

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

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

dr Agnieszka Kuźniar

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

Wydział Medyczny

Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów

LUBLIN 2023

1. Imię i nazwisko: Agnieszka Kuźniar

Adres służbowy: Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów

Instytut Nauk Medycznych

Wydział Medyczny

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

ul. Konstantynów 1 I, 20-708 Lublin

tel. 081-454-54-61, fax.: 081-445-46-11

e-mail: agnieszka.kuzniar@kul.pl

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

26.06.2008 – tytuł **magistra biotechnologii** uzyskany w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Skorupskiej, na podstawie pracy pt.: „Identyfikacja i analiza regionu replikacyjnego *repABC* plazmidu pRtTA1c *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1”.

24.04.2013 – tytuł **doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii** uzyskany na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, z **wyróżnieniem**, na podstawie pracy pt.: „Potencjał biotechnologiczny układu endofitycznego *Sphagnum* sp. - metanotrofy”, wykonanej pod kierunkiem prof. Zofii Stępniewskiej. Recenzentami dysertacji byli: prof. dr hab. Wanda Małek (UMCS) oraz dr hab. Mieczysław K. Błaszczuk, prof. SGGW.

3. Informacje o przebiegu pracy naukowej

2008–2014	Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy (obecnie Wydział Medyczny), Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, asystent naukowo-dydaktyczny
2014–do chwili obecnej	Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Medyczny, Katedra Biologii i Biotechnologii, adiunkt naukowo-dydaktyczny

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

„Bioróżnorodność endofitów pszenicy oraz możliwość ich wykorzystania w promowaniu wzrostu roślin”

a. autorzy, tytuły publikacji, rok wydania

A1. Wolińska A. [✉], **Kuźniar A.**, Gałązka A., 2020. Biodiversity in the rhizosphere of selected winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars – genetic and catabolic fingerprinting. *Agronomy*, 10(7), 953.

IF₂₀₂₀: 3,417; IF_{5 letni}: 4,0; punktacja MNiSW: 100; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 10

A2. **Kuźniar A.** [✉], Włodarczyk K., Wolińska A. 2019. Agricultural and biotechnological applications resulting from trophic plant-endophyte interactions. *Agronomy*, 9(12): 779.

IF₂₀₁₉ 2,603; IF_{5 letni}: 4,0; punktacja MNiSW: 100; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 15

A3. **Kuźniar A.** [✉], Włodarczyk K., Grządziel J., Goraj W., Gałązka A., Wolińska A., 2020. Culture-independent analysis of an endophytic core microbiome in two species of wheat: *Triticum aestivum* L. (cv. ‘Hondia’) and the first report of microbiota in *Triticum spelta* L. (cv. ‘Rokosz’). *Systematic and Applied Microbiology* 43(1), 126025.

IF₂₀₂₀: 3,725; IF_{5 letni}: 3,601; punktacja MNiSW: 100; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 45

A4. **Kuźniar A.** [✉], Włodarczyk K., Grządziel J., Woźniak M., Furtak K., Gałązka A., Dziadczyk E., Skórzyńska-Polit E., Wolińska A. 2020. New insight into the composition of wheat seed microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4634.

IF₂₀₂₀: 5,924; IF_{5 letni}: 6,208; punktacja MNiSW: 140; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 22

A5. Makar O. [✉], **Kuźniar A.**, Pastula O., Kavulych Y., Kozlovsky V., Wolińska A., Skórzyńska-Polit E., Vatamaniuk O., Terek O., Romanyuk N. 2021. Bacterial Endophytes of Spring Wheat Grains and the Potential to Acquire Fe, Cu, and Zn under Their Low Soil Bioavailability. *Biology*, 10, 409.

IF₂₀₂₁: 5,168; IF_{5 letni}: 4,4; punktacja MEiN: 100; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 5

[✉] autor korepondencyjny

A6. Kuźniar A. [✉], Włodarczyk K., Sadok I., Staniszevska M., Woźniak M., Furtak K., Grządziel J., Gałązka A., Skórzyńska-Polit E., Wolińska A. 2021. A Comprehensive Analysis Using Colorimetry, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Bioassays for the Assessment of Indole Related Compounds Produced by Endophytes of Selected Wheat Cultivars. *Molecules*, 26, 1394

IF₂₀₂₁: 4,927; IF_{5 letni} 4,9; punktacja MEiN: 140; liczba cytowań (wg bazy Web of Science): 3

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **25,764** i/lub **27,109** (uwzględniając IF_{5 letni}).

Sumaryczna liczba punktów MNiSW/MEiN za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **680**.

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science): **100**.

Indeks Hirscha z dnia złożenia wniosku – **15**.

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

Osiągnięcie naukowe, stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi 6 prac opublikowanych w latach 2019–2021, pod wspólnym tytułem „Bioróżnorodność endofitów pszenicy oraz możliwość ich wykorzystania w promowaniu wzrostu roślin”. Wspomniane prace są efektem realizacji w latach 2018–2021 projektu Lider finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, pt. „Innowacyjny preparat do stymulacji wzrostu i plonowania pszenicy ozimej” (LIDER/7/0024/L-9/17/NCBR/2018), w którym pełniłam funkcję kierownika [**Zał. 4: II I**].

Na wstępie należy podkreślić, iż obecnie biotechnologia mikroorganizmów jest szybko rozwijającym się dziedziną wiedzy. Wśród kierunków badań jest analiza endofitów, która jest niezwykle ważnym aspektem w rozwoju nauk biologicznych, wraz z wieloma nowymi osiągnięciami w zakresie charakterystyki produktów naturalnych, a także z ich rosnącym wykorzystaniem w kontroli biologicznej oraz zastosowaniem tych mikroorganizmów do podtrzymania i wspomagania produkcji roślinnej.

[✉] autor korepondencyjny

Endofity pozyskiwane są ze wszystkich rodzajów tkanek roślinnych, które nie posiadają zewnętrznych objawów obecności drobnoustrojów. Intensywnie pokonywane kroki milowe w odkrywaniu i analizowaniu mikrobiomu ludzi i zwierząt, wywołało również ogromne zainteresowanie mikrobiomem roślinnym (m. in. głównie endofitami) i tym, jak te mikroorganizmy mogą wpływać na rozwój i zdolność rośliny do przeciwstawiania się chorobom, suszy, upałowi, zimnu i innym stresom środowiskowym. Co więcej, na wzrost zainteresowania drobnoustrojami endofitycznymi miało wpływ odkrycie, iż wiele z nich produkuje ważne związki o znaczeniu farmaceutycznym (biologicznie czynnym). Reprezentuję pogląd wraz z wieloma naukowcami, że biotechnologia mikroorganizmów może zostać rozszerzona o drobnoustroje endofityczne. Ta specjalność jest dojrzała do odkryć naukowych i wynalazków w wielu ważnych obszarach naukowych.

Doniesienia literaturowe prezentują definicję mikroorganizmów endofitycznych, od wczesnych czasów, niezmiennie podobną, mianowicie, że są to "mikroorganizmy związane z żywymi tkankami roślinnymi, które nie dają widocznych oznak swojej obecności w roślinie i wydają się nie szkodzić gospodarzowi" (Bacon i White 2000). Sugeruje się, że zapisy kopalne odnośnie mikroorganizmów endofitycznych pochodzą już sprzed ponad 400 milionów lat, co wskazuje na udział tych mikroorganizmów w adaptacji roślin żywicielskich do zmian siedliskowych (Card i wsp. 2016). Istnieją raporty, że wszystkie formy roślinne, w tym te występujące w oceanach świata, są gospodarzami lub są potencjalnymi gospodarzami dla jednego lub więcej gatunków endofitów (Stępniewska i Kuźniar 2013). Dodatkowo, wiele niższych roślin, takich jak mchy i wątrobowce są również gospodarzami dla endofitów (Stępniewska i Kuźniar 2013).

Nisze ekologiczne endofitów to praktycznie wszystkie tkanki organów roślinnych (korzenie, łodygi, liście, kwiaty, owoce, nasiona). Najczęściej obserwowanymi endofitami są grzyby (w przewodzie są to grzyby Ascomyceteous związane z Fungi Imperfecti). Często izolowanymi mikroorganizmami są także bakterie i to zarówno te nitkowate należące do typu Actinomycetes, jak również gatunki filogenetycznie przynależne do typu Proteobacteria. Okresowo izoluje się z materiału roślinnego również grzyby należące do typu Zygomycetes, oraz Basidiomycetes (Anisha i Radhakrishnan 2017). Należy podkreślić też fakt, że endofity bakteryjne w przyrodzie są bardzo zróżnicowane, polifiletyczne (Ibáñez i wsp. 2017). Potwierdzono, że nawet niektóre gatunki mykoplazm pozostają w symbiotycznym związku z wybranymi czerwonymi glonami z gatunków: *Bryopsis pennata*, *B. hypnoides*, a także z bakteriami z rodzaju *Arcobacter* (Gouda i wsp. 2016). Haridoim i wsp. (2015) opublikowali raport pokazujący dużą różnorodność bakterii endofitycznych na podstawie danych

uzyskanych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji genu 16S rRNA. Badania ujawniły łącznie 21 typów bakteryjnych, z czego tylko cztery typy stanowiły 96% różnorodności, w tym 54% Proteobacteria, 20% Actinobacteria, 16% Firmicutes i 6% Bacteroidetes (Hardoim i wsp. 2015). Udowodniono, że Proteobacteria z klasami α , β i γ -Proteobacteria okazały się być najbardziej dominującym typem, a następnie typami subdominującymi były Firmicutes i Actinobacteria. Rzadziej jako endofity występują typy Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Acidobacteria i Planctomycetes (Chaudhary i wsp. 2022). Do najczęściej występujących rodzajów bakterii endofitycznych należą: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* i *Microbacterium*, (Papik i wsp. 2020). Endofityczne Actinobacteria, które występują obficie w korzeniach, w umiarkowanych ilościach w łodygach, a najmniej obficie w liściach stanowią najważniejszą klasę endofitów bakteryjnych pod względem zastosowań praktycznych (Ganapathy i Natesan, 2018; Singh i Dubey, 2018). Natomiast, *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Arthrobacter* sp. i *Curtobacterium* sp. to powszechnie występujące endofityczne rodzaje aktynobakterii (Hardoim i wsp. 2015). Źródłem endofitów należących do typu Acidobacteria są ekosystemy namorzynowe, co więcej, udowodniono, że endofity tej formacji ziemno-wodnej są bardzo zróżnicowane (Azman i wsp. 2015).

Podaje się, że najczęstszą drogą kolonizacji endofitów bakteryjnych jest ryzosfera (Papik i i wsp. 2020). Istnieją doniesienia, że endofity bakteryjne pochodzą ze środowiska ryzosfery, która przyciąga mikroorganizmy ze względu na obecność wysięków korzeniowych i ryzodepozytów (Shaffique i wsp. 2022). Istnieją też sugestie, że wnikanie endofitów bakteryjnych do korzeni odbywa się poprzez kolonizację włóśników korzeniowych (Verma i wsp. 2021). Udowodniono również, że powierzchnie łodyg i liści wytwarzają wysięki, które przyciągają mikroorganizmy (Walitang i wsp. 2017). Jednakże, promieniowanie UV, brak składników odżywczych i wysychanie powodują mniejszą kolonizację powierzchni roślin i tylko wysoko wyspecjalizowane bakterie mogą przetrwać i „przedostać” się do rośliny przez szparę aparatów szparkowych, rany czy też hydatody (Walitang i wsp. 2017; Verma i wsp. 2021). Endofity mogą także wnikać do roślin przez kwiaty i owoce poprzez kolonizację antosfery i karposfery.

Mikroorganizmy mogą być ściśle związane z roślinami i odbywać większą część lub nawet cały swój cykl życiowy wewnątrz roślin. Mikroorganizmy, które wymagają tkanek roślinnych do zakończenia swojego cyklu życiowego są klasyfikowane jako endofity obligatoryjne. Dobrze udokumentowane przykłady endofitów obligatoryjnych można znaleźć wśród grzybów mikoryzowych i członków rodzajów grzybów *Balansia*, *Epichloë*

i *Neotyphodium*, z rodziny Clavicipitaceae, Ascomycota (Ferguson i wsp. 2021). Drugą grupą są endofity oportunistyczne, które rozwijają się głównie poza tkankami roślinnymi (jako epifity) i sporadycznie tylko wnikają do endosfery (Hardoim i wsp. 2015). Wśród mikroorganizmów oportunistycznych znajdują się tzw. „kolonizatorzy kompatybilni z ryzosferą”, między innymi takie jak bakterie z rodzajów *Pseudomonas* i *Azospirillum* oraz grzyby z rodzajów *Hypocrea* i *Trichoderma* (Hardoim i wsp. 2015). Interesujące jest, że endofity, które są przenoszone pionowo przez nasiona, często stają się mikroorganizmami epifitycznymi. Może to sugerować, że różne endofity mogą również kolonizować otaczające je środowisko roślin żywicielskich (Papik i wsp. 2020). Pomędzy tymi dwoma skrajnymi grupami endofitów istnieje grupa pośrednia, która obejmuje zdecydowaną większość mikroorganizmów endofitycznych, tzw. endofity fakultatywne. Przedmiotem dyskusji są hipotezy dotyczące endofitów fakultatywnych, mianowicie czy te mikroorganizmy wykorzystują roślinę jako wektor do rozprzestrzeniania się, czy też są aktywnie selekcjonowane przez gospodarza (Papik i wsp. 2020). Należy wziąć pod uwagę stwierdzenie, że endofity fakultatywne mogą przecież zużywać składniki odżywcze dostarczane przez rośliny, co w rzeczywistości zmniejszyłoby ekologiczną sprawność rośliny jako gospodarza. Stąd ten argument często jest przedstawiany do wyjaśnienia mutualistycznego (komensalnego) trybu życia endofitów fakultatywnych (Hardoim i wsp. 2015). Istnieją doniesienia o wpływie neutralnym endofitów, ale również szkodliwym na roślinę-gospodarza w normalnych warunkach wzrostu. Z drugiej strony mogą być korzystne oddziaływania endofitów w bardziej ekstremalnych warunkach lub podczas różnych etapów cyklu życia rośliny, wówczas mamy do czynienia z patogenami utajonymi (Devi i wsp. 2017). Znane są przykłady kiedy np. grzyb *Fusarium verticillioides* pełni podwójną rolę zarówno jako patogen, jak i korzystny endofit kukurydzy (Lofgren i wsp. 2018). Równowaga pomiędzy tymi dwoma stanami jest zależna od genotypu gospodarza, ale także od lokalnie występujących abiotycznych czynników stresowych, które obniżają kondycję gospodarza, co skutkuje zaburzeniem małej równowagi i wystąpieniem objawów chorobowych w roślinie oraz produkcją mykotoksyn przez grzyba (Lofgren i wsp. 2018). Wykazano jednak również korzystne działanie, np. szczepki grzyba endofitycznego *F. verticillioides* tłumią wzrost innego grzyba patogennego *Ustilago maydis*, chroniąc swojego gospodarza przed chorobą (Rodriguez Estrada i wsp. 2012).

