; bioaugmentacji gleby konsorcjum bakterii oraz biopreparatem BIO ACTIV HGS kod 208 [B.6].

Wszystkie doświadczenia wykonano w hali wegetacyjnej. Roślinami doświadczalnymi były owies [B.4] i kukurydza [B.5 i B.6]. Badania wykonano na glebie o składzie granulometrycznym gliny piaszczystej o $pH_{KCl} - 6,58$ [B.4], piasku gliniastego o $pH_{KCl} - 6,63$ [B.5], piasku gliniastego o $pH_{KCl} - 6,98$ i gliny piaszczystej o $pH_{KCl} - 7,13$ [B.6]. W publikacji pierwszej glebę zanieczyszczano olejem napędowym Shell Diesel, a w pracy drugiej i trzeciej olejem napędowym VERVA – gatunek B.

W wyniku badań [B.4] stwierdzono silnie toksyczny wpływ oleju napędowego na wzrost i rozwój *Avena sativa* L. Istotnie zmniejszyło się pobranie makro- i mikroelementów przez badaną roślinę. Na podstawie analizy sekwencji kodujących 16S rRNA dokonano identyfikacji aktywnych bakterii. Z próbek gleby poddanych presji oleju napędowego wyizolowano *Pseudomonas aeruginosa*, *Kocuria palustris*, *Gordonia amicalis*, *Pseudomonas monteilii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* i *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* z 97-100% punktacją trafności dopasowania sekwencji według analizy przy użyciu bazy danych NCBI. Mikroorganizmy te mogą być wykorzystane w bioaugmentacji. W obiektach zanieczyszczonych DO stwierdzono dynamiczniejszy rozwój bakterii organotroficznych, promieniowców i grzybów oraz większą aktywność dehydrogenaz, katalazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej i β -glukozydazy. Nawożenie węglem drzewnym oraz słomą stymulowało rozwój drobnoustrojów i aktywność enzymów glebowych, ale nie łagodziło negatywnego oddziaływania DO na wzrost i rozwój owsa. W glebach zanieczyszczonych DO

znajdowało się więcej C_{org} oraz potasu przyswajalnego i wymiennego niż w glebach niezanieczyszczonych. Na zawartość pozostałych pierwiastków w glebie DO nie wywarł tak istotnego wpływu. Nawożenie słomą i węglem drzewnym nie zmieniało właściwości fizykochemicznych gleby. W obiektach niezanieczyszczonych olejem napędowym pH, Hh, S, T, V i zawartość węgla organicznego była na jednakowym poziomie, niezależnie od rodzaju nawożenia, natomiast w obiektach zanieczyszczonych DO zwiększała się istotnie jedynie zawartość C_{org} .

W badaniach opisanych w publikacji [B.5] wykazano, że zanieczyszczenie gleby olejem napędowym (DO) istotnie zakłócało wzrost i rozwój kukurydzy. Zmieniało też skład chemiczny tej rośliny. Zmniejszało wartość indeksu biokoncentracji azotu, fosforu, wapnia i potasu w kukurydzy. Użyte w badaniach sito molekularne, sepiolit, alginit i sorbent niwelowały rozmiary negatywnego oddziaływania oleju napędowego na części nadziemne i korzenie kukurydzy. Olej napędowy naruszał równowagę mikrobiologiczną gleby. Zmniejszał ekofizjologiczną różnorodność grzybów oraz bakterii organotroficznych. Analiza różnorodności taksonomicznej Procaryota oznaczona na podstawie składu sekwencji hiperzmiennego regionu V3 - V4 genu kodującego jednostkę 16S rRNA pozwoliła na określenie składu biocenozy bakteryjnej w próbkach gleby niezanieczyszczonej i zanieczyszczonej olejem napędowym. Dominującym taksonem w randze Phylum w obu glebach była *Proteobacteria*. Zanieczyszczenie gleby DO zmniejszyło udział procentowy *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Acidobacteria* w porównaniu do gleby niezanieczyszczonej. Jeszcze lepiej różnice w składzie taksonomicznym Procaryota przedstawiają poszczególne rodzaje. Zarówno z gleby niezanieczyszczonej jak i zanieczyszczonej olejem napędowym, najczęściej wyizolowano bakterii należących do rodzaju: *Janthinobacterium* i *Arthrobacter*. Uwagę zwraca fakt, że w glebie poddanej presji DO dominowały bakterie: *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*, *Streptomyces* i *Pseudomonas*, a bez DO: *Janthinobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Kaistobacter*, *Oxalobacter*, *Pedobacter* i *Paenibacillus*. Olej napędowy, podobnie jak w pracy [B.4], stymulował aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych. Działał niekorzystnie na właściwości fizykochemiczne gleby. W glebie zanieczyszczonej DO działanie substancji remediacyjnych na mikrobiom gleby było różnokierunkowe. Z reguły sepiolit, alginit i sorbent wpływały korzystnie na rozwój promieniowców. Przesuwały ich strukturę w kierunku dominacji promieniowców strategii K. Wszystkie zwiększały ekofizjologiczną różnorodność bakterii organotroficznych, stymulowały aktywność dehydrogenaz i poprawiały właściwości fizykochemiczne gleby. Wszystkie substancje

wykorzystane w remediacji zintensyfikowały degradację benzyn (C₆-C₁₂) i sumy 9 WWA, a sito molekularne i alginit także biodegradację oleju mineralnego (C₁₂-C₃₅). Mogą być one stosowane w remediacji gleby zanieczyszczonej DO, szczególnie sito molekularne i alginit, jako najbardziej efektywne.

Wyniki zamieszczone w publikacji [B.6] dowodzą, że o skali toksycznego oddziaływania oleju napędowego (DO) na *Zea mays* decyduje skład granulometryczny gleby. Bardziej toksyczny DO był dla kukurydzy uprawianej na piasku gliniastym niż na glinie piaszczystej. Powodował zaburzenia w proporcjach między drobnoustrojami szybko- i wolnorosnącymi (strategii r) i wolnorosnącymi (strategii K). Działał niekorzystnie na ekofizjologiczną różnorodność drobnoustrojów. Bioaugmentacja preparatem BIO ACTIV HGS kod 208 i konsorcjum bakterii w składzie *Arthrobacter pascens* – 12%, *Rhizobium petrolearium* – 10%, *Rhodococcus erythropolis* – 13%, *Streptomyces atratus* – 13%, *Bacillus aryabhata* – 12%, *Gordonia amicalis* – 15%, *Ochrobactrum intermedium* – 12%, *Pseudomonas plecoglossicida* – 13% łagodziła rozmiary negatywnego wpływu oleju napędowego na wzrost i rozwój kukurydzy. Zmieniała proporcje w strukturze zespołów bakterii. Nastąpiło częściowe przesunięcie zespołów promieniowców do strategii r i bakterii organotroficznymi do strategii K. Łagodziła niekorzystne oddziaływanie DO na różnorodność drobnoustrojów. W piasku gliniastym bez zabiegu bioaugmentacji degradacja benzyn wynosiła 94%, a olei mineralnych 87%, natomiast w glinie piaszczystej odpowiednio: 75% i 37%. Zarówno preparat handlowy BIO ACTIV HGS kod 208, jak i konsorcjum drobnoustrojów namnożone w warunkach laboratoryjnych, istotnie przyspieszało degradację benzyn i olei mineralnych w obydwu glebach. Jednak degradacja Σ 9 WWA po 60 dniach od zanieczyszczenia gleb DO była wysoka (od 95% do 97%) i nie zależała od zabiegu bioaugmentacji.

Podsumowanie i wykorzystanie wyników

Zakłócenia powodowane w metabolizmie gleby przez zanieczyszczenie olejem napędowym należy rozpatrywać z punktu widzenia możliwości przywracania równowagi w ekosystemie. Dlatego też wyniki przedstawione w publikacjach, powiązanych ze sobą tematycznie, będących podstawą osiągnięcia naukowego są ważnym ogniwem w cyklu badań dotyczących jakości środowiska, w którym funkcjonujemy. Zatem połączenie wskaźników mikrobiologicznych i biochemicznych z jednoczesnym określeniem właściwości fizykochemicznych, chemicznych gleby oraz plonowaniem i składem chemicznym roślin daje

szansę na kompleksową ocenę jakości gleby będącej pod presją oleju napędowego i jednocześnie zaproponowanie najbardziej efektywnej metody remediacji takich gleb.

