

## Imię i nazwisko

**Agnieszka Kalwasińska**

## Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

**01.07.2000** Dyplom magistra biologii uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska). Praca magisterska pt. „Bakterie epifityczne grążela żółtego *Nuphar lutea* L” wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wód i Ścieków (obecnie Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii). Promotor: prof. dr hab. Wojciech Donderski.

**22.09.2008** Dyplom doktora uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska. Praca doktorska pt. „Studium mikrobiologiczne Jeziora Chełmżyńskiego”, wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii (obecnie Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii). Promotor: prof. dr hab. Wojciech Donderski. Recenzenci: prof. dr hab. Zbigniew Mudryk, prof. dr hab. Aleksander Świątecki.

## Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

**01.10.2010** obecnie adiunkt na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii

**01.10.2015 - 31.03.2016** urlop bezpłatny na UMK w związku z zagranicznym stażem podoktorskim. Stypendysta w ramach The Visby Programme 2015/2016. Instytucja przyjmująca: Swedish University of Agricultural Sciences, Department Microbiology, Uppsala, Sweden.

**05.03.2001 - 01.10.2010** asystent na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Zakład Mikrobiologii Wód i Ścieków/późniejszy Zakład Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii

**01.09.2000 - 12.02.2001** nauczyciel biologii w Gimnazjum nr 35 w Bydgoszczy

## Wskazanie osiągnięcia naukowego o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy

Cykl publikacji z lat 2015-2020, pod wspólnym tytułem: **Zbiorowiska bakteryjne i archeonowe środowisk ekstremalnych o różnym stopniu zasolenia.**

**Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (Impact Factor, IF roku wydania wg bazy Journal Citation Reports, cytowania wg Web of Science, punkty wg MNiSW)**

1. **Kalwasińska A.**, Felföldi, T., Walczak, M., Kosobucki, P. **2015**. Physiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline distillery lime. Polish Journal of Microbiology 64(4):369-377.

**IF2015 0.750; cytowania 5, punktacja MNiSW 15**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, pobraniu prób, wykonaniu eksperymentów t.j.: oznaczenie liczebności mikroorganizmów hodowlanych, oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów, izolacja bakterii, przeprowadzenie testów fizjologiczno-biochemicznych szczepów, analizie statystycznej wyników,*

*napisaniu w całości tekstu, przygotowaniu tabel i wykresów, korekcie manuskryptu po recenzjach.*

2. **Kalwasińska A.**, Felföldi T., Szabó A., Deja-Sikora E., Kosobucki P., Walczak M. **2017**. Microbial communities associated with the anthropogenic, highly alkaline environment of a saline soda lime, Poland. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110(7):945-962.

**IF2017 1.588; cytowania 7, punktacja MNiSW 20**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, pobraniu prób, przeprowadzeniu eksperymentów t.j.: oznaczenie liczebności mikroorganizmów hodowlanych, oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów, izolacja bakterii, identyfikacja molekularna izolatów, wykonaniu analizy statystycznej wyników, napisaniu w całości tekstu artykułu, przygotowaniu tabel i korekcie manuskryptu po recenzjach.*

3. **Kalwasińska A.**, Jankiewicz U., Felföldi T., Burkowska-But A., Swiontek Brzezinska M. **2018**. Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. *Food Technology and Biotechnology* 56(4):553-561.

**IF2018 1.517; cytowania 0, punktacja MNiSW 25**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu następujących eksperymentów: testów fizjologicznych oceniających optymalne warunki hodowli badanego szczepu, optymalizacji podłoża i warunków jego hodowli w celu maksymalizacji produkcji proteazy, optymalizacja metody oznaczania aktywności proteaz oraz zawartości białka bakteryjnego, analizie wyników wszystkich przeprowadzonych w pracy doświadczeń, napisaniu w całości tekstu, przygotowaniu wszystkich tabel i wykresów i korekcie manuskryptu po recenzjach.*

4. **Kalwasińska A.**, Deja-Sikora Edyta, Szabó Attila, Felföldi Tamás, Kosobucki Przemysław, Swiontek Brzezinska Maria, Walczak Maciej. **2019a**. Salino-alkaline lime of anthropogenic origin a reservoir of diverse microbial communities. *Science of the Total Environment* 655:842-854.

**IF2019 5.589; cytowania 0, punktacja MNiSW 200**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu eksperymentów t.j.: oznaczenie liczebności mikroorganizmów hodowlanych, oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów, izolacja bakterii, identyfikacja molekularna izolatów, ilościowy PCR, analizie statystycznej wyników wszystkich przeprowadzonych doświadczeń, napisaniu w całości tekstu, przygotowaniu tabel i wykresów i korekcie manuskryptu po recenzjach.*

5. **Kalwasińska A.**, Deja-Sikora E., Szabó A., Krawiec A., Felföldi T., Swiontek Brzezinska M., Walczak M. **2019b**. Microbial communities of low temperature, saline groundwater used for therapeutical purposes in North Poland. *Geomicrobiology Journal* 36(3):212-223.

**IF2019 1.609; cytowania 0, punktacja MNiSW 40**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu eksperymentów t.j.: oznaczenie liczebności mikroorganizmów hodowlanych, oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów, izolacja bakterii, identyfikacja*

*molekularna izolatów, analizie statystycznej wyników wszystkich przeprowadzonych doświadczeń, napisaniu w całości tekstu, przygotowaniu tabel i wykresów i korekcie manuskryptu po recenzjach.*

6. **Kalwasińska A.**, Krawiec A., Deja-Sikora A., Gołębiwski M., Kosobucki P., Swiontek Brzezinska M., Walczak M. Microbial diversity in deep subsurface hot brines of the North West Poland: from a community structure to isolate characteristics. DOI:10.1128/AEM.00252-20.

**IF2019 4,077; cytowania 0, punktacja MNiSW 100**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu eksperymentów t.j.: oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów, izolacji bakterii, identyfikacji molekularnej izolatów, analizie genomu, analizie statystycznej wyników wszystkich przeprowadzonych doświadczeń, napisaniu w całości tekstu, przygotowaniu tabel i wykresów, korekcie manuskryptu po recenzjach.*

**Łączny IF 15,13, punktacja MNiSW 400, Liczba cytowań prac 13. We wszystkich pracach byłam pierwszym autorem i autorem do korespondencji.**

**Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **Streszczenie**

**Osiągnięcie habilitacyjne jest wynikiem badań które prowadzono w latach 2013–2018 (Kalwasińska i wsp., 2015, 2017, 2018, 2019a, 2019b, 2020).**

Nadrzędnym celem badań była eksploracja unikalnych, ekstremalnych środowisk sztucznych i naturalnych o różnym stopniu zasolenia pod kątem poznania liczebności, bioróżnorodności, struktury zbiorowisk bakteryjnych i archeonowych, a także określenia czynników fizyko-chemicznych kształtujących tę strukturę oraz zbadanie fizjologii i potencjalnych możliwości wykorzystania konkretnych izolatów w przemyśle i ochronie środowiska.

Eksplorację środowisk ekstremalnych rozpoczęto badaniami nad mikroorganizmami występującymi w silnie alkalicznym i w różnym stopniu zasolonym wapnie posodowym, będącym produktem ubocznym wytwarzania sody metodą Solvay'a w Janikowskich Zakładach Sodowych SODA CIECH SA (Kalwasińska i wsp., 2015; Kalwasińska i wsp., 2017; Kalwasińska i wsp., 2018; Kalwasińska i wsp., 2019a). Następnie badaniom poddano zbiorowiska mikroorganizmów występujących w chłodnych ( $T < 12^{\circ}\text{C}$ ) wodach podziemnych, wykorzystywanych w celach terapeutycznych w Kołobrzegu i Połczynie Zdroju (Kalwasińska i wsp., 2019b), a także w solankach termalnych ( $T > 60^{\circ}$ ), znajdujących zastosowanie w produkcji energii cieplnej w geotermiach Pyrzyce i Stargardu Szczecińskiego (Kalwasińska i wsp., 2020).

Badania mikrobiologiczne prowadzono metodami molekularnymi, takimi jak wysokoprzepustowe sekwencjonowanie amplikonów 16S rDNA, sekwencjonowanie całych genomów, metodami hodowlanymi oraz biochemicznymi.

## Wstęp

Ekosystemy ekstremalne, w których panują skrajne z punktu widzenia człowieka warunki życia występują na znacznym obszarze naszej planety, w szczególności pod powierzchnią Ziemi i oceanów. Mikroorganizmy zdolne do bytowania i rozmnażania się w skrajnych warunkach zwane są ekstremofilami. Występują one zarówno w ekosystemach naturalnych, takich jak np. lód lodowców, gejzery, jeziora sodowe, ujścia kominów hydrotermalnych, jak i antropogenicznych, powstałych głównie wskutek przemysłowej działalności człowieka.

W zależności od rodzaju parametru działającego w znacznym natężeniu wyróżnia się siedem głównych grup ekstremofili (Gerday i Glansdorff, 2007): psychrofile (zaadaptowane do bytowania w niskich temperaturach, często poniżej 0°C), termofile (bytujące w środowiskach gorących, w których temperatura przekracza 60°C), halofile (organizmy, których rozwój może być uzależniony od obecności soli w podłożu o stężeniu przekraczającym 35%), acidofile (zaadaptowane do niskich wartości pH, często bytujące w pH 2 lub niższym), alkalifile (przystosowane do wysokich wartości pH, rosnące w pH 10 i wyższym), piezofile zwane też barofilami (żyjące na znacznych głębokościach, poddane działaniu wysokiego ciśnienia rzędu kilkudziesięciu-kilkuset MPa) oraz metalofile (odporne na działanie wysokich stężeń metali ciężkich). W wielu przypadkach są to organizmy zaadaptowane do co najmniej dwóch skrajnych wartości określonych parametrów fizyko-chemicznych i nazywane są poliekstremofilami (Bowers i wsp., 2009).