Zbudowanie warsztatu naukowego podczas prowadzenia analiz nad endofitami roślin chronionych (*Sphagnum* sp.) do pracy doktorskiej pozwoliło na rozpoczęcie badań, w którym

materiałem badawczym były mikroorganizmy endofityczne wyizolowane z wnętrza tkanek roślin tym razem użytkowanych rolniczo – pszenicy ozimej.

Impulsem do podjęcia rozważań była analiza pozytywnych relacji endofit – roślina, która to przynosi korzystny efekt z uwagi na fakt, iż niektóre mikroorganizmy endofityczne mogą prowadzić stymulację rozwoju i wzrostu roślin, a także zwiększać przyswajalność substancji odżywczych. Niezwykle ważnym pozostaje fakt, że obiekt badań został wybrany na podstawie danych, iż dominującym gatunkiem roślin uprawianym w Polsce pozostaje pszenica, którą w roku 2022 zasiano na 2,5 mln ha polskich pól (ok. 42% zasiewów zbóż podstawowych z mieszankami zbożowymi, GUS 2022). Co więcej, pszenica ozima ma największe wymagania glebowe i płodozmianowe spośród gatunków zbóż uprawnych. Istotną rolę w wysokim plonowaniu pszenicy pełnią również zabiegi uprawowe, które mają na celu zmniejszenie ilości chwastów, które mogą zaatakować uprawę. Dlatego też mając na uwadze powyżej przedstawione informacje postawiono **hipotezę**, że mikroorganizmy endofityczne zasiedlają różne tkanki pszenicy uprawianej w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz mogą wspierać rozwój różnych gatunków i odmian pszenicy uprawianych w Europie.

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

- analizy aktywności metabolicznej/fizjologicznej oraz różnorodności genetycznej mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę gleb spod uprawy pszenicy [A1],
- profilowania składu mikrobiomu dwóch gatunków pszenicy ozimej: *Triticum aestivum* L. i *T. spelta* L. z wykorzystaniem sekwencjonowania genu 16S rRNA o wysokiej przepustowości [A2],
- analizy obciążenia bakterii (ang. *bacterial load*) nasion różnych gatunków i odmian uprawnych pszenicy [A4, A6],
- wytypowaniu endofitów obligatoryjnych i fakultatywnych stanowiących endosferę różnych części roślin: *Triticum spelta* L. cv. ‘Rokosz’ i *Triticum aestivum* L. cv. ‘Hondia’ [A1, A2, A4],
- izolacji mikroorganizmów endofitycznych z różnych gatunków i odmian pszenicy, które potencjalnie mogą promować wzrost roślin i stanowić skład biopreparatów do stosowania w uprawie pszenicy ozimej [A5, A6],
- określenie cech fenotypowych i genotypowych uzyskanych izolatów endofitycznych pod kątem stymulacji wzrostu pszenicy ozimej [A5, A6],
- analizy zależności między bakteriami endofitycznymi ziarna, stężeniami Fe, Cu i Zn a tym samym izolacji taksonów bakteryjnych o potencjale biotechnologicznym

polepszającym wzrost i rozwój roślin przeznaczonych do biofortyfikacji mikroelementów [A6].

Weryfikację postawionej hipotezy rozpoczęłam od analizy gleby ryzosferowej pod kątem różnorodności genetycznej i metabolicznej mikroorganizmów jako potencjalnego rezerwuaru endofitów bakteryjnych dla tkanek roślinnych. Do tego celu wybrałam gleby ryzosferowe czterech odmian uprawnych pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.): Hondia, Nordkap, Rotax, Tytanika uprawianych w systemie bezorkowym [A1]. W celu uzyskania całościowego obrazu bioróżnorodności zastosowałam dwie techniki, tj. sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*) amplikonów fragmentu genu 16S rRNA i profilowanie metaboliczne na poziomie społeczności (CLPP, ang. *Community Level Physiological Profiles*).

Określono, że bakterie z typu Proteobacteria (stanowiące 38–42% wszystkich odczytów sekwencji genu 16S rRNA) były dominantami w ryzosferze badanych gleb niezależnie od odmiany pszenicy. Kolejno mikroorganizmy subdominujące stanowiły bakterie należące do Bacteroidetes (4–13%), Firmicutes (8–11%) oraz Actinobacteria (9–15%). Należy podkreślić, że w odniesieniu do subdominantów odnotowano zróżnicowanie typologiczne w zależności od uprawianej odmiany pszenicy. Najwyższą liczbę odczytów sekwencji genu 16S rRNA Bacteroidetes odnotowano w ryzosferze odmian Hondia i Rotax (odpowiednio 13,14% i 10,86%), podczas gdy znacznie niższego poziomu przyporządkowania sekwencji genu 16S rRNA dokonano do typu Bacteroidetes w ryzosferze Nordkap (4,77%) i Titanika (3,79%). Względna liczebność przedstawicieli typu Firmicutes była najniższa w ryzosferze Rotax (8,7%), podczas gdy ich podobny poziom odnotowano w glebach ryzosferowych pobranych z pozostałych trzech odmian pszenicy (10-11%). Podobny trend zależności bogactwa Actinobacteria został udowodniony dla badanych odmian pszenicy. W pracy [A1] wykazano, że Actinobacteria preferowały (tzn. ich bogactwo było wyższe) ryzosferę Rotax (13,85%) i Titanika (15,14%), w przeciwieństwie do ryzosfery odmiany uprawnej Hondia (9,04%) oraz Nordkap (9,44%). Bogactwo ekologicznie ważnej grupy mikroorganizmów należącej do typu Verrucomicrobia w badanych glebach wynosiło 5% w ryzosferze Nordkap i Rotax. W pozostałych dwóch odmianach względne bogactwo mikroorganizmów osiągnęło niższą wartość: 3,74% (Hondia) i 4,35% (Titanika). Poziom bogactwa przedstawicieli należących do Acidobacteria wahał się od 1,8% (ryzosfera Rotax) do 4,64% (ryzosfera Hondia), podczas gdy Nitrosospirae preferowali jako korzystną niszę ekologiczną - ryzosferę Hondia (3,87%) a natomiast ich bogactwo było najmniej liczne w ryzosferze Rotax.

W ryzosferze *Triticum aestivum* L. odmiany uprawnej Hondia wykazano wzrost bogactwa mikroorganizmów należących do następujących klas: Betaproteobacteria, Sphingobacteriia, Gammaproteobacteria, Bacilli, Acidobacteria i Opitutae. Gatunki sklasyfikowane do Alphaproteobacteria dominowały w ryzosferze Rotax, podczas gdy ryzosfera Nordkap wydawała się być optymalną niszą ekologiczną dla mikroorganizmów z klas: Deltaproteobacteria, Clostridia i Calditrichae. Mikroorganizmy należące do klas Actinobacteria i Chlamydiae wykazywały najwyższe względne bogactwo w ryzosferze Tytanika [A1].

W ryzosferze badanych odmian pszenicy wykryto zarówno wspólne, jak i unikalne rodzaje mikroorganizmów. Stwierdzono, że mikrobiom ryzosferowy odmiany Hondia znacząco różnił się od pozostałych analizowanych odmian. Obejmował on rodzaje *Aquicella*, *Chitinophaga*, *Legionella*, *Nitrospira* i *Segetibacter*, których obecności nie wykryto w glebie ryzosferowej pozostałych odmian pszenicy. Tylko dwa rodzaje: *Edaphobacter* i *Vogesella* okazały się powszechne w glebach ryzosferowych odmian uprawnej Hondia i Tytanika. Dwa unikalne rodzaje bakterii *Desulfovibrio* i *Pedosphaera* odnotowano w ryzosferze Nordkap (nie zidentyfikowano ich w innych odmianach uprawnych), podczas gdy inne rodzaje były również charakterystyczne dla gleb ryzosferowych w uprawie pszenicy odmiany Rotax i Tytanika. Trzy rodzaje, tj. *Cellvibrio*, *Flavobacterium* i *Pedobacter* zostały uznane za charakterystyczne dla mikroorganizmów gleby ryzosferowej odmiany Rotax, podczas gdy *Gemmatimonas*, *Rhodoplanes* i *Saccharopolysphora* były powszechne w glebie ryzosferowej Tytanika. Rodzaje *Chondromyces* i *Cuthonobacter* zostały sklasyfikowane jako powszechne, ponieważ ich obecność wykazano w glebach ryzosferowych aż trzech odmian pszenicy: Nordkap, Rotax i Tytanika, podobnie jak rodzaj *Vogesella*, który był obecny w ryzosferach wszystkich analizowanych odmianach pszenicy [A1]. Podsumowując w ryzosferze badanych odmian pszenicy można odnotować bakterie, które mogą tworzyć endofityczny mikrobiom rdzeniowy pszenicy przedstawiony w pracy [A3]. Mikroorganizmy należące do rodzaju *Flavobacterium* były gatunkami wspólnymi dla gleby ryzosferowej odmiany hodowlanej Rotax oraz endosfer badanych odmian pszenicy zwyczajnej i orkiszowej. Podczas gdy szczepy z rodzaju *Pedobacter* stanowiły jednocześnie mikrobiom gleby ryzosferowej odmiany Rotax oraz endofityczny mikrobiom rdzeniowy tkanek roślinnych odmiany 'Rokosz' należącej do *Triticum spelta* L. [A3].

Z wykorzystaniem techniki CLPP wykazano, że aktywność metaboliczna drobnoustrojów zależała zarówno od rodzaju substratu, jak i odmiany pszenicy, która była uprawiana w badanej glebie. Węglowodany i kwasy karboksylowe były najłatwiej wykorzystywanymi

związkami we wszystkich glebach ryzosferowych przez zasiedlające je mikroorganizmy. Analiza głównych składowych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) wykazała, że gleby ryzosferowe spod uprawy Rotax i Nordkap charakteryzowały się wyższą aktywnością metaboliczną (silna korelacja z indeksem Shannona-Wienera, indeksem Richness (bogactwa) oraz metabolizmem węglowodorów) niż gleby spod uprawy pszenicy odmiany Hondia i Tytanika [A1].

W pracy przeglądowej [A2] dokonałam przedstawienia najnowszych doniesień literaturowych odnośnie zastosowania mikrobioty endofitycznej w biotechnologii. Podsumowałam rolę endofitów nie tylko w dostarczaniu roślinom podstawowych składników odżywczych niezbędnych do ich wzrostu, ale także wspomaganie w mechanizmach adaptacji do różnych stresów środowiskowych (tj. zasolenie, susza), co jest ważne w aspekcie plonowania. W tej pracy podkreśliłam, że z punktu widzenia rolniczego i biotechnologicznego wiedza na temat endofitów i ich roli w zwiększaniu plonów, odporności roślin na choroby i pomaganiu w przetrwaniu stresu środowiskowego jest niezwykle pożądana. W niniejszym artykule zawarłam informacje o efekcie stymulacji wzrostu roślin, adaptacji organizmów żywicielskich w warunkach zasolenia i suszy oraz wspierania mechanizmów obronnych roślin, jak i potencjalnych zastosowań w biotechnologii (bioaktywne metabolity, potencjał endofitów w procesach bioremediacji i biotransformacji oraz produkcja biopreparatów i nawozów [A2].

W pracy [A3] postawiłam hipotezę, że endofityczny mikrobiom rdzeniowy jest związany z roślinami przez cały cykl ich życia; jednak organy roślinne mogą determinować rzeczywistą społeczność endofityczną. Dlatego też, głównym celem badań w tej pracy [A3] było określenie profilu bakterii endofitycznych zasiedlających różne części roślin dwóch gatunków pszenicy, *Triticum aestivum* L. cv. 'Hondia' i *Triticum spelta* L. cv. 'Rokosz') rosnących w warunkach polowych. Do realizacji celu użyłam jednej z technik sekwencjonowania następnej generacji (NGS) opartej o analizę amplikonów genu 16S rRNA. Należy podkreślić, że w pracy [A3] po raz pierwszy dokonałam opisu unikalnego i jeszcze dotąd nierozpoznanego mikrobiomu endofitycznego *Triticum spelta* L. Wykazałam, że endosfera bielma, zarodków, korzeni, liści i koleoptyli *T. spelta* L. była zasiedlana przez bakterie endofityczne. Kolejne wnioski płynące z badań pozwoliły na wykazanie, że bakterie należące do rodzajów: *Flavobacterium*, *Pseudomonas* i *Janthinobacterium* są gatunkami wspólnymi dla endosfer badanych tkanek obu odmian i gatunków pszenicy. Wśród nich bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* okazały się być jedynym endofitycznym rodzajem towarzyszącym obu gatunkom pszenicy od stadium bielma do rozwoju liści. Gatunki należące do rodzaju

Paenibacillus sklasyfikowano jako dominujące - główny rodzaj dla tkanek roślinnych odmiany 'Hondia', podczas gdy gatunki *Pedobacter* i *Duganella* stanowiły dominujący mikrobiom dla tkanek roślinnych odmiany 'Rokosz'. Otrzymane wyniki dostarczyły wiedzy dotyczącej profilowania rdzeniowego mikrobiomu w różnych organach roślinnych pszenicy zwyczajnej i orkiszowej. Warty podkreślenia jest fakt, że badania mikrobiomu koleotypy obu gatunków pszenicy zostały opisane po raz pierwszy w literaturze mikrobiologicznej [A3].