Do najważniejszych osiągnięć cyklu prezentowanych prac zaliczam:

1. Rozpoznanie struktury zespołów mikroorganizmów zasiedlających gleby zanieczyszczone olejem napędowym z wykorzystaniem spektrometrii masowej MALDI-TOF MS, analizy sekwencji kodujących 16S rRNA oraz metodą NGS.
2. Udowodnienie, że olej napędowy zmniejszył udział procentowy *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Acidobacteria* w porównaniu do gleby niezanieczyszczonej. W glebie poddanej presji tego produktu dominowały bakterie: *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Caulobacter*, *Streptomyces* i *Pseudomonas*, a w glebie niezanieczyszczonej - *Janthinobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Kaistobacter*, *Oxalobacter*, *Pedobacter* i *Paenibacillus*.
3. Określenie profilu katabolicznego bakterii z wykorzystaniem systemu „Biolog” na płytkach EcoPlate zawierających 31 źródeł węgla oraz grzybów na płytkach FF Palte z 95 źródłami węgla. Stwierdzenie, że reakcja bakterii i grzybów na zanieczyszczenie gleby olejem napędowym wykonana na podstawie rozwoju kolonii na płytkach Petriego (wskaźnik CD i EP) jest zbieżna z analizą wykonaną na podsatwie EcoPlate i FF Microplate systemem Biolog.
4. Wykazanie, że działanie oleju napędowego na aktywność enzymów może być różnokierunkowa. W zdecydowanej większości doświadczeń testowane zanieczyszczenie stymulowało aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych, co można uznać za zjawisko pożądane, gdyż zwiększona aktywność dynamizuje degradację węglowodorów.
5. Wykazanie, że degradacja oleju napędowego zależy od stopnia zanieczyszczenia oraz od składu granulometrycznego gleby. Skutki silnego zanieczyszczenia olejem napędowym ($50 \text{ cm}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ s.m.}$) są długotrwałe. Najtrudniej degradowalne były oleje mineralne i benzyny. Szybciej degradacja przebiegała w piasku gliniastym niż w glinie piaszczystej.
6. Rozpoznanie reakcji *Avena sativa* i *Zea mays* na działanie oleju napędowego i wykazanie, że na obydwie rośliny produkt ten działał toksycznie. Kukurydza mniej odporna była na działanie oleju napędowego, gdy była uprawiana na piasku gliniastym niż na glinie piaszczystej.

7. Wykazanie negatywnego wpływu oleju napędowego na indeksy biokoncentracji azotu, fosforu, wapnia i potasu mierzone stosunkiem zawartości pierwiastków w częściach nadziemnych do zawartości pierwiastków w korzeniach kukurydzy.
8. Wyizolowanie z gleby bakterii opornych na działanie oleju napędowego i stworzenie konsorcjum skutecznego w bioaugmentacji o następującym składzie: *Arthrobacter pascens*, *Rhizobium petrolearium*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces atratus*, *Bacillus aryabhata*, *Gordonia amicalis*, *Ochrobactrum intermedium*, *Pseudomonas plecoglossicida*.
9. Nawożenie węglem drzewnym oraz słomą stymulowało rozwój drobnoustrojów i aktywność enzymów glebowych, ale nie łagodziło negatywnego oddziaływania oleju napędowego na wzrost i rozwój owsa.
10. Rozpoznanie przydatności sita molekularnego, sepiolitu, alginitu i sorbentu w remediacji gleby zanieczyszczonej olejem napędowym i wskazanie, że do odnowy biologicznej takiej gleby, można zarekomendować wszystkie testowane substancje, wskazując na sito molekularne i alginit, jako najbardziej efektywne.

Literatura

- ADAM I.U., DUARTE M., PATHMANATHAN J., MILTNER A., BRÜLS T., KÄSTNER M. 2017. *Microbial communities in pyrene amended soil-compost mixture and fertilized soil*. AMB EXPRESS. 7(1): 7.
- ADAMS G.O., FUFAYIN P.T., OKORO S.E., Ehinomen I. 2015. *Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A Review*. International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation. 3(1): 28-39.
- ALBERT E., TANEE, F. 2011. *A laboratory trial of bioaugmentation for removal of total petroleum hydrocarbon (TPH) in Niger Delta soil using Oscillatoria bornettia*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 1: 147–168.
- COM. 2006. Commission staff working document - Accompanying document to the Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Thematic Strategy for Soil Protection - Summary of the impact assessment.
- COMBER M.H.I., DE FERRER J.A., DJEMEL N., EADSFORTH C.V., LESCRAUWAET A., LÉON PAUMEN M., LININGTON S., REDMAN A., VILLALOBOS S.A. 2016. *Analysis of N-, O-, and S- heterocyclics in petroleum products using GCxGC with specific detection*. CONCAWE. 75.
- COVINO S., STELLA T., D'ANNIBALE A., LLADÓ S., BALDRIAN P., ČVANČAROVÁ M., CAJTHAML T., PETRUCCIOLI M. 2016. *Comparative assessment of fungal augmentation treatments of a fine-textured and historically oil-contaminated soil*. Science of The Total Environment. 566–567: 250-259.
- EPA 2017. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (<https://clu-in.org/remediation/>)
- GARCIA-LOR E., SANCHO J. V., SERRANO R., HERNANDEZ F. 2012. *Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia*. Chemosphere. 87, 453–462.
- GLOBAL ENVIRONMENT OUTLOOK GEO5. 2012. *Environment for the future we want*. United Nations Environment Programme: 551.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). 2016. *Oil market report*. ss: 63.
- JIANG S., WANG W., XUE X., CAO C., ZHANG Y. 2016. *Fungal diversity in major oil-shale mines in China*. Journal of Environmental Sciences. 41, 81–89.
- KHALILOVA H.K. 2015. *The impact of oil contamination on soil ecosystem*. Biological and Chemical Research. 133–139.
- KUCHARSKI J., JASTRZĘBSKA E. 2006. *Effect of heating oil on the activity of soil enzymes and the yield of yellow lupine*. Plant, Soil and Environment. 52(5): 220–226.

- KUCHARSKI J., JASTRZĘBSKA E. 2005. *Effects of heating oil on the count of microorganisms and physico-chemical properties of soil*. Polish Journal of Environmental Studies. 14(2): 195-204.
- KUPPUSAMY S., THAVAMANI P., VENKATESWARLUK., LEE V.B., NAIDU R., MEGHARAJ M. 2017. *Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions*. Chemosphere. 168: 944-968.
- LIU R., JADEJA R. N., ZHOU Q., LIU Z. 2012. *Treatment and Remediation of Petroleum-Contaminated Soils Using Selective Ornamental Plants*. Environ. Eng. Sci. 29(6): 494-501.
- LIU R., XIAO N., WEI S., ZHAO L., AN J. 2014. *Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix*. Science of The Total Environment. 473-474: 350-358.
- MA W., YOU X. 2016. *Numerical simulation of plant-microbial remediation for petroleum-polluted soil, soil and sediment contamination*. International Journal. 25(7): 727-738.
- MARCHAND CH., ST-ARNAUD M., HOGLAND W., BELL T H., HURI M. 2017. *Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil*. International Biodeterioration and Biodegradation. 116, 48-57.
- MASY T., DEMANÈCHE S., TROMME O., THONART P., JACQUES P., HILIGSMANN S., VOGEL T.M. 2016. *Hydrocarbon biostimulation and bioaugmentation in organic carbon and clay-rich soils*. Soil Biology and Biochemistry. 99: 66-74.
- MOUBASHER H. A., HEGAZY A. K., MOHAMED N. H., MOUSTAFA Y. M., KABIEL H.F., HAMAD H. F. 2015. *Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using Bassia scoparia and its associated rhizosphere microorganisms*. International Biodeterioration and Biodegradation. 89: 113-120.
- NIEPCERON M., MARTIN-LAURENT F., CRAMPON M., PORTET-KOLTALO F., AKPA-VINCESLAS M., LEGRAS M., BRU D., BUREAU F., BODILIS J. 2013. *GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils*. Environmental Pollution. 180, 199-205.
- NWAICHI E. O., FRAC M., NWOHA P. A., ERAGBOR P. 2015. *Enhanced Phytoremediation of Crude Oil-Polluted Soil by Four Plant Species: Effect of Inorganic and Organic Bioaugmentation*. International Journal of Phytoremediation. 17, 1253-61.
- PINEDO J., IBÁÑEZ R., IRABIEN A. 2012. *Risk assessment of total petroleum hydrocarbons (TPHs) fractions*. Chemical Engineering Transactions. 28: 61-66.
- RAMKUMAR S., KIRUBAKARAN V. 2016. *Biodiesel from vegetable oil as alternate fuel for C.I engine and feasibility study of thermal cracking: A critical review*. Energy Conversion and Management. 118: 155-169.
- SHANAHAN P. (2004). *Bioremediation. Waste Containment and Remediation Technology*, Spring 2004, Massachusetts Institute of Technology, MIT OpenCourseWare.
- SOUZA E. C., VESSONI-PENNA T. C., AND DE SOUZA OLIVEIRA R. P. 2014. *Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview*. International Biodeterioration and Biodegradation 89: 88-94.
- SUN T. R., CANG L., WANG Q. Y., ZHOU D. M., CHENG J. M., XU H. 2010. *Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil*. Journal of Hazardous Materials. 176, 919-925.
- WOLIŃSKA A., KUŹNIAR A., SZAFRANEK-NAKONIECZNA A., JASTRZĘBSKA N., ROGUSKA E., STĘPNIWSKA Z. 2016. *Biological Activity of Autochthonic Bacterial Community in Oil-Contaminated Soil*. Water, Air and Soil Pollution. 227: 130.
- WORD ENERGY OUTLOOK (WEO) <http://www.iea.org/weo2017/>
- WYSZKOWSKA J., BOROWIK A., KUCHARSKI J. 2015. *Response of Avena sativa, microorganisms and enzymes to contamination of soil with diesel oil*. Plant, Soil and Environment. 61(11): 483-488.
- WYSZKOWSKA J., KUCHARSKI J. 2005. *Correlation between the number of microorganisms and soil contamination with diesel oil*. Polish Journal of Environmental Studies. 14(3): 359-368.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Parametry naukometryczne mojej działalności naukowej zostały zaprezentowane w wykazie osiągnięć – Załącznik nr 3 i 4. W poniższych podrozdziałach przedstawiam opis dotychczasowego rozwoju naukowego.

