

Autoreferat

1. IMIĘ I NAZWISKO

Magdalena Pacwa-Płociniczak

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 2016 **Doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Wykorzystanie bakterii produkujących biosurfaktanty w bioremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi*.
Promotor: prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget
Kopromotor: prof. dr hab. Grażyna Płaza
Rozprawa doktorska została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska z dnia 24.06.2016 oraz nagrodzona Nagrodą Naukową Rektora Uniwersytetu Śląskiego
- 2009 **Dyplom magistra** (Kierunek: Biotechnologia, Specjalność: Biotechnologia roślin i mikroorganizmów), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- 2007 **Dyplom licencjata** (Kierunek: Biotechnologia), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH

- 01.10.2016 - obecnie: **adiunkt naukowo-dydaktyczny**, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach
- 13.10.2014 - 30.09.2016: **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 Z DNIA 20 LIPCA 2018R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.)

a) Temat osiągnięcia naukowego:

Wspomaganie bio- i fito-remediacji gleb skażonych

b) Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, wraz z określeniem indywidualnego wkładu w ich powstanie

Załącznik	Dane bibliograficzne	IF ¹	MNiSW ²	Cytowania ³
4A	Pacwa-Płociniczak M. , Czapla J., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z. 2019. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with <i>Rhodococcus erythropolis</i> strains on removal of petroleum from soil. <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> 169, 615-622	4,872	100	45 (68) ⁴
	<i>Wkład w powstanie publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (charakterystyka molekularna szczepów bakterii, współudział w przeprowadzeniu doświadczenia bioaugmentacyjnego, izolacja RNA z gleby, przeprowadzenie PCR w czasie rzeczywistym z użyciem odwrotnej transkryptazy, wykonanie analiz statystycznych), interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, autor korespondencyjny, kierownik projektu PRELUDIUM 2, w ramach, którego prowadzono badania.</i>			
4B	Pacwa-Płociniczak M. , Binińska P., Bondarczuk K., Piotrowska-Seget Z. 2020. Metagenomic functional profiling reveals differences in bacterial composition and function during bioaugmentation of aged petroleum-contaminated soil. <i>Frontiers in Microbiology</i> 11, 2106, 1-12	5,64	100	19 (28)
	<i>Wkład w powstanie publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu bioaugmentacyjnego, wykonanie części analiz bioinformatycznych, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, autor korespondencyjny, kierownik projektu SONATA 14, w ramach, którego prowadzono badania.</i>			

4C	Pacwa-Płociniczak M. , Byrski A., Chlebek D., Prach M., Płociniczak T. 2023. A deeper insight into phytoremediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons supported by the <i>Enterobacter ludwigii</i> ZCR5 strain. <i>Applied Soil Ecology</i> 181, 104651	4,8	140	8 (8)
	<i>Wkład w powstanie publikacji: współudział w koncepcji pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (izolacja i charakterystyka szczepu ZCR5, współudział w przeprowadzeniu doświadczenia fitoremediacyjnego, izolacja RNA z tkanki roślinnej, współudział w przeprowadzeniu PCR w czasie rzeczywistym z użyciem odwrotnej transkryptazy, wykonanie analiz statystycznych), interpretacja wyników, wiodąca rola w przygotowaniu manuskryptu, udział w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, autor korespondencyjny.</i>			
4D	Chlebek D., Płociniczak T., Gobetti S., Kumor A., Hupert-Kocurek K., Pacwa-Płociniczak M. 2022. Analysis of the genome of the heavy metal resistant and hydrocarbon-degrading rhizospheric <i>Pseudomonas qingdaonensis</i> ZCR6 strain and assessment of its plant-growth-promoting traits. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> 23, 214, 1-28	5,6	140	14 (20)
	<i>Wkład w powstanie publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (izolacja i częściowa charakterystyka właściwości biochemicznych szczepu ZCR6, izolacja DNA genomowego szczepu ZCR6), interpretacja wyników, wiodąca rola w przygotowaniu manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, autor korespondencyjny, kierownik projektu SONATA 14, w ramach, którego prowadzono badania.</i>			
4E	Pacwa-Płociniczak M. , Kumor A., Bukowczan M., Sinkkonen A., Roslund M., Płociniczak T. 2024. The potential of enhanced phytoremediation to clean up multi-contaminated soil – insights from metatranscriptomics. <i>Microbiological Research</i> 284, 127738	6,1*	100	0 (0)
	<i>Wkład w powstanie publikacji: koncepcja pracy, projekt i wykonanie eksperymentu (współudział w przeprowadzeniu doświadczenia fitoremediacyjnego, izolacja RNA z gleby, przeprowadzenie PCR w czasie rzeczywistym z użyciem odwrotnej transkryptazy, wiodąca rola w wykonaniu</i>			

	<i>analiz bioinformatycznych, wykonanie analiz statystycznych), interpretacja wyników, wiodąca rola w przygotowaniu manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, autor korespondencyjny, kierownik projektu SONATA 14, w ramach, którego prowadzono badania.</i>
Sumaryczny IF ¹ publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 27,012	
Sumaryczna liczba punktów MNiSW ² publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 580	
Sumaryczna liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Scopus ³ : 86	
Sumaryczna liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Google Scholar ⁴ : 124	

¹ Wartość wskaźnika Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) podano zgodnie z rokiem ich opublikowania, *wyjątkiem jest publikacja 4E dla której podano wartość IF z roku 2023;

² Punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z punktacją określoną w wykazie czasopism naukowych, obowiązującym na koniec roku kalendarzowego, w którym ukazała się publikacja;

³ Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Scopus na dzień 27.08.2024

⁴ Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Google Scholar na dzień 27.08.2024

Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego nie były i nie będą wykorzystane w żadnym innym postępowaniu habilitacyjnym. Oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zamieszczono w **załączniku numer 5**.

c) Merytoryczny opis prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Wprowadzenie

Zanieczyszczenie środowiska jest jednym z największych problemów, z jakimi mierzy się współczesny świat. Najnowsze dane wskazują, iż nawet 2,5 miliona lokalizacji w Europie może być potencjalnie skażonych. Wśród zanieczyszczeń występujących w środowisku najczęściej spotykane są węglowodory ropopochodne (PHs, *ang. petroleum hydrocarbons*) i metale ciężkie (HMs, *ang. heavy metals*), które na terenach przemysłowych, bardzo często występują łącznie (European Environment Agency, 2021). Zanieczyszczenia te mają negatywny wpływ na funkcjonowanie całych

ekosystemów, a ze względu na właściwości mutagenne i cytotoksyczne stanowią poważne zagrożenie także dla zdrowia człowieka. W ostatnich latach intensyfikowane są badania nad opracowaniem skutecznych, niedrogich, a przede wszystkim przyjaznych dla środowiska technologii remediacji terenów zanieczyszczonych. Mając na uwadze te wymagania, coraz częściej w oczyszczaniu środowisk skażonych dostrzegany jest potencjał metod biologicznych, które definiuje się pod wspólnym pojęciem technik bioremediacyjnych (Nwankwegu and Onwosi, 2017).

W bioremediacji gleb skażonych węglowodorami wykorzystuje się naturalną zdolność mikroorganizmów zasiedlających to środowisko do przekształcania zanieczyszczeń w związki mniej toksyczne lub najlepiej, na drodze całkowitej mineralizacji, do dwutlenku węgla i wody. Wysoka koncentracja toksycznych i trudno degradablealnych zanieczyszczeń ogranicza jednak liczbę mikroorganizmów zasiedlających środowiska skażone. Jedną z najczęściej wykorzystywanych strategii wspomagania bioremediacji jest wówczas bioaugmentacja, która polega na wprowadzeniu do zanieczyszczonej gleby wyselekcjonowanych, zdolnych do degradacji węglowodorów, pojedynczych szczepów mikroorganizmów lub ich społeczności (Vogel, 1996). Jednym z głównych ograniczeń skutecznej bioremediacji gleb zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi jest bardzo niska rozpuszczalność i równocześnie wysoka hydrofobowość węglowodorów. Związki te wiążą się silnie z cząstkami gleby, przez co są trudno dostępne dla mikroorganizmów. Dlatego też, aby przezwyciężyć ten problem, do bioaugmentacji wykorzystuje się szczepy, które oprócz zdolności degradacyjnych dodatkowo wykazują zdolność do produkcji związków powierzchniowo-czynnych – biosurfaktantów i/lub bioemulgatorów (Chirakkara et al., 2016).

Do oczyszczania gleb skażonych węglowodorami ropopochodnymi stosuje się również technikę fitoremediacji, w której do eliminacji zanieczyszczeń z gleby wykorzystywane są rośliny, a przede wszystkim związane z nimi mikroorganizmy ryzosferowe i endofityczne. Proces mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń zachodzi w tym przypadku głównie w ryzosferze i nosi nazwę ryzodegradacji. Ryzosfera jest glebą przykorzeniową będącą pod wpływem wydzielin korzeniowych i wtórnych metabolitów roślinnych uwalnianych na drodze ryzodepozycji. Są one często wykorzystywane przez mikroorganizmy, jako substraty pomocnicze w mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń na drodze ich kometabolizmu. Ryzosfera stanowi, więc dla tych mikroorganizmów bardzo dobre środowisko do wzrostu i

aktywności, także w glebach zanieczyszczonych (Simmer and Schnoor, 2022). W procesie fitoremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi rozkład pobranych przez roślinę węglowodorów może zachodzić również wewnątrz jej tkanek przy udziale znajdujących się tam mikroorganizmów endofitycznych wykazujących aktywność mechanizmów degradacyjnych. Wyniki wielu badań potwierdzają, że mikroorganizmy endofityczne często zawierają w swoim genomie geny odpowiedzialne za rozkład różnorodnych związków organicznych (Feng et al., 2017). Ponadto, zarówno mikroorganizmy ryzosferowe, jak i endofityczne, bardzo często aktywują również mechanizmy promowania wzrostu roślin (PGPM, *ang. plant growth-promoting mechanisms*), dzięki czemu mogą one poprawiać kondycję roślin, intensyfikować ich wzrost w warunkach stresu środowiskowego i zwiększać ich tolerancję na obecne w glebie zanieczyszczenia (Basu et al., 2021; Santoyo et al., 2016). Do tej grupy mikroorganizmów należy wiele gatunków bakterii, jak i grzybów, a bakterie, pozytywnie wpływające na rozwój roślin określane są, jako promujące ich wzrost (PGPB, *ang. plant growth-promoting bacteria*), a w zależności od miejsca występowania klasyfikowane są, jako ryzosferowe (PGPR, *ang. plant growth-promoting rhizobacteria*) lub endofityczne bakterie promujące wzrost roślin (PGPE, *ang. plant growth promoting endophytic bacteria*). Mikroorganizmy te promują wzrost roślin dzięki aktywności jednego lub kilku mechanizmów, zarówno bezpośrednich jak i pośrednich. Do pierwszej grupy mechanizmów zalicza się między innymi zwiększanie dostępności składników odżywczych, w tym przekształcanie azotu w formy dostępne dla roślin, rozpuszczanie trudno dostępnych form fosforu czy udostępnianie roślinom żelaza, a także syntezę fitohormonów, w tym głównie kwasu indolilo-3-octowego (IAA), oraz regulację stężenia etylenu dzięki aktywności enzymu – deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC, *ang. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*). Pośrednie mechanizmy promowania wzrostu roślin polegają z kolei na ochronie roślin przed patogenami na skutek wytwarzania przez mikroorganizmy antybiotyków czy też enzymów degradujących ściany komórkowe fitopatogenów (Glick, 2012). Ze względu na liczne korzyści płynące z zastosowania PGPB do wspomagania wzrostu roślin bardzo często do oczyszczania terenów zanieczyszczonych węglowodorami wykorzystuje się połączenie techniki fitoremediacji i bioaugmentacji w procesie zwanym fitoremediacją wspomaganą. W tym wariacie wprowadzane szczepy oprócz aktywności PGPM, wykazują także zdolność do degradacji związków ropopochodnych i produkcji biosurfaktantów, co ma na celu intensyfikację

mikrobiologicznego usuwania zanieczyszczeń, głównie w strefie ryzosferowej (Simmer and Schnoor, 2022). Fitoremediację wspomaganą mikroorganizmami wykorzystuje się również do oczyszczania gleb skażonych metalami ciężkimi i jest to jedyna metoda pozwalająca na trwałe usunięcie zanieczyszczeń metalicznych z gleb skażonych. W tym przypadku proces usuwania zanieczyszczeń zachodzi na drodze fitoekstrakcji polegającej na pobieraniu metali obecnych w glebie przez system korzeniowy roślin, a następnie ich translokacji i magazynowaniu w organach nadziemnych. Efektywność tego procesu jest również zależna od aktywności PGPB, które oprócz wspomagania wzrostu roślin mogą dodatkowo zwiększać biodostępność metali ciężkich w glebie oraz ich translokację w roślinie, co istotnie przyczynia się do zwiększenia ich akumulacji przez rośliny. Mobilizacja metali w glebie jest najczęściej wynikiem obniżania pH gleby będącego następstwem wytwarzania przez bakterie kwasów organicznych, takich jak kwas glukonowy, szczawiowy, octowy i jabłkowy, a także syntezy sideroforów, czyli związków o wysokim potencjale chelatowania jonów metali, które mogą być następnie pobierane przez rośliny (Alves et al., 2022).

W przypadku gleb skażonych węglowodorami i metalami ciężkimi (koczanieczyszczonych) wykazano, iż współwystępowanie tych dwóch rodzajów zanieczyszczeń stanowi znacznie większe niebezpieczeństwo dla środowiska w porównaniu do zagrożeń powodowanych występowaniem tylko jednego z nich. Jest to związane z faktem, iż zanieczyszczenia te charakteryzują się odmiennymi właściwościami chemicznymi, w związku, z czym ich równoczesne usunięcie jest trudne do przeprowadzenia (Dai et al., 2020). Ponadto, obecność zanieczyszczeń z jednej grupy może wpływać na efektywność usuwania z gleby związków należących do drugiej grupy. Na przykład, obecność metali ciężkich w niewielkich ilościach w glebie może początkowo negatywnie wpływać na skuteczność usuwania węglowodorów. Dzieje się tak na skutek zajmowania przez kationy metali ciężkich ujemnie naładowanych fragmentów powierzchni komórek mikroorganizmów degradujących węglowodory, w wyniku, czego zasłonięte zostają obszary, w których mogłoby dojść do adsorpcji węglowodorów. Jednak wraz ze wzrostem stężenia kationów metali na powierzchni komórek, ładunek mikroorganizmów jest stopniowo neutralizowany, co prowadzi do zmniejszenia hydrofilowości ich powierzchni i ostatecznie sprzyja adsorpcji węglowodorów (Liu et al., 2017). Ponadto, metale ciężkie obecne w glebie w dużych stężeniach mogą konkurować z mikroelementami (np. Mg^{2+} , Ca^{2+}) wykorzystywanymi, jako kofaktory enzymów zaangażowanych w degradację

węglowodorów lub mogą łączyć się z grupami sulfhydrylowymi białek hamując w ten sposób ich aktywność enzymatyczną (Guo et al., 2010; Karaca et al., 2010). Do oczyszczania terenów ko-zanieczyszczonych coraz częściej stosuje się fitoremediację. Podczas tego procesu wykorzystuje się zarówno naturalne zdolności niektórych roślin do pobierania, translokacji do części nadziemnych i akumulacji metali ciężkich w procesie fitoekstrakcji, jak i możliwość równoczesnej mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń organicznych w strefie ryzosferowej (Zhang et al., 2009). Rośliny stosowane do fitoremediacji terenów ko-skażonych muszą, więc wykazywać tolerancję zarówno na obecność metali ciężkich, jak i zanieczyszczeń organicznych w glebie. Ich odpowiedni dobór jest często problematyczny, dlatego zastosowanie fitoremediacji do jednoczesnego usuwania z gleby węglowodorów i metali ciężkich często nie przynosi oczekiwanych efektów. Z tego powodu do oczyszczania gleb ko-zanieczyszczonych coraz częściej stosuje się tzw. fitoremediację wspomaganą, która polega na jednoczesnym zastosowaniu fitoremediacji w połączeniu z innymi technikami mającymi na celu zwiększenie jej efektywności np. bioaugmentacją i/lub biostymulacją (Cao et al., 2022). W tym celu do gleby, w której rosną uprzednio wyselekcjonowane rośliny dodatkowo wprowadza się mikroorganizmy (najczęściej bakterie) wykazujące aktywność pożądaných mechanizmów np. promowania wzrostu roślin, i/lub naturalne nawozy, np. mączkę kostno-mięsną (MBM, *ang. meat and bone meal*), łuskę ryżową, biowęgiel, czy też martwą biomasę bakteryjną (Bartucca et al., 2022). Wprowadzane bakterie często charakteryzują się zdolnością do degradacji węglowodorów, a także produkcji biosurfaktantów i/lub związków zakwaszających glebę, dzięki czemu mogą zwiększać biodostępność zanieczyszczeń (zarówno organicznych jak i nieorganicznych) obecnych w glebie skażonej. Przykładowo, w wyniku produkcji m.in. fitohormonów, PGPB modyfikują architekturę systemu korzeniowego, co prowadzi do zwiększonego bocznego rozgałęziania się korzeni i rozwoju włosników, przez co istotnie zwiększa się powierzchnia chłonna systemu korzeniowego. Powiększa to także istotnie grubość ryzosfery i tworzy nowe nisze, które mogą być zasiedlane przez ryzobakterie rozkładające węglowodory, co w ostateczności intensyfikuje procesy degradacyjne (Vacheron et al., 2013). Ponieważ istotna część bakterii endofitycznych zasiedlających wnętrza roślin pochodzi z ryzosfery, większa liczba i bioróżnorodność bakterii w strefie przykorzeniowej będzie powodowała zwiększenie bioróżnorodności i aktywności mikrobiologicznej także w endosferze roślin.

