

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Tomasz Płociniczak

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

Doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, specjalność mikrobiologia,
Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, 10.12.2010r.
Tytuł rozprawy doktorskiej: Wspomaganie fitoekstrakcji metali ciężkich przez metalooporne szczepy bakterii z rodzajów *Brevibacterium*, *Enterobacter* i *Pseudomonas*.
Promotor: prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- od 01.12.2012r. do nadal; Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- od 20.10.2005r. do 30.11.2012r.; Asystent naukowo-dydaktyczny, Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy.

Temat osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie bakterii promujących wzrost roślin do wspomagania fitoremediacji terenów skażonych

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2b Ustawy:

1. **Płociniczak T.**, Chodór M., Pacwa-Płociniczak M., Piotrowska-Seget Z. 2019. Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants. *Chemosphere* 219, 250-260; DOI 10.1016/j.chemosphere.2018.12.018
(IF₂₀₁₉ 5.778; 100 pkt MNiSW₂₀₁₉; Cyt.Scopus 7) (**Zał. 4 A**)
Udział w powstaniu publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (izolacja i charakterystyka szczepów endofitycznych, analiza filogenetyczna izolatów, pozyskanie spontanicznych mutantów opornych na rifampicynę, doświadczenia fitoremediacyjne, izolacja wprowadzonych szczepów z tkanek roślinnych, określenie przeżywalności szczepów w glebie), interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny.
2. **Płociniczak T.**, Pacwa-Płociniczak M., Kwaśniewski M., Chwiałkowska K., Piotrowska-Seget Z. 2020. Response of rhizospheric and endophytic bacterial communities of white mustard (*Sinapis alba*) to bioaugmentation of soil with the *Pseudomonas* sp. H15 strain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 194:110434, 1-9; DOI 10.1016/j.ecoenv.2020.110434
(IF₂₀₁₉ 4.872*; 100 pkt MNiSW₂₀₁₉; Cyt.Scopus 0) (**Zał. 4 B**)
Udział w powstaniu publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu fitoremediacyjnego, przygotowanie tkanek roślinnych do izolacji DNA, analiza wyników, wykonanie części analiz bioinformatycznych, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny.
3. Pacwa-Płociniczak M., **Płociniczak T.**, Iwan J., Żarska M., Chorążewski M., Dzida M., Piotrowska-Seget Z. 2016. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management* 168, 175-184; DOI 10.1016/j.jenvman.2015.11.058
(IF₂₀₁₆ 4.01; 35 pkt MNiSW₂₀₁₆; 100 pkt MNiSW₂₀₁₉; Cyt.Scopus 26) (**Zał. 4 C**)
Udział w powstaniu publikacji: koncepcja pracy, izolacja szczepów i charakterystyka bakteryjnych mechanizmów promowania wzrostu roślin, interpretacja wyników, wykonanie analiz statystycznych, współudział w przygotowaniu manuskryptu.

4. **Płociniczak T.**, Fic E., Pacwa-Płociniczak M., Pawlik M., Piotrowska-Seget Z. 2017. Improvement of phytoremediation of an aged petroleum hydrocarbon-contaminated soil by *Rhodococcus erythropolis* CD 106 strain. *International Journal of Phytoremediation* 19, 614-620; DOI 10.1080/15226514.2016.1278420 (IF₂₀₁₇ 1.886; 25 pkt MNiSW₂₀₁₇; 100 pkt MNiSW₂₀₁₉; Cyt.Scopus 8) (**Zał. 4 D**)
Udział w powstaniu publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (pozyskanie spontanicznych mutantów opornych na rifampicynę, doświadczenia fitoremediacyjne, określanie przeżywalności wprowadzonego szczepu w glebie), analizy chromatograficzne, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny.
5. Ptaszek N., Pacwa-Płociniczak M., Noszczyńska M., **Płociniczak T.** 2020. Comparative study on multiway enhanced bio- and phytoremediation of aged petroleum-contaminated soil. *Agronomy* 10 (7), 947, 1-20, DOI 10.3390/agronomy10070947 (IF₂₀₁₉ 2,603^{*}; 100 pkt MNiSW₂₀₁₉; Cyt.Scopus 0) (**Zał. 4 E**)
Udział w powstaniu publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (izolacja i częściowa charakterystyka bakterii endofitycznych, pozyskanie spontanicznych mutantów opornych na rifampicynę, współdziałanie w przeprowadzeniu doświadczeń fitoremediacyjnych, określanie przeżywalności wprowadzonego szczepu w glebie), analizy chromatograficzne, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny, kierownik projektu SONATA 12, w ramach którego prowadzono badania.

Oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zamieszczono w **załączniku numer 5**.

Suma współczynnika **Impact Factor (IF)** dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy **Journal Citation Report (JCR)** z roku wydania publikacji^{*}: **19,149**

Punktacja według list MNiSW: 360^a [60_{do2018} (2)+300_{od2019} (3)]; 500^b

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według bazy **Scopus** na dzień 25.07.2020: **41**

^{*}Dla publikacji z roku 2020 podano wartość IF z roku 2019.

^aPublikacje do 31.12.2018r. wg załącznika z dnia 25.01.2017r., a od 01.01.2019r. wg załącznika z dnia 18.12.2019r. do komunikatów MNiSW.

^bWszystkie publikacje zgodnie z załącznikiem do komunikatu MNiSW z dnia 18.12.2019r.

Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego metalami ciężkimi i związkami ropopochodnymi stanowi obecnie jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemów zarówno glebowych, jak i wodnych. Spośród stosowanych obecnie metod bioremediacji skażonych terenów najbardziej perspektywiczna wydaje się być fitoremediacja, wykorzystująca naturalne zdolności roślin i towarzyszących im mikroorganizmów do pobierania i/lub rozkładu tych zanieczyszczeń. Do usuwania metali ciężkich z gleby najbardziej przydatna jest fitoekstrakcja, wykorzystująca zdolność wybranych gatunków roślin do pobierania i akumulowania zanieczyszczeń. Następnie, po ich translokacji do części nadziemnych, rośliny usuwa się w celu trwałej i efektywnej eliminacji metali z zanieczyszczonych środowisk. Z kolei efektywność fitoremediacji gleb skażonych substancjami organicznymi, w tym związkami ropopochodnymi, zależy przede wszystkim od aktywności mikroorganizmów ryzosferowych zdolnych do przeprowadzania procesów degradacji zanieczyszczeń w strefie gleby bezpośrednio przylegającej do korzeni i będącej pod wpływem wydzielin korzeniowych. Skuteczna fitoremediacja gleb zanieczyszczonych związkami organicznymi wykorzystuje także potencjał metaboliczny roślin, jest więc połączeniem fito- i ryzo-degradacji (Weyens i in., 2009).

Wydajność procesów fitoremediacji zależy od wielu czynników, w tym od aktywności metabolicznej rodzimych zespołów mikroorganizmów zasiedlających skażoną glebę i wewnątrz roślin użytych do tego procesu. Zarówno fitoekstrakcja gleb skażonych metalami ciężkimi, jak i fitoremediacja terenów zanieczyszczonych substancjami organicznymi mogą być wspomagane przez wprowadzenie do gleby (bioaugmentację) wyselekcjonowanych szczepów aktywnych mikroorganizmów. Wśród nich największą uwagę przyciągają bakterie promujące wzrost roślin (PGPB), w skład których wchodzi zarówno bakterie ryzosferowe (PGPR), jak i endofityczne (PGPE). Głównym celem ich stosowania jest intensyfikacja wzrostu roślin zasiedlających środowiska skażone oraz modulowanie odpowiedzi roślin na obecne w środowisku zanieczyszczenia. Do bakteryjnych mechanizmów odpowiedzialnych za potencjalne wspomaganie wzrostu roślin należą: wiązanie i/lub mobilizacja trudno dostępnych składników mineralnych (azot, fosfor, żelazo), synteza związków regulujących wzrost i rozwój

roślin (produkcja fitohormonów, enzymów, amoniaku), a także konkurencja z fitopatogenami o miejsce i składniki pokarmowe. Dodatkowo, bakterie te mogą zwalczać patogeny dzięki syntezie antybiotyków, enzymów litycznych oraz cyjanowodoru (Gkorezis i in., 2016).

Jednym z najistotniejszych mechanizmów bakteryjnego promowania wzrostu roślin, szczególnie w warunkach stresu środowiskowego, jest wytwarzanie przez bakterie deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC). Enzym ten (ACCD) hydrolizuje prekursor etylenu do amoniaku i α -ketomaślanu. Zmniejszenie stężenia etylenu opóźnia starzenie się roślin, szczególnie w warunkach stresu, a przez to wydłuża ich czas wegetacji umożliwiając uzyskanie większej biomasy. Ponadto, powstały w tej reakcji amoniak może być dodatkowo wykorzystywany przez rośliny jako źródło azotu (Santoyo i in., 2016).

Stosowanie PGPB przyczynia się do zwiększania biomasy roślin, zarówno części nadziemnych, jak i korzeni, co jest istotne zarówno dla zwiększenia efektywności fitoekstrakcji metali z gleby, jak i fitoremediacji zanieczyszczeń organicznych. Dodatkowo, wprowadzane szczepy mogą wpływać na biodostępność zanieczyszczeń metalicznych i organicznych w glebie poprzez produkcję substancji o charakterze kwaśnym, a także związków powierzchniowo-czynnych (biosurfaktantów). W przypadku zanieczyszczeń organicznych wprowadzane mikroorganizmy mogą również zwiększać potencjał degradacyjny zespołów mikroorganizmów autochtonicznych, który w środowiskach silnie skażonych jest często niewystarczający. Co więcej, wprowadzane do gleby szczepy, zarówno bakterii glebowych, ryzosferowych, jak i endofitycznych mogą w sprzyjających warunkach kolonizować wnętrza roślin, wpływając na ich metabolizm, mechanizmy pobierania i tolerancji zanieczyszczeń, a także w przypadku zanieczyszczeń organicznych istotnie zwiększać potencjał degradacyjny endobiomu roślinnego, co jest szczególnie istotne dla efektywnej fitodegradacji.