5a) Przed doktoratem

Na trzecim roku studiów na Wydziale Nauk Technicznych zaczęłam pogłębiać wiedzę z zakresu nauk przyrodniczych i rolniczych, a na czwartym podjęłam pracę w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Kształtowania Środowiska Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie na podstawie umowy zlecenie (4 miesiące) w ramach badań realizowanych z działalności statutowej. Na piątym roku studiów, tj. od 1.10.2006 r. zostałam zatrudniona w wyżej wymienionej Katedrze na stanowisku technika i uczestniczyłam w badaniach laboratoryjnych z zakresu mikrobiologii i biochemii gleby. W 2007 roku zostałam włączona w skład zespołu wykonawców realizujących badania finansowane z działalności statutowej wydziału [Zał. 3: G.2.1] oraz opracowującego projekt badawczy własny, pt. „Opracowanie biochemicznego wskaźnika jakości gleb” kierowanego przez prof. dr hab. Jadwigę Wyszowską [Zał. 3: G.1.1], który otrzymał finansowanie z MNiSW. W międzyczasie, 9 lipca 2007 roku, uzyskałam tytuł magistra i z dniem 1.09.2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku technologa. W 2008 uczestniczyłam w kolejnych badaniach z działalności statutowej [Zał. 3: G.2.1]. W tym samym roku, chcąc podnieść swoje kwalifikacje, ukończyłam dwa kursy pt. „Technika PCR i jej zastosowania” oraz „Genotypowanie - technika PCR II” w Gdańsku [Zał. 4: C.2.1-C.2.2], co zostało dostrzeżone przez pracodawcę i otrzymałam nagrodę zespołową JM Rektora UWM w Olsztynie [Zał. 4: D.3.1].

Przed doktoratem moje zainteresowania naukowe skupiały się w **2 obszarach badawczych**:

1. Czynniki warunkujące przebieg procesu nityfikacji w glebie. Z tego zakresu powstały 3 publikacje [Zał. 3: B.1.1; B.1.3; B.1.8].
2. Aktywność mikrobiologiczna i biochemiczna w glebach poddanych stresowi antropogenicznemu. Problematyka ta została opublikowana w 6 oryginalnych pracach badawczych [Zał. 3: B.1.2; B.1.4 - B.1.7; B.1.9].

W ramach **pierwszego problemu badawczego** wykazano, że 2-chloro-6-(trichlorometylo) pirydyna (N-Serve) oraz 4-amino-1,2,4-triazol (ATC) częściowo zakłócały proces przemian kwasu L-asparaginowego i kwasu L-glutaminowego, chociaż nie oddziaływały na liczebność bakterii amonifikacyjnych. Istotnie hamowały proces nityfikacji przez 24 dni, przyczyniając się do zwiększenia immobilizacji azotu. Ponadto, intensywny proces nityfikacji powodował zakwaszenie gleby [Zał. 3: B.1.1]. Również fluoren i benzen zastosowany w ilościach 500 - 1000 mg kg⁻¹ s. m. gleby powodowały zakłócenia procesu nityfikacji. Powodowały one zakłócenia w cyklu azotu poprzez hamowanie procesu nityfikacji i zmniejszenie liczebności

nitryfikatorów I i II fazy. Wykazano, że pomiar aktywności nitryfikacyjnej gleby może być dobrym testem stosowanym w bioremediacji fluorenu i benzenu. Nitryfikacja jest procesem ciągłym, o czym świadczy zwiększająca się pula azotu azotanowego w trakcie trwania doświadczenia. Dotyczyło to zarówno azotu rodzimego, jak i azotu nawozowego. Proces nitryfikacji zachodził intensywnie przez 28 dni, ale największy przyrost bezwzględny azotu azotanowego nastąpił w 14 dniu trwania doświadczenia [Zał. 3: B.1.3, B.1.8].

W ramach **drugiego problemu badawczego** wraz ze współautorami stwierdziłam, że wrażliwość bakterii oligotroficznych, bakterii kopiotroficznych, amonifikacyjnych, immobilizujących azot, celulolitycznych oraz bakterii z rodzaju *Arthrobacter* i *Pseudomonas* na Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Pb^{2+} jest cechą specyficzną [Zał. 3: B.1.2; B.1.5; B.1.6; B.1.9]. Związana jest ona z zawartością metali w glebie oraz ze sposobem użytkowania gleby. Rozwój bakterii z rodzaju *Arthrobacter* oraz *Pseudomonas* był intensywniej hamowany w glebie obsianej owsem, natomiast bakterii amonifikacyjnych, immobilizujących azot oraz celulolitycznych – w glebie nieobsianej. Bardziej odporne na te zanieczyszczenia okazały się bakterie kopiotroficzne, celulolityczne, immobilizujące azot i amonifikacyjne niż bakterie z rodzaju *Arthrobacter* i *Pseudomonas*. Miedź miała najsilniejszy wpływ na bakterie kopiotroficzne; ołów i cynk - na bakteriach amonifikacyjne i bakterie immobilizujące azot; bakterie *Arthrobacter* najsilniej reagowały na zanieczyszczenie cynkiem, a *Pseudomonas* - kadmem i cynkiem. Wszystkie metale ciężkie miały silniejszy wpływ na bakterie z rodzaju *Arthrobacter* i *Pseudomonas* niż na poszczególne grupy fizjologiczne. Tolerancja bakterii na pojedyncze metale była często wyższa niż na ich działanie wspólne. Jedynym wyjątkiem była mieszanina wszystkich czterech metali, która najbardziej negatywnie wpłynęła na drobnoustroje [Zał. 3: B.1.2; B.1.9]. W kolejnych badaniach [Zał. 3: B.1.5; B.1.6], wykazano, że zarówno cynk i miedź zaburzają nie tylko namnażanie drobnoustrojów w glebie, ale również powodują istotne zmiany we właściwościach biochemicznych, mierzonych aktywnością dehydrogenaz, ureazy, fosfatazy kwaśnej i fosfatazy zasadowej. Metale te zakłócają prawidłowe funkcjonowanie ekosystemów wywołując negatywny wpływ na przebieg wielu procesów, związanych z przemianami związków węgla i azotu. Rzeczywisty efekt wpływu metali ciężkich zależał od rodzaju i stopnia zanieczyszczenia gleby oraz składu granulometrycznego gleby. Spośród testowanych enzymów dehydrogenazy były najbardziej wrażliwe na nadmiar metali, a katalaza najbardziej oporna. Dehydrogenazy i katalaza były mniej tolerancyjne na miedź w glinie piaszczystej niż w piasku gliniastym, w przeciwieństwie do ureazy, która była bardziej tolerancyjna na zanieczyszczenia w piasku gliniastym niż w glinie piaszczystej. Stwierdzono również korzystny wpływ nawożenia słomą jęczmienną na

właściwości mikrobiologiczne i biochemiczne gleb zanieczyszczonych cynkiem. Kukurydza okazała się bardziej odporna niż jęczmień jary na nadmiar cynku, a rzepak jary bardziej odporny niż owies i łubin żółty na nadmiar miedzi. Publikacje [Zał. 3: B.1.2; B.1.5; B.1.6; B.1.9] oraz komunikaty konferencyjne [Zał. 3: C.2.2; C.2.3; C.2.7; C.2.9] poświęcone rozpoznaniu wpływu metali ciężkich na właściwości mikrobiologiczne i biochemiczne gleby były rezultatem mojego uczestnictwa w badaniach realizowanych w dwóch zadaniach badawczych z działalności statutowej [Zał. 3: G.2.1; G.2.2].

W omawianym okresie opublikowałam również jedną pracę poświęconą oddziaływaniu herbicydu Granstar 75WG na liczebność drobnoustrojów [Zał. 3: B.1.4], w której stwierdzono, że zanieczyszczenie gleby tym herbicydem w ilości 5 i 10-krotnie większej od dawki rekomendowanej istotnie naruszało równowagę mikrobiologiczną gleby. Liczebność bakterii oligotroficznych, bakterii kopiotroficznych przetrwalnikujących, bakterii *Azotobacter* spp. i grzybów była istotnie ujemnie skorelowana z dawką herbicydu.

Praca w latach 2007-2010 w projekcie własnym, pt. „Opracowanie biochemicznego wskaźnika jakości gleb” [Zał. 3: G.1.1] i uzyskane wyniki stały się podstawą mojej przyszłej rozprawy doktorskiej pt. „Studia nad czynnikami kształtującymi aktywność biologiczną gleby” wykonywanej pod promotorstwem prof. dr hab. Jadwigi Wyszowskiej, którą obroniłam z wyróżnieniem przed Komisją Doktorską 11.02.2011 roku [Zał. 3: H.1], a 17 lutego 2011 roku Rada Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie nadała mi stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie kształtowania środowiska, specjalność mikrobiologia środowiskowa. Recenzentami rozprawy były: prof. dr hab. Elżbieta Jolanta Bielińska i dr hab. Zofia Filipkowska. Ukoronowaniem tego etapu mojej pracy zawodowej było otrzymanie 01.10.2011 r. nagrody indywidualnej II stopnia JM Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, za osiągnięcia w dziedzinie naukowej [Zał. 3: H.2].