Siłą napędzającą badania nad mikroorganizmami środowisk skrajnych jest w głównej mierze biotechnologiczny potencjał ich komórek. Z jednej strony ekstremofile, z racji naturalnych adaptacji do skrajnych warunków, są producentami m.in. szerokiej gamy enzymów hydrolitycznych, związków hamujących rozwój lub eliminujących patogeny, wykazujących działanie antynowotworowe, barwników, biosurfaktantów i bioplastików, które znalazły zastosowanie w specyficznych warunkach w przemyśle, medycynie, biologii molekularnej i ochronie środowiska (Dalmaso i wsp., 2015; Durvasula i Rao, 2018; DasSarma i wsp., 2019). Z drugiej strony, poznanie bioróżnorodności oraz mechanizmów adaptacyjnych, umożliwiających ekstremofilom bytowanie w trudnych warunkach siedliskowych, pozwala na formułowanie hipotez związanych z ewolucją życia na Ziemi, zmianami w naturalnych biocenozach powodowanych przemysłową działalnością człowieka, a także z możliwością istnienia życia poza naszą planetą (Mykytczuk i wsp., 2013; Schulze-Makuch i wsp., 2017).

Szybki rozwój technik biologii molekularnej w ostatnim czasie przyczynił się do znacznego poszerzenia wiedzy o mikroorganizmach, w tym o organizmach ekstremofilnych (Das i Dash, 2018). W szczególności, wysokoprzepustowe technologie sekwencjonowania DNA (NGS) ujawniły, że zbiorowiska bakterii i archeonów w środowiskach skrajnych charakteryzują się nieoczekiwanie wysokim poziomem różnorodności i złożoności (np. Grant i Jones, 2016; Gavrillov i wsp., 2019). Pomimo tego, wiedza dotycząca mikroorganizmów ekstremofilnych wciąż jest niepełna, szczególnie w odniesieniu do przedstawicieli domeny *Archaea*, a wiele siedlisk skrajnych nigdy nie było jeszcze badanych.

Ze względu na trudności metodyczne związane z poborem i analizą materiału pochodzącego ze szczególnie trudno dostępnych siedlisk np. z głębi litosfery, czy przemysłowych linii technologicznych, informacje dotyczące możliwości życia i jego trwania w tych obszarach są niezwykle ubogie i fragmentaryczne (Schloss i wsp., 2016; German i wsp., 2011; Santini i wsp., 2015). Interesującym i bardzo mało poznanym aspektem bioróżnorodności mikroorganizmów w

środowiskach podziemnych jest wpływ trwającej miliony lat izolacji powodowanej obecnością nieprzepuszczalnych warstw skalnych na kształtowanie się specyficznych zbiorowisk.

Z przeglądu literatury dotyczącej ekosystemów podziemnych wynika, że zaledwie 8% sekwencji 16S rRNA znajdujących się w publicznych bazach danych pochodzi z organizmów występujących w środowisku podziemnym (Schloss i wsp., 2016). A przecież biomasa ukryta w głębi litosfery stanowi aż 15% masy wszystkich żywych organizmów na naszej planecie (Bar-On i wsp., 2018). Jeszcze mniej informacji pochodzi ze skrajnych ekosystemów pochodzenia antropogenicznego (Dhal i Sar, 2014; Santini i wsp., 2015), przykładem których są wielkoobszarowe miejsca składowania produktów ubocznych przemysłu chemicznego, np. przemysłu sodowego. Takie sztuczne i stosunkowo młode ekosystemy to niezwykle interesujące siedliska o nieznanym poziomie bioróżnorodności.

Wiele czynników fizyko-chemicznych kształtuje strukturę zbiorowisk mikroorganizmów w danym środowisku. Jednym z ważniejszych parametrów wywierających wpływ na funkcjonowanie mikrobiota jest zasolenie (Zhang i wsp., 2013; Canfora i wsp., 2014; Yang i wsp., 2016). Wiele prac dowiodło, że ze wzrostem zasolenia bioróżnorodność mikroorganizmów maleje, ale mało jest informacji, o tym, jaki jest wpływ tego czynnika w środowiskach poliekstremalnych, w których oddziałuje jednocześnie kilka różnych parametrów skrajnych, takich jak np. oligotrofia, wysoki odczyn, czy wysokie ciśnienie.

Wreszcie, każdego roku odkrywane są nowe enzymy czy antybiotyki o unikalnych właściwościach, lecz zapotrzebowanie na nowe, lepiej dostosowane do specyficznych wymogów technologicznych, tańsze substancje pochodzenia biologicznego wykazuje trend wzrostowy i w dalszym ciągu pozostaje niezaspokojone (GVR, 2019 a,b).

Niepełna wiedza dotycząca bioróżnorodności, wpływu czynników środowiskowych, w tym zasolenia, na strukturę zbiorowisk mikroorganizmów oraz ciągle aktualna konieczność pozyskiwania nowych substancji biologicznie aktywnych stały się inspiracją do podjęcia badań nad mikrobiomem bakteryjnym i archeonowym unikalnych środowisk skrajnych, takich jak wapno posodowe oraz solanki podziemne.

### **Hipotezy badawcze**

Oprócz określenia zróżnicowania taksonomicznego zbiorowisk bakteryjnych i archeonowych i zbadania czynników kształtujących ich skład, celem podjętych badań było zweryfikowanie przedstawionych poniżej hipotez badawczych:

1. Zasolenie to ważny czynnik ekologiczny, powodujący selekcję mikroorganizmów, kształtujący określony skład zbiorowisk mikroorganizmów. Oczekuje się, spadku liczebności i bioróżnorodności mikroorganizmów ze wzrostem zasolenia.
2. Ekstremalne środowiska pochodzenia antropogenicznego, w szczególności te, które powstały na skutek składowania produktów ubocznych przemysłu sodowego, generowanych w wyniku procesów chemicznych pod wpływem wysokiej temperatury i działania agresywnych odczynników charakteryzują się niską bioróżnorodnością.
3. Pierwszymi opisanymi w literaturze naukowej archeonami były organizmy występujące w środowiskach ekstremalnych. Archeony stanowią ważny komponent zbiorowiska mikroorganizmów w badanych ekosystemach.

4. Mikroorganizmy zaadaptowane do bytowania w warunkach silnego zasolenia syntetyzują enzymy hydrolityczne np. proteolityczne odporne na wysokie stężenie NaCl o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle lub ochronie środowiska.
5. Fizyczna izolacja głęboko położonych warstw wodonośnych od wód warstw nadległych trwająca tysiące/miliony lat jest przyczyną zmniejszenia liczby nisz ekologicznych oraz uniemożliwia migrację mikroorganizmów. Zbiorowiska mikroorganizmów poddanych długotrwałej izolacji charakteryzują się niską bioróżnorodnością.

### Omówienie wyników badań

#### Wapno posodowe (Kalwasińska i wsp., 2015; 2017; 2018, 2019a)

Wapno posodowe w Janikowskich Zakładach Sodowych jest deponowane w osadnikach ziemnych zwanych „białymi morzami” w wyniku oddzielenia fazy stałej obecnej w gorącym płynie podestylacyjnym podczas produkcji sody kalcynowanej z solanki i wapienia metodą Solvay’a (etap regeneracji amoniaku). W zależności od jego genezy wapno zawiera od około 3% do 30% NaCl, jest silnie alkaliczne (pH 11) i ubogie w biogeny, szczególnie w azot i węgiel organiczny. Głównym jego składnikiem jest węglan wapnia.

W wyniku procesów technologicznych wytwarzania sody i soli spożywczej powstają trzy rodzaje wapna: (i) wapno odsolone charakteryzujące się obniżonym stężeniem jonów chlorkowych i sodowych na skutek odsalania płynu podestylacyjnego w produkcji sody (wapno to zawiera około 2% NaCl); (ii) wapno o pośrednim stopniu zasolenia (około 14% NaCl) powstające w procesie oczyszczania solanki polegającym na strącaniu jonów magnezu i wapnia za pomocą silnie alkalicznych roztworów mleka wapiennego lub węglanu sodu w produkcji sody, dodatkowo podlegające częściowemu odsalaniu (iii) wapno o największym stopniu zasolenia (około 30% NaCl) powstałe w wyniku oczyszczania solanki oraz w procesach czyszczenia linii technologicznych głównie w produkcji soli spożywczej.

Próby do badań pochodziły ze stawów osadowych, różniących się genezą i zasoleniem wynoszącym około 2%, 14% i 26% NaCl, pobieranych z różnych głębokości (0.5 – 2 m, co 0,5 m), odzwierciedlających odmienny wiek i właściwości fizyko-chemiczne wapna. Powierzchniowa warstwa osadów jest stosunkowo młoda i w największym stopniu podlega wpływowi warunków atmosferycznych; jej wiek może być liczony w miesiącach. Szacuje się, że warstwa z głębokości 2 m liczy około dziesięciu lat a warunki w niej panujące są ustabilizowane.

Z przeprowadzanych badań wynika, że ogólna liczebność mikroorganizmów w wapnie posodowym wahała się między  $10^5$  a  $10^8$  komórek/g suchej masy (s.m.) produktu (Kalwasińska i wsp., 2015; 2017; 2019a). Ze szczegółowych i kompleksowych badań, w których uwzględniono wszystkie rodzaje składowanego wapna pobranych z różnych głębokości wynika, że w wapnie o najwyższym stopniu zasolenia (26%) liczebność mikroorganizmów była istotnie niższa niż w wapnie o niskim lub średnim zasoleniu (odpowiednio 2% i 14% NaCl).

Średnie liczebności mikroorganizmów odnotowane w przypadku mniej zasolonych prób wapna wynoszące  $10^7$  komórek/g s.m. osadu były podobne do tych, które stwierdzano w hiperstonych środowiskach, takich jak słone jeziora i salternie o odczynie zbliżonym do obojętnego (Máthé i wsp., 2014; Gomariz i wsp., 2015; Çinar i Mutlu, 2016), a także w naturalnie słonym i alkalicznym jeziorze sodowym Lonar Lake w Indiach (Humayoun i wsp., 2003). W porównaniu do gleb sołonczakowych (Polyanskaya i wsp., 2015), które należą do naturalnie

występujących środowisk słonych w największym stopniu zbliżonych pod względem zasolenia, odczynu i zawartości pierwiastków (C, N, P) do wapna posodowego, liczebność mikroorganizmów była jednak od jednego do dwóch rzędów wielkości wyższa.