Praca [A4] była kontynuacją badań zapoczątkowanych nad analizą ryzosfery jako puli potencjalnych mikroorganizmów endofitycznych, jak też endosfery roślinnej. Idąc krok dalej w tej publikacji dokonano badania mikrobiomu kolejnych nisz ekologicznych związanych z rośliną rosnącą w warunkach *in vitro*. W literaturze można było odnaleźć naukowe dowody, że obciążenie bakterii (ang. *bacterial load*) jest przenoszone w okrywie nasiennej pszenicy i bielmie, a jest nieobecne w zarodku pszenicy, który uważany był za sterylną niszę (Robinson i wsp. 2016). Wyniki Robinson i wsp. (2016) opierały się na metodzie identyfikacji zależnej od hodowli mikroorganizmów. W pracy przeprowadzono badania [A5], w których analiza mikrobiomu bielma i zarodka została wykonana z wykorzystaniem techniki niezależnej od hodowli – sekwencjonowania następnej generacji amplikonu genu 16S rRNA. Materiałem badawczym były nasiona sześciu odmian pszenicy zwyczajnej: Euforia, Hondia, Opcja, STH, Tybalt i Wilejka oraz dwie odmiany pszenicy orkiszowej: Schwabencorn i Rokosz. W tej pracy postawiono hipotezę, że obciążenie mikrobiologiczne nasion różni się pomiędzy odmianami pszenicy i jest zależne od części nasiona, zarówno zarodka jak i pozostałych części: bielma oraz okrywy nasiennej. Co więcej, w przypadku dwóch wybranych gatunków pszenicy - *Triticum spelta* L. cv. Rokosz i *Triticum aestivum* L. cv. Hondia wykonano eksperymenty, w których wytypowano endofity obligatoryjne oraz fakultatywne. Wcześniej określiłam te mikroorganizmy endofityczne obligatoryjne jako ściśle związane z endosferą roślin, które odbywają większą część lub nawet cały swój cykl życiowy wewnątrz roślin, natomiast fakultatywne jako endofity nie wymagające do swojego rozwoju endosfery roślin. Istotnie mikroorganizmy obligatoryjne mogą być ważnym kierunkiem badań w tworzeniu preparatów na bazie szczepów endofitycznych. Dowody te analizowano na podstawie badania mikrobiomu różnych nisz ekologicznych: nasion, roślin hodowanych *in vivo* oraz *in vitro*, jak też gleby ryzosferowej spod upraw tych gatunków/odmian pszenic. Wybór materiału badawczego: rośliny i gleby ryzosferowej podyktowany był wykazaniem bytowania wspólnych drobnoustrojów dla badanych nisz ekologicznych ze wskazaniem mikroorganizmów ryzosferowych – potencjalnej puli endofitów.

Pierwsze wnioski jakie otrzymałam to dowód istnienia endofitów, które były obecne zarówno w endosferze roślin rosnących *in vivo*, jak i w endosferze liści roślin hodowanych w warunkach *in vitro*. W pracy [A4] podkreśliłam, że fakt ten niezaprzeczalnie dowodzi, że nawet sterylizowane powierzchniowo zarodki pszenicy rosnące w podłożach *in vitro* nie powinny być uważane za sterylną niszę, ponieważ są one zasiedlane przez endofityczny mikrobiom, pochodzący najprawdopodobniej z zarodka (podkreślam, iż rośliny nie wykazywały żadnych objawów infekcji), który to mikrobiom może być kolejno transportowany do tkanek korzeni i liści. Co więcej, wykazałam, że endosfera korzeni obu próbek pszenicy zwyczajnej i orkiszowej były bardziej preferowanymi organami dla zasiedlania endofitów niż liście. Interesujące, że w endosferze korzeni obu badanych gatunków i odmian zidentyfikowano tych samych przedstawicieli 13 rodzajów bakterii. Obejmowały one następujące mikroorganizmy należące do rodzajów: *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Limnohabitans*, *Lachnoclostridium*, *Escherichia/Shigella*, *Paenibacillus*, *Cutibacterium*, *Candidatus Brocardia*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Paenisporosarcina*, *Streptomyces* i *Roseburia*. Należy podkreślić, że liście stanowiły niszę ekologiczną mniej różnorodną pod kątem mikroorganizmów endofitycznych. Biorąc pod uwagę ten fakt, odnotowano jednak wyższą bioróżnorodność bakterii w tkankach liści odmiany Rokosz niż Hondia, gdzie zidentyfikowano tylko trzy rodzaje: *Escherichia/Shigella*, *Paenibacillus*, *Cutibacterium*. Natomiast tkanki liści odmiany Rokosz zasiedlane były przez dziewięć następujących rodzajów bakterii: *Escherichia/Shigella*, *Paenibacillus*, *Cutibacterium*, *Candidatus Brocardia*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Paenisporosarcina*, *Streptomyces* i *Roseburia*.

Bakterie z rodzaju *Bacillus* najczęściej występowały w korzeniach i liściach obu odmian pszenicy w doświadczeniu *in vitro* (ponad 90% odczytów sekwencji genu 16S rDNA w liściach odmiany Hondia i Rokosz, 89,83% odczytów sekwencji genu 16S rRNA w tkankach korzeni odmiany Hondia i 74,49% odczytów sekwencji genu 16S rRNA w endosferze korzeni odmiany Rokosz). Bakterie należące do rodzajów *Paenibacillus* i *Cutibacterium* były obecne we wszystkich częściach badanych odmian. Tylko w tkankach liści Hondia nie znaleziono przedstawicieli z rodzaju *Streptomyces* jako endofitów.

W wariancie polowym (*in vivo*), rodzaje bakterii *Pantoea*, *Janthinobacterium*, *Acidovorax*, *Cryobacterium*, *Herbaspirillum* i *Duganella* stanowiły większość zidentyfikowanych taksonów zarówno w endosferze korzeni, jak i liści Hondii [A4]. Sześć innych rodzajów mikroorganizmów, tj. *Flavobacterium*, *Paenibacillus*, *Pedobacter*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* i *Variovorax* wykryto w trzech siedliskach: liściach

Hondia, korzeniach i badanej glebie ryzosferowej. Stosunkowo niską różnorodność mikrobiomu endofitycznego odnotowano w liściach *T. aestivum* L., gdzie w odczytach sekwencji genu 16S rRNA potwierdzono tylko obecność swoistych sekwencji dla trzech rodzajów: *Methylotenera*, *Sphingomonas* i *Tabaiella*. Rodzaje *Mesorhizobium*, *Mucilaginibacter*, *Rhizobium* i *Staphylococcus* zostały sklasyfikowane jako dominujące i unikalne mikroorganizmy w dwóch niszach ekologicznych: endosferze korzeni i glebie ryzosferowej odmiany Hondia [A4].

Zupełnie inny trend w strukturze mikrobiomu endofitycznego stwierdzono w endosferze tkanek odmiany Hondia pochodzącej z eksperymentu *in vitro*. Zidentyfikowano charakterystyczne sekwencje genu 16S rRNA tylko dla dwóch wspólnych rodzajów endofitów, tj. *Bacillus* (93,98% odczytów sekwencji genu 16S rRNA) i *Paenibacillus* (6,02% odczytów sekwencji genu 16S rRNA). Pragnę podkreślić, że mikroorganizmy należące do rodzajów: *Streptomyces* (4,96% odczytów sekwencji genu 16S rRNA), *Microbacterium* (0,12% odczytów sekwencji genu 16S rRNA), *Paenisporosarcina* (0,13%) i *Corynebacterium* (0,13% odczytów sekwencji genu 16S rRNA), zostały określone jako obligatoryjny mikrobiom endofityczny, charakterystyczny dla endosfery liści i korzeni obu odmian pszenicy (Hondia, Rokosz) rosnących w warunkach *in vitro*. Ponadto, 12 zidentyfikowanych rodzajów na podstawie odczytów sekwencji genu 16S rRNA można sklasyfikować do sporadycznie występujących i określono je jako towarzyszący mikrobiom endofityczny odmiany Hondia rosnącej w warunkach *in vitro*: *Nocardioides* (0,03%), *Propionibacterium* (0,03%), *Roseburia* (0,26%), *Pedobacter* (0,04%), *Ilumatobacter* (0,02%), *Clostridium* (0,02%), *Pseudomonas* (0,05%), *Staphylococcus* (0,25%), *Gemmatimonas* (0,02%) i *Lysinibacterium* (0,04%).

Wykazano dwa wspólne rodzaje bakterii: *Propionibacterium* sp. i *Janthinobacterium* sp., które zidentyfikowano w tkankach liści i korzeni odmiany Rokosz uprawianej w glebie. Istotnie, cztery inne rodzaje mikroorganizmów należące do *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Flavobacterium* i *Duganella* były obecne w trzech niszach: glebie ryzosferowej, tkankach liści i korzeni. Stosunkowo niskie bogactwo odczytów sekwencji genu 16S rRNA mikrobiomu endofitycznego odnotowano w endosferze liści i strefie ryzosferowej odmiany Rokosz obejmujące jedynie mikroorganizmy z rodzajów *Variovorax* i *Sphingobacterium* [A5].

Wspólne gatunki zasiedlające korzenie i liście *T. spelta* L. uprawianej *in vitro* należą do rodzajów: *Staphylococcus* (0,9%), *Propionibacterium* (0,51%), *Halomonas* (0,43%) i *Candidatus Kuenenia* (0,31%). Ponadto odnotowano, że taksony z rodzaju *Propionibacterium* były wspólne zarówno dla endosfery liści, jak i korzeni z eksperymentów

in vitro i *in vivo*. *Bacillus* (91,3%), *Paenibacillus* (5,58%) i *Streptomyces* (3,12%) zostały zidentyfikowane jako część mikrobiomu endofitycznego zasiedlającego trzy nisze ekologiczne: strefę ryzosfery oraz endosferę liści i korzeni roślin *in vitro*.

Podsumowując, określono, że taksony *Paenibacillus* i *Propionibacterium* zasiedlające endosferę pszenicy Rokosz i Hondia mają status mikroorganizmów obligatoryjnych dla tkanek tych roślin. Wykazano, że zarodek nie jest sterylną niszą, jednak większą bioróżnorodność endofitów stwierdzono w bielmie nasion niż w zarodkach. Opisano również, że w różnych badanych tkankach pszenic występują typowe taksony związane z człowiekiem, do których m.in należy *Cutibacterium* sp., co sugeruje międzykrólestwowy transfer drobnoustrojów od człowieka do tkanek roślin podczas ich udomowienia (Abdullaeva i wsp. 2021). Analiza porównawcza bogactwa operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU, ang. *operational taxonomic unit*) wykazała, że część budowy nasiona znacząco wpłynęła na względną obfitość endofitów z zaznaczeniem ubogiego bogactwa w zarodku nasiona. Skład mikrobiomu nasion nie różni się istotnie od badanej odmiany pszenicy, ale nie można jednak twierdzić, że każde ziarno pszenicy jest takie samo pod względem obciążenia mikrobiologicznego (ang. *microbial load*) [A5].

Badania zaprezentowane w kolejnej pracy [A6] były kontynuacją badań nad mikrobiomem ziarniaków pszenicy pod kątem możliwości wykorzystania mikroorganizmów endofitycznych do poprawy składu mikroelementarnego ziarna. Badania te wykonane zostały we współpracy z Narodowym Uniwersytetem Lwowskim im. Ivan Franko w ramach projektu finansowanego z Międzynarodowego Funduszu Wyszehradzkiego, w których byłam opiekunem naukowym po stronie polskiej [Zał. 4: III K]. W tym projekcie poruszaliśmy ważne zagadnienie dotyczące bezpieczeństwa żywnościowego, ze szczególnym uwzględnieniem nasion pszenicy jako źródła pokarmu i ich składu mikroelementarnego. Doniesienia literaturowe wskazują, że około jedna trzecia populacji ludzkiej doświadcza utajonego głodu spowodowanego niedoborem Fe (anemia), Zn lub Cu. Ziarna pszenicy są zazwyczaj ubogie w niezbędne mikroelementy. Hipoteza jaką postawiono w tych badaniach obejmowała stwierdzenie, że polepszenie jakości mikroelementarnej ziarna może odbywać się poprzez technologie na bazie mikroorganizmów, w tym endofitów bakteryjnych. W związku z tym, naszym celem badawczym było (1) wyizolowanie i zidentyfikowanie bakterii endofitycznych z wybranych ukraińskich odmian pszenicy jarej (chlebowej Oksamyt myronivs'kyi, Struna myronivs'ka, Dubravka i emmer Holikovs'ka – najczęstsze odmiany wybierane przez rolników), które były uprawiane w warunkach polowych w glebie o niskiej

biodostępności mikroelementów, oraz (2) ocena związku między zdolności endofitów do syntezy auksyn a stężeniem Fe, Zn i Cu w ziarnach.