Ponadto, w okresie przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora opublikowałam współautorską pracę, której celem było określenie oddziaływania obornika i kompostu na aktywność ureazy w glebach różniących się składem granulometrycznym [Zał. 3: B.1.7]. W wyniku badań stwierdzono, że aktywność ureazy jest determinowana pojemnością sorpcyjną gleby. Nawożenie obornikiem i kompostem stymuluje aktywność ureazy w glebie. Ich działanie zależy od gatunku gleby. W mniejszym stopniu nawozy te oddziałują na aktywność w pyle gliniastym niż w piasku gliniastym i glinie piaszczystej. Różnice w aktywności ureazy między poszczególnymi testowanymi glebami, tj. 3,5-krotnie większa aktywność w pyle gliniastym niż w piasku gliniastym i 4,7-krotnie większa niż w glinie piaszczystej,

prawdopodobnie wynikają z ochronnego działania mineralnych i organicznych koloidów w stosunku do ureazy, tworzącej z nimi związki kompleksowe. Świadczy o tym intensywniejsza aktywność ureazy w glebach o większej pojemności sorpcyjnej i pozytywna jej reakcja na nawożenie obornikiem i kompostem. Aktywność ureazy wykazuje dużą zmienność czasową. Z tego względu powinna być określana kilkakrotnie podczas trwania doświadczenia. Wyniki uzyskane w ramach wyżej wymienionego projektu, które są zaprezentowane w rozprawie doktorskiej były również przedstawiane na 1 konferencji międzynarodowej [Zał. 4: D.1.1.3] i 2 – krajowych [Zał. 4: D.1.2.3; D.1.2.4], co znalazło odzwierciedlenie w 4 komunikatach z tych konferencji [Zał. 3: C.2.4; C.2.5; C.2.8; C.2.10].

Chcąc uzyskać przygotowanie do pracy w charakterze nauczyciela akademickiego, uczestnicząc w badaniach realizowanych w Katedrze Mikrobiologii w ramach działalności statutowej i projektu własnego, którego byłam wykonawcą, jednocześnie ukończyłam sześciomiesięczny (01.10.2010 r. - 30.03.2011 r.) kurs doszkalający pt. „Doskonalenie pedagogiczne nauczycieli akademickich” organizowanym przez Wydział Nauk Społecznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie [Zał. 4: C.2.3].

W okresie przed doktoratem realizacja badań w ramach działalności statutowej [Zał. 3: G.2.1-G.2.2] oraz w projekcie własnym [Zał. 3: G.1.1] zaowocowała powstaniem **9 publikacji naukowych**, o łącznej wartości **44 pkt MNiSW**, opublikowanych w czasopiśmie z listy B MNiSW [Zał. 3: B.1.1-B.1.9]. Uczestniczyłam w 3 konferencjach międzynarodowych [Zał. 4: D.1.1.1- D.1.1.3] i 4 krajowych [Zał. 4: D.1.2.1-D.1.2.4], na których prezentowałam wyniki badań w formie 10 posterów [Zał. 3: I.1-I.10], z których ukazało się 10 komunikatów [Zał. 3: C.2.1-C.2.10].

5b) Po doktoracie

Bezpośrednio po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk rolniczych zostałam współwykonawcą dwóch projektów własnych, finansowanych przez MNiSW, pt.: „*Możliwości przywracania równowagi mikrobiologicznej i biochemicznej gleby zanieczyszczonej cynkiem*” [Zał. 3: G.1.2] i „*Określenie mikrobiologicznych i biochemicznych wskaźników diagnozujących stan zanieczyszczenia gleby herbicydami nowej generacji*” [Zał. 3: G.1.3]. Powyższe granty były realizowane w Katedrze Mikrobiologii. Z dniem 1.09.2011 roku awansowałam na stanowisko pracownika naukowo-dydaktycznego. W latach 2012-2017 uczestniczyłam również, jako wykonawca, w łącznie 9 zadaniach badawczych realizowanych w ramach działalności statutowej [Zał. 3: G.2.2] oraz byłam kierownikiem kolejnych 4 grantów uczelnianych uzyskanych w ramach badań przeznaczonych dla młodych

naukowców i uczestników studiów doktoranckich [Zał. 3: G.2.3]. Obecnie jestem kierownikiem projektu NCN: „*Odporność roślin z rodziny Poaceae oraz oporność ryzosferowych zespołów mikroorganizmów o zdolnościach promowania wzrostu roślin na zanieczyszczenie gleby produktami ropopochodnymi*” uzyskanego w konkursie MINIATURA 1 [Zał. 3: G.1.4].

Przez cały czas swojej pracy na stanowisku asystenta permanentnie podnoszę kwalifikacje, między innymi uczestnicząc w trzech kursach, pięciu szkoleniach i dwóch warsztatach [Zał. 4: C.2.4-C.2.13]. Odbyłam także jeden staż zawodowy w Przedsiębiorstwie Wodociągów i Kanalizacji Sp. z o.o. w Olsztynie [Zał. 4: C.1.2] oraz jeden staż naukowy w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie [Zał. 4: C.1.1].

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moje zainteresowania naukowe koncentrowały się w następujących obszarach:

1. Rozpoznanie mikrobiomu gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi oraz możliwości przywracania równowagi mikrobiologicznej i biochemicznej takich gleb.
2. Określenie mikrobiologicznych i biochemicznych wskaźników diagnozujących stan zanieczyszczenia gleby herbicydami nowej generacji.
3. Rozpoznanie właściwości mikrobiologicznych i biochemicznych gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi i możliwości przywracania homeostazy takich gleb.
4. Wykorzystanie mikroorganizmów i enzymów w monitoringu środowiska.

Mogły być one realizowane dzięki badaniom prowadzonym w licznych w projektach zewnętrznych, jak i w działalności statutowej.

W ramach pierwszego obszaru badawczego „**Rozpoznanie mikrobiomu gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi oraz możliwości przywracania równowagi mikrobiologicznej i biochemicznej takich gleb**” obok 6 publikacji naukowych zaprezentowanych jako osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym powstały także 2 publikacje z listy JCR [Zał. 3: A.12; A.13], 1 publikacja z listy B [Zał. 3: B.1.11] oraz 16 komunikatów z konferencji naukowych [Zał. 3: C.2.12; C.2.13; C.2.15; C.2.17; C.2.23; C.2.34; C.2.37; C.2.41; C.2.44; C.2.45; C.2.47; C.2.50-C.2.54].

W ramach tego problemu badawczego rozpoznano oddziaływanie różnych produktów ropopochodnych: biodiesla, diesla, oleju opałowego i benzyny bezołowiowej 98 na dehydrogenazy glebowe, które jako enzymy wewnątrzkomórkowe, dobrze odnajdują się w roli indykatorów zanieczyszczenia środowiska substancjami lipofilnymi. Uzyskane wyniki

pozwołyły na określenie wagi dehydrogenaz w monitoringu środowiska glebowego poddanego presji węglowodorów ropopochodnych. Wykazano, że aktywność analizowanych oksydoreduktaz była dodatnio skorelowana ze stopniem zanieczyszczenia gleby biodieslem, dieslem i olejem opałowym, a ujemnie z benzyną bezołowiową. W biostymulacji gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi zdecydowanie bardziej przydatny jest kompost niż mocznik i dlatego kompost powinien być używany w remediacji gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi [Załącznik 3: A.12]. Wykazano względnie wysoką oporność enzymów na olej napędowy. Odnotowano również wyższy odsetek WWA 2 i 3 pierścieni w całkowitej zawartości WWA po zastosowaniu oleju napędowego. Gleba zanieczyszczona węglowodorami traci swoją strukturę, a bilans wodno-powietrzny gleby, a także jej właściwości chemiczne i fizykochemiczne pogarszają się. Zmiany właściwości fizycznych i chemicznych mają niekorzystny wpływ na wielkość i jakość plonu nadziemnych części owsa [Załącznik 3: A.13]. Wykazano również, że olej opałowy i olej napędowy z reguły zwiększają liczebność grzybów, natomiast benzyna - zmniejsza. Liczebność tych mikroorganizmów w glinie piaszczystej była o 15% większa niż w piasku gliniastym, natomiast w pyłe gliniastym - aż o 23% większa. Produkty ropopochodne zmieniały strukturę grzybów glebowych. Miejsce grzybów szybko rosnących zajmowały grzyby wolniej rosnące. Najniższą opornością na produkty ropopochodne charakteryzowały się grzyby wyizolowane z piasku gliniastego, a najwyższą – z gliny piaszczystej [Załącznik 3: B.1.11]. **Rozwinięcie** powyższych badań z zakresu oddziaływania produktów ropopochodnych na życie biologiczne gleby realizowałam w ramach 4 grantów uczelnianych uzyskanych dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich, których byłam kierownikiem [Załącznik 3: G.2.3], a uzyskane wyniki stały się podstawą opracowania cyklu prac będących podstawą **osiągnięcia habilitacyjnego**, które zostało opisane w rozdziale 4 (strona 4). Obecnie w pracy naukowej skupiam się na badaniach związanych z odpornością roślin z rodziny Poaceae oraz opornością ryzosferowych zespołów mikroorganizmów promujących wzrost roślin na zanieczyszczenie gleby produktami ropopochodnymi, które realizuję w ramach projektu NCN, w konkursie MINIATURA 1, którego jestem kierownikiem [Załącznik 3: G.1.4].

Drugi obszar badawczy „**Określenie mikrobiologicznych i biochemicznych wskaźników diagnozujących stan zanieczyszczenia gleby herbicydami nowej generacji**” znalazł odzwierciedlenie w 10 publikacjach z listy JCR [Załącznik 3: A.4; A.6; A.7; A.10; A.11; A.14; A.17; A.19; A.20; A.22], 1 z listy B [Załącznik 3: B.1.14] oraz 3 komunikatach z konferencji naukowych [Załącznik 3: C.2.30; C.2.32; C.2.39]. Podstawą powyższych prac były wyniki

uzyskane w ramach projektu własnego „Określenie mikrobiologicznych i biochemicznych wskaźników diagnozujących stan zanieczyszczenia gleby herbicydami nowej generacji” [Zał. 3: G.1.3], którego byłam wykonawcą.