Liczebności mikroorganizmów hodowalnych, zarówno neutrofilnych, jak i alkalofilnych występujących w wapnie posodowym były rzędu  $10^3 - 10^5$  komórek/g świeżej masy (ś.m.) produktu (Kalwasińska i wsp., 2015; 2017), a udział organizmów alkalitolerancyjnych wśród ogółu organizmów neutrofilnych był wyższy od 5 do 14 razy niż w typowej glebie (Horikoshi, 1991), gdzie proporcje te wahają się zazwyczaj między 1/10 do 1/100.

Większość izolatów pozyskanych w toku badań należała do fakultatywnych alkalifili (optymalny wzrost w pH 9-10) i umiarkowanych halofili (optymalny wzrost przy stężeniu NaCl 30-50 g/l). Różnorodność mikroorganizmów hodowalnych była niska. Stwierdzono występowanie przedstawicieli zaledwie sześciu rodzajów bakteryjnych. Dominowały wśród nich mikroorganizmy z rodzaju *Bacillus* (*B. pseudofirmus*, *B. saliphilus*, *B. placortidis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*); stosunkowo liczni byli też przedstawiciele rodzaju *Halomonas* (*H. hamiltonii*, *H. olivaria*, *H. pantelleriensis*). Pojedyncze szczepy przynależały do następujących gatunków: *Planococcus citreus*, *Nocardopsis xinjangensis*, *Microcella putealis* i *Micrococcus luteus*. Co ciekawe, najbliżiej spokrewnione z badanymi izolatami szczepy referencyjne pochodziły z różnych ekstremalnych słonych lub/i alkalicznych środowisk, takich jak np. odchody zwierząt (Nielsen i wsp., 1995), słona gleba w prowincji Mandpam w Indiach (Subhash i wsp., 2014), słone źródła siarczkowe we Włoszech (Romano i wsp., 1996), silnie alkaliczne odpady z produkcji oliwy z oliwek (Amouric i wsp., 2014), woda głębinowa o wysokim odczynie (Tiago i wsp., 2006).

Ze wstępnych badań dotyczących właściwości enzymatycznych pozyskanych szczepów (Kalwasińska i wsp., 2015) wynika, że większość z nich była w stanie syntetyzować enzymy hydrolizujące wiązania estrowe w cząsteczkach związków organicznych zawierających cztery (esterazy) i osiem atomów węgla w cząsteczce (esterazy, lipazy). Kilka szczepów posiadało zdolność syntezy lipaz, zdolnych do rozkładu lipidów zawierających wiele atomów węgla t.j. kwas palmitynowy (tzw. prawdziwe lipazy). Wiele szczepów posiadało też zdolność syntezy  $\alpha$ -glukozydazy, która uczestniczy w rozkładzie skrobi. Liczne były też szczepy syntetyzujące proteazy. Badania te udowodniły, że mikroorganizmy pozyskane z wapna posodowego stanowią źródło zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych, amylolitycznych i proteolitycznych, aktywnych w warunkach wysokiego odczynu (pH 10) i zasolenia (3% NaCl) o potencjalnych możliwościach zastosowania w różnych gałęziach przemysłu, medycyny i ochrony środowiska. Ich aplikacja w przemyśle może przynieść ważne środowiskowe korzyści m.in. zwiększenie wydajności katalizowanych reakcji w warunkach skrajnych (wysokie zasolenie), lepsze wykorzystanie surowca, ograniczone wytwarzanie odpadów, co przekłada się na konkretny zysk ekonomiczny i ekologiczny.

Wysoka aktywność proteolityczna izolatów stała się inspiracją do podjęcia szczegółowych badań biochemicznych nad proteazami (Kalwasińska i wsp. 2018). Okazuje się bowiem, że informacje o tolerancji na zasolenie istniejących na rynku komercyjnych proteaz np. Alcalase, Savinase, Esperase (Novozymes, Bagsværd, Denmark) lub FoodPro subtilisin (Du Pont, Wilmington, NC, USA) używanych w transformacjach organicznych nie są dostępne, mimo, że byłyby niezwykle użyteczne w razie potrzeby zastosowania enzymów w środowisku o niskiej aktywności wody. Przeprowadzone badania wykazały, że enzym z grupy endoproteaz serynowych o masie około 37 kDa produkowany przez *Bacillus luteus* H11, pozyskany ze zbiornika wapna o najwyższym zasoleniu, był niezwykle stabilny w warunkach wysokiego odczynu (do pH 12) i

wysokiego stężenia soli (do 5M NaCl). Te właściwości, a także odporność biokatalizatora na surfaktanty (SDS, Triton X-100, Tween 80, CTAB), utleniacze ( $H_2O_2$ ), niektóre rozpuszczalniki organiczne (etanol, aceton, butanol, metanol) i jony metali (np.  $Ba^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) czyni go potencjalnie użytecznym dla chemii gospodarczej, przemysłu spożywczego oraz procesów bioremediacji ekosystemów słonych. Dodatkowo, możliwość zastosowania do jego produkcji odpadów z przerobu krewetek (zmielone pancerze) jest bardzo obiecujące, w kontekście obniżenia kosztów wytwarzania enzymu na skalę przemysłową, z jednoczesnym wykorzystaniem odpadów, których zagospodarowanie jest kosztowne.

Wstępne badania molekularne (Kalasińska i wsp., 2017) z wykorzystaniem nowoczesnych technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania ampikonów 16S rDNA na platformie GS Junior (Roche, Basel, Switzerland) przeprowadzone w 2014 r. wykazały, że wapno posodowe pozyskane ze stawu osadowego, w którym deponowane jest wapno z procesu oczyszczania solanki w produkcji soli jadalnej, mimo wysokiego odczynu (pH 11) i zasolenia ( $E_{Ce}=423$  dS/m), charakteryzowało się nieoczekiwanie wysoką różnorodnością sekwencji bakteryjnych.

Generalnie, wykazano obecność w wapnie posodowym sekwencji należących do mikroorganizmów reprezentujących wszystkie trzy domeny życia (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*), w tym sekwencji charakterystycznych dla skrajnie słonych ekosystemów, takich jak np. salternie, słone jeziora czy Morze Martwe ("*Candidatus Halobonum*", *Halorubrum*, *Salinibacter*, *Halomonas*, *Dunaliella*, *Euhalothece*, *Synechococcus*).

Wyodrębniono łącznie ponad 400 operacyjnych jednostek taksonomicznych, OTU (*operational taxonomic units*) bakteryjnych i wykazano, że zbiorowiska bakterii w powierzchniowej warstwie wapna, najbardziej narażonej na zmiany wilgotności, pH, zasolenia i temperatury związanej oddziaływaniem warunków atmosferycznych, ale także podlegającej okresowemu zalewaniu związanemu z procesem technologicznym deponowania osadów są bardziej różnorodne pod względem składu rodzajowego, w porównaniu z warstwą na głębokości 2 m, gdzie warunki są dużo bardziej stabilne. Te badania, których wyniki zaprezentowano na międzynarodowej konferencji VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, BioMicroWorld2015 oraz na I Ogólnopolskim Sympozjum Mikrobiologicznym - Metagenomy różnych środowisk w 2016 r. w Puławach stały się przyczynkiem do podjęcia szczegółowych badań molekularnych poświęconych bioróżnorodności sekwencji bakteryjnych i archeonowych.

Bardziej zaawansowane badania przeprowadzone w 2017 r. (Kalwasińska i wsp. 2019a) potwierdziły, że silnie alkaliczne i w różnym stopniu zasolone wapno o odmiennej genezie, pochodzące z produkcji sody i soli jest rezerwuarem mikroorganizmów o zdumiewająco wysokiej bioróżnorodności, biorąc pod uwagę ekstremalne warunki jego powstawania i krótki czas deponowania w porównaniu z naturalnymi ekosystemami, kształtującymi się na przestrzeni setek, tysięcy czy milionów lat.

Udowodniono ponadto, że zarówno szacowana liczba rodzajów mikroorganizmów, jak i bioróżnorodność mierzona wskaźnikiem różnorodności Shannona były wyższe w przypadku zbiorowisk bakteryjnych (odpowiednio  $S_{obs} = 116 - 585$ ,  $H' = 2.6 - 5.4$ ) niż archeonowych (odpowiednio  $S_{obs} = 7 - 90$ ,  $H' = 1.7 - 3.7$ ). Wyodrębniono ponad 1800 OTU bakteryjnych oraz około 400 OTU archeonowych należących odpowiednio do 36 typów wśród domeny *Bacteria* i 8 typów wśród domeny *Archaea*.

Wykazano, że struktura zbiorowisk bakteryjnych na poziomie typu charakteryzująca się znacznym udziałem sekwencji bakteryjnych należących do *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*,

*Firmicutes* i *Actinobacteria* była podobna do zbiorowisk bakteryjnych zamieszkujących naturalne haloalkaliczne środowiska, takie jak słońca pustynia Kutch w Indiach (Pandit i wsp., 2015), osady denne hipersłonego jeziora La Sal del Rey zlokalizowanego południowym Teksasie w USA (Hollister i wsp., 2010), czy solanki jeziora sodowego Tanatar w Rosji (Vavourakis i wsp., 2016).

Przeprowadzone badania dostarczyły ciekawych wyników dotyczących struktury zbiorowisk archeonowych. Zbiorowiska zdominowane przez przedstawicieli klasy *Halobacteria* były podobne pod tym względem do zbiorowisk archeonów w ekstremalnie słonych i alkalicznych glebach (de León-Lorenzana i wsp., 2017; Navarro-Noya i wsp., 2015), silnie zasolonych jeziorach (Han i wsp., 2017), słonej pustyni Kutch w Indiach (Pandit i wsp., 2015) w największej na świecie słonej pustyni Salar de Uyuni w Boliwii (Haferburg i wsp., 2017).