Opisywane w literaturze światowej badania nad wspomaganą fitoremediacją skupiają się przede wszystkim na ocenie efektywności stosowanych szczepów do wspomaganego wzrostu roślin i obejmują głównie ocenę przyrostu biomasy części nadziemnych i korzeni, a przez to zwiększenia efektywności fitoekstrakcji metali ciężkich oraz fito- i rizo-degradacji związków organicznych. W zdecydowanej większości pomijają jednak zagadnienia związane z przeżywalnością inokulantów po wprowadzeniu do gleby, ich zdolnością do kolonizacji tkanek roślinnych, a także aktywnością metaboliczną mikroorganizmów po ich wprowadzeniu do gleby. Niewiele wiadomo również o zmianach w strukturze zespołów mikroorganizmów ryzosferowych i endofitycznych w odpowiedzi na inokulację gleby wprowadzanymi szczepami. Wyniki badań z ostatnich lat pokazują, że właśnie te aspekty mogą mieć kluczowe

znaczenie dla określenia czynników determinujących efektywność fitoremediacji, a także mogą być istotne w wyjaśnieniu przyczyn niepowodzeń wielu doświadczeń wspomaganej fitoremediacji (Kandel i in., 2017; Sasse i in., 2018; Sergaki i in., 2018).

W badaniach ekologicznych związanych z introdukcją bakterii do środowiska szczególną uwagę należy zwrócić na wpływ wprowadzanych w dużych ilościach bakterii na strukturę i bioróżnorodność zespołów bakterii glebowych, a w przypadku fitoremediacji także ryzosferowych i endofitycznych. Poszczególne gatunki roślin posiadają specyficzny mikrobiom ryzosferowy (ryzobiom) i endofityczny (endobiom). Uważa się, że mikrobiom ten ma istotny wpływ na rozwój roślin, ich kondycję oraz odporność na stres środowiskowy (Thijs i in., 2016). Co więcej, poszczególne odmiany tego samego gatunku są gospodarzem unikalnych zespołów mikroorganizmów, podobnie ten sam gatunek lub odmiana rośliny rosnąca w różnych środowiskach wykazuje charakterystyczną dla siebie strukturę zespołów mikroorganizmów ryzo- i endo-fitycznych. Dodatkowo, obserwuje się także istotne zmiany w strukturze ryzo- i endo-biomu wraz z rozwojem i starzeniem się roślin (Yang i in., 2017).

Publikowane do tej pory wyniki badań fitoremediacyjnych w niewielkim stopniu opisywały zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów glebowych i endofitycznych w czasie prowadzonych doświadczeń. Wraz z rozwojem technik sekwencjonowania i co za tym idzie redukcją kosztów tych analiz, sekwencjonowanie następnej generacji (NGS ang. *next generation sequencing*) wykorzystywane jest obecnie m.in. do badań struktury endobiomu roślin pobranych z terenów skażonych i nieskażonych i/lub poddanych ekspozycji na różne stężenia metali ciężkich i związków organicznych. Z zastosowaniem tej techniki badano również wpływ fitopatogenów, zarówno bakteryjnych, grzybowych, jak i zwierzęcych na strukturę mikrobiomu różnych roślin (Akinsanya i in., 2015; Tian i in., 2015; Wang i in., 2016a; Wang i in., 2016b; Battu i in., 2017), jednak liczba opracowań naukowych, w których badano zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów glebowych/ryzosferowych i endofitycznych w czasie wspomaganej fitoremediacji gleb skażonych z zastosowaniem technik biologii molekularnej, w tym NGS, jest wciąż niewielka.

Omówienie uzyskanych wyników

Praca nr 1

Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants.

W pierwszej pracy badano wpływ endofitycznych szczepów bakterii wyizolowanych z lepnicy rozdętej (*Silene vulgaris*) na efektywność fitoremediacji gleby skażonej metalami ciężkimi z zastosowaniem gorczycy białej (*Sinapis alba*) (Zal. 4 A). Ze względu na fakt, iż bakterie endofityczne wchodzą w bardzo ścisłe interakcje z tkankami roślin stanowią one bardzo przydatne narzędzie do stymulacji wzrostu roślin. Wprowadzone do gleby mogą zwiększać efektywność fitoremediacji zarówno po skutecznej rekolonizacji tkanek roślinnych, jak i kolonizacji strefy ryzosferowej korzenia. W doświadczeniach oprócz oznaczania potencjału szczepów do promowania wzrostu roślin określano także, czy metalooporne szczepy endofityczne izolowane z lepnicy rozdętej są w stanie skutecznie kolonizować i wspomagać wzrost rośliny należącej do innej grupy taksonomicznej. Zagadnienie to jest szczególnie istotne ze względów praktycznych, ponieważ „uniwersalne”, zdolne do wchodzenia w ścisłe i gatunkowo niespecyficzne interakcje z roślinami szczepy PGPE są szczególnie przydatne do wspomaganie fitoekstrakcji gleb skażonych metalami ciężkimi. Co więcej, takie szczepy mogą wspomagać fitoremediację z wykorzystaniem wielu gatunków roślin, zasiedlających różne rodzaje gleby w odmiennych warunkach geograficznych. Szczepy takie powinny również tolerować różny poziom skażenia gleby oraz być odporne na stres środowiskowy spowodowany na przykład warunkami klimatycznymi. Wykazano, że tkanki lepnicy rozdętej rosnącej na terenach silnie skażonych metalami ciężkimi są źródłem metaloopornych endofitów wykazujących potencjał do promowania wzrostu roślin. Spośród 24 testowanych szczepów 9 izolatów, należących do różnych rodzajów, w tym *Bacillus*, *Proteus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* i *Variovorax*, wykazywało aktywność co najmniej pięciu mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin. Do doświadczeń doniczkowych, z wykorzystaniem gorczycy białej (*Sinapis alba*) wykorzystano szczepy *Proteus vulgaris* H7, *Pseudomonas* sp. H15 oraz *Pseudomonas helmanticensis* H16. Szczepy H7 i H16 wykazywały aktywność 5 testowanych mechanizmów promowania wzrostu roślin, a szczep H15, jako jedyny, wykazywał dodatnie wyniki we wszystkich przeprowadzanych testach. Wszystkie szczepy wybrane do badań doniczkowych efektywnie produkowały

auksynę, amoniak oraz kwas cyjanowodorowy (czynnik biokontroli), intensywnie rozpuszczały fosforan trójwapniowy i wykazywały wysoką aktywność deaminazy ACC. Przy wyborze szczepów uwzględniono również wartości MIC (*ang. minimum inhibitory concentration*) dla kadmu i cynku, a także krzywe wzrostu szczepów w warunkach laboratoryjnych, co jest istotne do przygotowania w krótkim czasie dużej objętości inokulum bakteryjnego.

W doświadczeniach doniczkowych obejmujących wspomaganą fitoekstrakcję szczepy H7, H15 i H16 wprowadzano do gleby w liczbie 10^7 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby. W układach kontrolnych stosowano zawiesiny termicznie inaktywowanych szczepów, w których liczba bakterii przed autoklawowaniem również wynosiła 10^7 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby. Taką kontrolę zastosowano, żeby wykluczyć, iż obserwowany wpływ inokulanta na wzrost roślin wynikał z ich stymulacji spowodowanej uwolnieniem pierwiastków biogennych z komórek bakteryjnych zamierających bezpośrednio po wprowadzeniu do gleby.

Wprowadzenie żywych komórek (bioaugmentacja) szczepów H7, H15 i H16 powodowało zwiększenie świeżej masy części nadziemnych gorzycy odpowiednio o 75.5, 121.7 i 142.2% w stosunku do roślin kontrolnych. Podobną tendencję, ale mniej wyraźny efekt inokulacji obserwowano także dla korzeni gorzycy białej. Świeża masa korzeni roślin podlewanych zawiesiną żywych komórek szczepów H7, H15 oraz H16 była odpowiednio o 16.4, 35.6 i 51.2% większa w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Wyniki te wskazują iż obserwowany efekt stymulacji wzrostu roślin powodowany był aktywnością bakteryjnych mechanizmów promowania wzrostu roślin po wprowadzeniu szczepów do gleby, a nie wynikał ze stymulacji wzrostu roślin przez wprowadzoną martwą biomasę bakterii. Wykorzystane w doświadczeniu odporne na rifampicynę szczepy były izolowane z gleby ryzosferowej we wszystkich punktach czasowych podczas trwania 50-dniowego eksperymentu, co jest dodatkowym potwierdzeniem aktywnego udziału wprowadzanych szczepów w promowaniu wzrostu roślin. Najwyższy przyrost biomasy roślin obserwowano w układzie traktowanym żywym szczepem H16, który nie wykazywał zdolności do kolonizacji tkanek roślinnych, co sugeruje, iż do skutecznego wspomaganie wzrostu roślin kolonizacja wnętrza korzeni i części nadziemnych przez wprowadzane szczepy nie jest niezbędna. Kluczowym etapem wydaje się być efektywna kolonizacja, przez wprowadzane szczepy, gleby ryzosferowej i aktywność metaboliczna mikroorganizmów zasiedlających ten obszar. Kolonizacja wnętrza rośliny nie jest także niezbędna do efektywnego zwiększania akumulacji metali ciężkich przez wprowadzane szczepy w czasie wspomaganie fitoremediacji. Największy wzrost akumulacji Cd i Zn, w porównaniu z roślinami kontrolnymi, obserwowano w układzie, w którym wykorzystano żywe

komórki szczepu H16. W korzeniach roślin podlewanych szczepem H16 akumulacja Cd i Zn była większa odpowiednio o 22.4 i 43%, a w pędach o 112.6 i 43.8% w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Wszystkie wprowadzone do gleby szczepy w istotny sposób wpływały na wartość współczynnika translokacji (TF, *ang. translocation factor*) Cd i Zn z korzeni do części nadziemnych, przy czym największy wzrost TF (o 73.6%) dla Cd obserwowano dla roślin inokulowanych szczepem H16, który nie wykazywał zdolności do kolonizacji wnętrza korzeni gorczycy białej. Spośród szczepów wykorzystanych w badaniach doniczkowych *Pseudomonas helmanticensis* H16 wykazywał największą aktywność ACCD (158.9 nmol α -ketomasłanu $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$), efektywnie produkował auksynę (63.4 μg IAA mL^{-1} pożywki), a także wykazywał największą zdolność do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, co sprzyjało mobilizacji metali ciężkich w glebie, a także lepszemu zaopatrzeniu roślin w związki fosforu.