Prowadząc eksperymenty bioaugmentacyjne należy pamiętać, że efektywność tej techniki jest ściśle uzależniona od odpowiedniej selekcji wprowadzanych szczepów, ich zdolności do adaptacji, przeżywalności i namnażania się, a także ich aktywności po wprowadzeniu do gleby. Ponadto, wprowadzane mikroorganizmy mogą wpływać na strukturę i aktywność zespołów mikroorganizmów autochtonicznych w glebie. Mikroorganizmy rodzime, a także te bioaugmentowane do gleby są organizmami społecznymi, żyjącymi w glebie w złożonych zespołach w obrębie, których tworzą skomplikowane interakcje (Stubbendieck et al., 2016). Proces bioaugmentacji może prowadzić do czasowych lub trwałych zaburzeń tych interakcji, co ostatecznie może mieć wpływ zarówno pozytywny jak i negatywny na efektywność procesu oczyszczania. Zmiany w strukturze zespołów bakterii zasiedlających oczyszczane gleby prowadzące do zwiększenia liczby i aktywności gatunków rozkładających zanieczyszczenia są pożądane i ich zajście sprzyja zwiększonemu usuwaniu zanieczyszczeń. Z drugiej jednak strony pomiędzy wprowadzonymi bakteriami a mikroorganizmami autochtonicznymi mogą wystąpić oddziaływania negatywne (współzawodnictwo lub antagonizm), czego konsekwencją może być zmniejszenie efektywności procesu bioremediacji (Herrero and Stuckey, 2015). Dlatego też nieodzownym, a wciąż często pomijanym elementem badań bioaugmentacyjnych, jest monitorowanie zmian w liczebności, strukturze i aktywności metabolicznej zespołów bakterii zasiedlających gleby poddane bioaugmentacji. Do tych oznaczeń mogą być wykorzystywane różne metody, zarówno klasyczne, hodowlane jak i molekularne niewymagające izolacji mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych. Spośród metod molekularnych największym zainteresowaniem w ostatnich latach cieszą się techniki oparte na wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu całych metagenomów lub metatranskryptomów (Sharma et al., 2019). Ponadto, eksperymenty remediacyjne, w których oprócz bakterii do usuwania zanieczyszczeń stosuje się również rośliny, powinny obejmować także analizę interakcji zachodzących pomiędzy tymi dwoma grupami organizmów oraz mikroorganizmami rodzimymi. Poznanie tych interakcji ma kluczowe znaczenie dla lepszego zrozumienia procesu wspomaganego fitoremediacji i jest możliwe, jeśli równocześnie z analizami metagenomowymi i/lub metatranskryptomicznymi gleby prowadzone będą także analizy transkryptomiczne roślin stosowanych w fitoremediacji (Mukherjee, 2022). Takie holistyczne podejście, obejmujące badanie ekologicznych, fizjologicznych i molekularnych konsekwencji prowadzonych procesów bioremediacyjnych zastosowano podczas projektowania

doświadczeń i opisywania uzyskanych wyników w ramach opisu osiągnięć naukowych prezentowanych w niniejszym wniosku.

Omówienie uzyskanych wyników

1. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil

W pracy nr 1 określano wpływ inokulacji gleby skażonej węglowodorami ropopochodnymi (PHs) szczepami bakterii *Rhodococcus erythropolis* CD 130 oraz CD 167, wprowadzanymi pojedynczo lub w postaci konsorcjum, na efektywność usuwania węglowodorów z tej gleby. Ponadto, badano zmiany w aktywności i strukturze zespołów autochtonicznych mikroorganizmów glebowych w testowanych układach (**Zal. 4A**). Szczepy CD 130 oraz CD 167 zostały uprzednio wyizolowane z gleby skażonej PHs, którą wykorzystano w opisywanym doświadczeniu bioremediacyjnym, były, więc przedstawicielami frakcji hodowalnej mikroorganizmów autochtonicznych. Ich izolację i charakterystykę przedstawiono w pracy Pacwa-Płociniczak et al. (2016), opublikowanej w *Journal of Environmental Management*, której byłam pierwszym autorem. Oba szczepy wykazywały zdolność do degradacji PHs, a także efektywnie produkowały biosurfaktanty. Spełniały, więc najważniejsze wymagania stawiane szczepom wykorzystywanym w bioaugmentacji gleb skażonych substancjami organicznymi. Ponadto, uważa się, iż wprowadzane szczepy, oprócz wykazywania odpowiednich właściwości katabolicznych względem zanieczyszczeń, powinny także charakteryzować się dobrą adaptacją do warunków panujących w oczyszczanej glebie, a co za tym idzie wysoką przeżywalnością i zdolnością do zwiększania swojej populacji w tym środowisku. W tego typu badaniach preferowane jest stosowanie namnożonych w warunkach laboratoryjnych szczepów rodzimych dla oczyszczanej gleby, zaadaptowanych do warunków panujących w glebie poddawanej bioremediacji. Jednakże bioaugmentacja, czy to szczepami autochtonicznymi czy też allochtonicznymi dla skażonej gleby, nie zawsze przyczynia się do zwiększenia efektywności usuwania PHs z gleby. Przyczyną niepowodzeń mogą być m.in. niekorzystne zmiany w funkcjonowaniu autochtonicznych zespołów mikroorganizmów glebowych zachodzące pod wpływem inokulacji. Tego typu, kluczowe analizy są wciąż bardzo często pomijane w doświadczeniach bioremediacyjnych, w których autorzy skupiają się bardzo często

jedynie na efektywności tego procesu. Dodatkowo, inokulowane do gleby szczepy nie zawsze wykazują w tym środowisku aktywność mechanizmów degradacyjnych, których działanie potwierdzono uprzednio w warunkach laboratoryjnych w czasie ich charakterystyki. Dlatego też nowatorskim podejściem w prezentowanej pracy było monitorowanie zmian w strukturze zespołów bakterii glebowych, a także zmian w ekspresji wybranych genów bakteryjnych kodujących mechanizmy zaangażowane w proces degradacji węglowodorów w czasie trwania doświadczenia.

Doświadczenie bioaugmentacyjne prowadzono w warunkach laboratoryjnych w doniczkach z glebą o wieloletniej historii zanieczyszczenia PHs. Całkowite stężenie węglowodorów (TPH, *ang. total petroleum hydrocarbons*) wynosiło $11,98 \text{ g kg}^{-1}$ suchej masy (s.m.) gleby. Gleba ta charakteryzowała się ponadto niskim pH równym 4. W zależności od układu szczepy CD 130 i CD 167 wprowadzano w liczbie 10^7 jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) g^{-1} s.m. gleby, jako pojedyncze inokulanty. W układzie wspomaganym konsorcjum tych szczepów liczba komórek każdego z nich wynosiła 5×10^6 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby. W doświadczeniu przygotowano także nieinokulowane bakteriami układy kontrolne. Eksperyment prowadzono przez 182 dni i w trakcie jego trwania monitorowano liczbę komórek wprowadzonych szczepów w glebie, do czego wykorzystano marker w postaci ich oporności na rifampicynę. Do rozróżnienia testowanych szczepów wykorzystywano również ich cechy morfologiczne, a także dodatkowo, w przypadku szczepu CD 130, oporność na kanamycynę. Co istotne, posiewając zawiesinę glebową z układów kontrolnych na płytki z rifampicyną w stężeniu $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ nie obserwowano wzrostu bakterii, co potwierdziło przydatność tego markera w oznaczaniu przeżywalności wprowadzanych szczepów.

Do 42 dnia po inokulacji na płytkach z rifampicyną obserwowano wzrost obu testowanych szczepów izolowanych z gleb, do których zostały wprowadzone. Brak wzrostu szczepów CD 130 oraz CD 167 izolowanych z gleby na podłożu z dodatkiem rifampicyny w późniejszych dniach trwania doświadczenia nie wyklucza jednak obecności tych szczepów w glebie, a jedynie wskazuje na niewystępowanie w glebie rifampicynoopornych mutantów tych szczepów. Szczepy CD 130 oraz CD 167 mogły utracić cechę oporności na rifampicynę w wyniku zjawiska określanego w literaturze naukowej, jako „*antibiotic masking*” polegającego na czasowej utracie oporności na antybiotyki (Nairn and Chanway, 2002).

W połowie trwania eksperymentu istotnie statystycznie ubytki węglowodorów względem kontroli odnotowano we wszystkich bioaugmentowanych glebach. Ponadto,

w glebie traktowanej bakteryjnym konsorcjum obserwowano istotnie wyższy ubytek TPH (28,52%), w porównaniu do gleb, do których wprowadzono pojedyncze szczepy CD 130 oraz CD 167, w których ubytek wynosił odpowiednio 19,37% oraz 21,87%. Wynik ten wskazuje na synergistyczne oddziaływanie pomiędzy szczepami, które może polegać m.in. na wykorzystaniu produktów pośrednich uzyskanych w czasie rozkładu węglowodorów przez jeden ze szczepów, jako źródło węgla dla drugiego szczepu. Analiza zawartości węglowodorów oszacowana w glebach po zakończeniu eksperymentu wykazała istotnie statystycznie wyższe ubytki TPH we wszystkich bioaugmentowanych układach, w porównaniu z nieinokulowanym układem kontrolnym. Inaczej niż w połowie trwania eksperymentu, w dniu 182 największy, wynoszący 38,40%, ubytek tych związków obserwowano w glebie traktowanej szczepem CD 167, natomiast w glebach traktowanych szczepem CD 130 i konsorcjum szczepów odnotowano porównywalną, około 30% redukcję zawartości TPH. Ze względu na to, iż od dnia 42 eksperymentu w bioaugmentowanych glebach nie odnotowano obecności rifampicynoopornych mutantów szczepów CD 130 oraz CD 167, natomiast w glebach tych wciąż obserwowano zwiększony ubytek węglowodorów, w porównaniu z nieinokulowaną glebą kontrolną, założono, iż rozkład ten mógł być efektem działalności wprowadzonych szczepów, które namnażały się w glebie i wykazywały aktywność degradacyjną, jednak utraciły oporność na rifampicynę. Ubytek ten może być również wynikiem aktywności mikroorganizmów autochtonicznych, które uzyskały zdolność degradacyjną w wyniku transferu genów kodujących mechanizmy rozkładu zanieczyszczeń pochodzących z wprowadzanych szczepów. Obserwowany ubytek węglowodorów mógł być również związany ze zmianami aktywności i/lub struktury zespołów mikroorganizmów autochtonicznych pod wpływem wprowadzonych szczepów. Wobec uzyskania opisanych powyżej wyników w kolejnym etapie badań zasadnym było określenie wpływu introdukowanych do gleby bakterii na aktywność i strukturę mikroorganizmów rodzimych oczyszczanej gleby.

W pierwszym etapie tych analiz określano wpływ inokulacji gleby szczepami CD 130 i/lub CD 167 na aktywność metaboliczną i strukturę zespołów mikroorganizmów ją zasiedlających. Zaobserwowano, że po wprowadzeniu testowanych szczepów bakterii następował wzrost aktywności biologicznej gleby, wyrażonej w $\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby uwolnionego w ciągu 120 h, co mogło wynikać z dostarczenia do gleby łatwo dostępnego źródła węgla z martwej biomasy bakteryjnej pochodzącej od bakterii, które nie przeżyły inokulacji. W doświadczeniach bioaugmentacyjnych, w których inokulum

zawiera zawiesinę o dużej liczbie komórek bakterii, bardzo często obserwuje się zamieranie części z nich bezpośrednio po inokulacji. Powstała w ten sposób martwa biomasa bakteryjna, zwana czasem nekromasą, staje się źródłem składników odżywczych dla pozostałych mikroorganizmów obecnych w glebie i jest przez nie metabolizowana. Pomimo, iż testowane rifampicynooporne szczepy były rodzime dla testowanej gleby i efektywnie ją zasiedlały, bezpośrednio po inokulacji obserwowano spadek ich liczby wynoszący około 20%. Nie jest to duża wartość, gdyż w szeregu prac opublikowanych przez Zespół Mikrobiologii i Bioremediacji Środowiska, a także innych badaczy redukcja ta wynosiła 90 a nawet 99% (Płociniczak et al., 2019, 2017; Ptaszek et al., 2020). Z kolei poziom respiracji glebowej oszacowany zarówno w dniu 91 jak i 182 w glebach bioaugmentowanych był niższy, w porównaniu z glebą kontrolną. Możliwym wyjaśnieniem tego wyniku jest pogorszenie warunków środowiskowych w glebie związane ze zwiększeniem biodostępności węglowodorów pod wpływem biosurfaktantów wytworzonych przez wprowadzane szczepy.

Analiza profili fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs, *ang. phospholipid fatty acids*) wykazała, że wprowadzenie do gleby dużej liczby komórek *R. erythropolis* spowodowało wzrost biomasy zarówno rozgałęzionych, jak i jednonienasyconych i cyklopropanowych PLFAs. Zmiany te nie miały jednak trwałego charakteru i pod koniec eksperymentu istotnie statystycznie różnice w profilach PLFAs obserwowano tylko w glebie inokulowanej szczepem CD 167, w porównaniu do gleby kontrolnej.

W kolejnym etapie w badanych glebach określano poziom ekspresji genu 16S rRNA oraz genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów alifatycznych [hydroksylazy alkanowej (*alkH*) oraz hydroksylazy alkanowej związanej z cytochromem P450 (CYP153)], aromatycznych [(1,2-dioksygenazy katecholowej (C120) oraz 2,3-dioksygenazy katecholowej (C230)], a także wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [dioksygenazy pirenu (*nidA*)]. Spośród badanych genów w analizowanych glebach odnotowano ekspresję genów 16S rRNA, *alkH*, CYP153 oraz C230. Zaobserwowano, iż ekspresja genu 16S rRNA w pierwszej części eksperymentu pozostawała na podobnym poziomie we wszystkich analizowanych próbkach, natomiast pod koniec jego trwania obserwowano istotnie statystycznie wyższą liczbę transkryptów tego genu w glebach inokulowanych bakteriami, w porównaniu z kontrolą. Z kolei ekspresja genów *alkH*, CYP153 oraz C230, ściśle powiązana z aktywnością bakterii rozkładających węglowodory, zachodziła na różnym

poziomie w testowanych glebach. Najwyższy poziom ekspresji w badanych glebach odnotowano dla genu *alkH* i był on wyższy od poziomu ekspresji genów CYP153 oraz C230 odpowiednio o 1 i 4 rzędy wielkości. Dla wszystkich analizowanych genów pod koniec trwania eksperymentu obserwowano istotnie statystycznie wyższy poziom ich ekspresji w glebach bioaugmentowanych, w porównaniu z kontrolą.

Podsumowanie:

- Wprowadzenie szczepów bakterii *Rhodococcus erythropolis* CD 130 i CD 167 oraz ich konsorcjum do gleby z wieloletnią historią skażenia PHs powodowało istotne zwiększenie efektywności usuwania zanieczyszczeń z tej gleby, w porównaniu z nieinokulowaną glebą kontrolną;
- Bioaugmentacja gleby zarówno pojedynczymi szczepami, jak i ich konsorcjum powodowała zwiększoną ekspresję genów, kodujących enzymy zaangażowane w degradację węglowodorów;
- Inokulacja gleby pojedynczymi szczepami oraz ich konsorcjum powodowała zmiany w strukturze autochtonicznych zespołów bakterii. Wynikiem tych zmian były różnice w efektywności usuwania węglowodorów pomiędzy układami badawczymi w czasie trwania eksperymentu, jednak nie miały one charakteru trwałego.

2. Metagenomic functional profiling reveals differences in bacterial composition and function during bioaugmentation of aged petroleum-contaminated soil

W pracy 2 opisano wyniki badań dotyczących wpływu inokulacji gleby skażonej PHs szczepami CD 130 oraz CD 167, a także ich konsorcjum na strukturę autochtonicznych zespołów bakterii glebowych. Badania te prowadzone były z wykorzystaniem niewymagającej hodowli mikroorganizmów techniki sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *ang. next generation sequencing*) fragmentów genu 16S rRNA. Umożliwiło to uzyskanie szczegółowych informacji na temat zmian w strukturze zespołów bakteryjnych, w porównaniu do danych uzyskanych w pracy 1, w której opisano wyniki otrzymane z zastosowaniem analizy PLFA. Dodatkowo, na podstawie uzyskanych sekwencji genu 16S rRNA z wykorzystaniem pakietu bioinformatycznego PICRUST (*ang. phylogenetic investigation of communities*

by reconstruction of unobserved states), przeprowadzono predykcyjną analizę funkcjonalną metagenomu oczyszczanej gleby (Załącznik 4B).