Wartym podkreślenia wynikiem uzyskanym w toku przeprowadzonych badań było ustalenie ilościowych proporcji pomiędzy archeonami a bakteriami. Udział ten, średnio, w przypadku wapna o umiarkowanym (14% NaCl) i niskim poziomie zasolenia (2% NaCl) wynosił około 0,5%, natomiast w przypadku wapna o najwyższym poziomie zasolenia wynosił około 1%. Wielokrotnie wyższą liczebność archeonów (56% w całości zbiorowiska mikroorganizmów), w porównaniu z liczebnością bakterii odnotował Pandit i wsp. (2015) w próbkach soli pobranych z indyjskich solnisk Kutch. Do chwili opublikowania prac składających się na omawiane osiągnięcie naukowe, niewiele było w dostępnej literaturze doniesień, w których przedstawiano by te proporcje dla naturalnych środowisk słonych, tym bardziej dla takich, które pod względem właściwości fizycznych przypominają wapno posodowe.

Wykazano, że zasolenie to ważny parametr kształtujący skład badanych zbiorowisk mikroorganizmów, ale bynajmniej nie jedyny. Zarówno w przypadku zbiorowisk bakteryjnych, jak i archeonowych uwodnienie osadów było ważnym czynnikiem, negatywnie skorelowanym z liczbą rodzajów bakteryjnych i archeonowych. Ponadto, wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem jonów wapnia, a liczbą rodzajów bakteryjnych oraz istotną negatywną zależność między stężeniem biogenów, a obserwowaną liczbą rodzajów z domeny *Archaea*.

W przypadku zbiorowisk bakteryjnych zasolenie negatywnie korelowało z obserwowaną liczbą gatunków, wskaźnikiem różnorodności i równocześnie, natomiast w przypadku zbiorowisk archeonowych ze wzrostem zasolenia obserwowano wzrost liczby rodzajów w badanych zbiornikach.

Szczegółowa analiza składu zbiorowisk bakteryjnych i archeonowych na poziomie rodzaju wykazała, że ich struktura była wysoce specyficzna dla danego rodzaju wapna. W wapnie o najniższym stężeniu soli (2%) do najliczniejszych OTU bakteryjnych należały *Marinobacter*, *Idiomarina* oraz *Pseudomonas*, przy czym liczba sekwencji przynależnych dwóm pierwszym rodzajom była istotnie i negatywnie skorelowana z zasoleniem wapna. Wapno o największym stopniu zasolenia charakteryzowało się wysokim udziałem sekwencji z rodzaju *Fodinibius* i *Halomonas*.

Liczba wspólnych OTU dla trzech badanych typów deponowanych osadów wynosiła w przypadku bakterii około 4% ogólnej liczby OTU, natomiast w przypadku archeonów, wspólne OTU stanowiły około 12%. Spośród bakteryjnych licznych OTU we wszystkich typach wapna występował *Halomonas*. Natomiast wśród archeonów licznie reprezentowanymi rodzajami obecnymi we wszystkich próbkach były *Natronomonas*, *Halorubrum*, *Halobellus*, *Halapricum* i *Halolamina*. Liczba sekwencji przypisanych czterem pierwszym wymienionym wyżej archeonom korelowała istotnie i pozytywnie ze stopniem zasolenia osadów.

Ciekawym wynikiem uzyskanym w trakcie badań nad zbiorowiskami archeonów w wapnie o najniższym stopniu zasolenia było stwierdzenie znacznej liczby niesklasyfikowanych do poziomu rodzaju sekwencji przypisanych do *Thermoplasmatales*. Wielu przedstawicieli tego rzędu to organizmy wysoce termofilne i acidofilne, takie jak *Ferroplasma* czy *Picrophilus*, odporne na działanie wysokiej temperatury i skrajnie niskiego odczynu. Z przeprowadzonych szczegółowych badań filogenetycznych wynika, że dwa liczne fylotypy OTU2 i OTU19 w obrębie *Thermoplasmatales* były spokrewnione z *Methanomassiliicoccus liminyensis*, który jest zaliczany do metanogenów i został wyizolowany po raz pierwszy z ludzkich odchodów (Dridi i wsp., 2012). Niskie pokrewieństwo analizowanych sekwencji do *Methanomassiliicoccus liminyensis* (84.34% i 84.64%) pozwala przypuszczać, że wapno posodowe jest miejscem występowania nowego gatunku, a być może również nowej rodziny w obrębie *Thermoplasmatales*.

Z przeprowadzonych badań wynika, że liczba niesklasyfikowanych do poziomu rodzaju sekwencji bakteryjnych i archeonowych była stosunkowo wysoka (40% niesklasyfikowanych sekwencji bakteryjnych w wapnie o najwyższym stopniu zasolenia, 64% sekwencji archeonowych w wapnie o najniższym poziomie zasolenia). Większą liczbę niesklasyfikowanych fylotypów stwierdzono wśród archeonów w porównaniu z bakteriami. Generalnie liczba niesklasyfikowanych, potencjalnie nowych rodzajów archeonów rosta wraz ze spadkiem zasolenia i wynosiła odpowiednio 15%, 26% i aż 64% wśród ogółu pozyskanych w danym typie wapna sekwencji. Pomimo znacznego wzrostu badań nad archeonami, ich różnorodność wciąż w znacznym stopniu pozostaje więc nieodkryta.

Badania przeprowadzone w roku 2017 zaprezentowano na 51. Ogólnopolskiej Konferencji Mikrobiologicznej. Mikrobiologia środowiskowa szansą bezpiecznego życia i postępu biotechnologicznego w Ciechocinku.

### **Chłodne solanki terapeutyczne Kołobrzegu i Połczyzna Zdroju (Kalwasińska i wsp. 2019b)**

Solanki terapeutyczne Kołobrzegu i Połczyzna Zdroju to wody, których właściwości określa Ustawa z dnia 9 czerwca 2011 r. Są to wody chłodne ( $T < 12^{\circ}\text{C}$ ), typu chlorkowo-sodowego, stare, powstałe w odległych epokach geologicznych, pochodzące z infiltracji przed plejstoceńskiej, tj. mającej miejsce ponad 2,58 mln lat, znajdujące się w strefach utrudnionej wymiany wód (Burzyński i wsp., 2004; Krawiec, 2013; Krawiec i wsp., 2000; Krawiec and Dulski, 2004). Ujmowane są z odwiertów sięgających osadów czwartorzędowych, jurajskich i górnego triasu, zakotwiczonych na głębokości od 46 do 1248 m poniżej powierzchni terenu (p.p.t.). Próby do bań pobierano z czterech ujęć kołobrzeskich: Perły (A16), Emilii (6), Bogusława (B2), Anastazji oraz z jednego ujęcia zlokalizowanego w Połczyźnie Zdroju (IG-1) o mineralizacji ogólnej (TDS) wynoszącej kolejno około 0.5%, 5%, 5%, 6% i 7%.

Z przeprowadzonych badań wynika, że liczebność bakterii heterotroficznych, zdolnych do wzrostu w temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$  nie przekraczała 20 jtk/ml, co jest zgodne ze standardami mikrobiologicznymi określającymi jakość wód mineralnych przeznaczonych do spożycia (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 marca 2011 r).

Ogólna liczba mikroorganizmów w badanych wodach wynosiła średnio  $10^3$ - $10^4$  komórek/ml i była podobna do liczebności mikroorganizmów w innych ekosystemach wód podziemnych (Pimenov i wsp., 2012; Lerm i wsp., 2013; Bomberg i wsp., 2015; Walczak i wsp., 2017). W porównaniu do wód o podobnym zasoleniu występujących na powierzchni Ziemi, charakteryzujących się ogólną

liczbą mikroorganizmów w zakresie  $10^6$ – $10^7$  komórek/ml, liczebność ta była stosunkowo niska (Çinar i Mutlu, 2016; Felföldi i wsp., 2016).

Przeprowadzone badania ujawniły, że zbiorowiska bytujące w chłodnych solankach ( $T < 12^\circ\text{C}$ ) Połczyna i Kołobrzegu o wysokim przeważnie poziomie mineralizacji (6-7%) charakteryzowały się niską bioróżnorodnością. Liczba OTU bakteryjnych w wodach z poszczególnych ujęć była bardzo niska i wahała się między 19 a 31, a wskaźnik bioróżnorodności Shannona mieścił się w zakresie od 1,12 do 2,85.

W większości środowisk podziemnych dopływ materii organicznej z powierzchni Ziemi, gdzie ma miejsce intensywna produkcja materii organicznej w wyniku procesu fotosyntezy jest często utrudniony lub uniemożliwiony ze względu na obecność fizycznej bariery w postaci trudno przepuszczalnych lub nieprzepuszczalnych utworów skalnych, co silnie ogranicza rozwój mikroorganizmów, w szczególności heterotrofów (Pan i wsp., 2017; Peter i wsp., 2012). Ze zrozumiałych względów również stężenia tlenu w środowisku podziemnym są bardzo niskie, lub też tlen w nich nie występuje. Dlatego mikroorganizmy bytujące w głębi litosfery to głównie oligotrofy i anaeroby charakteryzujące się w większości chemolitoautotroficznym stylem życia opartym w dużej mierze na redukcji siarczanów lub azotanów (Aüllo i wsp., 2013).

W przypadku Połczyna wody ujmowane z głębokości około 1250 m są izolowane od wód warstw nadległych warstwą utworów ilastych o znacznej miąższości (400 m), która uniemożliwia wymianę tych wód z wodami biorącymi udział we współczesnym obiegu hydrologicznym. Obecność takiej bariery uniemożliwia nie tylko dopływ materii organicznej, czy tlenu rozpuszczonego, ale również zapobiega migracji mikroorganizmów z wyżej położonych warstw wodonośnych, uczestniczących we współczesnym obiegu hydrologicznym, co przekłada się na niską różnorodność biologiczną. W przypadku wód kołobrzeskich, o izolacji wód ujmowanych z różnych głębokości wnioskować można na podstawie wyników badań izotopowych, składu gazów szlachetnych, a także po części z faktu, że wszystkie te wody to wody artezyjskie, posiadające nieprzepuszczalne warstwy skalne w swoim stropie (Burzyński i wsp., 2004; Krawiec, 2013; Krawiec i wsp., 2000; Krawiec i Dulski, 2004).