Jednym z głównych naturalnych hormonów roślinnych z grupy auksyn indolowych jest kwas indoilo-3-octowy (*IAA*, ang. *indole-3-acetic acid*), który jest cząsteczkę efektorową w fitostymulacji, odporności i interakcji między roślinami a bakteriami, podobnie jak cała grupa auksyn. Znane są również inne cząsteczki biologicznie czynne z tej grupy, jak nityryl kwasu indoilo-3-octowego oraz kwas 4-chloro-3-indoiloctowy, które to związki w pracy [A6] zostały określone jako związki indolilo podobne - IRCs (*IRCs*, ang. *Indole Related Compounds*). Udowodniono, że auksyny produkowane przez endofityczną mikrobiotę mają wpływ na procesy pozyskiwania i transportu mikroelementów poprzez promowanie zakwaszenia ryzosfery i stymulację aktywności H⁺-ATPazy oraz kontrolowanie ekspresji wielu genów, które są ważne dla homeostazy składników odżywczych (Zhang i wsp. 2019). Cząsteczki biologicznie czynne z grupy auksyn mogą regulować reakcje korzeni na niedobór Fe i tym samym indukować uwalnianie sideroforów w pszenicy a także wpływać na odporność pszenicy pod kątem toksyczności Fe (Kabir i wsp. 2016). Sygnalizacja auksynowa może również wyzwać pobieranie Zn i jego transport wewnętrzny w ryżu w warunkach niedoboru Zn (Qi i wsp. 2012). Natomiast, homeostaza Cu jest regulowana głównie przez czynniki transkrypcyjne SPL7 i CITF1, które regulują pobieranie Cu do korzeni i dostarczanie do kwiatów przy niedoborze Cu (Bernal i wsp. 2012). Z kolei, udział auksyn w tych procesach może być pośredni poprzez indukowanie zmian w poziomie kwasu jaśminowego. Ishka i Vatamaniuk (2020) wykazali, że niektóre objawy niedoboru miedzi (zwiększone rozgałęzianie pędów u *Arabidopsis* sp.) mogą być łagodzone poprzez egzogenne podawanie auksyn (Yamasaki i wsp. 2009). Uważa się, że wzrost roślin powoduje również zwiększone uwalnianie wydzielin korzeniowych przyspieszających metabolizm ryzobakterii, tym samym zwiększone ich bogactwo. Mogą one poprawić plon ziarna roślin uprawnych poprzez promowanie wzrostu korzeni; fotosyntezę; pobieranie składników odżywczych, w szczególności Fe i Zn; ich akumulację w tkankach roślinnych. Dlatego też, w pracy analizowaliśmy powiązanie pomiędzy ilością związków indoilo podobnych wydzielanych przez endofity bakteryjne a stężeniem Fe, Zn i Cu w ziarnach może pomóc w wyjaśnieniu roli tych związków w zawartości mikroelementów w nasionach pszenicy.

W pierwszym etapie badań wyznaczyliśmy współczynnik akumulacji biologicznej (*BAF*, ang. *BioAccumulation Factor*), który pozwolił na porównanie zdolności odmian pszenicy do pobierania i transportu mikroelementów do ziaren. W kolejnym kroku wyizolowano i opisano po raz pierwszy endofity bakteryjne otrzymane z ziarniaków pszenicy płaskurki

T. turgidum subsp. *dicoccum*. Uzyskano 12 różnych, stabilnych biologicznie izolatów z ziaren czterech odmian pszenicy, które należały do rodzajów: *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Sphingobium*, *Bacillus*, *Kosakonia* i *Micrococcus*. Wszystkie badane szczepy były zdolne do syntezy związków indolilo podobnych (IRCs, ang. *Indole Related Compounds*; maks.: 16,57 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) oznaczonych przy użyciu odczynnika Salkowskiego. IRCs produkowane przez bakterie z rodzajów *Pantoea* sp. i *Bacillus* sp. wyizolowane z wysokowydajnych ziaren pod kątem mikroelementów: Oksamyt myronivs'kyi i Holikovs'ka mogą być uważane za jeden z czynników determinujących plon pszenicy i jej właściwości odżywcze [A6]. Pragnę podkreślić, że w tkankach zarodków pochodzących z nasion ośmiu polskich odmian pszenicy zwyczajnej i orkiszowej ozimej zidentyfikowano gatunki z rodzaju *Bacillus*, co więcej bakterie te stanowiły mikrobiom dominujący - 75% wszystkich zidentyfikowanych taksonów [A5]. Wyniki te mogą sugerować, że gatunki należące do *Bacillus* mogą stanowić powszechną grupę mikroorganizmów endofitycznych nasion różnych gatunków i odmian pszenicy.

Podsumowując, przedstawione wyniki zawarte w pracy [A6] przedstawiają zależności między bakteriami endofitycznymi ziarna, stężeniami Fe, Cu i Zn oraz plonem odmian pszenicy jarej *T. aestivum* L. i *T. turgidum* subsp. *dicoccum*, które były uprawiane z ograniczoną biodostępnością tych mikroelementów na polu. Określono, że otrzymane izolaty mają potencjał do wykorzystania jako inokulanty promujące wzrost (PGP, ang. *Plant Growth Promoting*) do celów biofortyfikacji mikroelementów. Związki indolilo podobne (IRCs) produkowane przez endofityczne bakterie z rodzajów *Pantoea* spp. U.MO2 i U.MO3 oraz *Bacillus* spp. U.H2 wyizolowane z ziaren Oksamyt myronivs'kyi i Holikovs'ka mogą być uważane za jeden z czynników determinujących plon pszenicy i jej właściwości odżywcze. [A5].

Praca [A6] była kontynuacją badań nad zastosowaniem endofitów do promocji wzrostu roślin, których głównym celem było potwierdzenie wydajności produkcji biologicznie aktywnych związków IRCs (głównie IAA, ang. *indole-3-acetic acid*) przez wybrane endofity obecne w tkankach *T. aestivum* L. i *T. spelta* L. z wykorzystaniem trzech niezależnych technik: kolorymetrycznej, chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS, ang. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) oraz testu biologicznego (Biotestu). W tej pracy przedstawiono rozwinięcie hipotezy, że wybrane szczepy bakterii endofitycznych wyizolowane z tkanek odmian pszenicy ozimej (Hondia i Tytanika) oraz pszenicy orkiszowej (odmiana Rokosz) mogą być zdolne do produkcji biologicznie aktywnych form IRCs a szczególnie IAA. Kwas indolilo-3-octowy efektywnie oddziałuje

w procesie fitostymulacji, odporności i interakcji między roślinami a bakteriami. Łącznie przebadano 54 szczepy endofityczne należące do siedmiu rodzajów bakterii (*Bacillus* sp. (46), *Serratia* sp. (3), *Lysinibacillus* sp. (2), *Paenibacillus* sp. (2), and *Pantoea* sp. (1)). Otrzymane izolaty bakterii endofitycznych były zdolne do produkcji IRCs, w tym IAA, w warunkach *in vitro* poprzez szlak zależny od tryptofanu [A6].

Ilości IRCs oznaczone metodą kolorymetryczną (test Salkowskiego) wahały się od 7,256 do 33,298 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Niestety, test Salkowskiego nie był w stanie rozróżnić, które IRCs są wydzielane przez bakterie. Wykazano w literaturze i badaniach własnych, że różne związki IRCs mogą reagować z odczynnikiem Salkowskiego i powodować powstawanie związków kompleksowych o konkretnej barwie, np. kwas indolilo-3-pirogronowy i indolilo -3-acetamid - różowej, kwas indolilo-3-masłowy - pomarańczowej, siarczan indoksyłu - fioletowej, a indol - brązowej. Dlatego też, aby potwierdzić produkcję wolnego IAA, zastosowano bardziej selektywną metodę LC-MS/MS. Wyniki wskazały, że ilości wolnego IAA stanowiły od 1,75 do 52,68% wszystkich IRCs i sugerowały, że szczep *Paenibacillus* sp. PC 2-5 był najbardziej wydajnym producentem wolnego IAA, podczas gdy metoda kolorymetryczna sugerowała, że szczep *Lysinibacillus* sp. KC 1-4 produkował większe ilości wolnego IAA. Co więcej, LC-MS/MS pozwolił na ilościowe oznaczenie wolnego IAA w próbkach, w których barwa roztworu nie zmieniła się po dodaniu odczynnika Salkowskiego. W kolejnym kroku, użyto Biotestu specyficznego dla auksyn, aby potwierdzić obecność IAA działającego na tkanki roślinne. Test ten określił poziom stymulacji tkanek roślinnych przez IAA poprzez określenie długości segmentów koleoptyli pszenicy. Na początku eksperymentu (po upływie 24 h) wzrost segmentów koleoptyli pszenicy traktowanych bakterijskim IAA był stymulowany w zakresie od 1,98% (izolat HLB 2-6) do 18,72% (izolat KC 1-4). Ogólnie rzecz biorąc, dwa szczepy (szczep *Paenibacillus* sp.-PC 2-5 wyizolowany z tkanek koleoptyli Hondia i szczep *Lysinibacillus* sp.-KC 1-4 pochodzący z tkanek korzeni Hondia) reagowały na stymulację w podobny sposób w kolejnych godzinach eksperymentu (po upływie 72 i 96 h), kiedy to stymulacja wzrostu segmentów koleoptyla pszenicy oscylowała w zakresie 7,52-19,98% i 4,60-6,44% odpowiednio w 72 h i 96 h. Inne szczepy reagowały zahamowaniem wzrostu tkanek roślinnych w zakresie 0,83-2,86% (72 h) i 1,04-2,10% (96 h) w porównaniu do warunków kontrolnych. Określono, że aktywność biologiczna IAA syntetyzowanego przez endofity korzeniowe była wyższa, w porównaniu do IAA wytwarzanego przez endofity związane z koleoptylem. Oprócz wolnego IAA, wykorzystaliśmy również test biologiczny do analizy sztucznych koniugatów IAA, które zmniejszają aktywność biologiczną hormonu. Aktywność koniugatów kwasu asparaginowego (Asp) i glutaminowego (Glu) testowano

za pomocą Biotestu i porównano ją z aktywnością wolnego IAA. Ogólnie rzecz biorąc, koniugaty miały niższą (o 5,35-7,14%) aktywność biologiczną w porównaniu do samego wolnego IAA. Wyniki te mogą nasuwać wniosek, że wśród badanych szczepów występowały takie, które produkowały wolny kwas indolo-3-octowy, ale również takie, które wytwarzały go w postaci koniugatów, szczególnie tam gdzie obserwowano obniżenie aktywności biologicznej w badanych próbach.

Podkreślono, że aby uzyskać pełną analizę związków biologicznie czynnych dla roślin z grupy auksyn indolowych, ważne jest, aby analizować nie tylko ilość IRCs, zwłaszcza IAA, ale także ich aktywność biologiczną. W związku z tym w pracy [A6] zaproponowano podejście metodologiczne oparte na trzech uzupełniających się metodach: kolorymetrii, chromatografii sprzężonej ze spektrometrią mas oraz bioaktywności ocenianej poprzez Biotest.

Podsumowanie:

W pracach A1–A6 włączonych do osiągnięcia naukowego potwierdziłam postawioną hipotezę badawczą, że mikroorganizmy endofityczne zasiedlają różne tkanki pszenicy uprawiane w hodowlach *in vitro* jak i *in vivo* w tym endosferę ziarniaków: bielma oraz zarodka, który do tej pory był traktowany jako sterylna nisza i inne tkanki organów w tym korzeń, liście, koleoptyle, a także te endofity oraz mogą wspierać rozwój roślin pszenicy różnych gatunków i odmian uprawianych w Europie.

Za najważniejsze osiągnięcia ww. prac uważam:

- Kompleksową charakterystykę genetyczną i metaboliczną niszy ekologicznej – ryzosfery jako głównego źródła mikroorganizmów endofitycznych dla roślin [A1].
- Po raz pierwszy analizę profilu rdzeniowego mikrobiomu endofitycznego pszenicy orkiszowej *Triticum spelta* L., niezwykle ważnego zboża, którego areał rośnie z roku na rok. [A3].
- Wykazanie, że endosfera bielma, zarodka, korzenia, liścia i koleoptyla pszenicy jest zasiedlana przez bakterie endofityczne. Po raz pierwszy opisanie niszy ekologicznej - koleoptyla *T. aestivum* L. i *T. spelta* L. dla endofitów. To odkrycie stanowiło istotny wkład naukowy w analizę endofitycznego mikrobiomu i wskazanie jego powiązania z roślinami przez cały cykl ich życia [A4].
- Ustalenie, że gatunki bakterii *Paenibacillus* sp. i *Propionibacterium* sp. zasiedlające endosferę roślin Rokosz i Hondia mają status mikroorganizmów obligatoryjnych dla tkanek tych roślin [A4].

- Wykazanie, że w badanych tkankach roślin pszenicy (również tej hodowanej w warunkach *in vitro*) występują typowe taksony związane z człowiekiem, takie jak *Cutibacterium* sp., co może sugerować międzykrólestwowy transfer drobnoustrojów od człowieka do roślin podczas ich udomowienia. Wyniki te korelują z danymi literaturowymi dotyczącymi występowania gatunków z rodzaju *Cutibacterium* jako endofitów winorośli oraz również podkreślenie faktu ich pojawienia się podczas uprawy przez człowieka [A2; A4].
- Udokumentowanie, że zarodek nie jest sterylną niszą, jak dotychczas sądzono. Określenie zwiększonej bioróżnorodności endofitów przenoszonych przez bielmo niż w zarodek. Podkreślenie, że mikrobiom pochodzący z nasion nie różni się statystycznie istotnie od badanych odmian pszenicy, ale nie można jednoznacznie stwierdzić, że każde ziarno pszenicy niesie takie samo obciążenie mikrobiologiczne. Fakt ten może być związany z występowaniem endofitów fakultatywnych, które pojawiają się okazjonalnie w endosferze nasion [A4; A5].
- Wykazanie zależności między bakteriami endofitycznymi ziarna, stężeniami Fe, Cu i Zn oraz plonem odmian pszenicy jarej *T. aestivum* L. i *T. turgidum* subsp. *dicoccum*, które były uprawiane z ograniczoną biodostępnością tych mikroelementów na polu.. Analiza mikrobiomu nasion pszenicy połączona z izolacją i hodowlą szczepów bakteryjnych pozwoliła uzyskać kolekcję mikroorganizmów o potencjale biotechnologicznym polepszającym wzrost i rozwój roślin przeznaczonych do biofortyfikacji mikroelementów. Szczególnie, izolaty *Pantoea* sp. U.MO2, U.MO3 i *Bacillus* sp. U.H2 mogą mieć szczególnie wysoki potencjał [A5].
- Zaproponowanie rozwiązania metodologicznego opartego na trzech uzupełniających się metodach: kolorymetrii, chromatografii sprzężonej ze spektrometrią mas oraz bioaktywności dla związków IRCs produkowanych przez różne szczepy bakterii endofitycznych pszenicy [A6].