Nadrzędnym celem publikacji przypisanych do omawianego problemu badawczego było określenie wpływu zanieczyszczenia gleby herbicydami Successor T 550 SE (petoksamid + terbutylazyna), Aurora 40 WG (karfentrazon etylowy), Boreal 58 WG (flufenacet + izoksaflutol), Fuego 500 SC (metazachlor), Lumax 537,5 SE (mezotrion + s-metolachlor) i Alister Grande 190 OD (diflufenikan + mezosulfuron metylowy + jodosulfuron metylosodowy) na:

- 1) liczebność bakterii oligotroficznych, bakterii oligotroficznych przetrwalnikujących, bakterii z rodzaju *Azotobacter*, bakterii organotroficznych, promieniowców i grzybów oraz aktywność dehydrogenaz, katalazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, arylosulfatazy i β -glukozydazy;
- 2) indeks rozwoju kolonii drobnoustrojów (CD) oraz współczynnik ekofizjologicznej różnorodności drobnoustrojów (EP);
- 3) reakcję wybranych grup drobnoustrojów hodowanych na podłożach stałych;
- 4) właściwości fizykochemiczne gleby;
- 5) wzrost i rozwój roślin.

Powyższe cele były weryfikowane w doświadczeniach modelowych prowadzonych w warunkach laboratoryjnych [Zał. 3: A.6; A.7; A.11; A.14; A.17; B.1.14] i wegetacyjnych wazonowych [Zał. 3: A.4; A.10; A.19; A.20; A.22].

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że bakterie: *Azotobacter* spp., *Arthrobacter* spp., *Bradyrhizobium* spp. (lupini), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* oraz promieniowce: *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces intermedius*, *Streptomyces viridis*, *Streptomyces odoriver*; grzyby: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, hodowane na podłożach stałych, były najmniej wrażliwe na zastosowanie herbicydu Aurora 40 WG, a najbardziej na Alister Grande 190 OD. Ze wszystkich drobnoustrojów hodowanych na podłożach stałych, najbardziej oporny na działanie herbicydów okazały się *Azotobacter* spp. Spośród wszystkich testowanych preparatów tylko Lumax 537,5 SE hamował ich wzrost.

Zaaplikowanie tych herbicydów do gleby, inkubowanej w warunkach laboratoryjnych, spowodowało zwiększenie liczebności bakterii organotroficznych i oligotroficznych. Successor T 550 SE oraz Fuego 500 SC zwiększały również liczebność bakterii oligotroficznych przetrwalnikujących, natomiast wzrost tej grupy drobnoustrojów hamował herbicyd Aurora 40 WG. Preparat ten wpłynął także inhibycyjnie na rozwój promieniowców.

Zastosowanie najwyższej dawki wszystkich herbicydów, z wyjątkiem Alister Grande 190 OD, spowodowało obniżenie liczebności *Azotobacter*. Na rozwój grzybów inhibicyjnie oddziaływały Aurora 40 WG oraz Successor T 550 SE. Najwyższą wartość EP bakterii organotroficznych stwierdzono po zastosowaniu preparatu Lumax 537,3 SE, a najniższą – Boreal 58 WG. Wartości EP promieniowców obniżały się wraz ze wzrostem zanieczyszczenia preparatami Boreal 58 WG i Fuego 500 SC. EP grzybów najwyższe było w obiektach z dodatkiem Successor T 550 SE, a najniższe z dodatkiem Boreal 58 WG.

Z kolei w doświadczeniu wegetacyjnym wszystkie herbicydy obniżały liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Najwyższą liczebność bakterii oligotroficznych zaobserwowano po zastosowaniu preparatu Successor T 550 SE, a najniższą - Aurora 40 WG. Alister Grande 190 OD stymulował namnażanie bakterii oligotroficznych przetrwalnikujących, a pozostałe preparaty miały zróżnicowane działanie na te bakterie. Największe destrukcje w namnażaniu bakterii organotroficznych spowodował Boreal 58 WG, ale jednoznaczny negatywny wpływ miały również Successor T 550 SE i Fuego 500 SC. Na grzyby najsilniej negatywnie oddziaływały Fuego 500 SC, Boreal 58 WG oraz Successor T 550 SE, a herbicyd Aurora 40 WG działał stymulująco. Wartość indeksu rozwoju kolonii CD bakterii organotroficznych zmniejszała się wraz ze wzrostem dawek preparatów: Successor T 550 SE, Boreal 58 WG, Fuego 500 SC oraz Lumax 537,3 SE. Odwrotną tendencję zaobserwowano po zastosowaniu herbicydu Aurora 40 WG oraz Alister Grande 190 OD. Successor T 550 SE, Lumax 537,5 SE oraz Fuego 500 SC zmniejszały wartości CD promieniowców. Najwyższą wartość indeksu CD grzybów zaobserwowano w obiektach z dodatkiem Alister Grande 190 OD, następnie Aurora 40 WG i Boreal 58 WG.

Zanieczyszczenie gleby herbicydami nowej generacji zaburzało nie tylko namnażanie mikroorganizmów, ale powodowało również zaburzenia w równowadze biochemicznej gleby.

W doświadczeniu laboratoryjnym herbicydy wywierały inhibicyjny wpływ na aktywność dehydrogenaz i arylosulfatazy, przy czym preparaty Aurora 40 WG i Boreal 58 WG w niewielkim stopniu działały na dehydrogenazy. Wszystkie herbicydy stymulowały aktywność fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i katalazy. Aktywność ureazy była hamowana przez Boreal 58 WG, Fuego 500 SC i Alister Grande 190 OD, natomiast stymulowana przez Successor T 550 SE i Aurora 40 WG. Na aktywność β -glukozydazy negatywnie wpływał herbicyd Successor T 550 SE, natomiast Lumax 537,5 SE i Alister Grande 190 OD stymulowały aktywność tego enzymu. Konkludując można stwierdzić, że najbardziej destrukcyjnie na dehydrogenazy i β -glukozydazę działał herbicyd Successor T 550 SE, na katalazę - Aurora 40 WG i Boreal 58 WG, na ureazę i fosfatazę alkaliczną - Alister Grande

190 OD, na fosfatazę kwaśną – Boreal 58 WG i Alister Grande 190 OD, na arylosulfatazę - Boreal 58 WG.

Z kolei w doświadczeniu wegetacyjnym wszystkie herbicydy hamowały aktywność dehydrogenaz, ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej i β -glukozydazy. Natomiast na aktywność katalazy i arylosulfatazy herbicydy miały zróżnicowane działanie. Preparaty Successor T550 SE, Boreal 58 WG i Fuego 500 SC zmniejszały aktywność katalazy i arylosulfatazy, natomiast Aurora 40 WG stymulowała aktywność zarówno katalazy jak i arylosulfatazy. Zanieczyszczenie gleby testowanymi herbicydami w niewielkim stopniu modyfikowało pH gleby i stopień wysycenia gleby kationami zasadowymi. Wszystkie środki chwastobójcze spowodowały zwiększenie kwasowości hydrolitycznej gleby, a tym samym zmniejszenie sumy kationów zasadowych. Na pojemność sorpcyjną gleby i zawartość węgla organicznego herbicydy wpływały niejednoznacznie. Testowane herbicydy zaaplikowane w zwiększonych dawkach wpływały jednoznacznie inhibicyjnie na wzrost i rozwój roślin, o czym świadczy obniżenie plonu kukurydzy przez Successor T 550 SE, Boreal 58 WG i Lumax 537,5 SE, pszenicy jarej – przez Aurora 40 WG i Alister Grande 190 OD oraz rzepaku jarego – przez Fuego 500 SC.

Podsumowując opisywany obszar badawczy można stwierdzić, że wyniki przedstawione w publikacjach [Zał. 3: A.4; A.6; A.7; A.10; A.11; A.14; A.17; A.19; A.20; A.22, B.1.14] jednoznacznie dowodzą, że herbicydy powinny być stosowane zgodnie z kodeksem dobrej praktyki rolniczej. Stosowanie tych preparatów w ilościach zanieczyszczających narusza mikrobiom gleby oraz wzrost i rozwój roślin, zmniejszając jednocześnie ich plon. Herbicydy stają się wówczas toksyczne nie tylko dla chwastów, ale także dla roślin rolniczych. Nadmierne ilości herbicydów w glebie zakłócają biologiczną równowagę gleby poprzez zmianę mikrobiologicznych i biochemicznych właściwości. Przedstawione powyżej wyniki dowodzą, że prawidłową ocenę narażenia środowiska glebowego na zanieczyszczenie herbicydami można dokonać tylko poprzez kompleksowe badania, na które składa się ocena właściwości mikrobiologicznych i biochemicznych gleby, łącznie z oceną reakcji roślin.