Kolejnym czynnikiem, który istotnie wpływa na efektywność wspomaganej fitoremediacji są interakcje pomiędzy wprowadzonymi szczepami a mikroorganizmami autochtonicznymi, które skutkują zmianami w liczebności, a także w strukturze zespołów mikroorganizmów oczyszczanych gleb. Wpływ bakteryjnego inokulum na liczebność bakterii autochtonicznych w glebie, w czasie wspomaganej fitoekstrakcji określano z zastosowaniem metody PCR w czasie rzeczywistym, która umożliwia oznaczenie liczby kopii genu 16S rRNA. Wykazano, że wprowadzenie zarówno żywych, jak i martwych komórek testowanych szczepów powodowało czasowe zwiększenie liczby kopii genu 16S rRNA. W dniu pierwszym istotnie statystycznie większą liczbę kopii testowanego genu w stosunku do kontroli obserwowano w układach traktowanych szczepem H7 i H16, jednak w miarę upływu eksperymentu różnice te zmniejszały się. W dniu 50 liczba kopii genu we wszystkich układach była porównywalna i nie wykazywała istotnych statystycznie różnic. Wynika to głównie z faktu, iż bezpośrednio po wprowadzeniu bakterii do gleby obserwuje się istotną redukcję liczby żywych i aktywnych komórek inokulowanego szczepu. Martwe komórki służą wówczas jako źródło łatwo dostępnych składników odżywczych, które przyczyniają się do szybkiego namnażania mikroorganizmów autochtonicznych. Podobną sytuację obserwowano również w układach kontrolnych do których wprowadzono jedynie zawiesinę martwych bakterii. Zwiększenie liczby bakterii autochtonicznych, wśród których wiele wykazuje aktywność mechanizmów promowania wzrostu, wspomaganych żywymi i aktywnymi komórkami wprowadzanego szczepu przyczyniło się do uzyskania lepszych efektów w układach, w których stosowano bioaugmentację.

Podsumowanie:

- Tkanki lepnicy rozdętej są źródłem metaloopornych bakterii endofitycznych wykazujących aktywność mechanizmów promowania wzrostu roślin.
- Szczepy *Proteus vulgaris* H7 oraz *Pseudomonas* sp. H15 nie były swoiste względem gospodarza roślinnego i wykazywały zdolność do kolonizacji wnętrza korzeni gorczycy białej.
- Na przykładzie endofitycznego szczepu *Pseudomonas helmanticensis* H16 potwierdzono, iż skuteczna kolonizacja tkanek roślinnych nie jest niezbędna do efektywnego wspomaganie fitoekstrakcji metali ciężkich przez bakterie endofityczne. Istotniejszą rolę odgrywa kolonizacja ryzosfery przez wprowadzane szczepy oraz wysoka przeżywalność i aktywność metaboliczna szczepu w strefie gleby przykorzeniowej.
- Inokulacja gleby żywymi komórkami testowanych szczepów powodowała istotnie statystycznie większą stymulację fitoekstrakcji w porównaniu z roślinami traktowanymi martwą biomasą. Wynik ten wskazuje, iż wprowadzone szczepy aktywnie wspomagały wzrost roślin i fitoekstrakcję metali ciężkich, a nie stanowiły jedynie źródła substancji odżywczych dla roślin.

Praca nr 2***Response of rhizospheric and endophytic bacterial communities of white mustard (*Sinapis alba*) to bioaugmentation of soil with the *Pseudomonas* sp. H15 strain.***

Aby w pełni wykorzystać potencjał bakterii wykazujących aktywność mechanizmów biochemicznych potencjalnie przydatnych do wspomaganie wzrostu roślin niezbędne jest poznanie ekologicznych konsekwencji bioaugmentacji gleby tymi szczepami. Uważa się, że istotne zmiany w strukturze mikroorganizmów ryzosferowych i endofitycznych roślin na skutek inokulacji do gleby PGPB, zarówno PGPR jak i PGPE, mogą warunkować sukces lub niepowodzenie wspomaganie fitoekstrakcji metali ciężkich z gleby. Poznanie tych zależności było celem badań, których wyniki opisano w kolejnej pracy (**Zal. 4 B**). W pracy tej określano wpływ wprowadzenia do gleby szczepu *Pseudomonas* sp. H15 na strukturę zespołów bakterii rizo- i endo-sfery gorczycy białej w czasie wspomaganie fitoekstrakcji. Należy podkreślić, że opublikowane wyniki badań są jednymi z pierwszych na świecie, w których z wykorzystaniem

techniki NGS, śledzono zmiany w strukturze zespołów bakterii ryzosferowych i endofitycznych w trakcie wspomaganej fitoekstrakcji metali ciężkich.

W warunkach laboratoryjnych szczep H15 wykazywał aktywność wszystkich testowanych mechanizmów promowania wzrostu roślin, ponadto produkował celulazę, a także był zdolny do ruchu. Akumulacja Cd i Zn w częściach nadziemnych roślin traktowanych tym szczepem była odpowiednio o 62.9 i 25.3% większa, w porównaniu z roślinami kontrolnymi, dodatkowo w roślinach podlewanych szczepem H15 wartość współczynnika translokacji Cd z korzeni do części nadziemnych była o 33% większa w porównaniu z kontrolą. Po wprowadzeniu do gleby, w której rosła gorczyca biała, szczep ten zasiedlał ryzosferę przez cały czas trwania eksperymentu, a 5 dni po inokulacji odporne na rifampicynę komórki szczepu H15 izolowano także z wnętrza korzeni gorzycy. Co istotne, komórki tego szczepu izolowano z korzeni aż do końca trwania doświadczenia.

Badania z zastosowaniem analizy NGS wykazały, iż w glebie ryzosferowej dominowały bakterie zaliczane do typów *Proteobacteria* (rzędy *Rhizobiales*, *Burkholderiales* i *Sphingomonadales*) i *Actinobacteria* (rzędy *Actinomycetales* i *Solirubrobacterales*). Wprowadzenie do gleby, żywych komórek szczepu H15 powodowało istotny wzrost udziału procentowego sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Pseudomonadales* (do 35.3%) w ryzosferze już 24 godziny po bioaugmentacji. Z kolei, udział procentowy sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Pseudomonadales* w glebie traktowanej martwą biomasą był niewielki i przez cały czas trwania eksperymentu nie przekraczał 0.5%. W glebie traktowanej żywym szczepem H15 udział procentowy sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Pseudomonadales* zmniejszał się w czasie trwania eksperymentu i osiągał wartość 2.6 i 0.5% odpowiednio w 7 i 28 dniu po inokulacji. Związany z inokulacją żywego szczepu wzrost udziału procentowego tych sekwencji miał charakter krótkotrwały, ich udział zmniejszał się wraz z czasem trwania eksperymentu i był skorelowany ze spadkiem liczby komórek szczepu H15 w glebie. Struktura zespołów bakterii zasiedlających ryzosferę roślin w ostatnim dniu eksperymentu, zarówno w układzie traktowanym żywym szczepem, jak i w kontroli podlewanej zawiesiną martwych bakterii, nie wykazywała istotnych różnic i była bardzo zbliżona do wyników uzyskanych dla kontroli 24 godziny po wprowadzeniu martwej biomasy bakterii. Obserwacje te potwierdza analiza PCoA zamieszczona w artykule (**Zał. 4 B, Rys. 4 A**).

Struktura zespołów bakterii zasiedlających korzenie roślin traktowanych żywym szczepem H15 i roślin kontrolnych podlewanych martwą biomasą różniła się istotnie, a zmiany

zachodzące w czasie trwania eksperymentu miały odmienny charakter. W pierwszym punkcie czasowym zespoły bakterii zasiedlających korzenie roślin kontrolnych były zdominowane przez przedstawicieli rzędu *Rhizobiales* (23.7%), *Actinomycetales* (17.3%) oraz *Rhodospiriales* (6.3%). Udział tych sekwencji malał w czasie trwania eksperymentu i w ostatnim punkcie czasowym wynosił odpowiednio 8.5, 4.2 i 0.1%. W tym samym czasie obserwowano istotny wzrost udziału sekwencji charakterystycznych dla *Flavobacteriales* (z 1.8 do 32.7%), *Burkholderiales* (z 4.7 do 28.3%) oraz *Caulobacteriales* (z 0.8 do 5.8%). W korzeniach roślin traktowanych żywym szczepem w pierwszym punkcie czasowym dominowały sekwencje charakterystyczne dla *Burkholderiales* (55.4%) i *Flavobacteriales* (35.7%). Udziały procentowe tych sekwencji zmieniały się w czasie trwania eksperymentu i w dniu 7 i 28 wynosiły odpowiednio dla *Burkholderiales* 19.6 i 22.3%, a dla *Flavobacteriales* 66.5 i 41.9%.

W pierwszym punkcie czasowym, 24 godziny po wprowadzeniu żywych lub martwych komórek testowanego szczepu, w endobiomie łodyg zaobserwowano istotny udział sekwencji charakterystycznych dla *Pseudomonadales* zarówno w układach, w których stosowano żywy szczep H15 (10.9%), jak i układach kontrolnych (49.2%). W kolejnych punktach czasowych udział sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Pseudomonadales* zmniejszył się istotnie i w obu układach nie przekraczał 1%. W kolejnych punktach czasowych w łodygach roślin traktowanych żywym i martwym szczepem dominowały rzędy *Burkholderiales* i *Flavobacteriales*, a dodatkowo w układach kontrolnych obserwowano istotny wzrost udziału procentowego sekwencji charakterystycznych dla *Sphingomonadales*.

Podobną tendencję dotyczącą udziału procentowego sekwencji *Pseudomonadales* obserwowano również w liściach roślin. Wykazano, że w tych częściach roślin dominujące sekwencje były charakterystyczne dla innych, nie obserwowanych w łodygach, rzędów, np. *Bacteroidales* i *Lactobacillales* (liście roślin kontrolnych) oraz dodatkowo *Clostridiales* występujące w liściach roślin traktowanych żywym szczepem H15. Wyraźne różnice w strukturze bakteryjnych zespołów pomiędzy korzeniami a częściami nadziemnymi gorczycy białej wskazują na to, iż bioróżnorodność bakterii w liściach i łodygach nie jest w pełni determinowana przez mikroorganizmy zasiedlające wnętrze korzeni i ryzosferę. Dodatkowo, bardzo niski procentowy udział sekwencji charakterystycznych dla rodzaju *Pseudomonas* w łodygach i liściach roślin traktowanych żywym szczepem H15 potwierdza wcześniejsze obserwacje, iż szczep ten nie kolonizuje części nadziemnych, a jego obecność w pędach nie jest niezbędna do promowania wzrostu roślin, zwiększania akumulacji Cd i Zn, a także wpływu na

wartość TF tych metali. Krótkotrwały, istotny wzrost udziału sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Pseudomonadales* w układach kontrolnych wynika z faktu iż DNA, uwolnione z komórek szczepu H15 w czasie autoklawowania, może być bardzo intensywnie pobierane przez rośliny, a następnie transportowane do liści, gdzie fosfor wchodzący w skład cząsteczek DNA jest wykorzystywany w procesie fotosyntezy. O wysokim tempie pobierania DNA przez gorczycę białą świadczy również fakt, iż zwiększonego udziału sekwencji *Pseudomonadales* nie obserwowano w ryzosferze i korzeniach nawet w pierwszym punkcie czasowym.