W przyszłości, rozwijając moje zainteresowania naukowe planuję kontynuację badań poszerzonych o następujące kwestie:

- zaprojektowanie preparatu z wykorzystaniem idei tworzenia syntetycznej społeczności endofitycznej (SynCom – ang. *Synthetic Community*) złożonego ze szczepów już przeze mnie przeanalizowanych pod kątem różnych aktywności wspomagających wzrost i rozwój roślin [Zał. 4: IIIIF1],

- analizę metaboliczną (LC-MS) w trakcie stosowania preparatu endofitycznego - profilowanie wzorców metabolicznych oddziaływania układu rośliny – endofit w różnych stadiach rozwoju roślin i endofitów [Zał. 4: IIIQ4],

- sekwencjonowanie shotgun szczepów endofitycznych wchodzących w skład SynCom.

LITERATURA

1. Anisha C, Radhakrishnan EK. Metabolite analysis of endophytic fungi from cultivars of *Zingiber officinale* Rosc. identifies myriad of bioactive compounds including tyrosol. *3 Biotech.* 2017 Jun;7(2):146. doi: 10.1007/s13205-017-0768-8. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28597159; PMCID: PMC5465049.
2. Azman AS, Othman I, Velu SS, Chan KG, Lee LH. Mangrove rare Actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Front Microbiol.* 2015 Aug 20;6:856. doi: 10.3389/fmicb.2015.00856. PMID: 26347734; PMCID: PMC4542535.
3. Bernal, M.; Casero, D.; Singh, V.; Wilson, G.T.; Grande, A.; Yang, H.; Dodani, S.C.; Pellegrini, M.; Huijser, P.; Connolly, E.L.; et al. Transcriptome sequencing identifies *SPL7* -regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the Copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012, 24, 738–761, doi:10.1105/tpc.111.090431
4. Chaudhary P, Agri U, Chaudhary A, Kumar A, Kumar G. Endophytes and their potential in biotic stress management and crop production. *Front Microbiol.* 2022 Oct 17;13:933017. doi: 10.3389/fmicb.2022.933017. PMID: 36325026; PMCID: PMC9618965.
5. Devi KA, Pandey G, Rawat AKS, Sharma GD, Pandey P. The Endophytic Symbiont-*Pseudomonas aeruginosa* Stimulates the Antioxidant Activity and Growth of *Achyranthes aspera* L. *Front Microbiol.* 2017 Sep 27;8:1897. doi: 10.3389/fmicb.2017.01897. PMID: 29021789; PMCID: PMC5623812.
6. Ferguson TD, Vanzant ES, McLeod KR. Endophyte Infected Tall Fescue: Plant Symbiosis to Animal Toxicosis. *Front Vet Sci.* 2021 Dec 24;8:774287. doi: 10.3389/fvets.2021.774287. PMID: 35004925; PMCID: PMC8740028.
7. Ganapathy A., Natesan S., Metabolic Potential and Biotechnological Importance of Plant Associated Endophytic Actinobacteria. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*, 2018, 207-224
8. Gouda S, Das G, Sen SK, Shin HS, Patra JK. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Front Microbiol.* 2016 Sep 29;7:1538. doi: 10.3389/fmicb.2016.01538. PMID: 27746767; PMCID: PMC5041141.
9. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015 79(3):293-320. doi: 10.1128/MMBR.00050-14. PMID: 26136581; PMCID: PMC4488371.

10. Ibáñez F, Angelini J, Taurian T, Tonelli ML, Fabra A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 2009 Feb;32(1):49-55. DOI: 10.1016/j.syapm.2008.10.001. PMID: 19054642.
11. Ishka, M.R.; Vatamaniuk, O.K. Copper deficiency alters shoot architecture and reduces fertility of both gynoecium and androecium in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Direct.* 2020, 4, doi:10.1002/pld3.288
12. Kabir, A.H.; Khatun, M.A.; Hossain, M.M.; Haider, S.A.; Alam, M.F.; Paul, N.K. Regulation of phytosiderophore release and antioxidant defense in roots driven by shoot-based auxin signaling confers tolerance to excess iron in wheat. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, doi:10.3389/fpls.2016.01684
13. Lofgren LA, LeBlanc NR, Certano AK, Nachtigall J, LaBine KM, Riddle J, Broz K, Dong Y, Bethan B, Kafer CW, Kistler HC. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytol.* 2018; 217(3):1203-1212. doi: 10.1111/nph.14894. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29160900; PMCID: PMC5813145.
14. Papik J, Folkmanova M, Polivkova-Majorova M, Suman J, Uhlik O. The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnol Adv.* 2020 Nov 15;44:107614. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107614. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32858117.
15. Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Microbiol* 2013. 11:789–799. doi: 10.1038/nrmicro3109
16. Qi, Y.; Wang, S.; Shen, C.; Zhang, S.; Chen, Y.; Xu, Y.; Liu, Y.; Wu, Y.; Jiang, D. OsARF12, a Transcription activator on auxin response gene, regulates root elongation and affects iron accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* 2012, 193, 109–120, doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03910.x
17. Rodriguez Estrada AE, Jonkers W, Kistler HC, May G. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genet Biol.* 2012 Jul;49(7):578-87. doi: 10.1016/j.fgb.2012.05.001. Epub 2012 May 12. PMID: 22587948.
18. Shaffique S, Khan MA, Wani SH, Pande A, Imran M, Kang SM, Rahim W, Khan SA, Bhatta D, Kwon EH, Lee IJ. A Review on the Role of Endophytes and Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Mitigating Heat Stress in Plants. *Microorganisms.* 2022 Jun 24;10(7):1286. doi: 10.3390/microorganisms10071286. PMID: 35889005; PMCID: PMC9319882..
19. Singh R, Dubey AK. Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. *Front Microbiol.* 2018, 8;9:1767. doi: 10.3389/fmicb.2018.01767. PMID: 30135681; PMCID: PMC6092505.
20. Stepniewska Z, Kuźniar A. Endophytic microorganisms--promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013 Nov;97(22):9589-96. doi: 10.1007/s00253-013-5235-9. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24048641; PMCID: PMC3825493.
21. Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, J.F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, 2000 New York, 3-29
22. Verma SK, Sahu PK, Kumar K, Pal G, Gond SK, Kharwar RN, White JF. Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress

- tolerance. *J Appl Microbiol.* 2021 Nov;131(5):2161-2177. doi: 10.1111/jam.15111. Epub 2021 May 17. PMID: 33893707.
23. Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M. et al. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiol* 2017, 17, 209. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>
 24. Yamasaki, H.; Hayashi, M.; Fukazawa, M.; Kobayashi, Y.; Shikanai, T. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for Copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009, 21, 347–361, doi:10.1105/tpc.108.060137.
 25. Zhang, X.; Zhang, D.; Sun, W.; Wang, T. The adaptive mechanism of plants to Iron deficiency via Iron uptake, transport, and homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2424, doi:10.3390/ijms20102424.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W latach 2003–2008 studiowałam Biotechnologię na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej. Pracę magisterską pt. „Identyfikacja i analiza regionu replikacyjnego *repABC* plazmidu pRtTA1c *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Skorupskiej oraz dr hab. Andrzeja Mazura, prof. UMCS - w roli opiekuna, w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie na Wydziale Biologii i Biotechnologii.

Po ukończeniu studiów i uzyskaniu tytułu magistra biotechnologii w 2008 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska, kierowanej przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską. (Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II).

Początkowo realizowałam tematykę badawczą związaną z izolacją materiału genetycznego z różnych środowisk, szczególnie z gleb, skał otaczających pokłady węgla oraz zajmowałam się analizą mikroorganizmów w tych niszach ekologicznych – szczególnie w odniesieniu do metanotrofów. Wyniki tych badań opublikowałam [Zał. 4: A10, A11, A12] rozpoznając endosymbiotyczne metanotrofy *Sphagnum* sp. z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. *Fluorescence In Situ Hybridization*). Określiłam również aktywność metanotroficzną (AM) mchów *Sphagnum* sp. (całych roślin i fragmentów) zanurzonych i niezanurzonych w wodzie torfowej. Wyzaczyłam, że AM jest na poziomie $7,6 \pm 0,1$ i $2,5 \pm 0,1 \mu\text{M CH}_4\text{g}^{-1}\text{DWday}^{-1}$. Najwyższą aktywność AM stwierdziłam w górnych częściach roślin. Analizowałam również mikroorganizmy pod kątem ich występowania w torfie, pochodzącym z torfowiska zlokalizowanego na Polesiu Lubelskim. Pozytywne wyniki otrzymałam dla mikroorganizmów z rodziny Methylococcaceae, na podstawie fragmentu

genu 16S rRNA oraz dla mikroorganizmów należących do rodzajów: *Methylocystis* i *Methylosinus*, na podstawie fragmentu genu *pmoA*. Kontynuując analizę mikroorganizmów w torfie i torfowcach zwracałam uwagę na możliwość recyklingu/wykorzystania metanu, które to zagadnienie jest bardzo ważne w związku z postępującym ociepleniem klimatu i w traktowaniu terenów podmokłych jako strumieni metanu. Wyniki tych badań zaprezentowałam na międzynarodowej konferencji w Moskwie [Zał. 4: II K1], których celem była analiza endofitów metanotroficznych roślin jako aktywnych składników biofiltrów metanu. Badania roli symbiontów metanotroficznych *Sphagnum* sp. w obniżeniu emisji metanu w rejonie Poleskiego Parku Narodowego kontynuowałam w projekcie [Zał. 4: II I13], w którym była głównym wykonawcą pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Stępniewskiej. Efekt pracy w tym projekcie zawarłam w publikacjach [Zał. 4: II IA]. Głównym celem tych badań było wskazanie wpływu składu roślinnego na emisję metanu z torfowiska Moszne. Badania rozszerzono o kolejne rośliny bagiennie oprócz różnych gatunków *Sphagnum* mianowicie: *Eriophorum vaginatum*, *Carex nigra* i *Vaccinium uliginosum*. Ostatecznie stwierdziłam, że emisja metanu zależy od składu roślinności torfowiskowej. Najwyższą i niezależną od sezonu zdolność biofiltracji metanu zaobserwowano w składzie roślinności z dominacją *Sphagnum* sp. Udział gatunków *Carex* sp. zwiększał emisję metanu w całym sezonie wegetacyjnym. Rola *Vaccinium* sp. i *Eriophorum* sp. w emisji metanu zdecydowanie zależała od sezonu. Potencjalna zdolność układu roślina - bakterie metanotroficzne do zmniejszania emisji metanu pozostawała na poziomie od 0,01 do 77%, w zależności od pory roku i rośliny stanowiącej główny składnik badanego układu. Kolejne szczegółowe badania mchów *Sphagnum* sp. wykonałam z zastosowaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz izolacji materiału genetycznego i jego amplifikacji z wykorzystaniem reakcji PCR. Na podstawie analiz molekularnych stwierdziłam, że endosymbionty *Sphagnum* sp. należały do metanotrofów typu I i II. Wyniki tych badań przedstawiłam w pracy [Zał. 4: A10 i A18]. Następne badania układu roślina - bakterie metanotroficzne rozszerzające już podjęte przeze mnie wcześniej badania przedstawiłam w projekcie NCN w ramach Preludium 1, na które otrzymałam dofinansowanie [Zał. 4: II I12].

Równolegle włączyłam się w badania zapoczątkowane w Katedrze przez prof. dr hab. Zofię Stępniewską, związane ze szczegółową analizą mikroorganizmów bytujących w skałach przywęglowych, pochodzących z różnych polskich kopalni węgla. Efektem tych badań są prace [Zał. 4: A7], w których przedstawiłam aktywność metanotroficzną (AM) w funkcji temperatury (5-30 °C), zawartości wilgoci (25-200% pełnej pojemności wodnej, WHC, ang. *water holding capacity*) i stężenia substratu (1-30% v/v CH₄). Obserwację bakterii

metanotroficznych przedstawiłam z wykorzystaniem techniki skaningowej krio-SEM (ang. *Scanning Electron Microscopes*), dzięki której wykazano obecność w badanych skałach bakterii (ok. 2-2,5 μm długości i 0,5-1 μm szerokości) oraz struktur przetrwalnikowych (0,5-1 μm średnicy). Oprócz techniki mikroskopowej SEM do obserwacji mikroorganizmów użyłam fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami Mg705 (5'fluoresceina), Mg84 (5'Cy3) i Ma450 (5'Cy5), które wykazały, że hodowle wzbogacone z pożywką NMS (ang. *Nitrate Minimal Salts*) zawierają bakterie metanotroficzne należące do typu I i II. Identyfikacja przeprowadzona przy użyciu amplifikacji 16S rDNA ukierunkowanej na startery specyficzne dla tej grupy potwierdziła obecność bakterii należących do *Methylosinus*, *Methylomicrobium*, *Methylocystis* i *Methylocaldum*.