Trzeci obszar moich zainteresowań badawczych „**Rozpoznanie właściwości mikrobiologicznych i biochemicznych gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi i możliwości przywracania homeostazy takich gleb**” zawiera się w następujących opracowaniach naukowych: w 8 publikacjach z listy JCR [Zał. 3: A.1-A.3; A.5; A.8; A.9; A.15; A.21] oraz 10 komunikatach z konferencji naukowych [Zał. 3: C.2.16; C.2.20-C.2.22; C.2.24; C.2.29; C.2.31; C.2.35; C.2.38; C.2.43]. Wyniki zaprezentowane w 5 publikacjach

[Zał. 3: A.1; A.5; A.9; A.15; A.21] oraz 2 komunikatach naukowych [Zał. 3: C.2.21; C.2.29] uzyskano w ramach projektu badawczego finansowanego przez MNiSW/NCN pt. „*Możliwości przywracania równowagi mikrobiologicznej i biochemicznej gleby zanieczyszczonej cynkiem*” [Zał. 3: G.1.2], którego byłam wykonawcą, a w 3 publikacjach [Zał. 3: A.2; A.3; A.8] i 8 komunikatach naukowych [Zał. 3: C.2.16; C.2.20; C.2.22; C.2.24; C.2.31; C.2.35; C.2.38; C.2.43] - w badaniach z działalności statutowej pt. „*Rola drobnoustrojów i enzymów w monitoringu środowiska*” [Zał. 3: G.2.2], którego też jestem wykonawcą.

Celem oryginalnych prac twórczych [Zał. 3: A.1; A.5; A.9; A.15; A.21] było określenie w glebie zanieczyszczonej cynkiem:

- 1) mikrobiologicznych i biochemicznych właściwości;
- 2) indeksu rozwoju kolonii (CD) drobnoustrojów izolowanych z gleby zanieczyszczonej cynkiem oraz współczynnika ekofizjologicznej różnorodności drobnoustrojów (EP),
- 3) przebiegu procesu nityfikacji w glebie zanieczyszczonej cynkiem,
- 4) roli materii organicznej wprowadzanej do gleby zanieczyszczonej cynkiem w przywracaniu jej równowagi biologicznej.

W wyniku badań stwierdzono, że mimo, iż cynk należy do pierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, to gdy występuje w nadmiarze, może stać się silnie toksyczny dla bytujących organizmów. Zanieczyszczenie gleby cynkiem zakłóca nie tylko proces nityfikacji, ale także inne procesy metabolizmu azotu glebowego, o czym świadczy zmniejszająca się immobilizacja azotu wraz ze zwiększeniem stopnia zanieczyszczenia gleby tym pierwiastkiem. Niekorzystne oddziaływanie cynku na proces nityfikacji wynika głównie z negatywnego oddziaływania nadmiaru tego pierwiastka w środowisku glebowym na bakterie nityfikacyjne. Cynk w większym stopniu hamuje rozwój bakterii I fazy nityfikacji niż II fazy, ale bakterie I fazy nityfikacji szybciej powracają do stanu równowagi niż II fazy. Współczynniki oporności (RS) procesu nityfikacji na zanieczyszczenie cynkiem kształtowały się na niskim poziomie i zmniejszały się wraz z pogłębiającym się stopniem zanieczyszczenia. Oporność bakterii nityfikacyjnych na działanie cynku była tym mniejsza im większa jego ilość znajdowała się w glebie. Cynk, występujący w zbyt dużych ilościach w glebie działał inhibycyjnie także na inne mikroorganizmy. To negatywne działanie pogłębiało się wraz ze wzrostem zanieczyszczenia cynkiem. Najbardziej wrażliwe na nadmierne ilości cynku były bakterie z rodzaju *Azotobacter*, a najmniej bakterie oligotroficzne przetrwalnikujące. Enzymy glebowe charakteryzują się zróżnicowaną opornością na nadmiar cynku w glebie. Pod względem

zmniejszającej się oporności na ten metal enzymy można uszeregować następująco: β -glukozydaza > fosfataza kwaśna > ureaza > arylosulfataza = fosfataza alkaliczna > katalaza > dehydrogenazy. Negatywne działanie cynku na enzymy glebowe utrzymywało się przez cały okres badań (120 dni). Wartość ED₂₀ dla poszczególnych enzymów w mg Zn²⁺ kg⁻¹ s.m. gleby wynosiła: dehydrogenazy – 103, fosfataza alkaliczna – 184, ureaza – 233, arylosulfataza – 247, fosfataza kwaśna – 416, katalaza – 419 i - β -glukozydaza - 1373. Wysoka koncentracja cynku w glebie wywarła negatywny wpływ także na właściwości fizykochemiczne gleby oraz wzrost i rozwój roślin. Po zaaplikowaniu 2400 i 4800 mg Zn²⁺ kg⁻¹ rozwój owsa i gorczyca białej został prawie całkowicie zahamowany.

Wykazano, że skuteczność aplikacji do gleby materii organicznej w przywróceniu homeostazy gleby zanieczyszczonej cynkiem zależało zarówno od jej rodzaju jak i stopnia zanieczyszczenia. W glebie zanieczyszczonej cynkiem w ilości 300 mg Zn²⁺ kg⁻¹ kora, drobno zmielona słoma jęczmienna, trociny sosnowe, obornik bydlęcy, kompost i celuloza, łagodziły destrukcyjne działanie cynku na biochemiczne właściwości gleby, tj. na aktywność dehydrogenaz, katalazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, β -glukozydazy i arylosulfatazy, a w glebie poddanej presji 600 mg Zn²⁺ kg⁻¹ skuteczna była tylko celuloza, słoma jęczmienna i obornik. Celuloza, kompost, obornik i słoma zwiększały oporność gorczyca białej na działanie cynku, ale tylko w glebie z zanieczyszczonej 300 mg Zn²⁺ kg⁻¹. Natomiast kora i trociny – wzmacniały niekorzystny wpływ tego metalu na tą roślinę.

Rozpoznanie wszelkich uwarunkowań oddziaływania metali ciężkich na środowisko przyrodnicze, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości biochemicznych, było przedmiotem 3 kolejnych publikacji [Zał. 3: A.2; A.3; A.8]. Podjęte badania były ważne, zarówno z poznawczego jak i utylitarne punktu widzenia. Stwierdzono, że zanieczyszczenie gleby cynkiem hamuje istotnie aktywność dehydrogenaz, ureazy i katalazy. Enzymy pod względem wrażliwości na cynk uszeregowano następująco: dehydrogenazy > ureaza > katalaza. Gatunek roślin oraz skład granulometryczny gleby determinował oporność enzymów na zanieczyszczenie cynkiem. Dehydrogenazy najbardziej odporne na negatywne działanie cynku były w glebie pod uprawą owsa, ureaza - rzepaku jarego, a katalaza – łubinu żółtego. Dehydrogenazy i ureaza okazały się bardziej odporne na działanie cynku w glinie piaszczystej niż w piasku gliniastym, a katalaza odwrotnie – bardziej odporna w piasku gliniastym niż w glinie piaszczystej. Wrażliwość roślin na zanieczyszczenie cynkiem okazała się być cechą gatunkową. Spośród badanych roślin najbardziej wrażliwy na nadmiar cynku w glebie był łubin żółty, a najmniej - owies.

Bardzo cenne są badania, w których wykorzystując aktywność enzymów glebowych, zawartość ilu i węgla organicznego zaproponowano 21 wskaźników biochemicznej aktywności gleby ($BA_1 - BA_{21}$), które podzielono na wskaźniki: proste i złożone. Obliczono również współczynniki korelacji między plonem roślin a biochemicznymi wskaźnikami jakości gleby. Wykazano również, że spośród 21 przetestowanych biochemicznych wskaźników jakości gleb najlepszymi wskaźnikami są wskaźnik $BA_{20} = \%C \times (\text{Deh} + \text{Pal} + \text{Pac} + \text{Ure})$, obliczany na podstawie zawartości węgla organicznego i aktywności czterech enzymów: dehydrogenaz, fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i ureazy oraz $BA_{21} = \text{Deh} + \text{Kat} + \text{Pal} + \text{Pac} + \text{Ure} + \text{Glu} + \text{Aryl}$, obliczany na podstawie aktywności siedmiu enzymów: dehydrogenaz (Deh), katalazy (Kat), fosfatazy kwaśnej (Pac), fosfatazy alkalicznej (Pal), ureazy (Ure), β -glukozydazy (Glu) i arylosulfatazy (Aryl).

Podsumowując badania poświęcone rozpoznaniu właściwości mikrobiologicznych i biochemicznych gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi [Zał. 3: A.1-A.3; A.5; A.8; A.9; A.15; A.21] można stwierdzić, że zanieczyszczenie gleby zarówno cynkiem, jak i innymi metalami ciężkimi, stanowi zagrożenie dla organizmów żywych. Dlatego gleby terenów o podwyższonym ryzyku i większej depozycji metali ciężkich, powinny być częściej monitorowane na ich zawartość, niż wynika to z ogólnych przepisów związanych z ochroną środowiska. Bardzo cenne jest stwierdzenie, że aktywność enzymów powinna być wyrażona w jednostkach produktu katalizowanej reakcji w czasie 1 h w przeliczeniu na 1 kg s.m. gleby, tj.: dehydrogenaz - $\mu\text{mol TFF}$, katalazy – mol O_2 , fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i arylosulfatazy – mmol PNP , natomiast ureazy – mmol N-NH_4^+ . Używanie zunifikowanych jednostek umożliwia porównywanie wyników i ocenę jakości różnych gleb, niezależnie od autora i ośrodka badań.

Wyniki uzyskane w ramach czwartego obszaru badawczego „**Wykorzystanie mikroorganizmów i enzymów w monitoringu środowiska**” były podstawą przygotowania 2 publikacji z listy JCR [Zał. 3: A.16; A.18], 1 z listy B [Zał. 3: B.1.10; B.1.12; B.1.13], 2 rozdziałów w monografii [Zał. 3: B.2.1; B.2.2] oraz 15 komunikatów z konferencji naukowych [Zał. 3: C.2.11; C.2.14; C.2.18; C.2.19; C.2.25-C.2.28; C.2.33; C.2.36; C.2.40; C.2.42; C.2.46; C.2.48-C.2.49].