Podsumowanie:

- Wprowadzenie do gleby, w której rosła gorczyca biała, żywych komórek szczepu H15 powodowało odmienne zmiany w strukturze zespołów bakterii ryzosferowych i endofitycznych gorczycy białej w porównaniu z układem, w którym stosowano martwą biomasa bakterii.
- Wprowadzenie żywych komórek szczepu H15 powodowało jedynie krótkotrwałe zmiany w strukturze zespołów bakterii ryzosferowych gorczycy białej.
- Każda z badanych części gorczycy białej posiada swój charakterystyczny endobiom. Przykładowo, w liściach występowały szczepy z rzędów *Bacteroidales*, *Lactobacillales* oraz *Clostridiales* nie obserwowane w ryzosferze i innych częściach roślin.
- DNA bakteryjne uwolnione z martwej biomasy bakteryjnej jest bardzo szybko pobierane przez roślinę i transportowane do liści, a sekwencje termicznie inaktywowanego szczepu są wykrywane podczas sekwencjonowania i istotnie wpływają na strukturę badanych zespołów bakterii.

Wyniki opisane w pracach dotyczących wspomaganej fitoekstrakcji metali ciężkich (**Zał. 4 A i 4 B**) uzyskano realizując projekt badawczy OPUS 6 (2013/11/B/NZ9/00152) *Odpowiedź rośliny i endofitycznych zespołów bakterii na inokulację gleby metaloopornymi endofitami o zdolnościach promowania wzrostu roślin*, którego kierownikiem była prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget. W projekcie tym pełniłem funkcję głównego wykonawcy, a także byłem współautorem wniosku złożonego do Narodowego Centrum Nauki w Krakowie.

Rezultaty badań opisane w kolejnych artykułach (**Zał. 4 C i 4 D**) dotyczących izolacji i wykorzystania szczepów PGPB zdolnych do degradacji ropy naftowej i produkcji biosurfaktantów do wspomagania fitoremediacji gleb skażonych węglowodorami

ropopochodnymi uzyskano między innymi realizując projekty badawcze dla młodych pracowników nauki finansowane ze środków JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W projektach *Opracowanie metody wspomagania fitoremediacji gleb skażonych substancjami ropopochodnymi (2016)* oraz *Wykorzystanie bakterii produkujących związki powierzchniowo czynne i zdolnych do degradacji węglowodorów do wspomaganiej fitodegradacji związków ropopochodnych (2013)* pełniłem funkcję kierownika, byłem odpowiedzialny za przygotowanie wniosków projektowych, realizację badań, a także przygotowanie publikacji. Wyniki uzyskane w ramach realizacji tych projektów były również podstawą do przygotowania wniosku grantowego *Analiza ekspresji wybranych genów bakteryjnych i odpowiedź rośliny podczas wspomaganiej bakteriami endofitycznymi fitoremediacji gleb skażonych węglowodorami ropopochodnymi*, w ramach konkursu SONATA 12, który decyzją numer 2016/23/D/NZ9/01400 uzyskał finansowanie Narodowego Centrum Nauki w Krakowie. W projekcie tym pełnię funkcję kierownika i jest on obecnie w trakcie realizacji. Część wyników uzyskanych w ramach realizacji tego projektu, dotyczących wykorzystania PGPE i ramnolipidu do wspomagania bio- i fito-remediacji terenów skażonych węglowodorami ropopochodnymi, opublikowano w czasopiśmie *Agronomy* (**Zal. 4 E**).

Praca nr 3

Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits.

W kolejnej pracy opisano wyniki badań dotyczących izolacji i charakterystyki szczepów bakterii pozyskanych z gleby silnie skażonej węglowodorami ropopochodnymi pobranej z okolic rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach (**Zal. 4 C**). Co istotne, gleba ta została skażona kilkadziesiąt lat temu, co powoduje, że jest ona trudną matrycą do usuwania z niej zanieczyszczeń przy pomocy metod biologicznych. W glebach takich, na skutek odparowania i naturalnie przebiegających procesów samooczyszczania (naturalna atenuacja, fitoremediacja) najłatwiej degradowalne zanieczyszczenia zostały już usunięte, a pozostałe substancje należą do związków stosunkowo opornych na degradację mikrobiologiczną.

W celu efektywnej izolacji, bakterie glebowe namnażano wstępnie w płynnym podłożu mineralnym M9 z 1% (v/v) dodatkiem ropy naftowej. Następnie hodowlę bakteryjną posiewano na zestalone agarowo podłożu M9 z 1% (v/v) dodatkiem ropy naftowej. Wyizolowane szczepy zidentyfikowano następnie z wykorzystaniem analizy komórkowych kwasów tłuszczowych

(FAME) i oprogramowania Sherlock 6.0. Wśród 42 izolatów zdolnych do wykorzystywania ropy naftowej jako jedyne źródło węgla zdecydowanie dominowały szczepy *Rhodococcus erythropolis* (33). Wyizolowano również szczepy z rodzaju *Rahnella* (4), *Serratia* (3) oraz *Proteus* (1), a także jeden izolat, którego profil FAME nie występował w bazie TSBA 6.0 programu Sherlock. Dla wszystkich izolatów uzyskano pozytywny wynik testu *oil-spreading*, z czego dla 16 szczepów średnica przejaśnienia osiągała wartość powyżej 20 mm. Wyniki pozostałych testów wykazały zróżnicowane zdolności testowanych szczepów do produkcji związków powierzchniowo-czynnych. Przykładowo, jedynie 7 szczepów (CD 106, CD 154, CD 155, CD 157, CD 158, CD 166 oraz CD 167) obniżało napięcie powierzchniowe podłoża M9 z dodatkiem ropy (wyjściowe 70 mN m^{-1}) do wartości poniżej 60 mN m^{-1} . Dwadzieścia trzy szczepy wykazywały aktywność deaminazy ACC na poziomie wyższym niż $20 \text{ nmol } \alpha\text{-ketomałłanu mg}^{-1} \text{ białka h}^{-1}$, a 22 produkowały wiążące żelazo siderofory. Trzydzieści dwa szczepy produkowały auksynę, jednak w bardzo niskich stężeniach (poniżej $2.5 \text{ } \mu\text{g IAA mL}^{-1}$ pożywki), a najbardziej efektywny szczep CD 106 uwalniał $13.54 \text{ } \mu\text{g IAA mL}^{-1}$ pożywki. Spośród testowanych szczepów jedynie 15 wykazywało aktywność wszystkich testowanych mechanizmów bakteryjnego promowania wzrostu roślin, przy czym niejednokrotnie efektywność danego procesu była na minimalnym poziomie. W literaturze naukowej, jako najistotniejsze bakteryjne mechanizmy promowania wzrostu roślin, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju roślin i ich tolerancji stresów środowiskowych wymienia się zdolność szczepów do efektywnej produkcji auksyny, wysoką aktywność deaminazy ACC, a także zdolność do lepszego zaopatrywania roślin w składniki odżywcze takie jak żelazo, czy fosfor poprzez uwalnianie do gleby sideroforów czy kwasów organicznych (Sessitsch i in., 2013). Aktywność wszystkich kluczowych mechanizmów promowania wzrostu roślin zaobserwowano dla szczepu CD 106, który ponadto wykazywał wysoką zdolność do emulsyfikacji *p*-ksylenu (54.3%), obniżał wartość napięcia powierzchniowego podłoża M9 z dodatkiem ropy do wartości poniżej 60 mN m^{-1} , a średnica przejaśnienia warstwy ropy po dodaniu medium pochodowlanego w teście *oil-spreading* wynosiła powyżej 20 mm. Potencjalną przydatność szczepu CD 106 we wspomaganiu fitodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych z gleby potwierdziły również wyniki przeprowadzonej analizy głównych składowych (PCA). Uzyskane rezultaty wskazują, że szczep ten wprowadzony do gleby jako pojedynczy inokulant lub w konsorcjum z innym/innymi szczepami, a w szczególności aktywnie produkującymi związki powierzchniowo-czynne, może być przydatnym narzędziem przyspieszającym

biologiczne oczyszczanie gleby, na drodze biodegradacji i/lub wspomaganej fitoremediacji, gleb skażonych substancjami ropopochodnymi.

Podsumowanie:

- Dominującym gatunkiem hodowalnej frakcji bakterii zdolnych do degradacji surowej ropy naftowej w glebie pobranej z okolic rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach jest *Rhodococcus erythropolis*.
- Glebę pozakorzeniową zasiedlają szczepy bakterii wykazujących aktywność mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin. Dodatkowo wiele z nich wykazuje również zdolność do syntezy biosurfaktantów.
- Gleba historycznie skażona węglowodorami ropopochodnymi może być źródłem szczepów bakterii o potencjalnym wykorzystaniu we wspomaganie bio- i fitoremediacji. Szczepy te jako pojedyncze inokula lub konsorcja szczepów o uzupełniających się cechach mogą być wykorzystane do zwiększenia efektywności biologicznych metod oczyszczania terenów skażonych.

Praca nr 4

Improvement of phytoremediation of an aged petroleum hydrocarbon-contaminated soil by *Rhodococcus erythropolis* CD 106 strain.

Wyniki doświadczeń doniczkowych, w których do wspomagania bio- i fitoremediacji gleby skażonej substancjami ropopochodnymi zastosowano szczep *Rhodococcus erythropolis* CD 106 przedstawiono w kolejnej pracy (**Zał. 4 D**). Eksperyment obejmował 4 układy badawcze: (I) fitoremediacja wspomagana szczepem CD 106, [EP], (II) bioaugmentacja gleby szczepem CD 106, [B], (III) fitoremediacja, [P] oraz (IV) naturalna atenuacja, [S]. W doświadczeniach fitoremediacyjnych zastosowano glebę skażoną substancjami ropopochodnymi, których stężenie wynosiło około 1%, szczep CD 106 odporny na rifampicynę oraz życię trwałą (*Lolium perenne*) odmianę Pearlgreen, Ze względu na historyczne skażenie gleby zastosowano dłuższy czas trwania doświadczenia doniczkowego wynoszący 210 dni.