Analiza struktury autochtonicznych zespołów bakterii glebowych przeprowadzona w pierwszym dniu po wprowadzeniu bakterii wykazała, że wszystkie analizowane gleby charakteryzowały się wysokim, ale odmiennym bogactwem taksonomicznym, co określono na podstawie wyznaczonych współczynników bioróżnorodności. Odnotowano dominację sekwencji charakterystycznych dla rodzajów *Rhodococcus* oraz *Mycobacterium* w glebach poddanych bioaugmentacji oraz sekwencji charakterystycznych dla rodzaju *Mycobacterium* w nieinokulowanej glebie kontrolnej. W glebach inokulowanych pojedynczymi szczepami *R. erythropolis* CD 130 lub CD 167, a także w glebie traktowanej konsorcjum tych szczepów sekwencje charakterystyczne dla rodzaju *Rhodococcus* stanowiły odpowiednio 33,89%, 5,82% oraz 22,28% wszystkich sekwencji, natomiast te charakterystyczne dla rodzaju *Mycobacterium* stanowiły odpowiednio 12,79%; 28,71% oraz 17,62%. W glebie kontrolnej sekwencje przyporządkowane do rodzaju *Rhodococcus* stanowiły zaledwie 0,02%, natomiast w glebie tej dominowały bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, których udział wynosił 21,55%. Co istotne, we wcześniejszych badaniach, w których z tej samej gleby przeprowadzono izolację hodowalnej frakcji bakterii rozkładających węglowodory zawarte w surowej ropie naftowej, dominowały bakterie z rodzaju *Rhodococcus*, natomiast bakterie z rodzaju *Mycobacterium* na podłożach mikrobiologicznych nie wyizolowano (Pacwa-Płociniczak et al., 2016). Pozyskanie szczepów bakterii efektywnie degradujących PHs jest, zatem kluczowym etapem bioremediacji. Co ważne, szczepy te powinny należeć do grup dominujących w zanieczyszczonym środowisku, co umożliwi ich skuteczną adaptację do warunków glebowych, a finalnie może przyczynić się do wysokiej aktywności degradacyjnej po wprowadzeniu do skażonej gleby.

W glebach traktowanych szczepami *R. erythropolis* odnotowano także obecność sekwencji charakterystycznych dla bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (ich udział wynosił 9,39%; 1,28% oraz 7,28% odpowiednio w glebach CD 130; CD 167 oraz CD 130 + CD 167), nie zaobserwowano ich z kolei w glebie kontrolnej. Bakterie należące do tego rodzaju bardzo często wykazują aktywność degradacyjną względem PHs i są wykrywane w glebach zanieczyszczonych węglowodorami. Można, zatem przypuszczać, iż zastosowany zabieg bioaugmentacji miał wpływ na zwiększenie w glebie liczby bakterii należących do rodzaju *Pseudomonas*, co w konsekwencji

wpłynęło na wyższą efektywność usuwania PHs z gleb bioaugmentowanych. Ponadto, we wszystkich analizowanych glebach wykryto wysoki udział sekwencji charakterystycznych dla bakterii należących do rodzin *Acetobacteraceae* i *Acidobacteriaceae*, a także przyporządkowanych do rzędu *Acidimicrobiales* oraz grupy Ellin6513. Bakterie należące do wymienionych grup wykrywane były również przez innych badaczy w kwaśnych glebach zanieczyszczonych węglowodorami (Wu et al., 2017).

W kolejnych tygodniach trwania eksperymentu we wszystkich analizowanych glebach obserwowano spadek wartości współczynników bioróżnorodności (Chao1, Shannon, Simpson). W dniu 91 we wszystkich glebach dominowały bakterie zaklasyfikowane do rzędu *Acidimicrobiales* (25,71 – 40,26%), a także rodziny *Acetobacteraceae* (25,63 – 39,72%) oraz rodzaju *Mycobacterium* (20,93 – 30,62%). Sekwencje charakterystyczne dla bakterii z rodzaju *Rhodococcus* obecne były jedynie w glebach bioaugmentowanych, a ich udział był niewielki i stanowił zaledwie 0,37% (CD 130); 0,23% (CD167) oraz 0,21% (konsorcjum) wszystkich bakteryjnych sekwencji. We wszystkich glebach odnotowano również zwiększenie udziału, w porównaniu do dnia 1, sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Clostridiales*, co może świadczyć o miejscowym występowaniu warunków beztlenowych na skutek zwiększonej biodostępności lub migracji węglowodorów. W 182 dniu eksperymentu we wszystkich badanych glebach dominowały bakterie należące do rodziny *Acetobacteraceae*, a ich udział zawierał się w przedziale 26,37 – 36,42%. We wszystkich analizowanych glebach stwierdzono również obecność sekwencji przyporządkowanych do rzędu *Acidimicrobiales* oraz rodzaju *Mycobacterium*. Dodatkowo, w glebie traktowanej konsorcjum bakteryjnym obserwowano znaczący wzrost, w porównaniu do dnia 91, udziału sekwencji charakterystycznych dla rzędu *Clostridiales*. Uzyskane wyniki wskazują, że gleby z długą historią zanieczyszczenia PHs charakteryzują się posiadaniem stabilnego mikrobiomu. W związku z tym do intensyfikacji usuwania zanieczyszczeń z takich gleb na drodze bioaugmentacji powinno się wykorzystywać mikroorganizmy autochtoniczne, lub ta grupa mikroorganizmów powinna być wspomagana poprzez procesy biostymulacji. Zastosowanie gatunków/rodzajów „obcych” może być nieskuteczne ze względu na niską przeżywalność takich inokulantów oraz ich ograniczoną zdolność do adaptacji do istniejącej w glebie społeczności mikroorganizmów i pozostałych warunków glebowych. Co istotne, zdolne do degradacji PHs szczepy bakterii wyrosłe na podłożach mikrobiologicznych nie

muszą należeć do gatunków dominujących w danej glebie, co dodatkowo zmniejsza szanse na powodzenie procesu bioaugmentacji.

Dla badanych gleb przeprowadzono również predykcyjną analizę funkcjonalną metagenomu. Analiza ta pozwoliła na określenie potencjalnych szlaków metabolicznych zachodzących w komórkach bakterii zasiedlających te gleby, a następnie porównanie ich średniego udziału w próbkach pochodzących z różnych układów badawczych. W pierwszym dniu eksperymentu we wszystkich glebach poddanych bioaugmentacji obserwowano istotnie wyższy udział procesów związanych z biodegradacją i metabolizmem ksenobiotyków, a także metabolizmem lipidów, terpenoidów, poliketydów i aminokwasów, w porównaniu do gleby kontrolnej. Wynik ten może być konsekwencją wprowadzenia do gleby dużej liczby bakterii testowanych szczepów. W dniu 91 nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy szlakami metabolicznymi zachodzącymi w glebach z testowanych układów badawczych, natomiast pod koniec eksperymentu wykazano istotnie niższy udział procesów związanych z translacją białek i istotnie wyższy udział procesów związanych z metabolizmem terpenoidów i poliketydów w glebie CD 130, w porównaniu z kontrolą. W tym dniu odnotowano również istotne statystycznie różnice w profilach metabolicznych pomiędzy glebami CD 130 + CD 167 a kontrolą, które dotyczyły przebiegu aż 62% wszystkich potencjalnych szlaków metabolicznych wykrytych w tych glebach.

Ważną częścią prezentowanych badań była również analiza bioróżnorodności bakterii zaangażowanych w rozkład węglowodorów. W pracy określono skład taksonomiczny bakterii posiadających w swoim genomie testowane w pracy 1 geny *alkH*, CYP153, C120 oraz C230 i zasiedlających gleby pochodzące z różnych układów badawczych. Na początku eksperymentu w glebach poddanych bioaugmentacji wśród bakterii posiadających gen *alkH* dominowały bakterie z rodzaju *Rhodococcus* oraz *Mycobacterium*, podczas gdy w glebie kontrolnej występowały głównie bakterie z rodzaju *Mycobacterium*. Następnie, zarówno w dniu 91 jak i 182 we wszystkich analizowanych glebach dominowały bakterie z rodzaju *Mycobacterium*. Z kolei różnice w składzie taksonomicznym bakterii posiadających gen CYP153 kodujący hydroksylazę alkanową związaną z cytochromem P450 obserwowano między glebami pochodzącymi z różnych układów badawczych głównie w dniu 91 i 182. W dniu 91 w glebie traktowanej konsorcjum szczepów CD 130 + CD 167 oraz w kontroli dominowały głównie bakterie należące do rodziny *Bradyrhizobiaceae*, podczas gdy w

glebach CD 130 oraz CD 167 oprócz bakterii należących do tej rodziny obserwowano również wysoki udział sekwencji charakterystycznych dla rodziny *Nocardioideae*. W dniu 182 we wszystkich glebach dominowały bakterie z rodziny *Bradyrhizobiaceae* oraz dodatkowo w glebach bioaugmentowanych obecne były bakterie z rodzin *Isosphaeraceae* oraz *Streptosporangiaceae*. W przypadku genów C120 oraz C230 zaobserwowano, iż na początku eksperymentu w glebach traktowanych szczepami *R. erythropolis* dominowały bakterie należące do rodzaju *Rhodococcus*, podczas gdy bakterie te nie były obecne w glebie kontrolnej, w której w przypadku obu genów dominowały bakterie z rodziny *Bradyrhizobiaceae*. W dniu 91 dla obu badanych genów obserwowano podobieństwo w składzie taksonomicznym pomiędzy glebami CD 130 i CD 167, a także pomiędzy glebą traktowaną bakteryjnym konsorcjum i kontrolą. Na uwagę zasługuje fakt, iż w przypadku bakterii posiadających gen C120 zasiedlających glebę inokulowaną bakteryjnym konsorcjum dominowały bakterie należące do rzędu *Acidimicrobiales*, natomiast w glebach CD 130 i CD 167 największy udział stanowiły bakterie z rodzin *Bradyrhizobiaceae* oraz *Nocardioideae*. Bakterie należące do tych rodzin dominowały również wśród bakterii posiadających gen C230 zasiedlających gleby ze wszystkich testowanych układów badawczych. W dniu 182 profile taksonomiczne dla genów C120 oraz C230 uzyskane dla gleb CD 167, CD 130 + CD 167 oraz kontroli były do siebie bardzo zbliżone, natomiast odmienny skład taksonomiczny obserwowano w tym dniu w glebie traktowanej szczepem CD 130. Niemniej jednak, obserwowane zmiany w składzie taksonomicznym bakterii posiadających geny zaangażowane w proces rozkładu węglowodórów nie były powiązane z efektywnością usuwania tych związków z gleby, co sugeruje, że kluczowe znaczenie dla tego procesu ma wyznaczenie poziomu ekspresji tych genów, a nie jedynie sama ich obecność.

Podsumowanie:

- Wyniki sekwencjonowania fragmentów genu 16S rRNA pochodzących z puli DNA glebowego izolowanego z układów bioaugmentowanych wykazały wysoki udział sekwencji charakterystycznych dla rodzaju *Rhodococcus* tylko na początku eksperymentu, co potwierdziło brak zdolności szczepów *R. erythropolis* CD 130 oraz CD 167 do długotrwałej kolonizacji badanej gleby;

- Odnotowany ubytek węglowodorów był wynikiem aktywności rodzimych zespołów bakterii, wśród których dominowały bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, a rodzaj *Rhodococcus* stanowił jedynie niewielką frakcję tej grupy;
- Wprowadzenie szczepów CD 130 oraz CD 167, zarówno, jako pojedyncze szczepy jak i w postaci konsorcjum, powodowało tymczasowe zmiany w składzie taksonomicznym autochtonicznych zespołów bakterii glebowych, polegające głównie na zwiększeniu udziału sekwencji charakterystycznych dla bakterii z rodzajów *Rhodococcus* i *Pseudomonas*;
- Wśród przedstawicieli autochtonicznych zespołów bakterii glebowych posiadających w swoim genomie gen *alkH* dominowały bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, natomiast bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* dominowały wśród przedstawicieli posiadających geny CYP153, C120 oraz C230;
- Zespoły autochtonicznych bakterii w badanej glebie charakteryzowały się stabilnością składu taksonomicznego, dlatego też do jej bioaugmentacji należy wykorzystać gatunki dominujące wykazujące zdolności degradacyjne lub wspierać efektywność usuwania PHs na drodze biostymulacji.

Wyniki uzyskane w pracy 2 zostały zrealizowane w ramach grantu SONATA 14 (2018/31/D/NZ9/01610) *Badanie interakcji w układzie roślina-bakterie podczas wspomaganą fitoremediacji gleby ko-zanieczyszczonej węglowodorami i metalami ciężkimi* finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, a także w ramach projektu badawczego *Monitorowanie bioróżnorodności i aktywności degradacyjnej zespołów bakteryjnych zamieszkujących glebę zanieczyszczoną związkami ropopochodnymi poddaną procesowi bioaugmentacji* dla młodych pracowników nauki finansowanego ze środków JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. W obu projektach pełniłam rolę kierownika.

W kolejnym etapie prowadzono badania mające na celu usuwanie zanieczyszczeń z gleb z wykorzystaniem fitoremediacji wspomaganą bioaugmentacją i/lub biostymulacją. W badaniach tych wykorzystano gleby o długiej historii zanieczyszczenia węglowodorami oraz gleby ko-zanieczyszczone węglowodorami i metalami ciężkimi (HMs). Połączenie technik bioaugmentacji/biostymulacji i fitoremediacji pozwala zwiększyć efektywność usuwania węglowodorów z gleby, a w

przypadku gleb skażonych HMs (w tym ko-zanieczyszczonych) fitoremediacja jest jedyną biologiczną metodą pozwalającą na usunięcie zanieczyszczeń metalicznych.

3. A deeper insight into the phytoremediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons supported by the *Enterobacter ludwigii* ZCR5 strain

W pracy 3 opisano wyniki kompleksowych badań fitoremediacyjnych gleby z długą historią skażenia PHs. W badaniach tych do wspomaganie fitoremediacji zastosowano bioaugmentację szczepem *Enterobacter ludwigii* ZCR5, a w układach kontrolnych glebę traktowano termicznie inaktywowanymi komórkami tego szczepu lub wodą. Doświadczenie doniczkowe poprzedziła analiza potencjału genetycznego, jak i biochemicznego szczepu ZCR5 pod kątem aktywności mechanizmów kluczowych do wspomaganie procesu fitoremediacji. Ponadto, w pracy określano rzeczywistą aktywność bakteryjnych mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za wspomaganie fitoremediacji w trakcie prowadzonego doświadczenia. Aktywność ta była monitorowana poprzez pomiar poziomu ekspresji wybranych genów, których obecność w genomie szczepu ZCR5 potwierdzono uprzednio na drodze analizy bioinformatycznej (**Zal. 4C**). Zastosowane podejście było modyfikacją, a zarazem rozwinięciem analizy przeprowadzonej w pracy 1, w której badano poziom ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów alifatycznych z wykorzystaniem starterów uniwersalnych dla wielu grup bakterii. Wprowadzona modyfikacja polegała na określeniu poziomu ekspresji wybranych genów z użyciem zarówno starterów uniwersalnych dla wielu grup bakterii, jak i zaprojektowanych przez mnie starterów specyficznych dla szczepu ZCR5. Dzięki temu możliwa była ocena ekspresji wybranych genów bakterii autochtonicznych oraz specyficznych dla szczepu ZCR5.

Wykorzystany w doświadczeniu endofityczny szczep ZCR5 wyizolowano z liści kukurydzy rosnącej w glebie zanieczyszczonej węglowodorami w bezpośrednim sąsiedztwie koksowni „Jadwiga” w Zabrze. Wybór endofitycznego szczepu bakterii miał na celu zwiększenie efektywności procesu fitoremediacji zanieczyszczeń poprzez nawiązanie ścisłych relacji pomiędzy inokulantem a stosowaną rośliną. Wyniki wielu badań wykazały, że bakterie endofityczne wprowadzone do gleby skutecznie kolonizowały tkanki roślinne, promowały wzrost roślin oraz wykazywały wysoką aktywność degradacyjną PHs, zarówno w ryzosferze jak i endosferze roślin użytych do

fitoremediacji (Afzal et al., 2013; Khan et al., 2013; Weyens et al., 2010, 2009). Wykorzystany w doświadczeniu szczep ZCR5 w warunkach laboratoryjnych degradował węglowodory ropopochodne, produkował biosurfaktanty, a także wykazywał aktywność wybranych mechanizmów potencjalnie przydatnych do bakteryjnego wspomaganie wzrostu roślin, takich jak produkcja amoniaku oraz IAA, aktywność deaminazy ACC, a także zdolność do uwalniania fosforu z trudno rozpuszczalnego $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Analiza genomu szczepu ZCR5 wykazała obecność genów kodujących enzymy zaangażowane w prowadzenie wymienionych powyżej procesów oraz dodatkowo obecność genów związanych z biosyntezą sideroforów (enterobakteryjny i aerobakteryjny), egzopolisacharydów (celulozy), a także genów zaangażowanych w chemotaksję oraz ruch. Zaobserwowano, że w warunkach laboratoryjnych szczep ZCR5 nie wykazywał zdolności do produkcji sideroforów, jednak posiadał geny, których transkrypty są niezbędne do ich produkcji. Można, zatem przypuszczać, że wytwarzanie sideroforów przez ten szczep jest ściśle związane z warunkami środowiskowymi, w których się znajduje.

Doświadczenie doniczkowe wspomaganie fitoremediacji prowadzone było w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem życicy trwałej (*Lolium perenne* L. cv. Pinea), którą posiewano w liczbie 220 nasion do doniczek zawierających 500 g s.m. gleby skażonej PHs. Do inokulacji gleby wykorzystano spontanicznego mutanta szczepu ZCR5 opornego na rifampicynę (ZCR5^{rif}) o identycznych cechach jak szczep macierzysty. Dwa tygodnie po wykiełkowaniu roślin do gleby wprowadzano komórki szczepu ZCR5^{rif} w liczbie 10^8 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby, zarówno w postaci żywych komórek (bioaugmentacja, BA) jak i w postaci komórek inaktywowanych termicznie (biostymulacja, BS). Dodatkowo, przygotowano doniczki kontrolne, w których życica trwała w czasie inokulacji pozostałych układów traktowana była sterylną wodą (kontrola, W). Eksperyment prowadzony był przez 28 dni, a w trakcie jego trwania w układach BA monitorowano przeżywalność inokulanta w glebie, a także jego zdolność do kolonizacji tkanek życicy. Tego typu analizy stanowią bardzo ważny element eksperymentów z zastosowaniem fitoremediacji wspomaganie bakteriami, gdyż pozwalają określić czy obserwowany pod koniec doświadczenia efekt był spowodowany aktywnością wprowadzonego szczepu, czy też wynikał z innych czynników, takich jak nawożenie roślin martwą biomasą bakterii pochodzącą z wprowadzonego szczepu (układ BS). Analiza przeżywalności *E. ludwigii* ZCR5 wykazała, iż liczba komórek tego szczepu w glebie malała w trakcie trwania

eksperymentu i ostatecznie w czwartym tygodniu po inokulacji była o 99% mniejsza w stosunku do liczby komórek wprowadzonych, jako inokulum. Endofityczny szczep izolowany z tkanek kukurydzy nie wykazywał specyficzności względem gospodarza roślinnego i kolonizował korzenie życicy już w pierwszym tygodniu po wprowadzeniu do gleby. Od drugiego tygodnia eksperymentu obecność szczepu ZCR5^{rif} potwierdzono również w częściach nadziemnych życicy, gdzie liczba komórek tego szczepu utrzymywała się do końca trwania doświadczenia na poziomie 2-3 log₁₀ j.t.k. g⁻¹ świeżej masy (ś.m.) pędów.