Zbiorowiska bakteryjne badanych wód mineralnych były zdominowane przez sekwencje należące do typu *Proteobacteria* (klasa *Deltaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria*). Stosunkowo licznie występowały też *Firmicutes* (*Bacilli*) i *Actinobacteria* (*Actinobacteria*). W wodach z najgłębszych ujęć (Połczyn 1248 m; Anastazja 354 m) istotnym, pod względem liczby sekwencji, składnikiem zbiorowisk były *Spirochaete*.

Badania wykazały, że mineralizacja wód, szczególnie stężenia jonów chlorkowych, sodowych i magnezowych warunkowały określony skład taksonomiczny zbiorowisk bakteryjnych występujących w wodach Połczyna i Kołobrzegu. Biorąc pod uwagę stężenia jonów chlorkowych i sodowych odpowiednio w zakresie 0,7–42 i 0,5–24 g/l mikroorganizmy w wodach Kołobrzegu i Połczyna Zdroju powinny być rozpatrywane jako umiarkowane halofile, rosnące optymalnie w zakresie od 3% do 15% NaCl, lub słabe halofile, które nie wymagają zasolenia do swojego wzrostu, ale potrafiące rosnąć nawet przy wysokich stężeniach NaCl (Oren, 2008). Analiza składu taksonomicznego zbiorowisk bakteryjnych tych wód rzeczywiście to potwierdziła.

Innym istotnym parametrem fizyko-chemicznym wpływającym na strukturę zbiorowisk bakteryjnych były azotany. Liczebność względna sekwencji należących do potencjalnych denitryfikatorów, takich jak: *Pelomonas*, *Halomonas* i *Sphingopyxis* w próbie wody pochodzącej z ujęcia Perła A16 korespondowała ze zwiększonym stężeniem tych związków.

Głębokie i wysoko zmineralizowane wody z ujęcia Połczyn IG1 i Anastazja były najmniej zróżnicowane pod względem taksonomicznym i były najbardziej zdominowane przez przedstawicieli *Deltaproteobacteria* (głównie *Desulfovibrio*, w mniejszym stopniu *Desulfotignum*) w porównaniu do innych wód. Do innych, licznych rodzajów wykrytych w wodach mineralnych Kołobrzegu i Połczyna Zdroju należały *Halomonas*, *Idiomarina*, *Pseudomonas* i *Acinetobacter*. Te same rodzaje bakteryjne stwierdzono też w wodach leczniczych na terenie Niemiec przez Beyer i wsp., (2015; 2016). Jednakże struktura zbiorowisk bakteryjnych na poziomie typu była tam odmienna i charakteryzowała się przewagą *Actinobacteria* nad *Proteobacteria*.

Analizując skład zbiorowiska bakteryjnych badanych wód na poziomie rodzaju, można było stwierdzić, że były one niezwykle specyficzne dla danego ujęcia. Nawet w próbach pochodzących z osadów z tego samego okresu geologicznego, jak w przypadku wód z ujęć Anastazja i Bogusław (Dolna Jura), charakteryzujących się podobną mineralizacją ogólną (około 6%), ale ujmowanych z różnych utworów skalnych (odpowiednio gliny/muły oraz piaskowce/piaski) zidentyfikowano tylko jedno OTU wspólne. Można zatem stwierdzić, że określone i bardzo specyficzne dla danego stanowiska parametry fizyko-chemiczne ośrodka skalnego są odpowiedzialne za skład zbiorowisk bakteryjnych w ekosystemach podziemnych.

Zgodnie z oczekiwaniami stwierdzono istotną i negatywną zależność pomiędzy stężeniem tlenu rozpuszczonego a wskaźnikiem różnorodności biologicznej Shannona. Bakterie potencjalnie zaangażowane w redukcję siarczanów występowały we wszystkich analizowanych wodach i były zróżnicowane pod względem taksonomicznym. Należały one do sześciu rzędów (*Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales*, *Desulfarculales*, *Syntrophobacterales* w obrębie *Deltaproteobacteria*; *Peptococcaceae* w obrębie *Clostridiales*) i dziesięciu rodzajów (*Desulfovibrio*, *Desulfotignum*, *Desulfopila*, *Desulfocurvus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfofustis*, *Desulfuromuga*, *Desulfarculus*, *Desulfococcus* i *Desulfobacca*). Bakterie redukujące siarczany to organizmy powszechnie występujących w środowisku podziemnym (van Nostrand i wsp., 2009; Allen i wsp., 2008). W badanych wodach udział sekwencji przynależnych do tej grupy mikroorganizmów był istotnie i pozytywnie skorelowany z mineralizacją ogólną, stężeniem jonów wapnia i bromu i negatywnie skorelowany z zawartością azotanów.

Sekwencje archeonowe wykryto jedynie w wodzie ujmowanej z ujęcia GT-1 w Połczynie. Stwierdzone sekwencje należały do typu *Euryarchaeota*, klasy *Methanobacteria* i były zdominowane przez tylko jedno OTU zaklasyfikowane do *Methanobacterium*. Wykrycie sekwencji archeonowych tylko w jednej spośród pięciu badanych stanowisk potwierdziło przypuszczenie o niewielkim udziale archeonów w strukturze zbiorowisk mikroorganizmów wód podziemnych, wysnute na podstawie wcześniej prowadzonych badań dotyczących solanki zasilającej tężnie ciechocińskie (Kalwasińska i wsp., 2018). Założenie to zostało zweryfikowane i potwierdzone w kolejnych badaniach, w których również brałam udział (Deja-Sikora i wsp., 2019). We wszystkich wodach siarczkowych rejonu Buska-Zdroju wykryto sekwencje archeonów, ale ich udział w całości zbiorowiska mikroorganizmów był nieznaczący i nie przekraczał 0.5%.

Z przeprowadzonych badań wynika, że różnorodność mikroorganizmów hodowalnych w badanych wodach była niewielka. Podobnie jak w wapnie z produkcji sody i soli dominowały mikroorganizmy z rodzaju *Bacillus*, a najczęściej izolowanym gatunkiem był *B. simplex*. Przedstawiciele tego gatunku byli izolowani z różnych skrajnych środowisk, w tym siedlisk silnie oligotroficznych jak np. skały granitowe (Fajardo-Cavazos i Nicholson, 2006), czy próby powietrza pobranego ze stratosfery na wysokości ponad 4 000 m (Wainwright i wsp., 2003), co może w

pewnym stopniu odzwierciedlać ekstremalność badanego przez nas środowiska. Z drugiej strony *B. simplex* i *B. aryabhatai* były też izolowane z bogatych w związki organiczne gleb zanieczyszczonych węglowodorami pochodzącymi z przeróbki ropy naftowej i, co ciekawe, podobnie jak pozyskane izolaty *Diezia psychralkaliphila*, wykazały się zdolnością do remediacji gleb skażonych produktami przerobu ropy naftowej (Yumoto i wsp., 2002).

Badania dotyczące bioróżnorodności mikroorganizmów w wodach terapeutycznych Kołobrzegu i Połczyna Zdroju zaprezentowano na IX Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikrobiologicznej, Hydromicro 2017 w Olsztynie.

### **Solanki termalne Pyrzyc i Stargardu Szczecińskiego (Kalwasińska i wsp., 2020)**

Solanki termalne Pyrzyc i Stargardu Szczecińskiego to wody gorące, wysoko zmineralizowane (TDS około 12 i 14%), ujmowane z głębokości około 1,6 i 2,6 km p.p.t., których temperatura w złożu wynosi odpowiednio 67°C i 95°C. Podobne jak solanki Kołobrzegu i Połczyna, są to wody stare pochodzące z infiltracji przed plejstoceńskiej, znajdujące się w strefie utrudnionej wymiany, co pozwala zaliczyć je do zasobów nieodnawialnych, o długim czasie przebywania w ośrodku skalnym, który stanowią piaskowce dolnej jury. Próby do badań pobierano z dwóch odwiertów produkcyjnych (GT1 w Pyrzycach oraz GT2 w Stargardzie), eksploatujących solankę ze złoża i transportujących ją do naziemnej części instalacji, w której odbywa się odbiór geotermalnego ciepła.

Z przeprowadzonych badań wynika, że ogólna liczba mikroorganizmów w badanych wodach termalnych, kształtująca się na poziomie  $10^4$  komórek/ml, była podobna do ogólnej liczby mikroorganizmów występujących w chłodnych i mniej zasolonych wodach Kołobrzegu i Połczyna Zdroju.

Na podobnym poziomie,  $10^1$ - $10^2$  CFU/ml, prezentowała się również liczebność mikroorganizmów heterotroficznych, z tym, że w przypadku wód geotermalnych były to organizmy formujące kolonie w temperaturze 60°C, natomiast w przypadku wód chłodnych były to organizmy zdolne do wzrostu w temperaturze 20°C.

Liczba OTU bakteryjnych (średnio od 10 do 27), a także indeks bioróżnorodności Shannon'a (1,53 do 2,50) wyliczone dla solanek termalnych, charakteryzowały się podobnymi wartościami do wartości otrzymanych dla wód Kołobrzegu i Połczyna Zdroju.

Różnice między zbiorowiskami mikroorganizmów wód chłodnych i termalnych ujawniły się na poziomie struktury zbiorowisk. W obydwu typach wód dominowały sekwencje przynależne do *Proteobacteria* oraz *Firmicutes*. O ile, udział *Proteobacteria* w solankach Kołobrzegu i Połczyna był podobny do solanek termalnych (48-89% v 54-70%), o tyle udział *Firmicutes* był wyższy w solankach termalnych (22-46% v 0.8-23%). Jest to zrozumiałe z tego względu, że wśród *Firmicutes* znajdują się mikroorganizmy zdolne do tworzenia przetrwalników (EFF, ang. *endospore forming Firmicutes*), które umożliwiają przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych, takich jak m.in. wysoka temperatura, oligotrofia, wysokie ciśnienie, czy niska aktywność wody.