Efekt moich zainteresowań naukowych związanych z zagadnieniami aktywności metanotroficznej *Sphagnum* sp. i żyjących w asocjacji mikroorganizmów metanotroficznych doprowadził do wyłonienia tematu pracy doktorskiej, w której skoncentrowałam się na udowodnieniu hipotezy, iż rośliny *Sphagnum* sp. pozostają w ścisłej asocjacji z mikroorganizmami metanotroficznymi i że ten układ roślina – bakterie metanotroficzne może zostać wykorzystany w biotechnologii. Stąd tytuł mojej pracy doktorskiej: „Potencjał biotechnologiczny układu endofitycznego *Sphagnum* sp. – metanotrofy”. Moja rozprawa doktorska dotyczyła rozpoznania aktywności metanotroficznej układu endofitycznego *Sphagnum* sp. - metanotrofy w różnych warunkach środowiska (temperatury 10-30°C i stężenia substratu 1-20% (v/v) CH₄ oraz obejmowała analizę genetyczną i morfologiczną endofitów metanotroficznych z wykorzystaniem technik mikroskopowych i molekularnych. Wykazałam, że wszystkie przeanalizowane rośliny rodzaju *Sphagnum* pobrane z czterech stanowisk Poleskiego Parku Narodowego (PPN), należące do trzech gatunków: *Sphagnum flexuosum*, *Sphagnum magellanicum* oraz *Sphagnum fallax* wykazują zdolność do utleniania metanu oraz posiadają endofityczne metanotrofy w tkankach badanych gatunków *Sphagnum* sp. Tą hipotezę potwierdziłam techniką mikroskopową *in situ* (konfokalną, skaningową). Analizy molekularne sekwencji genu *pmoA* oraz *mmoX* wykonałam bezpośrednio w materiale roślinnym i wykazałam obecność metanotrofów należących do *Methylobacter* sp. (grupy A1, A2), *Methylomonas* sp. (grupa B) oraz niezależnej linii stanowiącej grupę A3. Przedstawiłam również możliwość wykorzystania wzbogaconych hodowli endofitów w różnych warunkach temperatury 10-30°C i stężenia metanu 1-20% v/v, jako źródła węgla i energii, które mogą posłużyć do biotechnologicznych zastosowań (np. zagospodarowanie nadkładów składowisk odpadów). Zauważyłam, że w społeczności wzbogaconych kultur metanotroficznych była mniejsza bioróżnorodność mikroorganizmów niż wśród badanych

tkanek *in situ*. Zidentyfikowano tam bakterie rodzaju: *Methylomonas*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, a także szczepy należące do rodzaju *Beijerinckia*, mające potencjalną zdolność wiązania azotu atmosferycznego, co zostało potwierdzone przez obecność podjednostek genu nitrogeazy (*nifH* oraz *nifD*). W rozprawie doktorskiej, podkreśliłam, że badania nad bakteriami metanotroficznymi zmierzają do określenia potencjalnych możliwości tych organizmów w celu zastosowania ich w różnych gałęziach przemysłu (m.in. produkcja biopaliw, białka paszowego, witamin, osmoprotektantów).

Doświadczenie zdobyte podczas analizy endofitów *Sphagnum* sp. pozwoliło na stworzenie warsztatu naukowego, który wykorzystałam i rozbudowałam w osiągnięciu naukowym oraz w badaniach nie wchodzących w skład tego osiągnięcia.

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

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora kontynuowałam moje zainteresowania badawcze w zakresie badania mikroorganizmów endofitycznych. Wyniki uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej opublikowałam w [Zał. 4: A11 i A12] oraz zaprezentowałam na konferencjach międzynarodowych. [Zał. 4: IIB10, IIB12].

W pracy [Zał. 4: A12] przedstawiłam wzbogacone kultury mikroorganizmów endofitycznych ze *Sphagnum* sp., które są niezbędnym krokiem w produkcji inokulum tych organizmów dla biotechnologii i bioinżynierii. Kolejno zaproponowałam potencjalne zastosowanie endofitycznych mikroorganizmów metanotroficznych do usuwania metanu wytwarzanego ze składowisk odpadów i kopalń węgla, a także biodegradacji związków toksycznych. Inkubację prowadzono w temperaturach 10, 20, 30 i 37°C. Źródłem węgla i energii dla endofitów był metan w zakresie stężeń 1-20% v/v. Okazało się, że społeczność bakterii endofitycznych udało się wyhodować tylko w temperaturze 20 i 30°C. Podczas hodowli endofitów prowadzone pomiary stężenia gazu wykazały stały ubytek metanu i tlenu, a także akumulację ditlenku węgla, jako produktu utleniania CH₄. Zastosowanie metody FISH umożliwiło mi scharakteryzowanie społeczności endofitów. Okazało się, że populacja endofitów składała się z metanotrofów typu I i II oraz towarzyszących im bakterii niemetanotroficznych, niezbędnych do prawidłowego bytowania mikroorganizmów metanotroficznych. Badania te rozszerzyłam również o analizę endofitycznych mikroorganizmów metanotroficznych w innych roślinach bagiennych [Zał. 4: A22]. W ramach projektu [Zał. 4: II I13], w którym byłam głównym wykonawcą, wykonałam badania wstępne dotyczące analizy emisji gazów *in situ* z powierzchni torfowiska Moszne.

Emisję gazów zbierano metodą komorową z wybranych stanowisk w sezonach wegetacyjnych (wiosna, lato, jesień). W celu oszacowania udziału roślin w emisji metanu z torfowiska, na każdym badanym stanowisku pobierano próbki gazu z powierzchni pokrytej rodzimą roślinnością oraz po jej usunięciu. W naszych badaniach szczególną uwagę zwróciłam na rośliny naczyniowe z torfowiska porośniętego przez *Sphagnum* spp. ale także *Eriophorum vaginatum*, *Carex nigra* i *Vaccinium oxycoccos*. Wyniki opublikowane w pracy [Zał. 4: A18 i A43] wskazały, że zmniejszenie emisji CH₄ było związane ze składem roślin, okresem wegetacji i warunkami roślin. Równoległe prowadziłam badania detekcji mikroorganizmów endofitycznych zasiedlających rośliny bagienne. Jako obiekt badań wybrałam rośliny: *Carex nigra*, *Vaccinium oxycoccus* i *Eriophorum vaginatum*, które pochodziły z torfowiska Moszne (wschodnia Polska). Bakterie metanotroficzne związane z roślinami izolowałam jako wzbogacone hodowle ze sterylnych fragmentów różnych części roślin (korzeni i łodyg) na podłożu NMS i inkubowałam przy różnych wartościach metanu (1-20% v/v CH₄). Charakterystykę metanotrofów przeprowadziłam za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami Mg705 i Mg84 dla metanotrofów typu I oraz Ma450 dla metanotrofów typu II. Identyfikację endofitów metanotroficznych przeprowadziłam również wykorzystując amplifikację 16S rRNA i genu *mmoX*. Badania te potwierdziły we wzbogaconych hodowlach obecność obu typów bakterii metanotroficznych (typ I i II) z przewagą metanotrofów typu I. Wśród hodowlanych metanotrofów występowały różne szczepy z rodzaju: *Methylomonas* i *Methylosinus*. Ponadto określono potencjał badanych bakterii do utleniania metanu, który wahał się od $0,463 \pm 0,067$ do $5,928 \pm 0,169 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{dzień}^{-1}$. W tej pracy podkreśliłam, że aerobowe bakterie utleniające metan są ważną dla środowiska grupą mikroorganizmów ze względu na ich rolę w globalnym obiegu węgla. Badania prowadzone w ciągu ostatnich kilku dekad zwiększyły zainteresowanie odkrywaniem nowych rodzajów bakterii rozkładających metan, które skutecznie go wykorzystują i zmniejszają efekt globalnego ocieplenia. Co więcej, metanotrofy mają bardziej obiecujące zastosowania w bioinżynierii środowiska, biotechnologii i farmacji. Aby te kwestie dobrze zrozumieć, analizowałam porównawczo stężenia metanu ze stacji monitoringu KUL i Kasprowy Wierch w latach 2007-2012. Wyniki tych badań opublikowałam w pracach [Zał. 4: A44 i A45]. Pozostałe wyniki otrzymane w ramach projektu [Zał. 4: II I12 i Zał. 4: II I13] zostały przedstawione w monografii pt. „Emisja gazów z powierzchni torfowisk” [Zał. 4: A38].

Kontynuowałam również tematykę analizy mikroorganizmów metanotroficznych pod ziemią – polskie kopalnie węgla. W pracy zespołowej udowodniłam, że pokładom węgla

(Górnośląskie Zagłębie Węglowe, m.in. kopalnie Borynia-Zofiówka i Budryk) - towarzyszą tlenowe bakterie metanotroficzne. Co więcej, te pokłady węgla zostały skolonizowane przez metanotrofy po zakończeniu procesu uwęglania. Indentyfikacja wykazała obecność metanotrofów należących do α - i γ -Proteobacteria [Zał. 4: A8 i A13]. Obecność mikroorganizmów metanotroficznych była niezwykle interesująca z punktu widzenia ich przeżycia w tak trudnych warunkach. Stąd rozpoczęłam poszukiwania możliwości adaptacji komórek mikroorganizmów do stresu osmotycznego poprzez pośredniczenie w utrzymaniu stałego turgoru. Wykazałam, że konsorcjum bakterii metanotroficznych wyizolowane ze skał przywęglowych kopalni Bogdanka (Polska) i odporne na ekstremalne warunki środowiskowe (niska zawartość wilgoci) było zdolne do syntezy ektoiny. Poziom ektoiny badany za pomocą pomiarów NIR wahał się od $1,33 \pm 0,10$ mg gDW⁻¹ do $0,42 \pm 0,08$ mg gDW⁻¹ w zależności od zasolenia roztworu [Zał. 4: A15]. Równolegle przedstawiłam w publikacji popularnonaukowej podsumowanie zastosowania ektoiny opisane w literaturze, którą nazwałam cząsteczką przyszłości [Zał. 4: A46]. Kolejno w pracy [Zał. 4: A26] postawiłam hipotezę, że mikroorganizmy metanotroficzne mogą odgrywać ważną rolę w żywieniu zwierząt, ponieważ mogą być wykorzystywane jako źródło pożywienia lub paszy czy też dodatek do pasz. Celem badań było określenie składników odżywczych i kwasów tłuszczowych zawartych w biomase bakterii metanotroficznych. Aby przeanalizować zasadność postawionej hipotezy zbadałam cztery konsorcja bakteryjne złożone z *Methylocystis* i *Methylosinus* wyizolowane z tkanek *Sphagnum flexuosum* (Sp1), *S. magellanicum* (Sp2), *S. fallax* II (Sp3), *S. magellanicum* IV (Sp4) oraz jedno złożone z *Methylocaldum*, *Methylosinus* i *Methylocystis*, które izolowano ze skały przywęglowej (Sk108). Określiłam, że biomasa metanotroficzna zawierała wysokie stężenia K, Mg i Fe, tj. odpowiednio ok. 9,6-19,1; 2,2-7,6 i 2,4-6,6 g kg⁻¹. Zakładana hipoteza została potwierdzona mianowicie biomasa metanotroficzna może być postrzegana jako odpowiednia pasza i/lub dodatek paszowy do suplementacji makroelementami i niektórymi mikroelementami. Ponadto wszystkie badane biomasy mikroorganizmów wykazały wyższą zawartość kwasów nienasyconych niż nasyconych. Tym bardziej zasadne jest stwierdzenie, że biomasa metanotroficzna (po odpowiednim przygotowaniu) może być dobrym rozwiązaniem w naturalnej suplementacji diety zwierząt [Zał. 4: A26].

W projekcie pt. „Naturalna i stymulowana aktywność metanogeniczna polskich węgli kopalnych”, którego byłam wykonawcą, kontynuowałam tematykę analiz mikroorganizmów z podziemnej niszy ekologicznej, tym razem mikroorganizmów metanogennych. W pracy [Zał. 4: II I14]., której celem była stymulacja metanogenezy w węglu bitumicznym

z Górnośląskiego Zagłębia Węglowego brałam udział w analizie mikroorganizmów zasiedlających torf, jak i osady. Określiłam, że mikroorganizmy autochtoniczne torfu i osadu dennego są zdolne do degradacji węgla, przy czym te drugie są bardziej skuteczne. W kolejnej pracy [Zał. 4: A25] uczestniczyłam w analizie molekularnej konsorcjów metanogennych za pomocą sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Analiza społeczności, które wyhodowano z wykorzystaniem różnych źródeł węgla, rzuca nowe światło na ekofizjologię niedawno opisaną gromady bakterii *Caldiserica* i metanogennych Archaea reprezentujących rodzaje *Methanomassiliicoccus* i *Methanothrix*. Ponadto postawiono hipotezę, że przedstawiciele *Caldiserica* mogą wspierać metanogenezę wodorotroficzną.