Pomimo tego, iż liczba opornych na rifampicynę komórek szczepu ZCR5 w glebie spadała w trakcie trwania eksperymentu, obserwowano jego stymulujący wpływ na biomasa roślin. Po zakończeniu eksperymentu świeża biomasa części nadziemnych roślin z układu BA była o 16% większa względem biomasy roślin kontrolnych, podczas gdy w układzie BS była jedynie o 3% większa, w porównaniu do kontroli. Z kolei biomasa korzeni roślin z układów BA i BS była istotnie wyższa w porównaniu z kontrolą w trzecim i czwartym tygodniu trwania eksperymentu.

Po zakończeniu eksperymentu w glebach pochodzących z wszystkich układów badawczych oszacowano procentowy ubytek PHs. Najwyższy, wynoszący 30,62%, ubytek PHs obserwowano w glebie BA traktowanej żywymi komórkami ZCR5^{rif} i był on istotnie statystycznie wyższy od ubytku odnotowanego w glebach BS (17,62%) oraz W (12,87%). Spośród testowanych układów największą biomasa roślin uzyskano również w układzie BA, co świadczy o istotnej roli tego inokulanta, pomimo stałej redukcji jego liczby w glebie, we wspomaganie fitoremediacji gleby skażonej PHs.

W czasie trwania eksperymentu analizowano aktywność bakteryjnych mechanizmów przydatnych we wspomaganie fitoremediacji gleb skażonych PHs. W tym celu zarówno w ryzosferze jak i korzeniach i liściach życicy monitorowano ekspresję wybranych genów bakteryjnych. Tego typu analizy pozwalają określić rzeczywistą aktywność bakterii (w tym inokulantów) w środowisku w trakcie prowadzonych doświadczeń wspomaganie fitoremediacji, jednak wciąż nie są powszechnie prowadzone w badaniach fitoremediacyjnych. Wielu autorów zakłada, że po inokulacji do skażonej gleby zastosowane szczepy będą wykazywały potencjał metaboliczny potwierdzony uprzednio w laboratoryjnych testach biochemicznych. Wyniki doświadczeń, opisywane w pracach 3 oraz 5 pokazują jednak, że jest to podejście wymagające weryfikacji.

W ramach tych analiz wyznaczano między innymi poziom ekspresji genu 16S rRNA w glebie i tkankach życicy z wykorzystaniem uniwersalnych starterów bakteryjnych. Na tej podstawie pośrednio określano całkowitą liczbę bakterii w analizowanych układach badawczych. Określano także poziom ekspresji genów zaangażowanych w rozkład węglowodorów alifatycznych: *alkH*, CYP153, C230, *nidA*, *nahAc*, kodujących odpowiednio hydroksylazę alkanową, hydroksylazę alkanową związaną z cytochromem P450, 2,3-dioksygenazę katecholową, dioksygenazę indukowaną naftalenem i dioksygenazę naftalenową, a także genów związanych z produkcją biosurfaktantów: *sfp* i *rhlB*, kodujących odpowiednio transferazę 4'-fosfopanteteinyłową i transferazę ramnozyłową. Ponadto, z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych dla specyficznych genów związanych z promowaniem wzrostu roślin obecnych w genomie szczepu ZCR5^{rif}, sprawdzano ekspresję tych genów w glebie i roślinie w trakcie trwania eksperymentu fitoremediacyjnego. Dzięki takiemu podejściu możliwe jest określenie, które z mechanizmów wspomagania fitoremediacji potwierdzone wcześniej dla szczepu ZCR5^{rif} były aktywne podczas prowadzonego eksperymentu. Ponadto, wyznaczając poziom ekspresji genów związanych z rozkładem węglowodorów zarówno w ryzosferze jak i endosferze korzeni i pędów roślin, możliwe jest wskazanie nisz, w których zachodzą procesy degradacji PHs.

Spośród 17 analizowanych genów w testowanych próbkach odnotowano ekspresję trzech z nich, tj. 16S rRNA, CYP153 oraz *nahAc*. Nie zaobserwowano jednak ekspresji genów kodujących enzymy związane z mechanizmami promowania wzrostu roślin, których obecność potwierdzono w genomie szczepu ZCR5^{rif}. W przypadku genu 16S rRNA istotne statystycznie różnice pomiędzy układami badawczymi obserwowano tylko w ryzosferze. W próbkach tych w pierwszym tygodniu trwania eksperymentu istotnie statystycznie wyższy poziom transkryptów tego genu uzyskano w ryzosferze BS, w porównaniu w układami BA oraz W. Okresowe zwiększenie liczby bakterii w glebie BS mogło być wynikiem wprowadzenia do tej gleby łatwo dostępnych substancji odżywczych w postaci martwej biomasy bakterii, co sprzyjało ich namnażaniu. W drugim tygodniu trwania eksperymentu liczba transkryptów genu 16S rRNA była istotnie wyższa w próbkach BS i W, w porównaniu z próbkami BA. Mniejsza liczba transkryptów w układzie BA może wynikać z pogorszenia warunków środowiskowych spowodowanego zwiększeniem biodostępności zanieczyszczeń na skutek aktywności wprowadzonego szczepu. Obserwowany efekt był jednak przejściowy, gdyż w trzecim tygodniu trwania eksperymentu nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy

analizowanymi układami badawczymi. W przypadku genu CYP153 istotne statystycznie różnice w liczbie transkryptów tego genu uzyskano tylko w próbkach ryzosfery w drugim tygodniu trwania eksperymentu. Obserwowano wówczas istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji tego genu w ryzosferze roślin z układów BS oraz W, w porównaniu z ryzosferą BA. Ponadto, zaobserwowano, iż liczba transkryptów tego genu oszacowana w próbkach korzeni i pędów życicy była o jeden rząd wielkości niższa, w porównaniu z liczbą oszacowaną w próbkach ryzosfery. Ekspresja genu *nahAc* została potwierdzona tylko w glebie ryzosferowej. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy próbkami ryzosfery pochodzącymi z różnych układów badawczych zaobserwowano jedynie w drugim tygodniu trwania eksperymentu, w którym liczba transkryptów *nahAc* była wyższa w próbkach z układu BS, w porównaniu z pozostałymi układami badawczymi.

Podsumowanie:

- Endofityczny szczep *Enterobacter ludwigii* ZCR5, wyizolowany z tkanek kukurydzy, zasiedlał zanieczyszczoną glebę przez cały okres prowadzonego eksperymentu fitoremediacyjnego, a także wykazywał zdolność do kolonizacji tkanek życicy trwałej (*Lolium perenne* cv. Pinia);
- Inokulacja gleby żywymi komórkami szczepu ZCR5^{nif} spowodowała istotny statystycznie wyższy ubytek PHs, w porównaniu z pozostałymi układami badawczymi;
- Na podstawie obecności transkryptów genów kodujących enzymy degradacyjne we wszystkich testowanych niszach można przypuszczać, że zachodzi w nich degradacja PHs, przy czym najwyższą ich liczbę oznaczono w glebie ryzosferowej;
- Żywy szczep ZCR5^{nif} istotnie stymulował biomasę pędów życicy trwałej, w porównaniu z pozostałymi układami badawczymi;
- Aktywność szczepu ZCR5^{nif} określona w warunkach laboratoryjnych nie pokrywała się z jego rzeczywistą aktywnością w glebie;
- Nie można jednoznacznie określić mechanizmu/mechanizmów odpowiedzialnych za promowanie fitoremediacji gleby skażonej PHs przez szczep ZCR5^{nif}.

Prace 4 i 5 opisują wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu SONATA 14 (2018/31/D/NZ9/01610) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, *Badanie*

interakcji w układzie roślina-bakterie podczas wspomaganej fitoremediacji gleby ko-zanieczyszczonej węglowodorami i metalami ciężkimi, którego byłam kierownikiem. W projekcie tym bazując na wcześniej uzyskanych wynikach zaproponowałam wykorzystanie wspomaganej fitoremediacji do oczyszczania gleb ko-zanieczyszczonych. Konsekwentnie, w badaniach tych szczególny nacisk położony został na identyfikację mechanizmów wpływających na efektywność prowadzonego procesu.

4. Analysis of the genome of the heavy metal resistant and hydrocarbon-degrading rhizospheric *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6 strain and assessment of its plant-growth-promoting traits

W pracy 4 opisano wyniki badań, których celem było pozyskanie metaloopornych szczepów bakterii zdolnych do degradacji węglowodorów oraz wykazujących aktywność mechanizmów promowania wzrostu roślin. Spośród izolatów spełniających te kryteria do dalszych badań wyselekcjonowano najbardziej perspektywiczny szczep z zamiarem jego wykorzystania do wspomagania fitoremediacji gleby ko-zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi (PHs) i metalami ciężkimi (HMs). W pracy tej zaproponowano nowe podejście umożliwiające kompleksowe zbadanie potencjału bakterii do wspomagania procesu fitoremediacji takich terenów przed ich zastosowaniem w badaniach doniczkowych (**Zał. 4D**). Szczepy bakterii izolowano z ryzosfery oraz tkanek kukurydzy rosnącej w glebie ko-zanieczyszczonej PHs i HMs na podłożu minimalnym z dodatkiem ropy naftowej, jako jedyne źródło węgla i energii oraz w obecności jonów metali ciężkich. Następnie izolaty badano pod kątem aktywności mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin wykonując standardowe testy biochemiczne. Szczep ZCR6 był jednym z 26 izolatów wykazujących zdolność do wzrostu w podłożu minimalnym z dodatkiem ropy naftowej w stężeniu 1% (v/v), jako jedyne źródło węgla oraz cynku w stężeniu 3mM. Jako jedyny spośród przebadanych bakterii wykazywał równocześnie bardzo wysoką aktywność deaminazy ACC (296,76 nmoli α -ketomasłanu mg^{-1} białka h^{-1}), zdolność do efektywnej produkcji związków powierzchniowo-czynnych, IAA (3,59 $\mu\text{g ml}^{-1}$), sideroforów, amoniaku i celulazy, a także zdolność do uwalniania fosforu z trudno rozpuszczalnego $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (średnica przejaśnienia wokół kolonii wynosiła 6,5 mm).

Ponadto, efektywną degradację węglowodorów przez szczep ZCR6 potwierdzono w eksperymencie z użyciem płynnej pożywki minimalnej, w której ropa naftowa była jedynym źródłem węgla. Po czterech tygodniach hodowli szczepu ZCR6 w tej pożywce efektywność degradacji wynosiła 75%. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę filogenetyczną na podstawie sekwencji fragmentu genu 16S rRNA oraz analizę MLSA (*ang. multilocus sequence analysis*) trzech genów metabolizmu podstawowego (16S rRNA, *gyrB* oraz *rpoD*). Analiza filogenetyczna ujawniła wysokie podobieństwo szczepu ZCR6 do *Pseudomonas qingdaonensis* JJ3^T, wyizolowanego przez Wang et al. (2019) z ryzosfery orzeszków ziemnych. W celu dokładniejszego porównania obu szczepów przeprowadzono dodatkowe analizy, które wykazały, że szczep ZCR6 produkował oksydazę, katalazę i dihydrolazę argininy oraz syntetyzował piowerdynę. Nie produkował z kolei dehydrogenazy, ureazy, reduktazy azotanowej i żelatynazy, a także nie hydrolizował skrobi oraz nie uwalniał piocyjaniny. Dla testowanego szczepu przeprowadzona została również analiza komórkowych kwasów tłuszczowych. Wyniki te były w dużym stopniu zbieżne z wynikami uzyskanymi dla szczepu *P. qingdaonensis* JJ3, a obserwowane różnice mogą wynikać z naturalnej zmienności występującej między szczepami należącymi do tego samego gatunku, lub zastosowania innych protokołów hodowli szczepów przed izolacją kwasów tłuszczowych.

W kolejnym etapie przeprowadzona została analiza genomu szczepu *P. qingdaonensis* ZCR6 w celu określenia genetycznego potencjału tej bakterii do wspomagania fitoremediacji gleb ko-zanieczyszczonych PHs i HMs.

W genomie ZCR6 stwierdzono obecność genów *iscS* oraz *iscU* kodujących odpowiednio desulfurazę cysteinową oraz białko wiązania azotu, których sekwencje aminokwasowe są podobne do sekwencji białek NifS oraz NifU. Rolą białek NifS oraz NifU jest formowanie klastrów żelazowo-siarkowych niezbędnych w procesie dojrzewania nitrogenazy. Sama obecność produktów genów *iscS* oraz *iscU* jest, co prawda niewystarczająca, aby proces wiązania azotu mógł być przeprowadzony, jednak ze względu na możliwość krzyżowych interakcji (*ang. cross talk*) między białkami Nif oraz ISC wspomniane białka IscS oraz IscU mogą być wykorzystane do tworzenia klastrów żelazowo-siarkowych przez inne bakterie ryzosferowe, u których nastąpiła utrata funkcji białek NifS i/lub NifU.

Procesy solubilizacji fosforu nieorganicznego, mineralizacji fosforu organicznego, a także pobierania i transportu tego pierwiastka są kodowane są przez geny należące do trzech grup, których obecność potwierdzono w genomie szczepu ZCR6. Do pierwszej

grupy zaliczany jest gen *gcd* kodujący chinoproteinową dehydrogenazę glukozy (PQQGDH) oraz klaster genów *pqqABCDE* niezbędny dla syntezy chinonu pirolochinolinowego (PQQ). PQQGDH jest enzymem zaangażowanym w proces biosyntezy kwasu glukonowego (GA) w szklaku bezpośredniego utleniania glukozy, natomiast PQQ jest kofaktorem tej reakcji. Wydzielanie GA jest głównym mechanizmem solubilizacji mineralnego fosforu. Do grupy tej zaliczane są również obecne w genomie szczepu ZCR6 geny *ppa* oraz *ppx-gppA*, kodujące odpowiednio pirofosfatazę nieorganiczną odpowiedzialną za hydrolizę nieorganicznego pirofosforanu P_{Pi} do nieorganicznego fosforanu Pi oraz egzopolifosfatazę katalizującą proces hydrolizy końcowych reszt nieorganicznych polifosforanów (polyP) do Pi. Do drugiej grupy genów należą obecne w genomie ZCR6 geny *pit* i *pstSCAB*, których produkty zaangażowane są w procesy pobierania i transportu P. Trzecią grupę stanowią geny *phoB*, *phoR* i *phoU* biorące udział w regulacji zapotrzebowania na fosfor u bakterii. Białka PhoR oraz PhoB tworzą dwuskładnikowy system regulacyjny odpowiedzialny za reagowanie na zmieniające się stężenie P w środowisku.

W genomie szczepu ZCR6 obecne były również geny kodujące enzymy zaangażowane w proces rozszczepienia wiązania O-S w estrach siarczanowych oraz biorące udział w mobilizacji SO₄ z sulfonianów (*ssuABCDE*). Ponadto, potwierdzono obecność genów kodujących białka zaangażowane w proces transportu tiosiarczanu lub nieorganicznego siarczanu do komórek. Obecne były również geny, których produkty zaangażowane są w proces syntezy H₂S. Siarkowódor w niskich stężeniach odgrywa korzystną rolę w modulowaniu wzrostu i rozwoju roślin, szczególnie w takich procesach jak kiełkowanie nasion, organogeneza w tkance korzeniowej, zamykanie aparatów szparkowych oraz dojrzewanie roślin i kwiatów.

W genomie szczepu ZCR6 potwierdzono występowanie kilku genów kodujących siderofory, tj. *entD* kodującego enterobaktynę, *bfr* kodującego bakterioferrytynę oraz *pvd* kodującego piowerdynę. Ponadto, w genomie *P. qingdaonensis* wykryto obecność genów *exbD*, *fepA*, oraz *pvdF*, których produkty zaangażowane są w transport kompleksu siderofor-żelazo, a także genu *tonB* kodującego białko peryplazmatyczne dostarczające energii potrzebnej do translokacji kompleksu siderofor-żelazo przez błonę zewnętrzną do przestrzeni peryplazmatycznej bakterii Gram-ujemnych. Siderofory bakteryjne mogą być skutecznie wykorzystywane przez rośliny zarówno w celu zwiększenia dostępności żelaza, przez co stymulują one ich wzrost, ale również mogą one tworzyć stabilne kompleksy z innymi metalami, takimi jak Al, Cd, Cu, Pb i Zn,

zwiększając tym samym ich dostępność dla roślin, co jest szczególnie istotne w procesie fitoekstrakcji.