Po zakończeniu doświadczenia doniczkowego największy, wynoszący 31.2%, ubytek całkowitej zawartości węglowodorów ropopochodnych (TPH) obserwowano w układzie EP. Istotnie niższą redukcję stężenia zanieczyszczeń obserwowano w wariantach B oraz P, w

których zawartość TPH w glebie zmniejszyła się odpowiednio o 18.7 oraz 16.8%. Ze względu na specyfikę skażenia w testowanej glebie, ubytek TPH w układzie S wynosił jedynie 3.7%. Wprowadzony do gleby szczep charakteryzował się wysoką przeżywalnością. W czasie trwania eksperymentu obserwowano stopniowy spadek liczby komórek szczepu CD 106 w glebie, przy czym w początkowych tygodniach po inokulacji większy spadek obserwowano w układzie B, w porównaniu z EP. Mogło to być związane z „ochronną” rolą ryzosfery, która jest środowiskiem bogatym w łatwo dostępne składniki odżywcze, dzięki czemu mikroorganizmy w mniejszym stopniu wykorzystują zanieczyszczenie jako źródło węgla i energii. Jednak duża liczba mikroorganizmów zdolnych do produkcji związków powierzchniowo-czynnych zasiedlających ryzosferę, a także sama roślina mogą się również przyczyniać do gwałtownego zwiększenia biodostępności toksycznych zanieczyszczeń w glebie. Wynikające z tego pogorszenie się warunków środowiskowych w układzie EP może wpływać hamująco na tempo namnażania się mikroorganizmów w tej glebie, co mogło być przyczyną wyższej przeżywalności szczepu CD 106 w układach B, w kolejnych punktach czasowych. Po 30 tygodniach inkubacji liczba opornych na rifampicynę komórek szczepu CD 106 w układzie B wynosiła około 3.5×10^4 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby i była około dwukrotnie wyższa w porównaniu z glebą EP. Statystycznie istotny wyższy ubytek TPH w układach EP, w porównaniu z układem P był skorelowany z istotnie wyższą biomasą roślin traktowanych szczepem CD 106. Wykazano, iż biomasa części nadziemnych i korzeni roślin podlewanych testowanym szczepem była odpowiednio o 49 i 30% większa w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Rośliny o większej biomasie mogą pobierać i akumulować więcej zanieczyszczeń organicznych, dodatkowo rośliny takie może zasiedlać więcej endofitów zdolnych do degradacji substancji ropopochodnych. Również większa biomasa, a co za tym idzie większa powierzchnia korzeni przyczynia się do powiększenia bogatej w mikroorganizmy strefy ryzosferowej. Analiza profili fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA) wykonywana w czasie trwania eksperymentu, potwierdzona analizą głównych składowych (PCA), wykazała tymczasowy charakter zmian w strukturze mikroorganizmów zasiedlających oczyszczaną glebę, po wprowadzeniu testowanego szczepu. Potwierdzono również istotny udział rośliny w zwiększaniu liczby mikroorganizmów w glebie (efekt ryzosferowy). Po 4 tygodniach hodowli roślin, w glebie ryzosferowej stwierdzono statystycznie większą ilość PLFA (19.1 nmol PLFA g^{-1} s.m. gleby) w porównaniu z glebą bez roślin (15.7 nmol PLFA g^{-1} s.m. gleby). Wyniki te potwierdziły duży potencjał szczepu CD 106 do przyspieszania degradacji zanieczyszczeń w

procesach bioremediacji, a także zwiększania biomasy roślin w czasie wspomaganiej fitoremediacji gleby historycznie skażonej.

Podsumowanie:

- Spośród stosowanych technik biologicznego oczyszczania gleb skażonych substancjami ropopochodnymi największą skuteczność wykazywała fitoremediacja wspomagana szczepem *Rhodococcus erythropolis* CD 106.
- Powolny przebieg naturalnej atenuacji potwierdza fakt, iż gleba historycznie skażona substancjami ropopochodnymi jest trudną matrycą do oczyszczania z zastosowaniem metod biotechnologicznych.
- Inokulacja szczepu CD 106 do gleby, z której został on uprzednio wyizolowany sprzyja wysokiej przeżywalności szczepu w czasie trwania eksperymentu doniczkowego. Jednocześnie zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów autochtonicznych powodowane inokulacją gleby szczepem CD 106 miały charakter zmian krótkotrwałych.
- Zastosowanie życicy trwałej wraz ze zdolnym do degradacji węglowodorów ropopochodnych i produkcji biosurfaktantów szczepem PGPB *Rhodococcus erythropolis* CD 106 jest efektywnym narzędziem do oczyszczania gleb skażonych substancjami ropopochodnymi.

Praca nr 5

Comparative study on multiway enhanced bio- and phytoremediation of aged petroleum-contaminated soil.

W omówionych wcześniej pracach (nr 3 i 4) wykazano przydatność szczepów bakterii, głównie z rodzaju *Rhodococcus*, wyizolowanych z gleby silnie skażonej węglowodorami ropopochodnymi do wspomagania bio- i fito-remediacji tych gleb. W omawianej pracy badano przydatność endofitycznego szczepu *Rhodococcus erythropolis* CDEL254 wyizolowanego z tkanek życicy trwałej (*Lolium perenne*) rosnącej na terenach silnie skażonych węglowodorami do wspomagania procesów biologicznego oczyszczania gleby (**Zał. 4 E**). Szczep ten degradował ropę naftową, produkował związki powierzchniowo-czynne oraz wykazywał aktywność kluczowych mechanizmów promowania wzrostu roślin. W warunkach

laboratoryjnych szczep CDEL254 uwalniał 242 nmol α -ketomasłanu mg^{-1} białka h^{-1} oraz produkował 32 μg IAA w przeliczeniu na mL^{-1} pożywki. Dodatkowo szczep ten wykazywał zdolność do uwalniania amoniaku, rozpuszczania fosforanu trójwapniowego i produkcji kwas cyjanowodorowego. Na potencjał testowanego szczepu do kolonizacji tkanek roślinnych wskazywały zdolność do produkcji celulazy oraz jego ruchliwość.

W doświadczeniach doniczkowych wykorzystano glebę historycznie skażoną węglowodorami ropopochodnymi, których stężenie w przeliczeniu na kg^{-1} s.m. gleby wynosiło około 2.5%. Przygotowano 12 układów badawczych obejmujących bio- i fito-remediację wspomaganą żywym (bioaugmentacja) lub martwym (biostymulacja) szczepem CDEL254, oraz ramnolipidem, w stężeniu 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.m. gleby, a także układy kontrolne. Kontrolę stanowiły układy, w których rośliny nie były traktowane zawiesiną żywych lub martwych bakterii i ramnolipidem (fitoremediacja), a także nietraktowana gleba bez roślin (naturalna atenuacja). W badaniach wstępnych wykazano, iż roztwór ramnolipidu w stężeniu stosowanym w doświadczeniach doniczkowych nie hamował wzrostu roślin oraz namnażania szczepu CDEL254 w glebie nieskażonej. W celu śledzenia przeżywalności wprowadzonego szczepu w glebie oraz oceny jego zdolności do kolonizacji tkanek życicy w czasie trwania eksperymentu, do inokulacji wykorzystano odporne na rifampicynę, spontaniczne mutanty szczepu CDEL254 o takich samych właściwościach biochemicznych jak szczep wyjściowy.

Największą stymulację świeżej masy części nadziemnych obserwowano w układzie, w którym stosowano zawiesinę żywego szczepu CDEL254 i była ona wyższa o 27% w porównaniu z nieinokulowaną kontrolą. Sam ramnolipid, jak również ramnolipid wprowadzony równocześnie z żywymi komórkami CDEL254 powodował zmniejszenie świeżej masy części nadziemnych roślin o około 8% w obu tych układach w stosunku do roślin kontrolnych. Największy przyrost biomasy korzeni obserwowano w układach bez biosurfaktantu, w których stosowano zawiesinę żywych lub martwych komórek testowanego szczepu, a świeża masa korzeni takich roślin była odpowiednio o 43.6 i 40.2% większa w porównaniu z korzeniami roślin kontrolnych. Wprowadzenie samego ramnolipidu powodowało istotne statystycznie, wynoszące 19%, zmniejszenie biomasy korzeni w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Największy ubytek zawartości TPH obserwowano w układzie traktowanym żywym szczepem oraz ramnolipidem i wynosił on 31.1% po 112 dniach inkubacji. Jednak wynik ten nie był istotnie statystycznie wyższy od rezultatów uzyskanych dla pozostałych układów badawczych, z wyjątkiem naturalnej atenuacji (14.2%), fitoremediacji (17.4%) oraz gleby traktowanej zawiesiną martwych komórek (16.3%). W fitoremediacji wspomaganą szczepem

CDEL254, jego obecność w glebie stwierdzano, aż do końca trwania eksperymentu, podczas gdy w glebie bez roślin, żywe komórki szczepu CDEL254 izolowano do 60 dnia (bioaugmentacja z dodatkiem ramnolipidu) oraz 90 dnia (bioaugmentacja). Stosowany szczep kolonizował zarówno korzenie, jak i części nadziemne życicy trwałej, jednak efektywniejszą i dłużej trwającą kolonizację obserwowano w układzie, w którym oprócz żywego szczepu stosowano również ramnolipid. U roślin z tego układu obecność komórek szczepu CDEL254 obserwowano w częściach nadziemnych do 60 dnia trwania eksperymentu, a w korzeniach aż do końca jego trwania. W układzie, w którym stosowano jedynie testowany szczep kolonizacja korzeni i części nadziemnych miała charakter okresowy, a żywe komórki testowanego szczepu obserwowano w tych częściach odpowiednio do 60 i 30 dnia inkubacji.

W kolejnym etapie badań oceniano wpływ zastosowanych układów na liczbę kopii genu 16S rRNA w glebie. Dwadzieścia cztery godziny po wprowadzeniu żywych lub martwych komórek CDEL254 oraz ramnolipidu najniższą liczbę kopii genu 16S rRNA obserwowano we wszystkich układach bez roślin, do których wprowadzano roztwór ramnolipidu. Ich odpowiednie warianty w grupie doświadczeń fitoremediacyjnych charakteryzowały się istotnie statystycznie większą liczbą kopii badanego genu, co wskazywało na istotną rolę roślin w łagodzeniu stresu wywołanego prawdopodobnie gwałtownym zwiększeniem biodostępności zanieczyszczeń ropopochodnych po dodaniu roztworu ramnolipidu do gleby. W pozostałych układach badawczych, z wyjątkiem naturalnej atenuacji, do których ramnolipid nie był wprowadzany liczba kopii genu 16S rRNA była porównywalna i istotnie statystycznie większa niż w układach z biosurfaktantem. Podobną tendencję obserwowano również po 112 dniach eksperymentu doniczkowego, co wskazuje, że prowadzone zabiegi mające na celu zwiększenie efektywności procesów bio- i fito-remediacji wywołały trwałe zmiany w liczbie kopii genu 16S rRNA, co przekłada się również na liczebność bakterii zasiedlających oczyszczane gleby.