W wyniku badań stwierdzono, że temperatura 15 °C była optymalną temperaturą dla rozwoju bakterii organotroficznych, promieniowców i grzybów. W piasku słabogliniastym, piasku gliniastym, glinie piaszczystej i pyle gliniastym w wymienionej temperaturze notowano także największą aktywność dehydrogenaz, katalazy, fosfatazy kwaśnej oraz

arylosulfatazy, w glebie o temperaturze 20 °C – fosfatazy alkalicznej, a o temperaturze 25 °C – ureazy i β -glukozydazy. Największy wskaźnik rozwoju kolonii (CD) bakterii organotroficznych notowano w glebach inkubowanych w temperaturze 25 °C, natomiast promieniowców i grzybów – w temperaturze 15 °C. Temperatura inkubacji gleby w niewielkim stopniu zmieniała ekofizjologiczną różnorodność testowanych grup drobnoustrojów. Reakcja drobnoustrojów i enzymów glebowych w większym stopniu uzależniona była od składu granulometrycznego gleby niż od jej temperatury [Zał. 3: A.16; B.2.2].

Dwie kolejne publikacje [Zał. 3: A.18; B.2.1] poświęcono określeniu zależności między wilgotnością gleby a wzrostem i rozwojem drobnoustrojów, ich różnorodnością oraz aktywnością enzymów glebowych w czterech glebach różniących się składem granulometrycznym. Wykazano, że optymalną wilgotnością dla rozwoju bakterii organotroficznych jest wilgotność na poziomie – 20% mpw, dla bakterii z rodzaju *Azotobacter* i promieniowców - 40% mpw, natomiast dla grzybów - 60% mpw. Różnorodność bakterii organotroficznych i grzybów była większa w glebach powietrznie suchych niż w glebach uwilgotnionych, natomiast – promieniowców bardzo zbliżona niezależnie od stopnia jej uwilgotnienia. Z kolei aktywność dehydrogenaz glebowych, katalazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, β -glukozydazy i arylosulfatazy najwyższa była w glebach, których wilgotność wynosiła 20% mpw. Analiza PCA wskazuje, że stan uwilgotnienia gleb w mniejszym stopniu determinuje aktywność mikrobiologiczną i biochemiczną niż ich rodzaj.

Stwierdzono także, że zmiana pH gleb z 7,0 do 5,0 przyczyniła się do zmniejszenia liczebności promieniowców nawet o 55% [Zał. 3: B.1.10]. Zmniejszyła się ich różnorodność przy jednoczesnym przesunięciu struktury z form stabilnych, wolno rosnących do form mniej stabilnych, szybciej wyrastających. Odradzanie się promieniowców po zakwaszeniu następowało najszybciej w glebach o największej zawartości frakcji piasku, przy jednoczesnym zmniejszeniu ich różnorodności. Oporność promieniowców na zakwaszenie była największa w piasku słabogliniastym, a najmniejsza w glinie piaszczystej o największej zawartości węgla.

Ponadto wykazano, że namnażanie niektórych grup mikroorganizmów i aktywność enzymów glebowych powiązane są z nawożeniem fosforanem mocznika [Zał. 3: B.1.12]. W wyniku badań wykazano, że fosforan mocznika stymulował namnażanie bakterii koptotroficznych, amonifikacyjnych, celulolitycznych, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* oraz promieniowców i grzybów, a hamował aktywność dehydrogenaz, ureazy, fosfatazy kwaśnej i

fosfatazy alkalicznej oraz aktywność nitryfikacyjną. Pod wpływem działania fosforu w postaci fosforanu mocznika zmniejszały się wartości współczynników charakteryzujących efekt ryzosferowy drobnoustrojów. Fosforan mocznika, chociaż korzystnie działał na wzrost i rozwój jęczmienia jarego, to powodował zakłócenia metabolizmu glebowego, objawiającego się obniżeniem potencjalnej żyzności gleby, skorelowanej z aktywnością biochemiczną.

W kolejnej pracy [Zał. 3: B.1.13] wykazano, że L-tryptofan istotnie wpływał na wzrost i rozwój cebuli. Korzystnie oddziaływał na mikrobiologiczne i biochemiczne właściwości gleby. Zwiększał liczebność bakterii oligotroficznych i ich form przetrwalnych, koptotroficznych i ich form przetrwalnych, amonifikacyjnych, immobilizujących azot, *Azotobacter*, bakterii celulozowych, promieniowców i grzybów oraz aktywność dehydrogenaz, ureazy, fosfatazy kwaśnej i fosfatazy alkalicznej, a zmniejszał - *Arthrobacter* i *Pseudomonas*.

Azotobakteryna zwiększała liczebność bakterii: *Azotobacter*, oligotroficznych i ich form przetrwalnych, koptotroficznych i ich form przetrwalnych, immobilizujących azot, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, promieniowców i grzybów oraz stymulowała aktywność ureazy a zmniejszała liczebność bakterii amonifikacyjnych i celulozowych oraz aktywność dehydrogenaz.

Konkludując opisywany obszar badawczy, przedstawiony w wyżej wymienionych pracach [Zał. 3: A.16; A.18; B.1.10; B.1.12; B.1.13; B.2.1; B.2.2], można stwierdzić, że monitoring stanu mikrobiologicznego i biochemicznego gleb powinien być wykonywany systematycznie i powinien uwzględniać jak najwięcej zmiennych niezależnych wpływających na różnorodność biologiczną gleby.

W okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora realizacja badań w ramach dwóch projektów własnych [Zał. 3: G.1.2-G.1.3] oraz działalności statutowej [Zał. 3: G.2.2-G.2.3] zaowocowała opublikowaniem **28 rozpraw naukowych** w czasopismach indeksowanych *Journal Citation Reports* – kat. A [Zał. 3: B.1-B.6; A.1-A.22], w tym **6** wskazanych jako cykl prac w postępowaniu habilitacyjnym [Zał. 3: B.1-B.6]. Ponadto opublikowano **5** prac w czasopismach z listy **B MNiSW** [Zał. 3: B.1.10-B.1.14], **1** publikację **recenzowaną** spoza listy MNiSW [Zał. 3: B.3.1] i **dwa** rozdziały w monografii w języku polskim [Zał. 3: B.2.1-B.2.2].

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora mój dorobek naukowy został oszacowany na **627 pkt MNiSW**, z czego **135 pkt** stanowi **osiągnięcie habilitacyjne**. Uczestniczyłam w 7 konferencjach międzynarodowych [Zał. 4: D.1.1.4- D.1.1.10] i 16 krajowych [Zał. 4: D.1.2.5-

D.1.2.20], na których prezentowałam wyniki badań w formie 3 referatów [Zał. 3: I.11-I.13], 3 e-posterów [Zał. 3: I.14-I.16] oraz 41 posterów [Zał. 3: I.17-I.57], z których ukazało się 44 komunikaty [Zał. 3: C.2.11-C.2.54].

W ramach swojej pracy naukowej współpracuję z: Instytutem Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, Instytutem Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach, Hodowlą Roślin w Bartążku Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Katedrą Chemii Rolnej i Ochrony Środowiska i Katedrą Chemii Środowiska Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie [Zał. 4; B.1.1; B.1.3-B.1.5].

Poza powyższymi głównymi nurtami badawczymi **aktualnie mój profil badawczy** koncentruje się na:

- 1) określeniu przydatności drobnoustrojów promujących wzrost i rozwój roślin w wspomaganiu fitoremedjacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi;
- 2) wykorzystaniu funkcjonalnej różnorodności bakterii (EcoPlate) i grzybów (FFPlate) w ocenie gleb zanieczyszczonych ksenobiotykami;
- 3) poszukiwaniu zależności między wzrostem i rozwojem roślin uprawnych a funkcjonalną i genetyczną różnorodnością mikroorganizmów.