W genomie szczepu *P. qingdaonensis* ZCR6 obecne były również geny związane z syntezą IAA. Bakteryjna auksyna aktywuje proces zakwaszenia komórek roślinnych poprzez pompowanie protonów do ścian komórkowych, a to z kolei aktywuje białko zwane ekspansyną, które rozbija połączenia między celulozą a hemicelulozą, pozwalając komórkom na rozszerzanie się. Wśród zidentyfikowanych genów zaangażowanych w biosyntezę IAA potwierdzono obecność zarówno genów *trpABCDE* odpowiedzialnych za syntezę L-tryptofanu, głównego prekursora kwasu indolilo-3-octowego, jak i geny *aspC*, *aldA*, *aldB*, oraz *ipdC* bezpośrednio zaangażowane w szlaku syntezy IAA. Ponadto, stwierdzono również obecność genu *acdS* kodującego deaminazę ACC oraz genu *dcyD* kodującego desulfhydrilazę D-cysteiny, będącą homologiem deaminazy ACC. Oba enzymy odpowiedzialne są za hydrolizę ACC będącego prekursorem etylenu, do amoniaku i ketomasłanu. Jest to szczególnie istotne, ponieważ w warunkach stresowych koncentracja etylenu znacznie wzrasta, co niekorzystnie wpływa na wzrost korzeni i metabolizm całej rośliny, prowadząc do przyspieszonego jej starzenia.

Ponadto, szczep ZCR6 posiadał geny kodujące mechanizmy oporności na metale ciężkie (Cd, Co, Zn, Cu, As, Cr oraz Hg) oraz związane z produkcją egzopolisacharydów, których główną rolą jest ochrona komórek bakterii przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, w tym przed metalami ciężkimi. W genomie badanego szczepu obecne były również geny odpowiedzi na stres oksydacyjny, powstający w wyniku wytworzenia w środowisku reaktywnych form tlenu. Stwierdzono obecność genów *katE* i *katG* kodujących katalazę, *sod2* kodującego dysmutazę nadadtlenkową, GST kodującego S-transferazę glutationową, *ggt* kodującego hydrolazę glutationową, *gpx* kodującego peroksydazę glutationową oraz *gor* kodującego reduktazę glutationową. Szczep ZCR6 posiadał również geny związane z degradacją węglowodorów, zarówno alifatycznych jak i aromatycznych. Stwierdzono na przykład obecność genu *ladA* kodującego zależną od flavin długołańcuchową monoooksygenazę alkanową, przeprowadzającą terminalną oksydację długołańcuchowych alkanów (o długości od C15 do C36). Spośród genów zaangażowanych w degradację węglowodorów aromatycznych obecne były geny należące do operonu *pca* kodujące enzymy zaangażowane w katabolizm kwasu protokatechowego, jednego z 4 głównych intermediatów transformacji ksenobiotyków o budowie aromatycznej, który następnie

w szlaku β -ketoadypinowym rozkładany jest do acetylo- i bursztynylo- koenzymu A ostatecznie włączanych do cyklu Krebsa. Ponadto, w genomie szczepu ZCR6 znaleziono geny należące do operonu *hpa* zaangażowane w rozkład kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego przebiegający z rozszczepieniem pierścienia aromatycznego w pozycji meta z wytworzeniem produktów włączanych do cyklu Krebsa, a także geny zaangażowane w rozkład feniloacetylo-CoA (*paaABCDE*), etylobenzenu (*etbAa* oraz *etbAb*) oraz naftalenu (*nagZ*). Analiza genomu szczepu *P. qingdaonensis* ZCR6 wykazała również obecność genów zaangażowanych w syntezę metabolitów wtórnych, w tym substancji o charakterze biosurfaktantów (wiskozynu, orfamidu B i anikasinu).

Analizy genetyczne wykazały, więc duży potencjał genetyczny szczepu ZCR6 do wspomagania fitoremediacji terenów ko-zanieczyszczonych. Co istotne, nawet najdokładniejsza biochemiczna charakterystyka szczepu w warunkach laboratoryjnych, przeprowadzona zgodnie z przyjętymi protokołami, nie umożliwia wykazanie takiego potencjału dla testowanego szczepu. Otwartym pozostawało jednak zagadnienie związane z ekspresją tych mechanizmów w glebie skażonej w czasie eksperymentu doniczkowego. Stanowiło to jednak przedmiot badań, których wyniki opisano w pracy 5.

Podsumowanie:

- Analiza genomu szczepu *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6, wyizolowanego z ryzosfery kukurydzy rosnącej w glebie ko-zanieczyszczonej PHs i HMs, wykazała obecność genów związanych z degradacją związków organicznych, opornością na metale ciężkie, a także kodujących mechanizmy potencjalnie odpowiedzialne za promowanie wzrostu roślin;
- Przeprowadzone testy biochemiczne i degradacyjne wykazały, iż *P. qingdaonensis* ZCR6 degradował PHs i produkował związki powierzchniowo-czynne, a także był odporny na wybrane metale ciężkie (Cd, Zn oraz Cu);
- Szczep ZCR6 w warunkach laboratoryjnych wykazywał aktywność mechanizmów potencjalnie przydatnych do promowania wzrostu, tj. produkował IAA, siderofory, amoniak i celulazy, uwalniał fosfor z trudno rozpuszczalnych związków fosforu, a także wykazywał aktywność deaminazy ACC;

- Przeprowadzona charakterystyka genetyczna i biochemiczna szczepu *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6 potwierdziła jego potencjalną przydatność do wspomagania fitoremediacji gleb ko-zanieczyszczonych.

5. The potential of enhanced phytoremediation to clean up multi-contaminated soil – insights from metatranscriptomics

Szczep *P. qingdaonensis* ZCR6, którego szczegółową charakterystykę przedstawiono w pracy 4 został następnie wykorzystany w badaniach fitoremediacyjnych gleby o długiej historii zanieczyszczenia PHs i HMs (Zał. 4E). Ze względu na niewielką liczbę prowadzonych badań fitoremediacja gleb zanieczyszczonych PHs i HMs jest wciąż niedostatecznie opisana. Ponadto, oczyszczanie gleb ko-zanieczyszczonych jest procesem trudnym do przeprowadzenia ze względu na wciąż nie w pełni poznane interakcje pomiędzy samymi zanieczyszczeniami należącymi do różnych grup chemicznych, które mogą istotnie wpływać na efektywność procesu oczyszczania. Dodatkowo, obecność zarówno węglowodorów, jak i metali ciężkich w glebie jest kluczowym czynnikiem wpływającym na metabolizm, zarówno mikroorganizmów jak i roślin, co ma fundamentalne znaczenie dla efektywności fitoremediacji. W związku z tym w trakcie badań podjęto próbę zwiększenia efektywności tego procesu poprzez bioaugmentację gleby z wykorzystaniem żywych komórek szczepu ZCR6 oraz biostymulację z zastosowaniem martwej biomasy tego szczepu i/lub bionawozu - mączki mięsno-kostnej (MBM). MBM to produkt uboczny przemysłu mięsnego, niezdatny do spożycia przez ludzi. Zawiera dużą ilość składników odżywczych – węgla, azotu i fosforu, oraz niewielkie ilości potasu i magnezu, głównie w wolno rozpuszczalnych formach organicznych, co czyni go cennym źródłem składników odżywczych dla roślin oraz mikroorganizmów glebowych. Kluczowym i nowatorskim elementem przeprowadzonych badań było zastosowanie metatranskryptomnicznej analizy gleby w celu zidentyfikowania bakteryjnych mechanizmów decydujących o efektywności fitoremediacji. Wykorzystanie tej zaawansowanej techniki badawczej umożliwiło określenie wpływu zastosowanych zabiegów na globalną ekspresję bakteryjnych genów w glebie w trakcie prowadzonej fitoremediacji. W czasie przygotowania niniejszego wniosku w ogólnodostępnych

bazach literaturowych znaleziono dosłownie tylko kilka publikacji wykorzystujących tę technikę do wskazania kluczowych mechanizmów wpływających na efektywność wspomaganej fitoremediacji terenów skażonych.

Gleba wykorzystana w doświadczeniu została pobrana z okolic koksowni „Jadwiga” w Zabrze. Gleba ta była zanieczyszczona PHs oraz cynkiem (Zn), kadmem (Cd) i miedzią (Cu). Doświadczenie fitoremediacyjne prowadzone było w warunkach laboratoryjnych przez 40 dni od dnia inokulacji bakterii i obejmowało przygotowanie czterech układów badawczych z wykorzystaniem kukurydzy (*Zea mays*, P9363, Corteva Agriscience) traktowanej: 1) mączką mięsno-kostną (MBM) i żywymi komórkami szczepu ZCR6 (BL+MBM), 2) MBM i termicznie inaktywowanymi komórkami szczepu ZCR6 (BTI+MBM), 3) MBM oraz sterylną wodą oraz 4) sterylną wodą (W). Żywe bakterie w liczbie 10^8 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby, martwą biomasę bakterii (10^8 j.t.k. g^{-1} s.m. gleby, po termicznej inaktywacji) lub wodę (50 ml) wprowadzano do gleby 2 tygodnie po wykiełkowaniu nasion kukurydzy. Podobnie jak w pracach 1 oraz 3 przed rozpoczęciem doświadczenia doniczkowego pozyskano spontanicznego mutanta szczepu ZCR6^{rif}, który wykazywał takie same właściwości jak szczep macierzysty. Dodatkowo z wykorzystaniem techniki elektroporacji szczep ten został wyznakowany białkiem zielonej fluorescencji (*egfp*), dzięki czemu jego losy w glebie można było monitorować zarówno z wykorzystaniem klasycznej metody płytkowej na podłożu z dodatkiem rifampicyny, jak i przy użyciu rzadko wykorzystywanej do tego celu cytometrii przepływowej. Obecność szczepu ZCR6^{rif} w glebie została potwierdzona przez cały okres prowadzonego doświadczenia z wykorzystaniem obu metod, jednak liczba komórek bakterii oszacowana w kolejnych dniach trwania eksperymentu różniła się w zależności od zastosowanej techniki pomiaru. Wyniki uzyskane metodą seryjnych rozcieńczeń z zastosowaniem podłoża z dodatkiem antybiotyku wskazywały na stopniowe zmniejszanie liczby komórek szczepu ZCR6^{rif} w glebie BL+MBM w trakcie trwania eksperymentu. Zaobserwowano zmniejszanie się liczby komórek tego szczepu z początkowej wartości $8 \log_{10}$ do $3,7 \log_{10}$ j.t.k. g^{-1} s.m. gleby w 40 dniu od inokulacji, a więc o ponad cztery rzędy wielkości. Co interesujące, na podstawie wyników uzyskanych z wykorzystaniem cytometru przepływowego redukcję liczby komórek szczepu ZCR6^{rif} obserwowano jedynie w ciągu pierwszych 3 dni doświadczenia (z wartości $8 \log_{10}$ do $6,9 \log_{10}$ j.t.k. g^{-1} s.m. gleby). Po tym czasie liczba komórek tego szczepu pozostawała na zbliżonym poziomie aż do końca trwania eksperymentu. Obserwowane istotne różnice mogły być związane z opisywanym w literaturze

zjawiskiem „antibiotic masking” lub przechodzeniem komórek do stanu określanego, jako „żywy, ale nie hodowalny” (VBNC, *ang. viable but not culturable*), przez co zmniejszała się liczba komórek zdolna do wzrostu na stosowanym podłożu. Ponieważ w metodzie z wykorzystaniem cytometru przepływowego pomiaru liczby komórek dokonuje się bez konieczności ich hodowania na podłożach mikrobiologicznych metoda ta dostarcza bardziej wiarygodnych wyników, ponieważ uwzględnia również komórki szczepu ZCR6^{nif}, które osiągnęły stan VBNC.

Podczas prowadzonego eksperymentu fitoremediacyjnego, od dwudziestego dnia po wykiełkowaniu roślin, we wszystkich układach doświadczalnych z dodatkiem MBM obserwowano mniejszą biomasę korzeni jak i pędów kukurydzy, w porównaniu do roślin traktowanych wodą. Od trzydziestego dnia eksperymentu rośliny te zaczęły wykazywać objawy ekspozycji na działanie substancji fitotoksycznych i obumarły. W późniejszych dniach wzrost roślin obserwowano jedynie w glebie bez dodatku MBM, co wskazywało, że to dodatek tego bionawozu w stężeniu 2% a nie obecność zanieczyszczeń w glebie, był przyczyną zamierania roślin. Obserwowany negatywny wpływ MBM na wzrost roślin mógł być związany z uwolnieniem do gleby dużej ilości amoniaku na drodze amonifikacji i jego dalszej transformacji do toksycznych azotynów. W połowie czasu trwania doświadczenia oraz po jego zakończeniu w glebach pochodzących ze wszystkich układów badawczych wyznaczono procentowy ubytek TPH. W dwudziestym dniu eksperymentu we wszystkich glebach wzbogaconych MBM obserwowano około 32% redukcję stężenia węglowodorów, niezależnie od zastosowanego wspomaganie. W glebie kontrolnej, bez dodatku MBM, w której rośliny przetrwały do końca eksperymentu ubytek ten był istotnie niższy i wynosił 18%. Co istotne, od połowy czasu trwania eksperymentu, aż do jego końca nie obserwowano dalszej degradacji PHs. Obserwowana wysoka efektywność usuwania węglowodorów w glebach z dodatkiem MBM związana była z istotnie wyższą aktywnością mikrobiologiczną oszacowaną w tych glebach z użyciem metody hydrolizy dwuocianu fluoresceiny (FDA, *ang. fluorescein diacetate*). Obserwowane zależności są zgodne z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych badaniach, które wskazują, że ubytek węglowodorów był wynikiem aktywności mikroorganizmów autochtonicznych, pobudzonych do działania przez stosowane zabiegi.

Ze względu na to, iż w glebach z dodatkiem MBM rośliny nie przetrwały do końca czasu trwania eksperymentu zdolność do akumulacji testowanych metali ciężkich (Zn, Cd i Cu) określono tylko dla roślin hodowanych w glebie W. Rośliny te akumulowały

metale głównie w korzeniach, a wartości współczynnika translokacji były istotnie niższe od 1, co świadczy o ograniczonym potencjale niewspomaganej zabiegami kukurydzy do usuwania metali ciężkich z gleby ko-zanieczyszczonej.

Analizując opisane powyżej wyniki, pomimo potencjału wykazanego w badaniach biochemicznych i analizach genetycznych, nie zaobserwowano stymulującego wpływu szczepu ZCR6^{rif} na przebieg procesu bioremediacji gleby ko-zanieczyszczonej traktowanej MBM. W kolejnym etapie przeprowadzono analizę poziomu ekspresji wybranych genów w sposób analogiczny do analizy przeprowadzonej w pracy 3. Spośród testowanych genów we wszystkich badanych glebach obserwowano jedynie obecność transkryptów genu CYP153, kodującego hydroksylazę alkanową związaną z cytochromem P450 oraz genu *acdS*, kodującego deaminazę ACC. Co zaskakujące, liczba transkryptów genu CYP153 oszacowana w dwudziestym dniu eksperymentu była na istotnie niższym poziomie we wszystkich glebach wzbogaconych MBM, w porównaniu do gleby bez dodatku tego bionawozu. Z kolei efektywność usuwania węglowodorów w glebach z MBM była w tym dniu istotnie statystycznie wyższa, niż w glebie bez dodatku MBM. Na tej podstawie można podejrzewać, iż degradacja węglowodorów w analizowanych glebach zachodziła przy udziale innych niż analizowane enzymów, specyficznych dla mikroorganizmów autochtonicznych.