Podsumowanie:

- Endofityczny szczep *Rhodococcus erythropolis* CDEL254, zdolny do degradacji węglowodorów ropopochodnych, produkcji biosurfaktantów i promowania wzrostu roślin istotnie wspomaga procesy bio- i fito-remediacji terenów silnie skażonych węglowodorami ropopochodnymi.

- Po wprowadzeniu do gleby, szczep CDEL254 charakteryzował się dużą przeżywalnością w tym środowisku oraz kolonizował życie trwałą, przy czym dodatek ramnolipidu zwiększał efektywność kolonizacji.
- Wprowadzenie do gleby ramnolipidu w stężeniu $5 \mu\text{g g}^{-1}$ s.m. gleby nie zwiększało istotnie statystycznie efektywności bio- i fito-remediacji wspomaganą żywymi lub martwymi komórkami szczepu CDEL 254, a miało negatywny wpływ na biomasę roślin.
- Zastosowanie ramnolipidu powodowało istotne statystycznie obniżenie liczby kopii genu 16S rRNA w glebie, przy czym największy, w stosunku do kontroli, spadek liczby kopii tego genu obserwowano w układach, w których nie hodowano roślin. Tendencja ta miała trwały charakter i była obserwowana także w ostatnim dniu trwania eksperymentu.

Wnioski z przeprowadzonych badań:

- Metalooporne szczepy bakterii endofitycznych mogą być skutecznym czynnikiem zwiększającym efektywność fitoekstrakcji metali ciężkich z gleby.
- Podczas fitoekstrakcji wspomaganą metaloopornymi szczepami bakterii endofitycznych efektywna rekolonizacja tkanek roślinnych nie jest niezbędna do uzyskania wysokiej efektywności usuwania zanieczyszczeń.
- Wybrane szczepy bakterii endofitycznych izolowanych z lepnicy rozdętej nie są specyficzne względem gospodarza roślinnego i mogą wspomagać fitoekstrakcję metali ciężkich z zastosowaniem innej rośliny.
- Gleba skażona substancjami ropopochodnymi, a także tkanki roślin rosnących w tym środowisku, są źródłem szczepów przydatnych do wspomaganą fitoremediacji gleb skażonych, a szczególnie cenne są te, które wykazują zdolność do promowania wzrostu roślin, degradacji węglowodorów oraz produkcji związków powierzchniowo-czynnych.
- Szczepy wykorzystane w doświadczeniach charakteryzowały się wysoką przeżywalnością po wprowadzeniu do gleby i powodowały jedynie krótkotrwałe zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów ryzosferowych i endofitycznych.
- Wprowadzenie ramnolipidu do gleby historycznie skażonej, poprzez gwałtowne zwiększenie biodostępności zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie, może

powodować efekt toksyczny w stosunku do glebowych mikroorganizmów autochtonicznych i roślin.

- W celu dokładniejszego poznania interakcji pomiędzy mikroorganizmami a roślinami w czasie wspomaganej fitoremediacji niezbędne jest stosowanie metod molekularnych, takich jak metagenomika, metabolomika oraz transkryptomika, co jest przewidziane w kolejnych doświadczeniach z tego tematu.
- Wyniki otrzymane w ramach realizacji badań podstawowych są przydatne do opracowania aplikacyjnych zastosowań w biotechnologii środowiska.

Literatura

- Akinsanya, M.A., Goh, J.K., Lim, S.P., Ting, A.S.Y., 2015. Metagenomics study of endophytic bacteria in Aloe vera using next-generation technology. *Genomics Data* 6, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.09.004>
- Battu, L., Reddy, M.M., Goud, B.S., Ulaganathan, K., Kandasamy, U., 2017. Genome inside genome: NGS based identification and assembly of endophytic *Sphingopyxis granuli* and *Pseudomonas aeruginosa* genomes from rice genomic reads. *Genomics* 109, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.02.002>
- Gkorezis, P., Daghighi, M., Franzetti, A., Van Hamme, J.D., Sillen, W., Vangronsveld, J., 2016. The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Front. Microbiol.* 7, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01836>
- Kandel, S., Joubert, P., Doty, S., 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5, 1–26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
- Koshlaf, E., Ball, A.S., 2017. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiol.* 3, 25–49. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T., 2018. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 23, 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003>
- Sergaki, C., Lagunas, B., Lidbury, I., Gifford, M.L., Schäfer, P., 2018. Challenges and

- approaches in microbiome research: from fundamental to applied. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01205>
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 60, 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.012>
- Thijs, S., Sillen, W., Rineau, F., Weyens, N., Vangronsveld, J., 2016. Towards an enhanced understanding of plant-microbiome interactions to improve phytoremediation: engineering the metaorganism. *Front. Microbiol.* 7, 341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00341>
- Tian, B.Y., Cao, Y., Zhang, K.Q., 2015. Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots. *Sci. Rep.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep17087>
- Wang, W., Zhai, Y., Cao, L., Tan, H., Zhang, R., 2016a. Illumina-based analysis of core actinobacteriome in roots, stems, and grains of rice. *Microbiol. Res.* 190, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.003>
- Wang, W., Zhai, Y., Cao, L., Tan, H., Zhang, R., 2016b. Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice (*Oryza sativa* L.). *Microbiol. Res.* 188–189, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.009>
- Weyens, N., Lelie, D. Van Der, Taghavi, S., Newman, L., 2009. Exploiting plant – microbe partnerships to improve biomass production and remediation 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.006>
- Yang, R., Liu, P., Ye, W., 2017. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia Sect. Moutan*) roots and leaves. *Brazilian J. Microbiol.* 48, 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.009>

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od momentu zatrudnienia na etacie asystenta naukowo-dydaktycznego w Katedrze Mikrobiologii moje zainteresowania badawcze skupiają się wokół tematyki fitoremediacji terenów skażonych metalami ciężkimi i substancjami ropopochodnymi, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania bakterii promujących wzrost roślin (PGPB) do wspomagania tych procesów. Podczas studiów doktoranckich realizowałem grant promotorski *Bakterie jako*

czynniki zwiększające efektywność fitoekstrakcji metali ciężkich z gleby pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Piotrowskiej-Seget, a uzyskane wyniki były podstawą przygotowania rozprawy doktorskiej zatytułowanej *Wspomaganie fitoekstrakcji metali ciężkich przez metalooporne szczepy bakterii z rodzajów Brevibacterium, Enterobacter i Pseudomonas*. W pracy doktorskiej wykazałem, iż wybrane metalooporne szczepy bakterii glebowych, należące do rodzajów *Brevibacterium*, *Enterobacter* i *Pseudomonas* wykazują aktywność mechanizmów potencjalnie przydatnych do promowania wzrostu roślin. Szczepy te, po wprowadzeniu do gleby, istotnie wspomagały wzrost roślin, pobieranie i akumulację metali ciężkich przez gorczycę białą (*Sinapis alba*). Potwierdzono również, iż wprowadzone do gleby szczepy przeżywały w tym środowisku przez 28 dni doświadczenia doniczkowego, dodatkowo wykazano, że inokulacja bakterii do gleby powodowała jedynie krótkotrwałe zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów glebowych. Wyniki uzyskane podczas realizacji badań do pracy doktorskiej stanowiły podstawę do przygotowania dwóch artykułów naukowych opublikowanych w *Applied Soil Ecology* (2013, 63, 1-7) oraz *Chemosphere* (2013, 91, 1332-1337).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora kontynuowałem badania w zakresie fitoremediacji wspomaganej PGPB, a moje zainteresowania badawcze poszerzyłem o bakterie endofityczne, zarówno metalooporne, jak i zdolne do degradacji substancji ropopochodnych. Realizując grant *Odpowiedź rośliny i endofitycznych zespołów bakterii na inokulację gleby metaloopornymi endofitami o zdolnościach promowania wzrostu roślin*, kierowany przez prof. dr hab. Zofię Piotrowską-Seget, kontynuowałem badania z wykorzystaniem szczepu *Brevibacterium casei* MH8a, które wykazały duży potencjał tego szczepu do kolonizacji wnętrza roślin, pomimo tego, iż został on wyizolowany z gleby. Wyniki te uzupełniły charakterystykę tego szczepu wykonaną wcześniej w ramach pracy doktorskiej i zostały opublikowane w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* (2016, 7:101, 1-10). W ramach projektu pozyskałem również nowe szczepy metaloopornych bakterii endofitycznych z tkanek lepnicy rozdętej (*Silene vulgaris*) i dokonałem ich charakterystyki biochemicznej m.in. pod kątem aktywności mechanizmów odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin. Wybrane szczepy *Proteus vulgaris* H7, *Pseudomonas* sp. H15 oraz *Pseudomonas helmanticensis* H16 wykorzystałem w badaniach doniczkowych, a dla szczepu H15 śledziłem także wpływ jego inokulacji do gleby na strukturę zespołów bakterii ryzo- i endo-sfery gorczycy białej w czasie wspomaganej fitoremediacji. Uzyskane wyniki opublikowałem w dwóch artykułach naukowych w czasopiśmie *Chemosphere* (2019, 219, 250-260) oraz *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2020, 194:110434, 1-9).

Badania dotyczące izolacji i charakterystyki bakterii endofitycznych prowadziłem również we współpracy z dr Małgorzatą Pawlik, a obejmowały one pozyskanie zdolnych do degradacji substancji ropopochodnych endofitów promujących wzrost roślin z życicy trwałej (*Lolium perenne*). Uzyskane wyniki wykazały, iż rosnąca na terenie silnie skażonym substancjami ropopochodnymi życica trwała jest źródłem bakterii endofitycznych o pożądanych cechach, które mogą być wykorzystane do wspomagania procesów fitoremediacji. Wyniki te opublikowano w czasopiśmie *Chemosphere* (2015, 117, 40-46). Uczestniczyłem również w badaniach prowadzonych pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Hryniewicz z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, które obejmowały izolację oraz biochemiczną i genetyczną charakterystykę bakterii endofitycznych izolowanych z halofitów - astra solnego i solirodu zielnego. Istotnym elementem tych prac była również charakterystyka struktury zespołów mikroorganizmów endofitycznych, tych roślin, którą przeprowadziłem z wykorzystaniem analizy fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA). Wyniki tych prac zostały opublikowane w dwóch artykułach zamieszczonych w czasopiśmie *Microbiological Research* (2016, 182, 68-79 oraz 192, 37-51).