Wysoki odsetek EFF w wodach Stargardu i Pyrzyc wynoszący odpowiednio 10 i 25% jest zgodny z wnioskami wyciągniętymi przez Filippidou i wsp., (2016). Autorzy postulowali, że wspólnie działające czynniki powodujące selekcję mikroorganizmów sprzyjają wysokiemu udziałowi EFF w zbiorowisku, który zawdzięczają zarówno możliwości sporulacji, jak i dodatkowym mechanizmom zwiększającym szansę na przeżycie t.j. chemotaksja, ruchliwość, zdolność tworzenia biofilmu, pobieranie DNA, ruchliwość oraz plastyczność metaboliczna.

W takim kontekście, fakt występowania organizmów potencjalnie zdolnych do wytwarzania przetrwalników takich jak "*Candidatus Desulforudis*", *Desulfotomaculum* oraz trzy niesklasyfikowane do poziomu rodzaju OTU przynależne do *Clostridia*, zarówno w wodach Pырzyc, jak i Stargardu, (wspólne OTU) jest w pełni zrozumiałe. Dlatego też postulujemy, że organizmy te mogą być częścią składową bardzo starego zbiorowiska mikroorganizmów, które bytowało w poprzednich epokach geologicznych. Z badań przeprowadzonych m.in. przez Vreeland i wsp., (2000) wynika, że mikroorganizmy zdolne do produkcji spor mogą przetrwać miliony lat.

Wśród sekwencji bakteryjnych w solankach Pырzyc dominowały sekwencje przypisane do *Halothiobacillus* (54%), natomiast w Stargardzie największym udziałem wśród ogółu pozyskanych sekwencji bakteryjnych charakteryzował się rodzaj *Methylobacterium* (35%). Mimo iż sekwencje przynależne do tych rodzajów bakteryjnych identyfikowano już w słonych środowiskach podziemnych, w tym hydrotermalnych (Sievert i wsp., 2000; Urschel i wsp., 2015; Pimenov i wsp., 2012; Johnson i wsp., 2003), to jednak nie pozyskano jeszcze izolatów, których właściwości fizjologiczne pozwalałyby zaliczyć je do organizmów termofilnych. Biorąc jednak pod uwagę liczną reprezentację odczytów przynależnych do *Halothiobacillus* oraz *Methylobacterium* w badanych wodach, możemy przypuszczać, że zarówno wśród przedstawicieli *Halothiobacillus*, jak i *Methylobacterium*, znajdują się organizmy zaadaptowane do wysokiej temperatury (termofile lub termotoleranty).

Z analizy potencjału metabolicznego zakodowanego w znanych genomach przedstawicieli *Halothiobacillus* i *Methylobacterium* wynika, że zawierają one geny odpowiedzialne za utlenianie związków siarki (tiosiarczanu do siarczanów). Pozwala to wnioskować, że dominujące rodzaje bakteryjne występujące w badanych solankach uczestniczą w obiegu tego pierwiastka w przyrodzie.

W odróżnieniu od wód Kołobrzegu i Połczyna Zdroju, dominujące w strukturze zbiorowiska bakteryjnego solanek Pырzyc i Stargardu były organizmy utleniające związki siarki, a nie organizmy zdolne do redukcji siarczanów. Jest to zgodne z obserwacjami przeprowadzonymi przez Schwermer i wsp., (2010) oraz zgodne z modelem zaproponowanym przez Lau i wsp., (2016). W warunkach wysokiego stężenia azotanów (powyżej 0.8 mM, które ma miejsce w solankach Pырzyc i Stargardu) obserwowano bowiem wzrost tendencji do redukcji tych związków połączony z utlenianiem związków siarki, co jest energetycznie korzystniejsze dla prowadzących te procesy mikroorganizmów, niż pozyskiwanie energii z redukcji siarczanów. Negatywna zależność pomiędzy udziałem bakterii redukujących siarczany a stężeniem azotanów, które odnotowano podczas badania mikrobiomu wód Kołobrzegu i Połczyna Zdroju potwierdza obserwowaną tutaj tendencję.

Spośród organizmów potencjalnie zdolnych do redukcji związków siarki w wodach termalnych Stargardu i Pырzyc najliczniej występowały "*Candidatus Desulforudis*" oraz *Desulfotomaculum*. Z przeprowadzonych badań filogenetycznych wynika, że najbliższe spokrewnione z nimi fylotypy pozyskano ze środowisk geotermalnych, odpowiednio z odwiertów na dnie Oceanu Spokojnego oraz z wysoko temperaturowego zbiornika ropy naftowej w Chinach. Z kolei najbliższe spokrewnione z *Halothiobacillus* oraz *Methylobacterium* sekwencje pozyskano odpowiednio z osadów dennych hiperstłonego jeziora Kasin w Rosji (Emmerich i wsp., 2012) oraz z osadów związanych ze środowiskiem wód głębinowych w Finlandii.

Odsetek niesklasyfikowanych do poziomu rodzaju odczytów bakteryjnych w solankach Pырzyc i Stargardu był znacząco wyższy niż w wodach Kołobrzegu i Połczyna i wynosił

odpowiednio 39% i 7%. Świadczy to o wyższym udziale nowych gatunków w badanych solankach termalnych w porównaniu do solanek chłodnych.

Podobnie jak przypadku chłodnych solanek Kołobrzegu i Połczyna Zdroju, tak i w przypadku solanek geotermalnych Pyrzyc i Stargardu stwierdzono tylko jedno OTU przypisane do domeny *Archaea*, co potwierdza niewielki udział przedstawicieli tej domeny w solankach podziemnych. Stwierdzone sekwencje, niesklasyfikowane na poziomie rodzaju i rodziny należały do rzędu *Thermoplasmatales* w obrębie typu *Thermoplasmata* (SILVA, v 138). Najbliżej spokrewnione z nimi sekwencje pozyskano z innych słonych i gorących środowisk, takich jak pustynia sodowa Kutch w Indiach, umiarkowana słona gleba w Chinach oraz wody podziemne w stanie Illinois, USA. Podobnie też, jak w przypadku sekwencji należących do *Thermoplasmata* występujących w wapnie posodowym, najbliższym spokrewnionym szczepem referencyjnym był *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 zdolny do produkcji metanu w wyniku redukcji metanolu (Dridi i wsp., 2012).

Analizując skład gatunkowy izolatów pozyskanych z solanek termalnych, zdolnych do wzrostu w temperaturze 60°C na podłożu zawierającym związki organiczne t.j. pepton i ekstrakt drożdżowy okazało się, że były to organizmy należące w większości do jednego tylko gatunku *Bacillus paralicheniformis*.

Badania właściwości fizjologiczno-biochemicznych oraz szczegółowe analizy genomu jednego z przedstawicieli *B. paralicheniformis* – szczepu TS6 ujawniły, że badany szczep prezentuje odrębny, nowy podgatunek. Biorąc pod uwagę jego wysokie optimum temperaturowe wynoszące 50°C, wysoki wskaźnik adaptacji temperaturowej oraz niski stosunek zawartości kwasów tłuszczowych antero- do iso - C<sub>15:0</sub> obecnych w błonach komórkowych, badany szczep można zaliczyć do grupy termofilnych/wysoce termotolerancyjnych organizmów, takich jak *Geobacillus stearothermophilus* i *Bacillus badius* (Diomandé i wsp., 2015). Inne cechy fizjologiczne odróżniające *B. paralicheniformis* TS6 od najbliższego spokrewnionego szczepu referencyjnego KJ-16 to m.in. brak możliwości syntezy ureazy, zdolność asymilacji D-galaktozy, *myo*-inozytolu oraz kwasu D-galakturonowego, a także podatność na kwas nalidyksowy.

Szczegółowe analizy porównujące potencjał genetyczny szczepu TS6 z najbliższym spokrewnionym szczepem KJ-16, pozyskany z fermentowanych nasion soi o dużej zawartości soli wykazały, że szczep TS6 zawiera więcej genów związanych z metabolizmem zarówno prostych związków, takich jak metan czy aminokwasy, jak i złożonych substancji organicznych, takich jak skrobia i pektyny, a także więcej genów związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych. Zawiera też geny związane z detoksykacją środowiska, uczestniczące w rozkładzie formaldehydu, którego synteza w środowisku podziemnym odbywa się przy udziale względnie beztlenowych i tlenowych mikroorganizmów metylotoficznych, wykorzystujących metanol jako podstawowe źródło węgla.

Dodatkowe geny obecne w genomie *B. paralicheniformis* TS6 są najprawdopodobniej związane ze zwiększonym potencjałem metabolicznym komórek, które w wysoc specyficznych warunkach środowiska podziemnego są zmuszone efektywnie wykorzystywać wszystkie dostępne substancje odżywcze oraz chronić się przed działaniem związków toksycznych.

Pozyskane przez nas szczepy bakteryjne, o szerokim potencjalnie genetycznym, które dodatkowo są stosunkowo łatwe w hodowli, rosnące w warunkach mikroaerofilnych, odporne na wysokie zasolenie i wymagające niewielkich tylko stężeń związków organicznych stanowią obiecujące źródło substancji biologicznie czynnych oraz ciekawy obiekt dalszych badań nad ich metabolizmem, przystosowaniami do skrajnych warunków środowiskowych oraz praktycznym wykorzystaniem w biotechnologii.

Badania dotyczące bioróżnorodności mikroorganizmów w wodach termalnych Pyrzyc i Stargardu Szczecińskiego zaprezentowano na X Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikrobiologicznej w 2019 r. w Toruniu.

#### Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań

1. Przeprowadzone badania dostarczyły unikalnych danych dotyczących liczebności, bioróżnorodności oraz wpływu czynników fizykochemicznych na skład zbiorowisk mikroorganizmów w trzech ekstremalnych środowiskach: wapnie posodowym, a także w chłodnych oraz w gorących wodach głębinowych znajdujących się w strefach utrudnionej wymiany wód oraz pozwoliły zweryfikować postawione hipotezy badawcze.
2. Udowodniono, że **zasolenie to ważny czynnik ekologiczny, kształtujący skład zbiorowisk mikroorganizmów we wszystkich badanych ekosystemach**. Dodatkowo wykazano, że inne czynniki środowiskowe, takie jak uwodnienie wapna, zawartość niektórych jonów (magnezu i wapnia), temperatura, pH, stężenia biogenów, w tym azotanów, oraz zawartość tlenu rozpuszczonego wywierały istotny wpływ na strukturę badanych zbiorowisk. Przy czym obserwowana struktura zbiorowisk mikroorganizmów danego siedliska była wypadkową działania często różnych parametrów fizyko-chemicznych.
3. **W wapnie posodowym liczba rodzajów bakteryjnych oraz wskaźnik bioróżnorodności Shannona był skorelowany negatywnie ze stopniem zasolenia środowiska, natomiast w przypadku zbiorowisk archeonowych ze wzrostem zasolenia obserwowano wzrost liczby obserwowanych OTU.**
4. Poznanie potencjału enzymatycznego alkalohalofilnych szczepów bakteryjnych wyizolowanych z wapna posodowego, a w szczególności dokładne analizy biochemiczne proteazy pozyskanej z *Bacillus luteus* H11 dowiodły, że **mikroorganizmy występujące w tym ekstremalnym środowisku stanowią ważne źródło enzymów o potencjalnym biotechnologicznym zastosowaniu.**
5. Przeprowadzone badania dostarczyły niezwykle ciekawych informacji dotyczących archeonów. W porównaniu do niektórych środowisk hipersłonnych, w których zbiorowiska mikroorganizmów były zdominowane przez przedstawicieli domeny *Archaea*, udział archeonów w silnie alkalicznym i zasolonym środowisku wapna z produkcji sody i soli nie przekraczał kilku procent. **Przyczyn marginalnego udziału przedstawicieli tej domeny życia wśród ogółu mikroorganizmów można upatrywać m.in. w występowaniu dodatkowych czynników fizyko-chemicznych powodujących selekcję organizmów, takich, jak silnie alkaliczny odczyn oraz niższa temperatura, w porównaniu do warunków panujących w salterniach i pustyniach solnych.**
6. Rosnący wraz ze spadkiem zasolenia wapna odsetek niesklasyfikowanych do poziomu rodzaju sekwencji archeonowych wskazuje, że o ile wiedza dotycząca taksonomii archeonów środowisk słonych została w stosunkowo dużym stopniu odkryta, o tyle **archeony środowisk alkalicznych o niewielkim stopniu zasolenia są w niewielkim tylko zakresie poznane.**
7. **Badania dotyczące mikroorganizmów obecnych w solankach głębinowych Kołobrzegu i Połczyna Zdroju potwierdziły negatywny wpływ istnienia barier na bioróżnorodność organizmów.**
8. **Badania dotyczące solanek termalnych dostarczyły nowych informacji dotyczących adaptacji termicznych mikroorganizmów, takich jak *Bacillus paralicheniformis*, *Halothiobacillus* oraz *Methylobacterium*.**

9. Wykazano, że **sekwencje przypisane domenie *Archaea* w „starych” wodach infiltracyjnych stanowią mało liczny komponent zbiorowiska mikroorganizmów.**
10. **Wszystkie badane ekosystemy, a w szczególności wapno posodowe i solanki termalne to potencjalne siedliska nowych mikroorganizmów, dotychczas nieznanymi nauce. Prawdopodobieństwo rozpoznania nowych związków biologicznie czynnych i nowych szlaków metabolicznych jest więc w tych środowiskach wysokie i daje podstawę do przedsięwzięcia dalszych, szczegółowych badań.**

## Literatura

- Allen TD, Kraus PF, Lawson PA, Drake GR, Balkwill DL, Tanner RS. 2008. *Desulfovibrio carbinoliphilus* sp. nov., a benzyl alcohol-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from a gas condensate- contaminated aquifer. *Int J Syst Evol Micro* 58(6):1313–1317.
- Amouric A, Liebgott PP, Joseph M, Brochier-Armanet C, Lorquin J. 2014. *Halomonas olivaria* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from olive-processing effluents. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:46–54.
- Aüllo T, Ranchou-Peyruse A, Ollivier B, Magot M. 2013. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Front Microbiol* 4: 362.
- Bar-On, Yinon M.; Phillips, Rob; Milo, Ron (19 June 2018). "The biomass distribution on Earth". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115 (25): 6506–6511.
- Beyer A, Burow K, Buchel G, Erika Kothe E. 2016. Bacterial communities in marine salt evaporate rocks and Pristine Zechstein Aquifers. *Geomicrobiol J* 33(9):774–778.
- Beyer A, Rzanny M, Weist A, Moller S, Burow K, Gutmann F, Neumann S, Lindner J, Musse S, Brangsch H, i wsp. 2015. Aquifer community structure in dependence of lithostratigraphy in groundwater reservoirs. *Environ Sci Pollut Res Int* 22(24):19342–19351.
- Bomberg M, Nyyssonen M, Pitkänen P, Lehtinen A, Itävaara M. 2015. Active microbial communities inhabit sulphate-methane interphase in deep bedrock fracture fluids in Olkiluoto, Finland. *Biomed Res Int* 2015:979530.
- Bowers KJ, Mesbah NM, Wiegel J. 2009. Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems* 5: 9.
- Burzyński K, Krawiec A, Sadurski A. 2004. The origin and mobilization of deep brines of the aquifer system by considering the circulation systems existing on the polish western coast of the Baltic Sea. In: Aragus L, Custodio E, Manzano M (Eds). *Groundwater and saline intrusion. Selected papers from the 18<sup>th</sup> Salt Water Intrusion Meeting*. Madrid: Instituto Geologico y Minero de Espana; pp. 521–530.
- Canfora L, Bacci G, Pinzari F, Lo Papa G, Dazzi C, Benedetti A. 2014. Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? *PLoS One* 9, e106662.
- Çınar S, Mutlu MB. 2016. Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles* 20:589–601.
- Dalmaso GZ, Ferreira D, Vermelho AB. 2015. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Mar Drugs* 13(4):1925-65.
- Das S, Dash HR. 2018. *Microbial diversity in the genomic era*. Elsevier Science, Academic Press, London, UK
- DasSarma S, DasSarma P, Laye VJ, Schwieterman EW. 2019. Extremophilic models for astrobiology: haloarchaeal survival strategies and pigments for remote sensing. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01126-3>.
- de León-Lorenzana AS, Delgado-Balbuena L, Domínguez-Mendoza C, Yendi E, Navarro-Noya YE, Luna-Guido M, Dendooven L. 2017. Reducing salinity by flooding an extremely alkaline and saline soil changes the bacterial community but its effect on the archaeal community is limited. *Front Microbiol* 8:466.
- Deja-Sikora E, Gołębiewski M, Kalwasińska A, Krawiec A, Kosobucki P, Walczak M. 2019. Comamonadaceae OTU as a Remnant of an Ancient Microbial Community in Sulfidic Waters. *Microb Ecol* 78(1):85-101.
- Dhal PK, Sar P. 2014. Microbial communities in uranium mine tailings and mine water sediment from Jaduguda Umine, India: a culture independent analysis. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 49:694–709.
- Diomandé SE, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. 2015. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front Microbiol* 6:813.
- Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human feces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1902–1907.
- Durvasula R, Rao DVS. 2018. *Extremophiles: from Biology to Biotechnology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Emmerich M, Bhansali A, Lösekann-Behrens T, Schröder C, Kappler A, Behrens S. 2012. Abundance, distribution, and activity of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing microorganisms in hypersaline sediments of Lake Kasin, southern Russia. *Appl Environ Microbiol* 78(12):4386-99.