Ponieważ uzyskane do tej pory wyniki nie pozwoliły na zidentyfikowanie mechanizmów warunkujących zwiększone usuwanie węglowodorów z gleb wzbogaconych MBM, dla wszystkich układów badawczych w dwudziestym dniu eksperymentu wykonano analizę metatranskryptomoczną. Analiza ta umożliwiła określenie różnic w składzie taksonomicznym i profilach ekspresji genów bakterii zasiedlających badane gleby. Analiza metatranskryptomu gleb wykazała, iż zastosowanie MBM doprowadziło do przebudowy składu zespołów bakterii glebowych, powodując przede wszystkim wzrost udziału w tych glebach bakterii należących do rodzaju *Nitrospira*, *Albibacterium*, *Rhodobacter* oraz *Lysobacter*, w porównaniu z glebą W, w której dominowały bakterie z rodzaju *Rhodococcus*. W wyniku przeprowadzonej analizy różnicowej ekspresji genów wykazano, że wprowadzenie do gleby traktowanej MBM żywych komórek szczepu ZCR6 (gleba BL+MBM) spowodowało zmianę ekspresji 7602 genów (405 z nich ulegały zwiększonej, a 7197 obniżonej ekspresji), w porównaniu do gleby W+MBM. Porównanie gleb BTI+MBM oraz W+MBM nie wykazało genów, które ulegały zróżnicowanej ekspresji (DEGs, *ang. differentially expressed genes*), natomiast zidentyfikowano aż 11 095 DEGs (7580 o zwiększonej i

5204 o zmniejszonej ekspresji) porównując profile ekspresji genów z gleb W+MBM oraz W. W celu wskazania procesów biologicznych, które uległy zmianie w badanych glebach, dla genów o zmienionej ekspresji przeprowadzono analizy wzbogacenia (GO i KEGG enrichment pathway). Analizy te pozwoliły na zaproponowanie przyczyny niższej aktywności mikrobiologicznej odnotowanej przy użyciu metody hydrolizy FDA w glebie nawożonej MBA i traktowanej żywym szczepem ZCR6^{rif}, w porównaniu do gleby W+MBM. W glebie BL+MBM wykazano, bowiem znacząco niższą ekspresję genów biorących udział w takich procesach metabolicznych jak glikoliza, szlak Entnera-Doudoroffa, szlak utleniania pirogronianiu i szlak pentozofosforanowy, w porównaniu do gleby nieinokulowanej bakteriami. Ponadto, w glebie BL+MBM obserwowano zmniejszoną ekspresję genów kodujących białka stanowiące część systemów sekrecji (typu II, typu VI oraz Sec-SRP), będących wielobiałkowymi kompleksami wykorzystywanymi przez bakterie do przenoszenia substancji przez błonę komórkową. Ponieważ systemy te są ściśle związane z wydzielaniem przez bakterie wielu różnorodnych substratów biorących udział między innymi w adhezji bakterii do podłoża, tworzeniu biofilmu czy też procesie *quorum sensing*, odgrywają ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej. Zmniejszona ekspresja genów kodujących składniki tych układów w glebie BL+MBM mogła spowodować zaburzenie interakcji pomiędzy bakteriami, które funkcjonują w glebie, jako zespoły, co spowodowało obniżenie ich aktywności. Analiza wzbogacenia przeprowadzona dla DEGs obecnych w glebie W+MBM, w porównaniu do gleby W, wykazała między innymi zwiększoną ekspresję genu *pmoA-amoA* kodującego podjednostkę A monooksygenazy metanowej/amonowej biorącej udział w bakteryjnym utlenianiu metanu przez bakterie z rzędu *Nitrosomonadales*. Enzym ten charakteryzuje się niską specyficznością substratową, dlatego może katalizować proces utleniania szeregu substratów, w tym amoniaku, metanu, a także węglowodorów i związków aromatycznych. Zwiększoną ekspresję tych genów, w porównaniu do gleby W, zaobserwowano również w pozostałych glebach nawożonych mączką (BL+MBM oraz BTI+MBM). Zwiększona ekspresja genu *pmoA-amoA* była skorelowana ze zwiększonym procentowym udziałem bakterii z rzędu *Nitrosomonadales* w tych glebach. Ponadto, analiza metatranskryptomyczna ujawniła ekspresję genów CYP153 oraz *alkB* zaangażowanych w rozkład węglowodorów we wszystkich analizowanych glebach. Co istotne, ekspresji genu *alkB* nie wykazano z zastosowaniem metody RT-qPCR, Zaobserwowane różnice mogą wynikać z faktu, iż zastosowana w metodzie RT-qPCR para starterów była specyficzna dla wariantu genu,

który charakteryzuje się dużą zmiennością sekwencji w obrębie różnych grup bakterii. Podobne obserwacje zostały także zaprezentowane w pracy Frostegård et al. (2022). Ekspresja genów CYP153 oraz *alkB* oszacowana na bardzo niskim poziomie w glebach nawożonych MBM sugeruje, że kodowane przez nie enzymy nie miały istotnego udziału w rozkładzie węglowodorów w tych układach badawczych. Z kolei bardzo wysoka liczba transkryptów genu *pmoA-amoA* oszacowana w tych glebach wskazuje na kluczową rolę monooksygenazy metanowej/amonowej w zwiększonym usuwaniu węglowodorów. Wysoki poziom ekspresji genów kodujących ten enzym oraz dodatkowo dehydrogenazy hydroksyloaminowej w glebach z dodatkiem MBM zaangażowanych odpowiednio w utlenianie amoniaku do hydroksyloaminy i następnie do azotynów, jest potwierdzeniem wcześniejszych przypuszczeń na temat prawdopodobnego powodu zamierania roślin z układach nawożonych mączką mięsno-kostną.

Podsumowanie:

- Szczep *Pseudomonas qingdaonensis* ZCR6^{trif}, pomimo potwierdzonej w warunkach laboratoryjnych aktywności kilku kluczowych mechanizmów do wspomagania fitoremediacji gleb ko-zanieczyszczonych nie wspomagał tego procesu w czasie doświadczenia doniczkowego;
- Mączka mięsno-kostna stanowiła dobry biostymulant zwiększający aktywność mikroorganizmów autochtonicznych w glebie ko-zanieczyszczonej węglowodorami i metalami ciężkimi, co przekładało się na zwiększone usuwanie PHs z gleby;
- Dodatek mączki mięsno-kostnej w stężeniu 2% (w/w) do gleby ko-zanieczyszczonej węglowodorami i metalami ciężkimi miał negatywny wpływ na wzrost kukurydzy i doprowadził do śmierci roślin, prawdopodobnie na skutek gwałtownego zwiększenia ilości amoniaku w glebie i wywołanego przez to efektu toksycznego;
- Kukurydza wykazywała ograniczony potencjał do akumulacji metali ciężkich, a ich akumulacja miała miejsce głównie w korzeniach;
- Selekcja efektywnych szczepów wspomagających fitoremediację terenów ko-zanieczyszczonych, a także dobór odpowiednich roślin do tego procesu jest kluczowe dla uzyskania zadawalających efektów;
- Stosowanie zaawansowanych analiz genetycznych umożliwia wskazanie kluczowych bakteryjnych mechanizmów wpływających na efektywność

wspomaganej fitoremediacji, a także umożliwia identyfikację przyczyn niepowodzenia prowadzonych procesów.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć przedstawionych prac należy:

- Wykazanie, że biologiczny proces usuwania węglowodorów z gleb o długiej historii skażenia zachodzi głównie dzięki aktywności autochtonicznych zespołów mikroorganizmów.
- Potwierdzenie, że stosowanie bioaugmentacji i/lub biostymulacji w celu zwiększenia potencjału degradacyjnego zanieczyszczonej gleby powoduje potencjalnie korzystne zmiany w strukturze zespołów glebowych mikroorganizmów autochtonicznych.
- Wykazanie, że mączka mięsno-kostna stanowi dobry biostymulant zwiększający aktywność mikroorganizmów autochtonicznych w glebie ko-zanieczyszczonej węglowodorami i metalami ciężkimi, co przekłada się na zwiększone usuwanie zanieczyszczeń organicznych z gleby.
- Potwierdzenie, że analiza wprowadzonych do gleby bakterii wyznakowanych białkiem zielonej fluorescencji z zastosowaniem cytometrii przepływowej jest przydatną metodą umożliwiającą monitorowanie ich przeżywalności w tym środowisku. Metoda ta uwzględnia również wyznakowane GFP komórki będące w stanie VBNC.
- Wykazanie, iż analiza genomu szczepów bakterii wskazuje jedynie ich potencjał do wspomagania fitoremediacji, jednak nie gwarantuje selekcji najbardziej optymalnych szczepów.
- Wskazanie analiz transkryptomicznych, jako niezbędne narzędzie do śledzenia aktywności inokulantów i mikroorganizmów rodzimych w czasie wspomaganej fitoremediacji.
- Wykazanie przydatności biostymulacji do zwiększania efektywności fitoremediacji poprzez stymulację aktywności mikroorganizmów autochtonicznych.

Literatura

- Afzal, M., Khan, S., Iqbal, S., Mirza, M.S., Khan, Q.M., 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 85, 331–336. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2013.08.022>
- Alves, A.R.A., Yin, Q., Oliveira, R.S., Silva, E.F., Novo, L.A.B., 2022. Plant growth-promoting bacteria in phytoremediation of metal-polluted soils: Current knowledge and future directions. *Sci. Total Environ.* 838. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156435>
- Bartucca, M.L., Cerri, M., Del Buono, D., Forni, C., 2022. Use of Biostimulants as a New Approach for the Improvement of Phytoremediation Performance—A Review. *Plants* 11, 1946. <https://doi.org/10.3390/plants11151946>
- Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., Enshasy, H., 2021. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability (Switzerland)* 13, 1–20. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
- Cao, X., Cui, X., Xie, M., Zhao, R., Xu, L., Ni, S., Cui, Z., 2022. Amendments and Bioaugmentation Enhanced Phytoremediation and Micro-ecology for PAHs and Heavy Metals Co-contaminated Soils. *J. Hazard. Mater.* 426, 128096. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128096>
- Chirakkara, R.A., Cameselle, C., Reddy, K.R., 2016. Assessing the applicability of phytoremediation of soils with mixed organic and heavy metal contaminants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 299–326. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9391-0>
- Dai, Y., Liu, R., Zhou, Y., Li, N., Hou, L., Ma, Q., Gao, B., 2020. Fire Phoenix facilitates phytoremediation of PAH-Cd co-contaminated soil through promotion of beneficial rhizosphere bacterial communities. *Environ. Int.* 136, 105421. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.105421>
- European Environment Agency, 2021. Progress in management of contaminated sites. <https://doi.org/10.2788/4658>
- Feng, N.X., Yu, J., Zhao, H.M., Cheng, Y.T., Mo, C.H., Cai, Q.Y., Li, Y.W., Li, H., Wong, M.H., 2017. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–

- endophyte partnerships. *Sci. Total Environ.* 583, 352–368.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.075>
- Frostegård, Å., Vick, S.H.W., Lim, N.Y.N., Bakken, L.R., Shapleigh, J.P., 2022. Linking meta-omics to the kinetics of denitrification intermediates reveals pH-dependent causes of N₂O emissions and nitrite accumulation in soil. *ISME Journal* 16, 26–37.
<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01045-2>
- Glick, B.R., 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica (Cairo) 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J., He, Y., 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresour. Technol.* 101, 8599–8605.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.085>
- Herrero, M., Stuckey, D.C., 2015. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 140, 119–128.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.033>
- Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C., Kizilkaya, R., 2010. Effects of Heavy Metals on Soil Enzyme Activities, in: *Soil Heavy Metals*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 237–262.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436-8_11
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., Mirza, M.S., Khan, Q.M., 2013. Inoculum pretreatment affects bacterial survival, activity and catabolic gene expression during phytoremediation of diesel contaminated soil. *Chemosphere* 91, 663–668.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.01.025>
- Liu, S.H., Zeng, G.M., Niu, Q.Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L.H., Tan, X. F., Xu, P., Zhang, C., Cheng, M., 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresour. Technol.* 224, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095>
- Mukherjee, A., 2022. What do we know from the transcriptomic studies investigating the interactions between plants and plant growth-promoting bacteria? *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.997308>
- Nairn, J.D., Chanway, C.P., 2002. Temporary loss of antibiotic resistance by marked bacteria in the rhizosphere of spruce seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 40, 167–170.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00230-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00230-1)

- Nwankwegu, A.S., Onwosi, C.O., 2017. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environ. Technol. Innov.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2016.11.003>
- 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. *J Environ. Manage.* 168, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.11.058>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.018>
- 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. *Int. J Phyto.* 19. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1278420>
- 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. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070947>
- 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>
- Sharma, P.K., Sharma, V., Sharma, S., Bhatia, G., Singh, K., Sharma, R., 2019. Comparative metatranscriptome analysis revealed broad response of microbial communities in two soil types, agriculture versus organic soil. *J Genet. Eng. Biotechnol.* 17. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0006-3>
- Simmer, R.A., Schnoor, J.L., 2022. Phytoremediation, Bioaugmentation, and the Plant Microbiome. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05970>
- Stubbendieck, R.M., Vargas-Bautista, C., Straight, P.D., 2016. Bacterial communities: Interactions to scale. *Front. Microbiol.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., Rewald, B., De Bello, F., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>

- Vogel, T.M., 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 311–316. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80036-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80036-X)
- Wang, M.Q., Wang, Z., Yu, L.N., Zhang, C.S., Bi, J., Sun, J., 2019. *Pseudomonas qingdaonensis* sp. nov., an aflatoxin-degrading bacterium, isolated from peanut rhizospheric soil. *Arch. Microbiol.* 201, 673–678. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01636-w>
- Weyens, N., Truyens, S., Dupae, J., Newman, L., Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Carleer, R., Vangronsveld, J., 2010. Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environ. Pollut.* 158, 2915–2919. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2010.06.004>
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Vangronsveld, J., 2009. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 248–254. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2009.02.012>
- Wu, Y., Zeng, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Lin, X., 2017. PH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Sci. Rep.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep40093>
- Zhang, H., Dang, Z., Zheng, L.C., Yi, X.Y., 2009. Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). *Int. J Environ. Sci. Tech.* 6, 249–258. <https://doi.org/10.1007/BF03327629>

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Bakterie produkujące biosurfaktanty i ich wykorzystanie do wspomagania bioremediacji gleb zanieczyszczonych

Badania związane z określaniem zdolności bakterii do produkcji biosurfaktantów, czyli biologicznych substancji powierzchniowo-czynnych oraz testowaniem wpływu tych bakterii na efektywność procesów oczyszczania gleb skażonych realizuję od momentu rozpoczęcia Studiów Doktoranckich na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w 2009 roku aż do dnia dzisiejszego. Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej finansowane były w pierwszych

etapach z projektu nr NN523418237 *Zastosowanie odpadów i ścieków z różnych gałęzi przemysłu spożywczego do produkcji biosurfaktantów* finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Kierownikiem tego projektu była prof. dr hab. Grażyna Płaza z Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach, Koprojektorka przygotowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej. Badania te finansowane były również ze środków projektu PRELUDIUM 2 2011/03/N/NZ9/02089 *Monitorowanie struktury zespołów mikroorganizmów w glebach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi inokulowanych szczepami bakterii zdolnymi do rozkładu węglowodorów i produkcji biosurfaktantów*, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, w którym pełniłam funkcję kierownika. Uzyskane wyniki były podstawą przygotowania rozprawy doktorskiej będącej zbiorem publikacji naukowych pod wspólnym tytułem *Wykorzystanie bakterii produkujących biosurfaktanty w bioremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi*. W pracy tej potwierdziłam, że usuwanie związków ropopochodnych z zanieczyszczonej gleby może być efektywnie wspomagane przez wprowadzenie szczepów *Bacillus subtilis* T⁻¹ i *Pseudomonas* sp. P-1 zdolnych do rozkładu węglowodorów i produkcji biosurfaktantów. Wprowadzenie pojedynczych szczepów, a także ich konsorcjum powodowało zmiany zarówno w bioróżnorodności genetycznej jak i funkcjonalnej zespołów mikroorganizmów zasiedlających oczyszczaną glebę. Zmiany te prowadziły do zwiększonego usuwania węglowodorów z tej gleby. Ponadto, w pracy wykazałam, że melasa może być wykorzystywana, jako tanie, alternatywne do komercyjnych, podłoże do namnażania bakterii zdolnych do produkcji biosurfaktantów.

W czasie planowania i prowadzenia badań w ramach pracy doktorskiej dokonałam szczegółowego przeglądu dostępnej literatury związanej z tematyką pracy, a naukowym efektem tej aktywności było przygotowanie manuskryptu publikacji przeglądowej:

Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 633-654.

W pracy tej opisane zostały mechanizmy działania biosurfaktantów i możliwość ich zastosowania w badaniach środowiskowych, a także produkujących je szczepów bakterii do oczyszczania środowisk skażonych zarówno związkami organicznymi jak i nieorganicznymi. Praca ta została doceniona przez środowisko naukowe, o czym świadczy fakt, iż została do tej pory zacytowana przez innych badaczy ponad 700 razy (wg. bazy Scopus na dzień 27.08.2024r).

Wyniki uzyskane podczas realizacji badań w ramach pracy doktorskiej stanowiły podstawę do przygotowania trzech oryginalnych artykułów badawczych opublikowanych w czasopismach z listy JCR (*ang. Journal Citation Reports*):

- 1) Płaza G.A., **Pacwa-Płociniczak M.**, Piotrowska-Seget Z., Jangid K., Wilk K.A. 2011. Using agro-industrial wastes as unconventional substrates for growing of *Bacillus* strains and biosurfactant production. *Environment Protection Engineering* 37 (3): 63-71;
- 2) **Pacwa-Płociniczak M.**, Płaza G.A., Poliwoda A., Piotrowska-Seget Z. 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 21(15): 9385-9395;
- 3) **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.

Ponadto, wyniki uzyskane podczas realizacji badań, które prowadziłam w ramach projektu kierowanego przez prof. dr hab. Grażynę Płazę stanowiły podstawę do przygotowania artykułu naukowego:

Płaza G.A., Król E., **Pacwa-Płociniczak M.**, Piotrowska-Seget Z., Brigmon R.S. 2012. Study of antifungal activity of bacilli species cultured on agro-industrial wastes. *Acta Scientiarum Polonorum Seria Hortorum Cultus* 11(5): 169-182;

oraz rozdziału w monografii:

Płaza G.A., **Płociniczak M.**, Piotrowska-Seget Z., Brigmon R., Król E. 2015. Characterization of bacillus strains producing biosurfactants. W: *Environmental Sustainability. Role of green technologies 2015*, Thangavel P., Sridevi G. (Eds.), Springer India, 173-184.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora kontynuowałam badania związane z izolacją bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów i produkcji biosurfaktantów. Bakterie te izolowane były z gleby długotrwale skażonej węglowodorami, pobranej z okolicy rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach. Uzyskane izolaty były następnie charakteryzowane pod kątem zdolności do produkcji związków powierzchniowo-czynnych oraz aktywności mechanizmów potencjalnie przydatnych do wspomaganie wzrostu roślin w trakcie wspomaganie bakteriami fitoremediacji terenów zanieczyszczonych. Do badań związanych z wykrywaniem produkcji biosurfaktantów przez bakterie wykorzystano szereg technik, w tym hodowlę bakterii na dedykowanych podłożach laboratoryjnych (agar krwisty, podłoże z dodatkiem błękitu metylenowego) oraz metody oceny aktywności powierzchniowej (metoda oil-spreading),

emulsyfikacyjnej (wyznaczanie indeksu emulsyfikacji) i pomiaru napięcia powierzchniowego podłoża po hodowli testowanych szczepów z użyciem tensjometru. Na podstawie uzyskanych wyników **wykazano, że zastosowane metody różniły się czułością, a do uzyskania wiarygodnych wyników należy wykonać szereg uzupełniających się analiz.** Badanie aktywności mechanizmów uważanych za przydatne do wspomaganie wzrostu roślin obejmowało ocenę produkcji sideroforów, auksyny, zdolności do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego i wytwarzania deaminazy ACC. Mechanizmy te są wymieniane w literaturze, jako kluczowe do wspomaganie wzrostu roślin w warunkach stresu powodowanego przez skażenie. **Przeprowadzona charakterystyka pozwoliła na wyselekcjonowanie szczepów przydatnych w bioaugmentacji i/lub wspomaganej fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi.** Wyniki te zostały opublikowane w artykule:

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

Manuskrypt ten nie wchodził w skład pracy doktorskiej, ale ze względu na fakt, iż został wysłany do recenzji w 2015 roku, a więc przed obroną pracy doktorskiej nie został on włączony do opisu głównego osiągnięcia naukowego we wniosku habilitacyjnym.