Brałam udział również w prowadzeniu badań, których celem było wykazanie, w jaki sposób działalność przemysłowa wpływa na jakość gleby pod względem jakości i ilości DNA gleby, a także właściwości gleby [Zał. 4: A37 i A48]. Analizowałam materiał glebowy pochodzący z obszaru miejskiego województwa śląskiego Polski. Oszacowaliśmy właściwości gleby: teksturę, wilgotność, pH, potencjał redoks (Eh) i całkowitą zawartość węgla (TOC, ang. *Total Organic Carbon*), a następnie było wyznaczenie poziomu wybranych metali ciężkich (Pb, Cd, Zn, Cr, Fe, Cu). W ostatnim etapie wyizolowano całkowite DNA z gleby, określono jego stężenie i dokonano identyfikacji mikroorganizmów. Otrzymano wyniki, które wykazały, że chociaż badana gleba była silnie zanieczyszczona metalami ciężkimi, nadal istniały mikroorganizmy odporne na metale, które były w stanie utrzymać aktywność gleby. Co więcej, organizmy te dotąd nie były zidentyfikowane w bazie danych GenBank. Rozszerzając tematy analizy gleb zanieczyszczonych prowadziłam badania [Zał. 4: A48], których celem było określenie zarówno katabolicznych, jak i genetycznych odcisków bakterii autochtonicznych zasiedlających glebę tym razem zanieczyszczonych paliwami samochodowymi. Do badań wykorzystałam warstwę powierzchniową (0-20 cm) gleby *Mollic Gleysol*, która została zanieczyszczona paliwami samochodowymi m.in. bezołowiową benzyną 95-oktanową i olejem napędowym w dawce 15 g na 10 g gleby, najczęściej identyfikowanej w regionach przemysłowych. Eksperyment trwał 42 dni i został przeprowadzony w temperaturze 20°C. Potencjał metaboliczny społeczności bakterii glebowych został oceniony przy użyciu systemu Biolog EcoPlate. Wyniki wykazały, że substancje ropopochodne wpłynęły na strukturę populacji drobnoustrojów i ich aktywność kataboliczną. W glebie zanieczyszczonej olejem napędowym stwierdzono obecność bakterii z rodzajów *Arthrobacter*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*, natomiast w glebie zanieczyszczonej benzyną - *Bacillus* i *Microbacterium*. Gatunki z rodzaju *Rhodococcus* zidentyfikowano w obu

wariantach zanieczyszczeń, co sugeruje najszersze możliwości degradacji paliwa samochodowego przez ten rodzaj bakterii. Co więcej, zanieczyszczenie benzyną bezołowiową 95-oktanową spowodowało szybkie zahamowanie aktywności metabolicznej bakterii glebowych, w przeciwieństwie do traktowania olejem napędowym, gdzie obserwowano wysoką aktywność metaboliczną bakterii do końca okresu inkubacji [Zał. 4: A48]. Kolejno w pracy [Zał. 4: A21] dokonano analizy profili fizjologicznych społeczności bakteryjnej w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi w porównaniu z glebami bez zanieczyszczeń metalami. Zanieczyszczona gleba (CT) pochodziła z okolic Szopienic (województwo śląskie, Polska). Kontrolę (C) stanowiła gleba nienarażona na działanie metali ciężkich. Gleby posiadały taką samą teksturę i właściwości. Przeanalizowano stężenie metali ciężkich w badanych glebach (C) i (CT), które określono za pomocą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS ang. *Atomic Absorption Spectrometry*), natomiast profil fizjologiczny określono za pomocą systemu Biolog EcoPlatesTM. Aktywność mikrobiologiczna gleby w obu miejscach została również oceniona za pomocą aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów glebowych (DA, ang. *Dehydrogenase Activity*). Materiał badawczy pobrano do głębokości 80 cm. Średnie stężenia metali ciężkich - głównie Pb, Cd i Zn w zanieczyszczonych próbach gleby mieściły się w zakresie od 147,27 do 12265,42 mg kg⁻¹. Gleby kontrolne cechowały się zakresem wspomnianych metali od 0,19 do 66,83 mg kg⁻¹. Stwierdziłam, że w glebach C DA zmniejszała się wraz ze wzrostem głębokości gleby, wynosząc 4,61 µg TPF g⁻¹ min⁻¹ w warstwie powierzchniowej (0-20 cm), podczas gdy w najgłębszej części profilu glebowego (60-80 cm) aktywność zmniejszyła się o 74% i wynosiła 1,19 µg TPF g⁻¹ min⁻¹. Odwrotną tendencję zaobserwowałam w przypadku profilu glebowego CT. Inhibicja DA (na poziomie ok. 18%) wystąpiła jako konsekwencja zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi w warstwie powierzchniowej (0-20 cm). W głębszych częściach badanego profilu zaobserwowano stymulujący wpływ zawartości metali ciężkich na DA (o 56, 34 i 37% - odpowiednio dla głębokości 20-40, 40-60 i 60-80 cm). Jednak od warstwy podpowierzchniowej (20-40 cm) notowano liniowy spadek DA wraz z głębokością gleby.

Mikrobiom gleb CT charakteryzował się następującymi cechami metabolicznymi, wyrażonymi przez zdolność do wykorzystywania specyficznych substratów węglowych: amin/amidów putrescyny i polimerów Tween 80, amidów i polimerów Tween 80. Zaobserwowano, że pewne wspólne źródła substratów węglowych były wykorzystywane podobnie przez obie społeczności drobnoustrojów, zasiedlające zarówno gleby kontrolne jak i zanieczyszczone. Zyskując doświadczenie w pracy z glebami zanieczyszczonymi oraz

autochtonicznymi mikroorganizmami uczestniczyłam w badaniach gleb technogenicznych (Technosoli) powstałych z urobku kopalnianego zawierającej siarczki żelaza (Rudki, Góry Świętokrzyskie, Polska). Moim zadaniem była analiza molekularna mikroorganizmów zasiedlających badane gleby [Zał. 4: A28]. Określiłam metodą hodowlaną, że w profilach glebowych dominują taksony z rodzaju *Bacillus*. Co istotne, w tej pracy dokonywaliśmy analizy możliwości przywrócenia funkcji ekologicznych poprzez rekultywację terenów pogórnich, co może stymulować procesy glebotwórcze i inicjować aktywność biologiczną na powierzchniach składowisk. W kolejnej pracy [Zał. 4: A30] rozszerzyłam analizy molekularne techno-gleb o sekwencjonowanie następnej generacji amplikonu 16S rRNA hiperzmiennego regionu V3-V4 (MiSeq, Illumina). W tej pracy również dokonano analizy metabolicznej mikroorganizmów autochtonicznych przy użyciu systemu Biolog®EcoPlates™. Wykazano, że zmiany w strukturze drobnoustrojów i ich aktywności metabolicznej były konsekwencją połączonego efektu zarówno głębokości gleby, jak i właściwości chemicznych gleby, będących końcowym wynikiem procesu rekultywacji. Wytypowałam wskaźniki mikrobiologiczne, które mogą pośrednio świadczyć o powodzeniu lub nieskuteczności rekultywacji gleb technogenicznych. Następujące taksony stwierdzono w glebach reprezentujących obszary, w których właściwości chemiczne gleby zostały poprawione w wyniku procesu rekultywacji: Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Alphaproteobacteria, Acidimicrobia, Nocardioidea, Streptomyces, Pseudonocardia, Jatrophihabitans, Alkanibacter i Ferrithrix. Nieskuteczność rekultywacji przejawiająca się silnym zakwaszeniem technosoli na badanym obszarze i występowaniem taksonów charakterystycznych dla takich właściwości niszy ekologicznej cechowała się wysokim bogactwem następujących przedstawicieli bakterii: Gammaproteobacteria, Clostridia, Conexibacter, Acidothermus, Granulicella, Metallibacterium, Acidithiobacillus, Acidocella, Leptospirillum, Desulfosporosinus i Cellulomonas.

Uczestniczyłam również jako wykonawca w projekcie SONATA 5 [Zał. 4: II I11] kierowanym przez dr hab. Agnieszkę Wolińską, prof. KUL. W trakcie realizacji zadań badawczych skupiałam się na izolacji DNA glebowego, jego czystości, ilości i integralności oraz analizie wyników otrzymanych w wyniku sekwencjonowania następnej generacji z wykorzystaniem Ion Torrent™. W pracach [Zał. 4: A19; A20; A24] analizowałam mikroorganizmy gleb rolniczych użytkowanych i nieużytkowanych. Szczególną uwagę poświęcono mikroorganizmom potencjalnie wiążącym azot, zasiedlającym badane obiekty badawcze. Badane gleby orne były wyraźnie zdominowane przez przedstawicieli β -Proteobacteria bakterii PNF - potencjalnie wiążących azot atmosferyczny (PNF, ang.

Potential Nitrogen Fixing) należących do rodzaju *Burkholderia*. Bakterie z klasy α -Proteobacteria i rodzaju *Devosia* były subdominantami. Wolno żyjąca populacja cyjanobakterii dominowała raczej w glebach rolniczych uprawianych niż w glebach nieuprawianych. Podsumowano, że zarówno gospodarka rolna, jak i procesy glebotwórcze są najbardziej istotnymi czynnikami wpływającymi na bogactwo bakterii PNF. Kolejno w projekcie brałam udział w badaniach, których celem było określenie struktury promieniowców w glebach uprawnych (C) i nieuprawnych (NC) w podziale na trzy grupy glebowe (autogeniczne, hydrogeniczne, litogeniczne) z uwzględnieniem procesu ich powstawania w celu oceny wrażliwości promieniowców na rolnicze użytkowanie gleb. Wyniki tych badań przedstawiono w pracy [Zał. 4: A19], której byłam współautorem. W projekcie SONATA zaproponowano nowe metagenomiczne wskaźniki zmęczenia gleby uprawnej. Zarekomendowano 10 rodzin bakterii i 8 rodzajów. Wytypowano również 5 rodzajów bakterii, które zasugerowano jako odporne na rolnicze użytkowanie gruntów. Wyniki tych badań zaprezentowano w pracy, której jestem współautorem [Zał. 4: A23].

Nabyte doświadczenie w badaniu gleb rolniczych poskutkowało uczestnictwem w projektach realizowanych we współpracy z Fundacją Potulicką [Zał. 4: II 12 i Zał. 4: II 18] i spółką CGFP [Zał. 4: II 15 i Zał. 4: II 17]. Jeden z projektów miał na celu optymalizację nawożenia oraz doboru systemu uprawy kukurydzy celem poprawy żyzności oraz ochrony bioróżnorodności gleb rolniczych pozostających w zasobach grupy kapitałowej Fundacji Potulickiej. Kolejno drugi, którego byłam kierownikiem określał wpływ zredukowanego nawożenia i systemu uprawy na plonowanie pszenicy i rzepaku oraz bioróżnorodność mikroorganizmów, utrzymujących żyzność gleb. Projekt był realizowany we współpracy z CGFP sp. z o.o. w Wojnowie (woj. kujawsko-pomorskie). Wyniki badań otrzymanych w projektach we współpracy z przemysłem zostały przedstawione w pracach, w których wskazałam grzybowe wskaźniki wrażliwości i odporności na długotrwałą monokulturę kukurydzy [Zał. 4: A32] oraz określano czy stosowanie mieszanki międzyplonowej naprawdę poprawia biologię gleb monokulturowych? W tej pracy wskazałam bakteryjne wskaźniki wrażliwości i odporności na długotrwałą monokulturę kukurydzy. W pracy [Zał. 4: A35] dokonałam analizy struktury Bacteroidota w glebach rolniczych poddawanych wpływowi różnych praktyk rolniczych. Udowodniono, że mikroorganizmy należące do Bacteroidota mogą być wskaźnikiem jakości gleby w kontekście jej zdrowia.

Nowy obszar moich zainteresowań stanowi także analiza mikrobiologiczna osadów dennych, realizowana w ramach projektu w interdyscyplinarnego KUL, którego byłam wykonawcą [Zał. 4: II 19]. W projekcie analizowałam bioróżnorodność bakterii

zasiedlających osady denne zbiornika przeznaczonego do hodowli karpia królewskiego z wykorzystaniem technik metagenomicznych. Wyniki tych analiz przedstawiłam w pracy [Załącznik 4: A34], której głównym celem było określenie zmian w strukturze bakteryjnej osadów dennych zachodzących na przestrzeni pór roku oraz oszacowanie aktywności metabolicznej drobnoustrojów. Osady denne pobierano cztery razy w roku (wiosną, latem, jesienią i zimą) z 10 różnych punktów pomiarowych na Stawie Kardynalskim (Ślesin, północno-zachodnia Polska). Okazało się, że Proteobacteria, Acidobacteria i Bacteroidetes były dominującymi rodzajami, podczas gdy przedstawiciele Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria i Deltaproteobacteria dominowali na poziomie klas w osadach dennych. Wykazano wpływ pory roku na bioróżnorodność i aktywność metaboliczną, z podkreśleniem, że warunki środowiskowe w lecie najsilniej modyfikowały badane parametry.

Pragnę również podkreślić, że analizę mikroorganizmów endofitycznych wykonałam również w paproci wodnej *Azolla filiculoides* L. we współpracy z dr Arturem Banachem [Załącznik 4: A49]. Do profilowania taksonów zasiedlających endosferę *Azolla* sp. wykorzystano izolację i hodowlę mikroorganizmów z uwagi na fakt potencjalnego zastosowania tych bakterii w biotechnologii. Uzyskano 58 izolatów drobnoustrojów (określono, że 43 z nich to epifity i 15 to endofity) o różnej morfologii. Udało się zidentyfikować 85% mikroorganizmów i przypisać je do 9 rodzajów bakterii: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Delftia*, *Agrobacterium* i *Alcaligenes* (epifity), a także *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* i *Acinetobacter* (endofity). Zbadano również cyjanobiont *Azolla* sp., który pierwotnie sklasyfikowany był jako *Anabaena azollae*. Jednak szczegółowa analiza jego cech morfologicznych sugeruje, że powinien on zostać przemianowany na *Trichormus azollae*. Na koniec sprawdzono potencjał przedstawicieli zidentyfikowanych rodzajów drobnoustrojów do syntezy substancji stymulujących wzrost roślin, takich jak kwas indolilo-3-octowy (IAA), enzymy celulazowe i proteazowe, siderofory i fosfor (P). Izolat *Delftia* sp. AzoEpi7 okazał się wykazywać zdolność do syntezy wszystkich badanych promotorów wzrostu; dlatego został zarekomendowany jako najbardziej korzystny w badanym mikrobiomie. Pozostałe trzy potencjalnie korzystne izolaty pod kątem promowania wzrostu (*Micrococcus* sp. AzoEndo14, *Agrobacterium* sp. AzoEpi25 i *Bacillus* sp. AzoEndo3) wykazywały syntezę 5 parametrów: IAA (z wyłączeniem *Bacillus* sp. AzoEndo3), celulazę, proteazę, siderofory (z wyłączeniem *Micrococcus* sp. AzoEndo14), a także mineralizację i solubilizację P (z wyłączeniem *Agrobacterium* sp. AzoEpi25).