Zdolne do degradacji węglowodorów ropopochodnych bakterie endofityczne promujące wzrost roślin wykorzystuję również realizując projekt Sonata 12, którego jestem kierownikiem. W ramach projektu wyizolowałem bakterie endofityczne z jastruna właściwego (*Leucanthemum vulgare*), poziomki pospolitej (*Fragaria vesca*), brzozy brodawkowatej (*Betula pendula*), jastrzębca wysokiego (*Hieracium piloselloides*) oraz życicy trwałej (*Lolium perenne*) rosnących na terenie silnie skażonym substancjami ropopochodnymi w Czechowicach-Dziedzicach. Po dokonaniu charakterystyki biochemicznej, obejmującej określenie aktywności mechanizmów promowania wzrostu roślin, a także zdolności do syntezy związków powierzchniowo-czynnych, wybrane szczepy wykorzystuję w doświadczeniach doniczkowych, a pozyskany materiał roślinny wykorzystany zostanie do analiz transkryptomicznych. W ramach tego projektu przygotowałem artykuł *Comparative study on multiway enhanced bio- and phytoremediation of aged petroleum-contaminated soil*, który został opublikowany w czasopiśmie *Agronomy* (2020, 10, 947, 1-20).

W dalszym ciągu prowadzę i uczestniczę w badaniach bio- i fito-remediacyjnych z zastosowaniem szczepów glebowych. Zdolne do degradacji związków ropopochodnych szczepy *Rhodococcus erythropolis*, wykazujące aktywność mechanizmów promowania wzrostu roślin, wyizolowane w ramach badań, których wyniki opublikowano w *Journal of Environmental Management* (2016, 168, 175-184) wykorzystywano w doświadczeniach

bioremediacyjnych (*Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169, 615-622) oraz fitoremediacyjnych (*International Journal of Phytoremediation*, 2017, 19, 614-620). Uzyskane wyniki wskazują na bardzo duży potencjał tych szczepów do wspomagania biologicznych procesów usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z gleby.

Do głównego nurtu moich zainteresowań badawczych należy również zagadnienie związane z analizą zespołów mikroorganizmów glebowych i endofitycznych, do czego wykorzystywałem analizę komórkowych kwasów tłuszczowych (*FAME*, ang. *fatty acid methyl ester*), fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (*PLFA*, ang. *phospholipid fatty acid*), elektroforezę w gradiencie czynnika denaturującego (*DGGE*, ang. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), a w ostatnim okresie także sekwencjonowanie następnej generacji (*NGS*, ang. *Next Generation Sequencing*). Wyniki prac dotyczących tego zagadnienia opublikowano w szeregu artykułów naukowych w czasopismach: *Water Air and Soil Pollution* (2011, 214, 205-218); *Applied Soil Ecology* (2013, 63, 1-7); *Journal of Soils and Sediments* (2013, 13, 1430-1438); *Microbiological Research* (2016, 182, 68-79 oraz 192, 37-51); *Frontiers in Plant Science* (2016, 7:101, 1-10); *Talanta*, (2016, 160, 148-156); *International Journal of Phytoremediation* (2017, 19, 614-620); *PLoS One* (2017, 12(11):e0187852, 1-18); *Water Air and Soil Pollution* (2018, 229:13, 1-13) oraz *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2019, 169, 615-622 i 2020, 194:110434, 1-9).

Do moich zainteresowań badawczych należą również zagadnienia związane z fizjologiczną odpowiedzią roślin na wprowadzenie do gleby PGPB/PGPE, obecność zanieczyszczeń, czy stres suszy. Do badań tych wykorzystuję chromatografię gazową (*GC-FID*, ang. *gas chromatography coupled with flame ionization detector*), chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (*GCMS*, ang. *gas chromatography coupled with mass spectrometry*), a także wysokosprawną chromatografię cieczową (*HPLC*, ang. *high-performance liquid chromatography*). Technikę HPLC wykorzystywałem do oznaczenia zawartości kwasu abscysynowego u roślin poddanych stresowi suszy. Wyniki tych badań prowadzonych we współpracy z dr Agatą Daszkowską-Golec z Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach opublikowano w *Frontiers in Plant Science* (2017, 8:942, 1-24), a także w artykule Daszkowska-Golec A., Skubacz A., Sitko K., Słota M., Kurowska M., Szarejko I. 2018. *Mutation in barley ERA1 (Enhanced Response to ABA1) gene confers better photosynthesis efficiency in response to drought as revealed by transcriptomic and physiological analysis* opublikowanym w *Environmental and Experimental Botany*, 148, 12–26. We współpracy z dr Daszkowską-Golec, metodą GCMS, uzyskałem również profile

wosków jęczmienia i rzodkiewnika pospolitego, a także ich mutantów w genie *CBP20* (*Cap-Binding Protein 20*), które wykazały, iż wyższa odporność mutantów na suszę jest związana z większą depozycją wosków i ich odmiennym składem w porównaniu do typów dzikich. Wyniki tych analiz zamieszczono w artykule *Cuticular waxes - a shield of barley mutant in CBP20 (Cap-Binding Protein 20) gene when struggling with drought stress*, który został zaakceptowany do publikacji w czasopiśmie *Plant Science* (2020, w druku, DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110593).

Plany badawcze:

W najbliższej perspektywie czasowej planuję kontynuować badania dotyczące interakcji pomiędzy mikroorganizmami a roślinami w czasie wspomaganej fitoremediacji. Badania te prowadzone będą na poziomie fizjologicznym i molekularnym. Szczególnie interesującym mnie zagadnieniem są mechanizmy odpowiedzi rośliny na wprowadzane szczepy, dzięki którym dochodzi do zwiększenia efektywności pobierania metali i degradacji substancji organicznych. Do oznaczeń wybranych metabolitów roślinnych (np. glutationu, kwasu abscysynowego, proliny) wykorzystywał będę wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-MS). Planuję również oznaczenia enzymatyczne (np. aktywność enzymów antyoksydacyjnych), a także analizę transkryptomu roślinnego z wykorzystaniem techniki mRNA-Seq. Część z tych analiz jest przewidziana do wykonania w projekcie SONATA12, który jest obecnie w trakcie realizacji.

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

Współpracę z prof. Martinem Romantschukiem (**Zał. 6 A str. 1**) i dr. Aki Sinkkonenem (**Zał. 6 B**) z Uniwersytetu w Helsinkach w Finlandii rozpocząłem w 2008 roku, w którym uzyskałem możliwość wyjazdu na 3-miesięczne praktyki w zagranicznej instytucji naukowej w ramach programu LLP-Erasmus. Praktyki te odbywałem w Department of Ecology and Environmental Sciences w Lahti. W czasie praktyk nauczyłem się wybranych technik biologii molekularnej, a w szczególności metody elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE), którą z powodzeniem stosowałem w badaniach po powrocie do Polski. Wyniki uzyskane przeze mnie w czasie praktyk wykorzystano w pracy naukowej *Kauppi S.*,

Romantschuk M., Strömmer R., Sinkkonen A. 2012. *Natural attenuation is enhanced in previously contaminated and coniferous forest soils. Environmental Science and Pollution Research*, 19, 53–63, czego potwierdzenie znajduje się w sekcji Acknowledgments w/w artykule (Załącznik 6 C). W trakcie pierwszego pobytu w Lahti wykonałem także analizy, których wyniki zamieściłem w przygotowanym we współpracy z prof. Romantschukiem i dr. Sinkkonenem manuskrypcie opublikowanym w *Applied Soil Ecology* (63, 1-7) (Załącznik 6 D). W 2009 na zaproszenie dr. Sinkkonena odbyłem 2-miesięczny staż naukowy, w czasie którego wykonywałem analizy molekularne, a także uczestniczyłem w planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów bioremediacyjnych. W czasie tego stażu zapoznałem się również z technikami wysokosprawnej chromatografii cieczonej i chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Wyniki prowadzonych przeze mnie analiz zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Soils Sediments* (13, 1430-1438) (Załącznik 6 E) i zaprezentowane na konferencji ISME 14 – *The power of the small. The 14th International Symposium on Microbial Ecology*, Kopenhaga, Dania w 2012 roku.

W 2011 roku zostałem ponownie zaproszony przez prof. Romantschuka do uczestnictwa w badaniach realizowanych w ramach projektu LIMES (*Limits of microbial evolution in soil*), finansowanego przez Academy of Finland. W czasie 4-miesięcznego pobytu w Department of Environmental Sciences w Lahti uczestniczyłem w planowaniu i realizacji doświadczeń bioremediacyjnych gleb skażonych zanieczyszczeniami organicznymi, a także przeprowadzałem badania mające na celu określenie bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających gleby zanieczyszczone metalami ciężkimi. Wyniki prowadzonych doświadczeń bioremediacyjnych opublikowano w dwóch czasopismach: *PLoS ONE* (12(11):e0187852, 1-18) oraz *Water Air and Soil Pollution* (229:13, 1-13) (Załącznik 6 F i 6 G).

Efektom wieloletniej współpracy z naukowcami z Department of Environmental Sciences w Lahti jest również artykuł dotyczący przeżywalności wprowadzonego do gleby ryzosferowego szczepu *Brevibacterium casei* MH8a i jego zdolności do kolonizacji roślin w czasie wspomaganą fitoremediacją gleb skażonych, który został opublikowany w *Frontiers in Plant Science* (7:101, 1-10) (Załącznik 6 H).

W kolejnych latach wraz z dr. Sinkkonenem i prof. Romantschukiem podejmowałem próby pozyskania środków na realizację badań w ramach programów finansowanych ze środków Unii Europejskiej: *Joint Programming Initiatives Water Challenges for a Changing World Agriculture, Food Security and Climate Change, 2016 (projekt Monitoring and reducing impacts of agrochemical contaminants)*, *ForestValue – Innovating the forest-based*

bioeconomy, 2017 (projekt Innovative Microbiological, Immunomodulatory and Biochemical Concepts of Forest-Based Products) oraz *Interreg Regionu Morza Bałtyckiego w osi priorytetowej 2: Efektywne zarządzanie zasobami naturalnymi, 2019 (projekt Comprehensive Baltic Sea pollution reversion initiative)*. W tym czasie zajmowałem się również organizowaniem przyjazdów zarówno prof. Romantschuka, jak i dr. Sinkkonena na Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W czasie ich wizyt, w trakcie spotkań naukowych, wielokrotnie prezentowałem wyniki prowadzonych przez siebie, a także we współpracy z prof. Romantschukiem i dr. Sinkkonenem badań.

W listopadzie 2019 roku w ramach współpracy z prof. Romantschukiem pełniłem funkcję eksperta zewnętrznego w ramach projektu *Nanorauta (fin. nanożelazo) - Combinations of nZVI, biostimulation, and electrokinetics in laboratory and field scale enabling profitable business for local remediation entrepreneurs* w Lahti, gdzie wygłosiłem wykład *Biosurfactant-producing bacteria in the bioaugmentation of soils contaminated with petroleum compounds*.