Szczep *Rhodococcus erythropolis* CD 106 pozyskany i scharakteryzowany w ramach pracy Pacwa-Płociniczak i in. (2016), został wykorzystany do wspomaganie fitoremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami z wykorzystaniem życicy trwałej (*Lolium perenne*). **Uzyskane wyniki wykazały, że wprowadzenie szczepu CD 106 do gleby skażonej istotnie zwiększyło biomasę życicy oraz efektywność usuwania węglowodorów z gleby.** Szczep ten przeżywał w glebie przez cały okres prowadzonego doświadczenia, dzięki czemu można go uznać za dobrego kandydata do przygotowania bioszczepionki w celu wspomaganie fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. Wyniki te zostały opublikowane w pracy:

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.

W kolejnych badaniach przeprowadziłam charakterystykę właściwości powierzchniowo-czynnych endofitycznego szczepu *R. erythropolis* CDEL254, wykorzystanego następnie w badaniach, których wyniki opublikowano w pracy Ptaszek i in. (2020). W przeprowadzonym eksperymencie porównywano efektywność 11 biologicznych metod oczyszczania gleby skażonej węglowodorami ropopochodnymi. Zaobserwowano, że **pośród testowanych metod bio- i fito-remediacyjnych po 112 dniach trwania doświadczenia najwyższy ubytek TPH miał miejsce w glebie poddanej fitoremediacji z wykorzystaniem życicy trwałej, wspomaganej żywym szczepem CDEL254 oraz dodatkiem komercyjnego preparatu zawierającego biosurfaktant ramnolidowy**. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy:

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.

Wykorzystanie technik molekularnych do badania zespołów mikroorganizmów

Moje zainteresowania naukowe dotyczą również zastosowania technik molekularnych do badania struktury i aktywności mikroorganizmów autochtonicznych w środowiskach zanieczyszczonych. Techniki te wykorzystuję do określania oddziaływań zachodzących podczas procesu bioaugmentacji pomiędzy wprowadzanymi do środowiska bakteriami a mikroorganizmami autochtonicznymi. Analizy te są przydatne również w badaniach fitoremediacyjnych do śledzenia wzajemnych interakcji pomiędzy inokulantami oraz mikroorganizmami rodzimymi gleby, a także związanymi z roślinami (mikroorganizmy ryzosferowe i endofityczne). Większość opublikowanych prac z tematyki bio- i fito-remediacji skupia się wciąż głównie na oznaczeniu efektywności tego procesu, nie próbując wyjaśnić rzeczywistych powodów uzyskania danych rezultatów, a zatem pomijając zupełnie aspekt interakcji między zanieczyszczeniami a organizmami tworzącymi układy remediacyjne. Dlatego moje zainteresowania badawcze koncentrują się na analizie tych oddziaływań, a uzyskane wyniki przyczyniają się do uzupełnienia brakujących informacji na temat kluczowych mechanizmów determinujących skuteczność prowadzonych procesów bioremediacyjnych. W badaniach tych oprócz klasycznych technik hodowlanych i

testów biochemicznych opartych m.in. na analizie fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA, *ang. phospholipid fatty acid analysis*), wykorzystywano także elektroforezę w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE, *ang. denaturing gradient gel electrophoresis*), a obecnie do tych analiz stosuje się najczęściej reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR, *ang. real-time polymerase chain reaction*) oraz sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, *ang. next generation sequencing*) ampliconu 16S rRNA, lub całkowitego DNA/RNA izolowanego bezpośrednio ze skażonych środowisk.

W ramach tej tematyki, we współpracy z naukowcami z University of Helsinki, analizowałam wpływ metali ciężkich i ryzodepozycji lepnicy rozdętej (*Silene vulgaris*) na strukturę autochtonicznych zespołów mikroorganizmów w glebie silnie skażonej metalami ciężkimi. Badania te prowadzone były z wykorzystaniem materiału roślinnego i gleby pobranej z terenu nieczynnej Huty Metali Nieżelaznych w Szopienicach. **Wykazały one, że zarówno obecność rośliny jak i odległość od emitora nie miały wpływu na ogólną liczebność bakterii w analizowanych próbkach gleby. Parametry te miały natomiast wpływ na liczebność bakterii opornych na Cd, a także na strukturę zespołów mikroorganizmów.** Wyniki tych badań opublikowano w pracy:

Pacwa-Płociniczak M., Płociniczak T., Yu D., Kurola J.M., Sinkkonen A., Piotrowska-Seget Z., Romantschuk M. 2018. Effect of *Silene vulgaris* and heavy metal pollution on soil microbial diversity in long-term contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution* 229:13, 1-13.

Podobne badania związane z monitorowaniem zmian w strukturze zespołów bakterii autochtonicznych w trakcie prowadzonych procesów bioremediacyjnych prowadziłam również w ramach badań do projektu PRELUDIUM 2, w którym pełniłam funkcję kierownika. Wyniki te opublikowano 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

Ponadto, technik biologii molekularnej, a także zaawansowane narzędzia bioinformatyczne stosowałam do analizy struktury i aktywności mikroorganizmów zasiedlających zanieczyszczone środowiska realizując badania we współpracy z innymi naukowcami zajmującymi się bioremediacją. **Wyniki przeprowadzonych przeze mnie analiz dostarczyły kluczowych informacji na temat zmian w liczebności bakterii**

autochtonicznych w glebie w trakcie wspomaganej fitoekstrakcji gleby skażonej metalami ciężkimi z zastosowaniem gorczycy białej (*Sinapis alba*). Liczebność ta była określana z wykorzystaniem techniki **real-time PCR w oparciu o wyznaczenie liczby kopii genu 16S rRNA. Takie podejście metodyczne spowodowało, że uzyskane wyniki odzwierciedlały całkowitą liczebność bakterii w glebie, z uwzględnieniem frakcji VBNC. Ponadto, przeprowadziłam analizy bioinformatyczne wyników sekwencjonowania amplikonu 16S rRNA wyizolowanego z ryzosfery i endosfery gorczycy białej, w trakcie wspomaganej fitoekstrakcji metali ciężkich. Uzyskane wyniki, w czasie ich publikacji, były jednymi z pierwszych dostępnych danych dotyczących monitorowania struktury zespołów bakterii w ryzosferze i endosferze podczas procesu wspomaganej fitoekstrakcji. Tę samą metodykę wykorzystałam także do określenia zmian w strukturze zespołów bakterii zasiedlających wodę i osad rzeczny zanieczyszczony bisfenolem A i S w czasie prowadzonego procesu bioremediacji wspomaganej bioszczepionką. Wyniki tych analiz zostały opublikowane w następujących pracach:**

- 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;
- 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;
- 3) Noszczyńska M., **Pacwa-Płociniczak M.**, Bondarczuk K., Piotrowska-Seget Z. 2023. The microbial removal of bisphenols in aquatic microcosms and associated alteration in bacterial community. *Environmental Science and Pollution Research* 30(36), 85292-85304.

W ramach prowadzonych badań wyznaczałam również poziom ekspresji wybranych genów bakteryjnych w osadzie czynnym zanieczyszczonym jodowym środkiem kontrastowym – diatrizoatem. Na podstawie uzyskanych wyników przygotowywany jest manuskrypt: Nowak A., **Pacwa-Płociniczak M.**, Marchlewicz A. *The effect of long-term exposure to diatrizoate on microbial communities in activated sludge*, który w najbliższym czasie zostanie wysłany do recenzji w czasopiśmie z listy JCR. Ponadto, przeprowadziłam izolację RNA, a także analizę bioinformatyczną wyników sekwencjonowania metatranskryptomu ryzosfery jęczmienia odmiany Sebastian w warunkach niedoboru wody. Na podstawie uzyskanych wyników

przygotowany został manuskrypt Collin A., **Pacwa-Płociniczak M.**, Płociniczak T., Novak Ô., Marzec M., Guo W., Simpson C.G., Daszkowska-Golec A. *Molecular and hormonal strategies of barley in combating drought stress*, który wysłano do recenzji w czasopiśmie Journal of Applied Genetics.

Plany badawcze

Ponieważ zastosowanie bakterii promujących wzrost roślin do wspomagania fitoremediacji gleb zanieczyszczonych nie zawsze przynosi pożądany efekt, w najbliższym czasie planuję przeprowadzić badania mające na celu identyfikację przyczyn tych niepowodzeń. Uważa się, że dla procesu fitoremediacji wspomaganej bioaugmentacją kluczowe znaczenie mają wciąż nie do końca poznane interakcje zachodzące między bakteriami a roślinami, dlatego też planuję przeprowadzenie kompleksowej analizy, w której wyniki analiz metatranskryptomicznych gleby zestawię z wynikami analizy transkryptomicznej roślin wykorzystywanych do fitoremediacji. Przeprowadzone analizy (RNA-seq) gleby i rośliny dostarczą szczegółowych danych na temat procesów wspomagania wzrostu roślin przez bakterie *in vivo*. Wiedza ta umożliwi uzupełnienie wciąż dalece niepełnych danych literaturowych z tego tematu. Dysponuję już wynikami sekwencjonowania transkryptomu kukurydzy oraz metatranskryptomu gleby ko-zanieczyszczonej pochodzącymi z eksperymentu wspomaganej fitoremediacji, a w najbliższym czasie będę przeprowadzała ich analizę bioinformatyczną.

Ponadto, w ramach międzynarodowego projektu Recovering and Exploiting Old and New Barley Diversity for Future-Ready Agriculture (RecoBar) będę prowadziła badania dotyczące oddziaływań między bakteriami a jęczmieniem narażonym na działanie stresu wodnego, tj. suszy i zalewania nadmierną ilością wody. Stres ten, będący konsekwencją postępujących zmian klimatycznych, przyjmujących formę nierównoważonej i nieprzewidywalnej dystrybucji opadów atmosferycznych w ciągu roku, jest obecnie głównym czynnikiem abiotycznym ograniczającym produkcję roślinną na całym świecie. Jest to również zjawisko klimatyczne o największym negatywnym wpływie na światową produkcję zbóż. Jedną z metod jego łagodzenia jest inokulacja roślin bakteriami promującymi wzrost roślin, zasiedlającymi zarówno ich ryzosferę jak i endosferę. Zaplanowane w ramach projektu badania mają na celu analizę transkryptomu jęczmienia i metatranskryptomu jego ryzosfery, dzięki czemu możliwe będzie określenie bakteryjnych mechanizmów istotnych dla zwiększania tolerancji

roślin na stres suszy i zalania, co w konsekwencji pozwoli na usprawnienie procesu wspomagania roślin przez towarzyszące im bakterie w tych warunkach.

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

Moja współpraca z naukowcami z Finlandii rozpoczęła się w 2007 roku, w którym część badań do pracy magisterskiej wykonywałam w University of Helsinki w Finlandii w ramach programu LLP-Erasmus. Podczas mojego 4-miesięcznego pobytu w Department of Ecology and Environmental Sciences w Lahti pod opieką naukową prof. Martina Romantschuka (**Zał. 6A**) oraz dr. Aki Sinkkonena (**Zał. 6B**) poznawałam techniki biologii molekularnej, w tym metody elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE, *ang. denaturing gradient gel electrophoresis*) oraz metody łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR), a następnie wykorzystywałam je do badania bioróżnorodności zespołów bakterii glebowych. Metody te stosowałam także po powrocie do Polski podczas prowadzenia badań naukowych, a wyniki uzyskane z ich pomocą zostały następnie opublikowane w pracach z zakresu bio- i fitoremediacji (*Applied Soil Ecology* 2016 105, 76-85; *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019 169, 615-622; *Chemosphere* 2019, 219, 250-260; *Applied Soil Ecology* 2023, 181, 104651). Następnie w roku 2011 zostałam zaproszona przez dr. Aki Sinkkonena do udziału w badaniach realizowanych w ramach projektu LIMES (*Limits of microbial evolution in soil*), finansowanego przez Academy of Finland. Podczas trwającego 4 miesiące stażu naukowego w Department of Ecology and Environmental Sciences w Lahti uczestniczyłam w planowaniu i realizacji doświadczeń bioremediacyjnych gleb zanieczyszczonych chlorofenolami. Wyniki tych doświadczeń zostały następnie zaprezentowane na konferencji ISME – 14th International Symposium on Microbial Ecology, Kopenhaga, Dania.

W kolejnych latach wraz z dr. Sinkkonenem oraz prof. Romantschukiem podejmowaliśmy próby zdobycia finansowania wspólnych badań w ramach projektów 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*;
- Interreg Regionu Morza Bałtyckiego w osi priorytetowej 2: Efektywne zarządzanie zasobami naturalnymi, 2018 - projekt *Comprehensive Baltic Sea pollution reversion initiative*, w którym prof. Romantschuk zaproponował mi pełnienie roli lidera czwartego zadania badawczego;
- Horizon 2020 - projekt *Novel Phytoremediation Strategies Integrating Ecorestoration and Clean Biofuel Production*.

Pomimo, iż starania te nie przyniosły oczekiwanego rezultatu, doświadczenie, które nabyłam przy przygotowaniu międzynarodowych wniosków grantowych okazało się bardzo cenne w czasie aplikacji o środki krajowe.

W roku 2018 wraz z naukowcami z Finlandii opublikowałam artykuł naukowy:

Pacwa-Płociniczak M., Płociniczak T., Yu D., Kurola J.M., Sinkkonen A., Piotrowska-Seget Z., Romantschuk M. 2018. Effect of *Silene vulgaris* and heavy metal pollution on soil microbial diversity in long-term contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution* 229:13, 1-13 (**Zal. 6C**).

W czerwcu 2019 roku pozyskałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki na realizację projektu SONATA 14 *Badanie interakcji w układzie roślina-bakterie podczas wspomaganej fitoremediacji gleby ko-zanieczyszczonej węglowodorami i metalami ciężkimi*, w którym oficjalnymi wykonawcami byli naukowcy z Finlandii w osobach dr. Akiego Sinkkonena oraz dr Marji Roslund z University of Helsinki. W ramach konsultacji związanych z realizacją tego projektu w październiku 2019 roku gościłam dr Sinkkonena oraz dr Roslund na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Celem wizyty naukowców z Finlandii było m.in. opracowanie planu prowadzenia eksperymentów fitoremediacyjnych, a także wygłoszenie przez gości wykładów dla społeczności Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, WNP. Część uzyskanych w ramach współpracy naukowej z dr. Sinkkonenem i dr Roslund wyników została opublikowana w pracy:

Pacwa-Płociniczak M., Kumor A., Bukowczan M., Sinkkonen A., Roslund M., Płociniczak T., 2024. The potential of enhanced phytoremediation to clean up multi-

contaminated soil – insights from metatranscriptomics. *Microbiological Research* 284, 127738 (**Zał. 4E**)

Kolejne uzyskane wspólnie wyniki są obecnie poddawane analizom i w najbliższej przyszłości manuskrypt zostanie złożony do czasopisma z listy JCR. Współpraca z dr. Sinkkonenem i dr Roslund ma charakter aktywny, nawet po zmianie miejsca zatrudnienia fińskich naukowców na Natural Resources Institute (LUKE), Finland.

W roku 2017 prowadziłam współpracę naukową z mgr Martą Siebyłą z Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym. W ramach tej współpracy wykonałam następujące badania, 1) *Izolacja DNA oraz analiza qPCR dla genu 16S rRNA z próbek glebowych* (**Zał. 6D**) oraz 2) *Wykonanie łańcuchowej reakcji polimerazy PCR wraz z interpretacją wyników* (**Zał. 6E**).

W roku 2022 rozpoczęłam współpracę naukową z prof. dr hab. Łukaszem Chrzanowskim oraz dr Martą Woźniak-Karczewską z Zakładu Chemii Organicznej Politechniki Poznańskiej (**Zał. 6F**). W ramach tej współpracy do tej pory pełniłam rolę opiekuna naukowego stażu dla trzech Doktorantów wykonujących prace doktorskie pod kierunkiem prof. Chrzanowskiego i dr Woźniak-Karczewskiej. Podczas stażu Doktoranci uczyli się pod moją opieką metod izolacji RNA z tkanek rzepaku i miotły zbożowej. Przygotowane przez nich próbki zostały następnie wysłane do sekwencjonowania, a otrzymane wyniki są aktualnie przeze mnie analizowane i będą podstawą do przygotowania wspólnych manuskryptów naukowych. Ponadto, jeden z Doktorantów, podczas dwumiesięcznego stażu, przeprowadził pod moją opieką eksperyment naukowy mający na celu zbadanie wpływu wybranych herbicydowych cieczy jonowych na zdolność szczepu *Hansschlegelia zihuaiae* do kolonizacji tkanek kukurydzy i miotły zbożowej. W celu realizacji zaplanowanego zadania student wyselekcjonował rifampicynoopornego spontanicznego mutantu szczepu *H. zihuaiae*, i następnie w trakcie prowadzonego eksperymentu doniczkowego monitorował jego liczebność zarówno w glebie jak i wewnątrz korzeni i liści badanych roślin. Manuskrypt obejmujący wyniki uzyskane przez Doktoranta podczas stażu jest aktualnie w przygotowaniu.