5c) Podsumowanie

5c1. Najważniejsze pozostałe osiągnięcia naukowe, niewchodzące w skład cyklu prac przedstawionych, jako osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym

Do najważniejszych osiągnięć naukowych, niewchodzących w skład cyklu prac przedstawionych, jako osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym, zaliczam wykazanie, że:

1. Aktywność dehydrogenaz jest dodatnio skorelowana ze stopniem zanieczyszczenia gleby biodieslem, dieslem i olejem opałowym, a ujemnie z benzyną bezołowiową oraz, że w biostymulacji gleb zanieczyszczonych tymi produktami zdecydowanie bardziej przydatny jest kompost niż mocznik i dlatego kompost powinien być używany w remediacji gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi.
2. Herbicydy: Successor T 550 SE, Boreal 58 WG i Lumax 537,5 SE, Aurora 40 WG, Alister Grande 190 OD oraz Fuego 500 SC nie powodują długotrwałych niekorzystnych zmian w środowisku glebowym, gdy są stosowane w dawce optymalnej.
3. Dobrymi wskaźnikami diagnozującymi stan zanieczyszczenia gleby herbicydami jest aktywność: dehydrogenaz, ureazy i arylosulfatazy oraz reakcja roślin, a mniej

- przydatnymi wskaźnikami są: liczebność mikroorganizmów, indeks rozwoju kolonii drobnoustrojów (CD) oraz ekofizjologiczny wskaźnik różnorodności (EP).
4. Zanieczyszczenie cynkiem powoduje zakłócenia nie tylko w procesie nityfikacji, ale także innych procesów metabolizmu azotu glebowego, o czym świadczy zmniejszająca się immobilizacja azotu wraz ze zwiększeniem stopnia zanieczyszczenia gleby tym pierwiastkiem.
 5. Wzbogacenie gleby w materię organiczną może przynajmniej częściowo zmniejszyć negatywne oddziaływanie nadmiaru cynku na mikrobiologiczne i biochemiczne właściwości gleby, natomiast w niewielkim stopniu łagodzi oddziaływanie tego metalu na rośliny. Nawożenie słomą, obornikiem, kompostem i celulozą w większym stopniu zmniejsza negatywne oddziaływanie cynku na dehydrogenazy, ureazę, fosfatyzę kwaśną i fosfatyzę alkaliczną niż nawożenie przefermentowaną korą i trocinami. Natomiast w przypadku pozostałych enzymów zależności te nie są tak jednoznaczne i zależą nie tylko od rodzaju dodanej substancji organicznej, ale także od gatunku uprawianej rośliny. W uprawie owsa najbardziej skutecznym zabiegiem remediującym jest nawożenie obornikiem, trocinami, kompostem i przefermentowaną korą, a w uprawie gorczycy białej – nawożenie kompostem.
 6. Najlepszym wskaźnikiem stanu gleby jest biochemiczny potencjalny wskaźnik jakości - BA₂₁, wyznaczony na podstawie aktywności siedmiu enzymów (dehydrogenaz, katalazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy alkalicznej, arylosulfatazy i β-glukozydazy). Indeks ten wyklucza przypadkowość, która może się zdarzyć przy wnioskowaniu na podstawie pojedynczych parametrów. Wskaźnik ten jest istotnie skorelowany ze stopniem zanieczyszczenia gleby herbicydami i metalami ciężkimi oraz dodatnio z wielkością plonu roślin uprawnych.
 7. Ekofizjologiczny wskaźnik różnorodności drobnoustrojów (EP), wskaźnik oporności (RS), indeks przywracania gleby do stanu równowagi (RL) oraz prosty (BA₂₀) i złożony (BA₂₁) wskaźnik potencjalnej biochemicznej jakości gleby dobrze charakteryzują stan gleby zanieczyszczonej cynkiem, miedzią i kadmem.
 8. W piasku słabogliniastym, piasku gliniastym, glinie piaszczystej i pyle gliniastym temperatura 15 °C jest optymalną temperaturą dla rozwoju bakterii organotroficznych, promieniowców i grzybów oraz aktywności dehydrogenaz, katalazy, fosfatazy kwaśnej oraz arylosulfatazy, 20 °C – fosfatazy alkalicznej, a 25 °C – ureazy i β-glukozydazy.
 9. Najbardziej optymalną wilgotnością dla rozwoju bakterii organotroficznych jest wilgotność na poziomie – 20% mpw, dla bakterii z rodzaju *Azotobacter* i promieniowców

- 40% mpw, natomiast dla grzybów - 60% mpw. Aktywność dehydrogenaz glebowych, katalazy, ureazy, fosfatazy kwasnej, fosfatazy alkalicznej, β -glukozydazy i arylosulfatazy najwyższa jest w glebach, których wilgotność wynosił 20% mpw.
10. Zmiana pH gleb z 7,0 do 5,0 przyczynia się do zmniejszenia liczebności promieniowców oraz zmian różnorodności drobnoustrojów przy jednoczesnym przesunięciu struktury z form stabilnych, wolno rosnących do form mniej stabilnych, szybciej wyrastających.
 11. Fosforan mocznika, chociaż korzystnie działa na wzrost i rozwój jęczmienia jarego, to może powodować zakłócenia metabolizmu glebowego, objawiające się obniżeniem potencjalnej żyzności gleby, skorelowanej z aktywnością biochemiczną.
 12. L-tryptofan korzystnie wpływa na mikrobiologiczne i biochemiczne właściwości gleby oraz wzrost i rozwój roślin.

5c2. Informacje naukometryczne

Mój dorobek naukowy, łącznie z cyklem prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne, obejmuje **118** pozycji, w tym m.in. **43** oryginalne publikacje naukowe, **2** rozdziały w monografii, **16** komunikatów z konferencji międzynarodowych oraz **38** komunikatów z konferencji krajowych (tab. 1). Warto podkreślić, że jestem współautorką **28** oryginalnych prac twórczych wydanych w czasopismach z IF (w 12 publikacjach z listy A jestem pierwszym autorem). Aktualnie opracowuję kolejne prace naukowe. Mój całościowy dorobek naukowy (łącznie z cyklem prac stanowiącym osiągnięcie) wg MNiSW, zgodnie z rokiem publikacji, szacowany jest na **671** punktów.

Sumaryczny Impact Factor opublikowanych prac, łącznie z cyklem prac stanowiącym osiągnięcie habilitacyjne, wynosi **36,112** (wszystkie prace opublikowane są po uzyskaniu stopnia doktora). **Liczba cytowań wg bazy Web of Science** wynosi **227**, a Index Hirscha **9** (tab. 2). W ciągu całego okresu pracy brałam i nadal biorę czynny udział w realizacji projektów badawczych. Jestem autorem lub współautorem **18** raportów i sprawozdań z badań. Byłam wykonawcą w **trzech** projektach NCN/MNiSW, w tym **2** po uzyskaniu stopnia doktora. Obecnie jestem kierownikiem grantu NCN w konkursie **Miniatura 1**. Uczestniczyłam również w realizacji **11 zadań** badawczych z działalności statutowej, w tym **9** po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Byłam **kierownikiem 4** grantów uczelnianych uzyskanych w ramach badań przeznaczonych dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich.

Podczas dotychczasowej pracy naukowej brałam czynny udział w **10** konferencjach międzynarodowych oraz **30** konferencjach krajowych. Po uzyskaniu stopnia doktora na

konferencjach wygłosiłam **trzy** referaty oraz **trzy** 10 minutowe e-postery. Łącznie, jako autor lub współautor, zaprezentowałam 51 posterów na konferencjach, w tym 16 - na konferencjach międzynarodowych, z czego 11 po uzyskaniu stopnia doktora oraz 35 - na konferencjach krajowych, w tym 30 po uzyskaniu stopnia doktora.

Tabela 1. Zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj publikacji	Przed doktoratem	Po doktoracie	Razem
Publikacje w czasopismach <i>Journal Citation Report (JCR)</i> – kat. A, w tym:	0	28	28
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	6	6
- pozostałe publikacje	0	22	22
Pozostałe oryginalne publikacje twórcze, w tym:	9	8	17
- oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza listy JCR – kat. B	9	5	14
- publikacje recenzowane spoza listy MNiSW	0	1	1
- rozdziały w monografiach w j. polskim	0	2	2
Sumaryczny IF	0	36,112	36,112
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	10,292	10,292
- pozostałe publikacje	0	25,820	25,820
Punkty MNiSW za publikacje, zgodnie z rokiem wydania	44	627	671
- publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe	0	135	135
- pozostałe publikacje	44	492	536
Projekty badawcze finansowane ze źródeł zewnętrznych	1	3	4
Projekty/zadania badawcze finansowane z działalności statutowej	1/2	2/13	3/15
Redakcja wieloautorskiej monografii	0	1	1
Raporty i sprawozdania	2	16	18
Komunikaty w materiałach konferencyjnych międzynarodowych	5	11	16
Komunikaty w materiałach konferencyjnych krajowych	5	33	38
Recenzje publikacji	0	15	15

Byłam także promotorem pomocniczym w **dwóch** zakończonych przewodach doktorskich [Zał. 4: A.6]:

- Ewy Mackiewicz-Walec, stopień naukowy doktora - 28.06.2017 r.;
- Grażyny Kaczyńskiej, stopień naukowego doktora - 24.05.2018 r.

Istotnym elementem mojej działalności naukowej jest wielokrotne recenzowanie prac dla czasopism o zasięgu międzynarodowym i krajowym: Geoderma, Applied and Environmental

Soil Science, Journal of Environmental Sciences, Polish Journal of Natural Sciences, Environmental Pollution, Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, Journal of Elementology, Environmental Earth Sciences, African Journal of Biotechnology, The Open Plant Science Journal, Net Journal of Agricultural Science, Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology. Wykonałam też recenzję pracy na konferencję międzynarodową International Workshop on Environment and Geoscience, Hangzhou, China (IWEG 2018). W sumie wykonałam 15 recenzji [Zał. 4: B.3.1-B.3.15].

Tabela 2. Print Screen wskaźników naukometrycznych z bazy Web of Science



Potwierdzeniem całej mojej aktywności naukowej było otrzymanie 4 nagród [Zał. 3: H.2-H.5] JM Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, w tym 3 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, za osiągnięcia naukowe oraz wyróżnienia za pracę doktorską. Intensywna aktywność naukowa skutkowała także uzyskaniem 3 (lata: 2014; 2015-2016; 2017-2018) podwyżek prostażnościowych (pensji) w obszarze działalności naukowej przyznanych przez Rektora UWM w Olsztynie [Zał. 3: H.6-H.8].

Szczegółowa informacja wraz z zestawieniem o: osiągnięciach dydaktycznych i sprawowanej opiece naukowej, współpracy z instytucjami naukowymi, odbytych stażach i działalności popularyzującej naukę znajduje się w załączniku 4.

Agata Borowik