Jednocześnie nie ustaję w próbach pozyskania środków na prowadzenie badań naukowych, we współpracy z naukowcami z Finlandii. W kwietniu 2020 roku złożony został wniosek projektowy w ramach programu Horizon 2020 (*tytuł projektu: Novel Phytoremediation Strategies Integrating Ecorestoration and Clean Biofuel Production, numer wniosku 101006938*) finansowanego przez Komisję Europejską. Wraz z prof. dr hab. Zofią Piotrowską-Seget, liderem drugiego zadania badawczego, we współpracy z prof. Romantschukiem, inicjatorem przygotowania wniosku i koordynatorem Dr. Panagiotisem Kougiąsem z Soil and Water Resources Institute (SWRI) opracowałem część wniosku projektowego dotyczącą oczyszczania terenów skażonych z zastosowaniem fitoremediacji wspomaganą mikroorganizmami promującymi wzrost roślin.

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

Od chwili zatrudnienia na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego w 2005 roku realizuję zajęcia laboratoryjne ze studentami studiów I i II stopnia z zakresu mikrobiologii ogólnej, mikrobiologii środowiskowej i biotechnologii. Od grudnia 2012 roku, po przejściu na etat adiunkta naukowo-dydaktycznego, prowadzę również wykłady w ramach modułów: *Podstawy biotechnologii, Biotechnologia mikroorganizmów, Metody biotechnologiczne w ochronie środowiska oraz Biotechnologia roślin*. W latach 2012-2013 dla doktorantów WBiOŚ

w ramach studiów doktoranckich *Advanced Methods in Biotechnology and Biodiversity* prowadziłem anglojęzyczne zajęcia *Techniques for biodiversity of soil microorganisms*.

Od roku 2010 pełniłem rolę promotora 17 prac licencjackich, a także sprawowałem opiekę merytoryczną nad 11 magistrantami, których promotorem była prof. dr. hab. Zofia Piotrowska-Seget. Byłem również recenzentem pracy licencjackiej, a także członkiem komisji w czasie egzaminów licencjackich i magisterskich.

W roku 2017 na zaproszenie prof. Rauni Strömmer pełniłem funkcję recenzenta pracy magisterskiej *Comparison of volatile PAH concentrations in urban and rural areas in Päijät-Häme* autorstwa Heli K. Vari, a wykonanej pod kierownictwem naukowców z Katedry Nauk o Środowisku Uniwersytetu Helsińskiego w Lahti (Aki Sinkkonen, Anna-Lea Rantalainen i Anirudra Parajuli).

W ramach projektu UPGOW (Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy) finansowanego ze środków Unii Europejskiej byłem współautorem dwóch kursów e-learningowych: *Wykorzystanie mikroorganizmów w ochronie środowiska (2009)* oraz *Mikrobiologia środowiskowa (2013)* umieszczonych na platformie Moodle Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Kursy te wciąż są popularne wśród studentów i są wykorzystywane jako źródło informacji niezbędnych do realizacji wielu modułów związanych z biotechnologią środowiska. W ramach projektu ATRINBIOTECH – *Atrakcyjna i Innowacyjna Biotechnologia* przygotowałem autorski program i prowadziłem zajęcia laboratoryjne oraz wykłady z przedmiotu *Ekologia mikroorganizmów*. W latach 2018-2019 w ramach projektu *Innovative Start*, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej przygotowałem i prowadziłem autorski kurs: *Warsztaty aparaturowe z zakresu chromatografii*. Projekt ten miał na celu podniesienie kompetencji zawodowych studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w odpowiedzi na oczekiwania przyszłych pracodawców.

Jednocześnie staram się w sposób ciągły podnosić swoje kompetencje dydaktyczne poprzez udział w kursach organizowanych m.in. w ramach projektu SWAN – *Szkolnictwo Wyższe Atrakcyjne i Nowoczesne* – Podnoszenie kompetencji dydaktycznych kadry akademickiej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Ukończyłem następujące kursy i szkolenia:

- kurs: Wystąpienia i prezentacje w języku angielskim, 2019
- certyfikowane szkolenie: Tutor II stopnia, 2018
- certyfikowane szkolenie: Tutor I stopnia, 2017
- certyfikowane szkolenie: Grywalizacja jako narzędzie w edukacji akademickiej, 2017

W 2018 roku byłem tutorem lic. Natalii Ptaszek, w ramach projektu *Tutornig dla najlepszych studentów Uniwersytetu Śląskiego*. W ramach tego projektu studentka realizowała badania, a także analizowała otrzymane wyniki. Efektem tych aktywności jest publikacja *Comparative study on multiway enhanced bio- and phytoremediation of aged petroleum-contaminated soil* przygotowana pod moim kierunkiem.

Staram się również nieustannie podnosić swoje kompetencje w zakresie obsługi aparatury i oprogramowania. Ponieważ w swoich badaniach w coraz szerszym zakresie korzystam z technik chromatografii ciekłowej (HPLC) i gazowej (GC), a także chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GCMS), w celu podniesienia swoich kompetencji uczestniczyłem w następujących szkoleniach:

- szkolenie: *Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas we współczesnej chemii analitycznej* w ramach Akademii Chemii Analitycznej, Jachranka 2019
- warsztaty: *Warsztaty z oprogramowania w zakresie HPLC-DAD-FLD* – zostań ekspertem w LabSolutions, Kraków 2016

Wiedzę nabytą w czasie tych szkoleń wykorzystuję w działalności naukowej, a także podczas zajęć ze studentami (moduły: *Analiza instrumentalna, Metody biotechnologiczne w ochronie środowiska, Technologie stosowane w ochronie środowiska*).

W roku 2014 odbyłem również staż naukowo-dydaktyczny w ramach projektu NITKA, finansowanego ze środków Unii Europejskiej. Podczas miesięcznego pobytu w *Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra w Portugalii* zapoznałem się z tematami badawczymi i technikami stosowanymi przez członków grupy kierowanej przez prof. Helenę Freitas. W czasie stażu izolowałem i charakteryzowałem endofityczne bakterie promujące wzrost roślin, a także badałem ich wpływ na aktywność wybranych mechanizmów roślinnej obrony przed stresem. Istotnym celem tego stażu było również zapoznanie się z ofertą dydaktyczną i sposobem prowadzenia zajęć w w/w jednostce.

W czasie swojej pracy dydaktycznej pełniłem również rolę opiekuna naukowego Studenckiego Interdyscyplinarnego Koła Naukowego Planeta, sekcja fizjologii roślin. Bardzo miłym i ważnym dla mnie wyrazem uznania ze strony studentów jest nagroda „Złoty Mikroskop w kategorii przyjaciel studenta”, którą otrzymałem w roku 2018 z rąk Przewodniczącego Samorządu Studenckiego WBiOŚ.

W ramach swojej pracy dydaktycznej pełniłem również wielokrotnie rolę recenzenta prac w ramach Olimpiady Biologicznej dla młodzieży licealnej. Angażowałem się także w działania Wydziału mające na celu popularyzację nauki, poczynając od udziału w „Dniach

otwartych” WBiOŚ, podczas których prowadziłem zajęcia praktyczne z zakresu mikrobiologii dla młodzieży licealnej. Wygłaszałem także wykłady popularno-naukowe dla młodzieży gimnazjalnej i licealnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŚ w Katowicach, w Pałacu Młodzieży w Katowicach, a także w ramach aktywności Centrum Studiów nad Człowiekiem i Środowiskiem Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Od roku 2012 angażowałem się w przygotowanie i prowadzenie zajęć w ramach Ogólnopolskiej Nocy Biologów, a w roku 2017 pełniłem rolę Wydziałowego Koordynatora VI Ogólnopolskiej Nocy Biologów nawiązując współpracę z Instytutem Badawczym Leśnictwa z Sękocina Starego w zakresie realizacji tego przedsięwzięcia.

W ramach działalności organizacyjnej w latach 2013-2018 roku pełniłem funkcję Wydziałowego Koordynatora ds. praktyk zawodowych dla studentów na kierunku Biotechnologia, dwukrotnie pełniłem również rolę członka Komisji rekrutacyjnej WBiOŚ. Od 2005 współorganizowałem, a także czynnie uczestniczyłem, jako prelegent, w seminariach organizowanych przez WBiOŚ w ramach programu LLP-Erasmus, w których udział brali naukowcy m.in. z Niemiec, Włoch, Finlandii, Anglii. W roku 2011 byłem współorganizatorem posiedzenia Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach. W 2020 roku społeczność akademicka powierzyła mi funkcję członka kolegium elektorów wybierających Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach na nową kadencję.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.

W ramach działalności naukowej wykonywałem również analizy, których wyniki zamieszczono w następujących publikacjach (**Zał. 7 A-D**):

- Kauppi S., Romantschuk M., Strömmer R., Sinkkonen A. 2012. Natural attenuation is enhanced in previously contaminated and coniferous forest soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 53–63, DOI: 10.1007/s11356-011-0528-y (**Zał. 7 A**)
- wykonałem analizy molekularne, których wyniki zamieszczono w pracy
- Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z. 2016. Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-

degrading strains. *Applied Soil Ecology*, 105, 76-85, DOI: 10.1016/j.apsoil.2016.04.005
(Załącznik 7 B)

- przy użyciu GC-FID wykonałem oznaczenia zawartości TPH w glebie, a także uzyskałem profile PLFA izolowanych z gleby

- Daszkowska-Golec A., Skubacz A., Sitko K., Słota M., Kurowska M., Szarejko I. 2018. Mutation in barley ERA1 (Enhanced Response to ABA1) gene confers better photosynthesis efficiency in response to drought as revealed by transcriptomic and physiological analysis. *Environmental and Experimental Botany*, 148, 12–26, DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.01.003 (Załącznik 7 C)

- izolowałem i oznaczałem, z zastosowaniem HPLC, zawartość kwasu abscysynowego (ABA) w tkankach roślin

- Krzyżowski M., Baran B., Łozowski B., Francikowski J. 2020. The effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil fumigation on biochemical, behavioral, and physiological parameters of *Callosobruchus masculatus*. *Insects*, 11, 344, DOI: 10.3390/insects11060344 (Załącznik 7 D)

- metodą GC-MS wykonałem analizę składu olejku rozmarynowego wykorzystanego w eksperymencie

Za działalność naukową otrzymałem następujące nagrody (Załącznik 8):

1. Nagroda Indywidualna JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach II stopnia za działalność naukowo-badawczą, 2018
2. Nagroda Zespołowa JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach I stopnia za działalność naukowo-badawczą, 2017
3. Dodatek jakościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, za wyniki pracy naukowej, 2015

30.07.2020

Tomasz Płociniczak