W roku 2023 rozpoczęłam również współpracę naukową z prof. Jaco Vangronsveldem i dr Sofie Thijs z Centre for Environmental Sciences na University of Hasselt w Belgii (**Zał. 6G**). W ramach tej współpracy, na zaproszenie Profesora, odbyłam sześciotygodniowy staż naukowy w Belgii, podczas, którego uczyłam się

analizy bioinformatycznej wyników uzyskanych z sekwencjonowania metatranskryptomu gleby poddanej procesowi fitoremediacji wspomaganej konsorcjum mikroorganizmów. Uzyskane wyniki zostaną w najbliższym czasie opublikowane w czasopiśmie z listy JCR.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKE

a) Osiągnięcia dydaktyczne

Od momentu rozpoczęcia Studiów Doktoranckich na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach w 2009 roku prowadzę zajęcia laboratoryjne ze studentami studiów zarówno I jak i II stopnia kierunków biotechnologia i biologia realizując następujące moduły: mikrobiologia, mikrobiologia przemysłowa, mikrobiologia sanitarna, podstawy biotechnologii, biotechnologia mikroorganizmów, biotechnologia środowiskowa. Od roku akademickiego 2017/2018, po przejściu na etat adiunkta naukowo-dydaktycznego, prowadzę również wykłady w ramach modułu Mikrobiologia dla studentów I stopnia kierunków biologia i biofizyka.

Od początku Studiów Doktoranckich sprawowałam opiekę merytoryczną nad 5 magistrantami, których promotorem była dr hab. Zofia Piotrowska-Seget, natomiast od uzyskania stopnia doktora pełniłam rolę promotora 6 prac licencjackich oraz 4 prac magisterskich. Byłam również ko-promotorem pracy magisterskiej realizowanej przez studentkę programu Erasmus+ Sarę Gobetti z University of Turin, która została obroniona na macierzystej Uczelni z wyróżnieniem. Pełniłam również rolę promotora pomocniczego doktorantki, mgr Darii Chlebek, która 13 listopada 2023 roku obroniła pracę doktorską zatytułowaną *Identyfikacja i uwarunkowania genetyczne antagonistycznych oddziaływań endofitycznych szczepów *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 i *Serratia quinivorans* KP32 z fitopatogenami grzybowymi* (promotorem pracy była dr hab. Katarzyna Hupert-Kocurek, prof. UŚ). Aktualnie jestem promotorem pomocniczym mgr. Mateusza Glenszczyka, który realizuje pracę doktorską *Właściwości przeciwdrobnoustrojowe kokonów u pajaków przędących i nieprzędących* (promotorem pracy jest dr hab. Agnieszka Babczyńska, prof. UŚ, a obrona planowana jest na rok 2025).

W okresie od 01.03 do 30.06.2017 roku (**Zał. 7A**) oraz od 01.11.2017 do 30.06.2018 (**Zał. 7B**) pełniłam funkcję opiekuna merytorycznego Studenckich Zespołów Projektowych w projekcie „NEW. Zwiększenie konkurencyjności studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego na rynku pracy przez rozwój ich kompetencji zawodowych” w ramach Programu operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego. W trakcie działalności zespołów studenci, pod opieką merytoryczną pracowników naukowych, realizowali własne projekty naukowe, których wyniki prezentowali podczas I Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej „Aktualne Problemy Ochrony Środowiska” organizowanej w dniu 19 maja 2017 roku w Katowicach oraz 52 Ogólnopolskiej Konferencji Mikrobiologicznej „Mikrobiologia środowiskowa szansą dla biotechnologii i zrównoważonego rozwoju” organizowanej w 2018 roku w Ustroniu.

W latach 2015-2018 pełniłam rolę opiekuna studentów studiów I stopnia na kierunku Biotechnologia, a od roku 2022 pełnię rolę opiekuna anglojęzycznych studentów studiów II stopnia na kierunku Biotechnologia.

W roku akademickim 2018/2019 byłam tutorem lic. Agaty Czopki, w ramach projektu Tutornig dla najlepszych studentów Uniwersytetu Śląskiego. W ramach tego projektu studentka przygotowywała artykuł popularnonaukowy przedstawiający problem zanieczyszczenia środowiska naturalnego metalami ciężkimi i węglowodorami, a także opisujący możliwość oczyszczania takich środowisk z zastosowaniem roślin i towarzyszących im bakterii. Pełniłam również rolę tutora dla dwóch doktorantek - mgr Agaty Kumor (semestr zimowy roku akademickiego 2022/2023) oraz mgr Marty Bukowczan (semestr zimowy roku akademickiego 2023/2024). Pierwsza z nich przygotowywała pod moją opieką manuskrypt anglojęzycznego artykułu naukowego, zawierającego wyniki badań uzyskane w trakcie pierwszego roku studiów w Szkole Doktorskiej. Wkrótce manuskrypt zostanie wysłany do czasopisma New Biotechnology. Natomiast tutoring z mgr Martą Bukowczan obejmował szkolenie doktorantki w zakresie przeprowadzania analiz bioinformatycznych wyników sekwencjonowania próbek metatranskryptomicznych.

Przez cały czas pracy staram się podnosić swoje kompetencje dydaktyczne. W tym celu uczestniczyłam w następujących kursach, szkoleniach:

- Certyfikowane szkolenie „Pobieranie próbek środowiskowych do badań zgodnie z odpowiednimi normami” realizowane przez CE2 Centrum Edukacji M. Dziewa, E. Tarnas-Szwed Sp. j., 27.09.2023, Katowice;

- Certyfikowane szkolenie „Kontrolowanie jakości podłoży z zastosowaniem szczepów wzorcowych” realizowane przez CE2 Centrum Edukacji M. Dziwa, E. Tarnas-Szwed Sp. j., 28 - 29.09.2021, Katowice;
- Warsztaty „Tworzenie i praca z bazami danych” realizowane w ramach programu „SWAN. Szkolnictwo Wyższe Atrakcyjne i Nowoczesne – Podnoszenie Kompetencji Dydaktycznych Kadry Akademickiej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach”, 18.02. - 29.04.2019, Katowice;
- Certyfikowane szkolenie „Grywalizacja jako narzędzie w edukacji akademickiej” realizowane przez Collegium Wratislaviense w ramach programu „SWAN. Szkolnictwo Wyższe Atrakcyjne i Nowoczesne – Podnoszenie Kompetencji Dydaktycznych Kadry Akademickiej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach”, 18.09 – 21.09.2017, Katowice;
- Kurs „Sposób postępowania z substancjami i mieszaninami chemicznymi, zgodnie z przepisami rozporządzeń REACH i CLP” prowadzony przez Placówkę Niepubliczną Kształcenia Ustawicznego – Kursowego, 13.06.2017, Katowice.

Równocześnie przez cały czas staram się podnosić swoje kwalifikacje w zakresie obsługi aparatury i narzędzi bioinformatycznych. W tym celu uczestniczyłam w następujących szkoleniach:

- „Wprowadzenie do analizy RNA-seq” organizowane przez firmę data2biology sp. z o.o., 18-19.11.2023, szkolenie on-line;
- „Metagenomics, metatranscriptomics, and multi'omics for microbial community studies” organizowane przez firmę Physalia Courses, 12-16.06.2023, szkolenie on-line;
- „Praktyczne zastosowanie Pythona w naukach przyrodniczych i medycznych – dla początkujących” organizowane przez Fundację na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, 6-20.12.2022, szkolenie on-line;
- „Wprowadzenie do systemu LINUX dla biologów” organizowane przez firmę data2biology sp. z o.o., 26.11.2022, szkolenie on-line;
- „Obsługa cytometru przepływowego Sysmex Partec CyFlow® Space” realizowane przez przedstawiciela firmy Sysmex Polska Sp. z o.o., 29.07.2020, Katowice;
- „Wprowadzenie do obróbki i analizy danych NGS” realizowane przez firmę ideas4biology sp. z o.o., 3.11.2017, Poznań.

Wiedzę i umiejętności nabyte w trakcie tych szkoleń wykorzystuję w pracy naukowej oraz w pracy ze studentami, np. prowadząc Pracownię dyplomową lub pełniąc funkcję opiekuna seminarium.

W 2018 roku otrzymałam wyróżnienie przyznawane przez studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego - nagroda Złoty Mikroskop -III miejsce w kategorii „Najlepszy ćwiczeniowiec w roku akademickim 2017/2018” (**Zał. 7C**).

b) Osiągnięcia organizacyjne i popularyzujące naukę

W roku 2012 byłam członkiem komitetu organizacyjnego I Ogólnopolskiej Nocy Biologów organizowanej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska i od tego czasu, co roku, angażuję się w organizację i prowadzenie zajęć z dziećmi i młodzieżą szkolną. W roku 2015 przygotowywałam i prowadziłam również zajęcia w ramach wydarzenia popularnonaukowego Fascination of Plants Day. W 2017 roku brałam udział w konferencji naukowej zorganizowanej z okazji Dnia Patrona – Marii Skłodowskiej-Curie w Zespole Szkół w Tarnowskich Górach zatytułowanej „Kobieta, nauka, pasja, szczęście, sukces”, podczas której wygłosiłam referat popularnonaukowy a następnie uczestniczyłam w dyskusji z uczniami, podczas której odpowiadałam na pytania związane z pracą i studiowaniem na WNP (**Zał. 7D**). W 2023 roku uczestniczyłam w spotkaniu z uczniami klas siódmych i ósmych zorganizowanym przez Szkołę Podstawową nr 6 im. ks. Jana Twardowskiego w Mysłowicach, którego celem było przybliżenie uczniom zawodu naukowca (**Zał. 7E**). Prowadziłam również liczne zajęcia popularnonaukowe dla młodzieży z I Liceum Ogólnokształcącego im. Tadeusza Kościuszki w Mysłowicach oraz II Liceum Ogólnokształcącego im. Stefana Żeromskiego w Dąbrowie Górniczej. Ponadto, prowadziłam zajęcia popularnonaukowe podczas Tygodnia Mikroświata organizowanego w ramach 50 Tygodni w Mieście Nauki, związanego z przyznaniem Katowicom tytułu Europejskiego Miasta Nauki w 2024 roku.

Do mojej działalności popularnonaukowej zaliczam również promowanie nauki w formie wywiadów: udzielonych do UŚ TV, Gazety UŚ, czasopisma NO Limits, czasopisma Newsweek i Polskiej Agencji Prasowej, a także udział w programie telewizyjnym „Dzień dobry TVN”:

- „Bakterie kochają melasę” – udzielenie wywiadu Gazecie Uniwersyteckiej UŚ (<https://gazeta.us.edu.pl/node/272631>)
- „Pożyteczne bakterie” – promocja w Gazecie Uniwersyteckiej UŚ projektu PRELUDIUM *Monitorowanie struktury zespołów mikroorganizmów w glebach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi inokulowanych szczepami bakterii zdolnymi do rozkładu węglowodorów i produkcji biosurfaktantów* (<https://gazeta.us.edu.pl/node/274211>)
- „Rośliny i bakterie oczyszczające skażone gleby” - udzielenie wywiadu Gazecie Uniwersyteckiej UŚ (<https://gazeta.us.edu.pl/node/428263>)
- „*Legionella*, czyli przeciwnik dobrze znany” – udzielenie wywiadu dla telewizji Uniwersytetu Śląskiego (<https://www.youtube.com/watch?v=duIWTvhxC00>)
- Kłóskowicz M., Pacwa-Płociniczak M., Płociniczak T. 2021 Plants and Bacteria as Rescue for Contaminated Soil. No Limits, (2(4), 24-27. https://doi.org/10.31261/no_limits.2021.4.07)
- Oczyszczają glebę przy pomocy bakterii i roślin. "Jeśli dalej chcemy żyć na Ziemi, musimy o niej myśleć" – udział w programie telewizyjnym „Dzień dobry TVN” (<https://dziendobry.tvn.pl/styl-zycia/jak-zapanowac-nad-zanieczyszczeniem-gleb-bakterie-i-rosliny-moga-pomoc-naszemu-srodowisku-da334668-ls5315763>)
- „Rośliny i bakterie mogą oczyszczać glebę z substancji ropopochodnych” – udzielenie wywiadu Polskiej Agencji Prasowej (PAP) (<https://www.pap.pl/aktualnosci/news%2C805075%2Crosliny-i-bakterie-moga-oczyszczac-glebe-z-substancji-ropopochodnych.html>)
- „Bioszczepionka z bakterii oczyści glebę ze związków ropopochodnych” – udzielenie wywiadu Polskiej Agencji Prasowej (PAP) (<https://naukawpolsce.pl/aktualnosci/news%2C393728%2Cbioszczepionka-z-bakterii-oczysci-glebe-ze-zwiazkow-ropopochodnych.html>)
- „Kiedy praca to pasja” – udział w materiale video promującym badania i studia na Wydziale Nauk Przyrodniczych UŚ (<https://www.youtube.com/watch?v=mCwHNJiffsg>)
- „Podglądamy bakterie w akcji” zajęcia przygotowane w ramach X Ogólnopolskiej Nocy Biologów odbywającej się w formule on-line (https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=3OFkgc4FfWk&embeds_refering_euri=https%3A%2F%2Fopus.us.edu.pl%2F&feature=emb_imp_woyt)

W ramach działalności organizacyjnej byłam członkiem komitetu organizacyjnego 52 Ogólnopolskiej Konferencji Mikrobiologicznej „Mikrobiologia środowiskowa szansą dla biotechnologii i zrównoważonego rozwoju” organizowanej w dniach 12-15 czerwca 2018 roku w Ustroniu przez pracowników Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŚ. Od lutego 2020 roku jestem członkiem Zespołu ds. Promocji Wydziału Nauk Przyrodniczych UŚ, który działa z ramienia Pani Prodzian ds. Promocji Badań i Umiejdzynarodowienia dr hab. Agaty Daszkowskiej-Golec, prof. UŚ (**Zał. 7F**). W zespole tym byłam odpowiedzialna za stworzenie kanału „UŚ WNP” na platformie YouTube, którego działaniem zajmuję się do dnia dzisiejszego. Ponadto, w zespole tym jestem odpowiedzialna za promocję kierunków studiów na naszym Wydziale, w związku, z czym współtworzę opisy oraz infografiki kierunków studiów umieszczane na stronie internetowej WNP, biorę udział w kampaniach reklamowych promujących kierunków studiów na WNP (konsultuję grafiki uniwersyteckie oraz redaguję teksty do płatnej reklamy), przygotowywałam materiały do folderu promującego anglojęzyczne kierunki studiów na WNP, biorę udział w spotkaniach z Centrum Promocji UŚ oraz Centrum Komunikacji Medialnej UŚ. W roku 2020 brałam udział w przygotowaniu Wirtualnych Dni Otwartych na WNP, a także byłam współodpowiedzialna za przygotowanie cyklu filmów promocyjnych, w których pracownicy, studenci i absolwenci naszego Wydziału opowiadali o badaniach i studiach na WNP. Filmy te zostały umieszczone, jako 3 odrębne playlisty na kanale WNP UŚ:

- Kiedy praca to pasja (https://youtube.com/playlist?list=PL9c89Z-ISqp04ohx_eAIqY7K4IOSxqeJF&si=5Yp3OQAOYdRgS-6B),
- WNP w studenckim zwierciadle (<https://youtube.com/playlist?list=PL9c89Z-ISqp1kPQEMpHnAwJUEhq6qWUYW&si=702rmJBGQNIIdOebZ>)
- WNP we wspomnieniach absolwentów (https://youtube.com/playlist?list=PL9c89Z-ISqp3rrjRAR8jykT9Uh5_H0yGb&si=T4MW35b_6sdD11Vt)

W lutym 2021 roku w ramach podnoszenia swoich kompetencji do pracy w Zespole ds. Promocji brałam udział w szkoleniu on-line pt. „VIDEOMARKETING” organizowanym przez Zespół Ekspertów Manager Pelczar Sp. j. W latach 2021, 2022, 2023 oraz 2024 jako członek Zespołu ds. Promocji brałam udział w pracach komitetu organizacyjnego Ogólnopolskiej Nocy Biologów, a moja rola związana była z

przygotowywaniem materiałów promujących te wydarzenia w mediach. W latach 2021, 2022 oraz 2023 brałam udział w przygotowywaniu i realizacji, przy współpracy z Centrum Komunikacji Medialnej UŚ, videospotu reklamowego dotyczącego pracy naukowej oraz studiowania na WNP (https://youtu.be/R89QcJIHEq4?si=BjB_Nvgo59yyjbTL). W roku 2022 byłam członkiem komisji dokonującej wyboru najlepszego absolwenta WNP UŚ w ramach Programu Najlepszych Absolwentów UŚ.

W październiku 2022 roku praca Zespołu ds. Promocji WNP została nagrodzona nagrodą zespołową II stopnia JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za wybitne osiągnięcia organizacyjne na rzecz Wydziału Nauk Przyrodniczych (Zał. 7G).

7. OPRÓCZ KWESTII WYMIENIONYCH W PKT. 1-6, WNIOSKODAWCA MOŻE PODAĆ INNE INFORMACJE, WAŻNE Z JEGO PUNKTU WIDZENIA, DOTYCZĄCE JEGO KARIERY ZAWODOWEJ.

Za działalność naukową otrzymałam następujące nagrody:

1. Dodatek prokościowy JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za wpływ społeczny, 2020 (Zał. 8A),
2. Dodatek uczelniany JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za działania prokościowe, 2019 (Zał. 8B),
3. Nagroda naukowa JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach za rozprawę doktorską, 2017 (Zał. 8C)


(podpis wnioskodawcy)