Uczestniczyłam też w badaniach [Załącznik 4: A29], w których postawiono hipotezę, że ekspozycja mikrobiomu na wybrane metale ciężkie ujawni szczepy endofityczne

tolerancyjne na metale. Wykorzystano technikę sekwencjonowania następnej generacji amplikonu genu 16S rRNA do identyfikacji możliwych szczepów tolerancyjnych na metale wyizolowanych z roślin poddanych działaniu metali (Pb, Cd, Cr(VI), Ni, Au, Ag). Głównymi dominantami były Cyanobacteria i Proteobacteria stanowiące łącznie ponad 97% wszystkich odczytów sekwencji genu 16S rRNA. Co więcej, traktowanie metalami doprowadziło do zmian w składzie mikrobiomu i wykazało znacznie większe bogactwo bakterii w roślinach traktowanych Pb, Cd- i Cr w porównaniu z innymi badanymi. Subdominujące mikroorganizmy to przedstawiciele należące do Actinobacteria (0,4-0,8%), Firmicutes (0,5-0,9%) i Bacteroidetes (0,2-0,9%). Należy podkreślić, że bogactwo wyżej wymienionych taksonów było wyższe niż w roślinach nietraktowanych metalami ciężkimi. Ponadto, zidentyfikowano możliwe rodzaje tolerujące metale, a mianowicie: *Acinetobacter*, *Asticcacaulis*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Methyloversatilis*, *Rhizobium* i *Staphylococcus*, które określono jako mikrobiom podstawowy. Dodatkowo potwierdzono obecność znanych rodzajów tolerujących metale (możliwości tolerancji udokumentowane w literaturze): *Mucilaginibacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Stenotrophomonas*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Geobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter* i *Delftia*. Udowodniono, że *A. filiculoides* posiada mikrobiom, którego przedstawiciele należą do gatunków odpornych na metale, co czyni paproć źródłem biotechnologicznie użytecznych mikroorganizmów do procesów remediacji. Kontynuowaliśmy tematykę mikroorganizmów tolerujących wysokie stężenie metali ciężkich. W ramach adaptacji do niekorzystnych warunków mikroorganizmy te mogą reprezentować różne fenotypy. Naszym celem było ujawnienie potencjału mikrobiomu do degradacji związków organicznych, a także jego potencjału do promowania wzrostu roślin w obecności metali ciężkich [Załącznik 4: A31]. Zastosowaliśmy platformę Biolog™ Phenotypic Microarrays do badania potencjału metabolicznego mikrobiomu do degradacji 96 związków węgla. Zbadano również potencjał hydrolityczny i produkcję auksyn (m.in. IAA) przez mikroorganizmy endofityczne w obecności Pb, Cd, Cr (VI), Ni, Ag i Au. Stwierdziliśmy różne zmiany fenotypu w zależności od czynnika stresowego, co sugeruje możliwą podwójną funkcję badanych mikroorganizmów, tj. w bioremediacji i jako bionawożu do stymulacji wzrostu roślin. Izolaty *Delftia* sp., *Staphylococcus* sp. i *Microbacterium* sp. wykazywały wysoką skuteczność w metabolizowaniu związków organicznych. Co więcej, *Delftia* sp., *Achromobacter* sp. i *Agrobacterium* sp. charakteryzowały się tolerancją na metale. Ponieważ każdy szczep wykazywał indywidualne zmiany fenotypu pod wpływem badanych czynników stresowych.

W trakcie mojej pracy naukowej podjęłam współpracę z Zakładem Badań Systemu Gleba-Roślina oraz Zakładem Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie; Zakładem Mikrobiologii Rolniczej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach; Katedrą Nauk o Środowisku Glebowym oraz Zakładem Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, a także z Zakładem Fizjologii Roślin i Ekologii Narodowy Uniwersytet Lwowski im. Iwan Franko. Obecnie nawiązałam współpracę z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie, z Instytutem Agroekologii i Produkcji Roślinnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz z Katedrą Agroekologii i Produkcji Roślinnej Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie [Zał. 4: III Q]. Rozpoczęłam również współpracę międzynarodową z prof. Jaco Vangronsveld z Hasselt University. W ramach projektu KUL z komponentem międzynarodowym odbyłam tygodniowy staż naukowy u prof. J. Vangronsveld we wrześniu 2022 roku [Zał. 4: III L]. Podczas wizyty miałam okazję zdobywać doświadczenie nad badaniem z zastosowaniem eksperymentów z ecotron oraz stosować techniki molekularne do analizy mikroorganizmów środowiskowych. Nadmieniam, że również podjęłam współpracę z przedstawicielami gospodarki, m.in. INTERMAG sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, a także z Fundacją Potulicką, CGFP z o.o. oraz z firmą Chemirol [Zał. 4: III Q].

Podsumowaniem moich prac nad endofitami o zastosowaniu w agrobiotechnologii i tworzeniu z nich produktów biotechnologicznych było wydanie monografii popularno-naukowej pt. „Aktualny stan wiedzy na temat biopreparatów stosowanych w rolnictwie” [Zał. 4: A39].

Byłam kierownikiem 3 projektów naukowych a także wykonawcą w 6 projektach naukowych [Zał. 4: II I]. Obecnie prowadzę projekt z komponentem międzynarodowym finansowany ze środków KUL pt. „Syntetyczna wspólnota mikroorganizmów (SynCom) jako składnik biopreparatu wspomagającego funkcjonowanie holobiontu pszenicy" (2022-2024). Teraz wykonuję prace profilowania mikroorganizmów zasiedlających gleby rolnicze oraz osady denne z wykorzystaniem technik molekularnych (NGS, *Real-time* PCR) w trzech projektach badawczych [Zał. 4: II I1; Zał. 4: II I2 i Zał. 4: II I4]. Jestem współautorem dwóch patentów: pt. „Sposób otrzymywania ektoiny przy udziale konsorcjum bakterii zasiedlających odpadowe skały przywęglowe. (P.395782). data uzyskania 20.11.2013 oraz drugiego o numerze P.401711 pt. „Sposób produkcji polihydroksyalkanolanów z metanu, przez konsorcjum bakteryjne zasiedlające skałę przywęglową - data uzyskania 18.12.2014. Ponadto, jestem głównym autorem zgłoszenia patentowego o nr P.439141 pt. "Biopreparat

i sposób otrzymywania biopreparatu wspomagającego wzrost i rozwój pszenicy ozimej zawierającego szczepy endofityczne" zgłoszonego w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej. Nadmieniam, że również jestem autorem znaku towarowego INNOENDOP o nr Z.532983 zatwierdzonego przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej [Załącznik 4: II B]. Potwierdzeniem aktywności naukowej jest też mój czynny udział w licznych [Załącznik 4: III B]. konferencjach naukowych, zarówno krajowych, jak i międzynarodowych, gdzie prezentowałam wyniki badań w formie referatów i posterów [Załącznik 4: II K; Załącznik 4: III B]. Jestem współorganizatorem III Sympozjum Naukowego pt. "Metagenomy różnych środowisk" (2018 rok). Współorganizowałam też konferencję naukową pt. „Biotechnologia - energia jutra” (19–20.10.2017). Brałam udział w organizowaniu również konferencji we współpracy z Fundacją Tygiel m.in. I Ogólnopolską Konferencją Naukową "Metody chromatograficzne w nauce, przemyśle i medycynie" oraz II Ogólnopolską Konferencją Naukową Krimed „Metody badawcze w kryminalistyce i medycynie sądowej”. Byłam też członkiem 12 Komitetów Naukowych konferencji [Załącznik 4: III C]. W roku 2024 będę współorganizować na KUL VIII edycję Ogólnopolskiego Sympozjum Mikrobiologicznego „Metagenomy różnych środowisk”.

Będąc asystentem na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Instytutu Ochrony Środowiska w latach 2008-2009 opracowywałam i prowadziłam ćwiczenia dla studentów Ochrony Środowiska [Załącznik 4: III I]. Od 2015 r. prowadzę zajęcia (wykłady i ćwiczenia) dla studentów Biotechnologii (I i II stopnia) w nowo utworzonym Instytucie Biotechnologii na Wydziale Biologii i Nauk o Środowisku KUL [Załącznik 4: III I].

Byłam promotorem pomocniczym 8 prac magisterskich [Załącznik 4: III J]. Ponadto, byłam również kopromotorem pracy doktorskiej pt. „ Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu rośliny – endofity do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej” obronionej 19 października 2021 roku z wyróżnieniem na Wydziale Agrobiotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie [Załącznik 4: III K]. Byłam opiekunem naukowym pracy doktorskiej wykonywanej w ramach projektu finansowanego z Międzynarodowego Funduszu Wyszehradzkiego. Praca doktorska pt. „Physiological basis of productivity and grain quality of spring wheat" została obroniona przez Orysię Makar na Lwowskim Uniwersytecie im. Ivan Franko National University of Lviv w dniu 5 maja 2023 [Załącznik 4: III K]. Jestem opiekunem studentów Biotechnologii w języku angielskim (od I roku akademickiego 2020/2021). Byłam również kuratorem koła Naukowego Studentów Biotechnologii w latach 2014-2016 [Załącznik 4: III Q]. Pracuję również aktywnie naukowo ze studentami Biotechnologii, zachęcając ich do pisania prac popularno-naukowych [Załącznik 4: A50 i A51]. Posiadam również ocenę wyróżniającą

za działalność naukową i dydaktyczną w latach 2013-2019 i 2021-2023 [Zał. 4: III D]. Otrzymałam również nagrody indywidualne i zespołowe Rektora za dzielność naukową oraz w 2022 roku został mi przyznany Laur Uniwersytecki drugiego stopnia za zrealizowanie grantu badawczego wyróżniającego się przełomowymi wynikami [Zał. 4: II J]. W roku 2020 otrzymałam Medal Komisji Edukacji Narodowej.

Pełniłam funkcję recenzenta w 15 pracach licencjackich oraz 5 magisterskich. Zrecenzowałam ponadto 51 publikacji naukowych, w tym 43 z listy A czasopism MNiSW, m.in. *Frontiers in microbiology*, *Frontiers in Plant Science*, *Science of the Total Environment*, *Chemosphere*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *Environmental Science and Pollution Research*, *Geomicrobiology Journal* [Zał. 4: III P]. Pełniłam również funkcję recenzenta w przewodzie doktorskim Sansuta Mohanty pt. „Recovery of electrolytic manganese from mining waste by fungal bioleaching” prowadzonym na uniwersytecie: Siksha O Anusandhan University [Zał. 4: III K].

Oprócz działalności naukowo-dydaktycznej angażowałam się również w prace na rzecz Uniwersytetu i Wydziału. W latach 2019 - 2021 uczestniczyłam w pracach Komisji Uniwersyteckiej ds. Kształcenia a także brałam czynny udział w opracowywaniu efektów kształcenia oraz programu studiów Biotechnologii I i II stopnia w ramach uczestnictwa w pracach Komisji ds. Programu i Efektów Kształcenia. Brałam również aktywny udział w przygotowaniu odpowiedzi do Raportu Samooceny dla PKA dla I i II stopnia Biotechnologii w kwestiach odnośnie systemu jakości kształcenia na kierunku Biotechnologia (Wrzesień 2015). W latach 2016 – 2017 pełniłam funkcję koordynatora ds. promocji na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Środowisku, w 2016 roku koordynatora ds. Lubelskiego Festiwalu Naukowego , a także koordynatora ds. Nocy Biologów [Zał. 4: III I].

Od 2011 roku biorę czynny udział w Lubelskim Festiwalu Nauki, łącznie zrealizowałam 11 projektów, jak również włączam się (od 2014 roku) w Noc Biologów, gdzie przedstawiłam 7 projektów. W latach 2015 prowadziłam też zajęcia dla dzieci w ramach Uniwersytetu Otwartego KUL, gdzie zaprezentowałam 2 pokazy połączonych z wykładami multimedialnymi. W ramach promocji kierunku Biotechnologia w 2011 roku wzięłam udział w nagraniu programu pt. "Kolory Biotechnologii", realizowanym przez TVP3 Lublin [Zał. 4: III I].

Należę do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Polskiego Towarzystwa Genetycznego oraz Polskiego Towarzystwa Metabolomicznego [Zał. 4: III H].

6. Podsumowanie dorobku i dane bibliometryczne

6.1. Publikacje i konferencje

Typ publikacji	1. Przed doktoratem			Suma (1+2)					
	Liczba	IF _{rok} publikacji	Punkty MNiSW/MEiN	Liczba	IF _{rok} publikacji	Punkty MNiSW/MEiN	Liczba	IF _{rok} publikacji	Punkty MNiSW/MEiN
Recenzowane czasopisma z bazy JCR ¹	3	4,493	65	32	108,029	2335	35	112,522	2400
Recenzowane czasopisma spoza listy JCR ^{2,3}	4	-	22	7	4,434	117	11	4,434	139
Rozdziały w książkach			-	-					
Monografie	1		5	2		80	3		85
Rozdziały w monografii	0		-	2			2		
RAZEM	8	4,493	87	43		2532	51	116,956	2539
<i>IF (WoS+Google based)</i>									
Konferencje międzynarodowe	8			26			34		
Konferencje krajowe	6			59			65		
RAZEM	14			85			99		

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

6.2. Cytowania* i indeks Hirscha

	Web of Science	Scopus	Google Scholar	Research Gate
Ilość cytowań*	574	751	946	559
Indeks Hirscha**	15	15	17	14

* liczba cytowań dla każdej publikacji przedstawiona jest w Załączniku nr 4

bez autocytowań

** stan na dzień 19.07.2023

Agnieszka Kuźniar