- Fajardo-Cavazos P, Nicholson W. 2006. *Bacillus* endospores isolated from granite: close molecular relationships to globally distributed *Bacillus* spp. from endolithic and extreme environments. *Appl Environ Microbiol* 72(4):2856–2863.
- Felföldi T, Ramganes S, Somogyi B, Krett G, Jurecska L, Szabó A, Vörös L, Márialigeti K, Máthé I. 2016. Winter planktonic microbial communities in highland aquatic habitats. *Geomicrobiol J* 33(6):494–504.
- Filippidou S, Wunderlin T, Junier T, Jeanneret N, Dorador C, Molina V, Johnson DR, Junier P. 2016. A combination of extreme environmental conditions favor the prevalence of endospore-forming firmicutes. *Front Microbiol* 7:1707.
- Gavrilov SN, Korzhenkov AA, Kublanov IV, Bargiela R, Zamana LV, Popova AA, Toshchakov SV, Golyshin PN, Golyshina OV. 2019. Microbial communities of polymetallic deposits Acidic ecosystems of continental climatic zone with high temperature contrasts. *Front Microbiol.* 17; 10:1573.
- Gerday C, Glansdorff N. 2007. *Physiology and biochemistry of extremophiles*, 1st Edition. ASM Press, Washington DC, USA.
- German CR, Ramirez-Llodra E, Baker MC, Tyler PA; ChEss Scientific Steering Committee. 2011. Deep-water chemosynthetic ecosystem research during the census of marine life decade and beyond: a proposed deep-ocean road map. *PLoS One.* 6(8):e23259.
- Gomariz M, Martínez-García M, Santos F, Rodríguez F, Capella-Gutiérrez S, Gabaldón T, Rosselló-Móra R, Meseguer I, Antón J. 2015. From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic Bacteroidetes generalists. *ISME J* 9:16–31.
- Grant WD, Jones BE. 2016. Bacteria, archaea and viruses of Soda Lakes. In: Schagerl M. (Ed.), *Soda Lakes of East Africa*. Springer, Switzerland, pp. 97–149.
- GVR, Grand View Research 2019 a. Enzymes market size, share & Trends analysis report by product (carbohydrases, proteases, lipases), by Application (industrial, specialty), by end use, by region, and segment forecasts, 2019 – 2025. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>
- GVR, Grand View Research 2019 b. Antibiotics market size, share & Trends analysis report by action mechanism (protein, DNA, RNA, cell wall synthesis inhibitors), by drug class (penicillin, cephalosporins, fluoroquinolones), and segment forecasts, 2019 – 2026. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/antibiotic-market>
- Haferburg G, Gröning JAD, Schmidt N, Kummer NA, Erquicia JC, Schlömann M. 2017. Microbial diversity of the hypersaline and lithium-rich Salar de Uyuni, Bolivia. *Microbiol Res* 199:19–28.
- Han R, Zhang X, Liu J, Long Q, Chen L, Liu D, Zhu D. 2017. Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke Salt Lake environments. *Can J Microbiol* 63:895–908.
- Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, Gentry TJ. 2010. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME J.* 4:829–838.
- Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:735–750.
- Johnson DB, Okibe N, Roberto FF. 2003. Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics. *Arch Microbiol* 180(1):60-68.
- Kalwasińska A, Felföldi T, Walczak M, Kosobucki P. 2015. Physiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline distillery lime. *Polish J Microbiol* 64(4):369–377.
- Kalwasińska A, Felföldi T, Szabó A, Deja-Sikora E, Kosobucki P, Walczak M. 2017. Microbial communities associated with the anthropogenic, highly alkaline environment of a saline soda lime, Poland. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110(7):945-962.
- Kalwasińska A, Jankiewicz U, Felföldi T, Burkowska-But A, Swiontek Brzezinska M. 2018a. Alkaline and halophilic protease production by *Bacillus luteus* H11 and its potential industrial applications. *Food Technol Biotechnol* 56(4):553-561.
- Kalwasińska A, Deja-Sikora E, Burkowska-But A, Szabó A, Felföldi T, Kosobucki P, Krawiec A, Walczak M. 2018b. Changes in bacterial and archaeal communities during the concentration of brine at the graduation towers in Ciechocinek spa (Poland). *Extremophiles* 22(2):233-246.
- Kalwasińska A, Deja-Sikora E, Szabó A, Felföldi T, Kosobucki P, Swiontek Brzezinska M, Walczak M. 2019a. Salino-alkaline lime of anthropogenic origin a reservoir of diverse microbial communities. *Sci Total Environ* 655:842-854.
- Kalwasińska A, Deja-Sikora E, Szabó A, Krawiec Arkadiusz, Felföldi T, Swiontek Brzezinska M, Walczak M. 2019b. Microbial communities of low temperature, saline groundwater used for therapeutical purposes in North Poland. *Geomicrobiol J* 36(3):212-223.
- Krawiec A, Dulski K. 2004. Therapeutical waters in Połczyn Zdroj. *Prz Geol* 52(2):147–150.
- Krawiec A, Rubel A, Sadurski A, Weise SM, Zuber A. 2000. Preliminary hydrochemical isotope, and noble gas investigations of the origin of salinity in coastal aquifers of Western Pomerania, Poland. In: Sadurski A, editor. *Hydrogeology of the coastal aquifers. Proceedings of the 16th Salt Water Intrusion Meeting MieRdzyzdrojeWolin Island*. Torun: Nicolaus Copernicus University 80; p87–94.
- Krawiec A. 2013. Pochodzenie anomalii chlorkowych w wodach podziemnych polskiego wybrzeża Bałtyku. Toruń, Wydawnictwo Naukowe UMK.
- Lau MCY, Kieftb T, Kuloyoc O, Linage-Alvarezc B, van Heerden E, Lindsaya MR, Magnaboscoa C, Wang W, Wiggins WJ,

- Guo L, Perlman DH, Kyne S, Shwe HH, Harris RL, Oh Y, Yi MJ, Purtschert R, Slater GF, Ono S, Wei S, Lik L, Lollar BS, Onstot TC. 2016. An oligotrophic deep-subsurface community dependent on syntrophy is dominated by sulfur-driven autotrophic denitrifiers. *P Natl Acad Sci USA* 113:E7927–E7936.
- Lerm S, Westphal A, Miethling-Graff R, Alawi M, Seibt A, Wolfram M, Wurdemann H. 2013. Thermal effects on microbial composition and microbiologically induced corrosion and mineral precipitation affecting operation of a geothermal plant in a deep saline aquifer. *Extremophiles* 17(2):311–327
- Máthé I, Borsodi AK, Tóth EM, Felföldi T, Jurecska L, Krett G, Kelemen Z, Elekes E, Barkács K, Márialigeti K. 2014. Vertical physico-chemical gradients with distinct microbial communities in the hypersaline and heliothermal Lake Ursu (Sovata Romania). *Extremophiles* 18:501–514.
- Mykytczuk NCS., Foote SJ, Omelon CR, Southam G, Greer CW, Whyte LG. 2013. Bacterial growth at  $-15^{\circ}\text{C}$ ; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1. *ISME J* 7:1211–1226.
- Navarro-Noya YE, Valenzuela-Encinas C, Sandoval-Yuriar A, Jiménez-Bueno NG, Marsch R, Dendooven L. 2015. Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea* 13:646820.
- Nielsen P, Fritze D, Priest EG. 1995. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiol* 141:1745–1761.
- Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst* 4:2.
- Pan D, Nolan J, Williams KH, Robbins MJ, Weber KA1. 2017. Abundance and distribution of microbial cells and viruses in an alluvial aquifer. *Front Microbiol* 8:1199.
- Pandit AS, Joshi MN, Bhargava P, Shaikh I, Ayachit GN, Raj SR, Saxena AK, Bagatharia SB. 2015. A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the world. *Extremophiles* 19:973–987.
- Peter S, Koetzsch S, Traber J, Bernasconi SM, Wehrli B, Durisch Kaiser E. 2012. Intensified organic carbon dynamics in the ground water of a restored riparian zone. *Freshwater Biol* 57(8):1603–1616.
- Pimenov NV, Kuranov GV, Bryukhanov AL, Veslopolova EF, Koryukina IP, Maslov YN. 2012. The sulfate-reducing bacterial community of sulfide-rich water of the Ust'-Kachka resort spring, Perm Krai, Russia. *Microbiol* 81(6):721–726.
- Polyanskaya LM, Pinchuk IP, Zvyagintsev DG, 2015. Assessment of the number, biomass, and cell size of bacteria in different soils using the "cascade" filtration method. *Eurasian Soil Sci.* 48:28.
- Romano I, Nicolaus B, Lama L, Manca MC, Gambacorta M. 1996. Characterization of a haloalkaliphilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. *Syst Appl Microbiol* 19: 326–333.
- Santini TC, Warren LA, Kendra KE. 2015. Microbial diversity in engineered haloalkaline environments shaped by shared geochemical drivers observed in natural analogues. *Appl Environ Microbiol* 81:5026–5036.
- Schloss PD, Girard RA, Martin T, Edwards J, Thrash JC. 2016. Status of the archaeal and bacterial census: an update. *MBio* 7(3):e00201–e00216.
- Schulze-Makuch D, Schulze-Makuch A, Houtkooper JM. 2015. The physical, chemical and physiological limits of life. *Life* 5:1472–1486.
- Schwermer CU, Ferdelman TG, Stief P, Gieseke A, Rezakhani N, van Rijn J, De Beer D, Schramm A. 2010. Effect of nitrate on sulfur transformations in sulfidogenic sludge of a marine aquaculture biofilter. *FEMS Microbiol Ecol* 72(3):476–84.
- Sievert SM, Heidorn T, Kuever J. 2000. *Halothiobacillus kellyi* sp nov, a mesophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from a shallow-water hydrothermal vent in the Aegean Sea, and emended description of the genus *Halothiobacillus*. *Int J Syst Evol Micr* 50(3):1229–37.
- Tiago I, Pires C, Mendes V, Morais PV, da Costa M, Verissimo A. 2006. *Microcella putealis* gen. nov., sp. nov., a Grampositive alkaliphilic bacterium isolated from a nonsaline alkaline groundwater. *Syst Appl Microbiol* 28:479–487.
- Ustawa z dnia 9 czerwca 2011 r. Prawo geologiczne i górnicze (Dz.U. 2011 nr 163, poz. 981)
- Urschel MR, Kubo MD, Hoehler TM, Peters JW, Boyd ES. 2015. Carbon source preference in chemosynthetic hot spring communities. *Appl Environ Microbiol* 81(11):3834–47.
- Van Nostrand JD, Wu WM, Wu L, Deng Y, Carley J, Carroll S, He Z, Gu B, Luo J, Criddle CS, Watson DB, Jardine PM, Marsh TL, Tiedje JM, Hazen TC, Zhou. 2009. GeoChip-based analysis of functional microbial communities during the reoxidation of a bioreduced uranium-contaminated aquifer. *Environ Microbiol* 11(10):2611–2626.
- Vavourakis CD, Ghai R, Rodriguez-Valera F, Sorokin DY, Tringe SG, Hugenholtz P, Muyzer G. 2016. Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Front Microbiol* 7: 211.
- Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407:897–900.
- Wainwright M, Wickramasinghe NC, Narlikar JV, Rajaratnam P. 2003. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. *FEMS Microbiol Lett* 218(1):161–165.
- Walczak M, Deja-Sikora E, Kalwasinska A, Krawiec A. 2017. Distribution of bacteria in the mineral waters of the Polish Lowlands. *Geol Quart* 61(1):177–185.
- Yang J, Ma L, Jiang H, Wu G, Dong H. 2016. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Sci Rep* 6:25078.

- Yumoto I, Nakamura A, Iwata H, Kojima K, Kusumoto K, Nodasaka Y, Matsuyama H. 2002. *Dietzia psychrocaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(1):85–90.
- Zhang L, Gao G, Tang X, Shao K, Bayartu S, Dai J. 2013. Bacterial community changes along a salinity gradient in a Chinese wetland. *Can J Microbiol* 59:611–619.

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

W roku 2014 rozpoczęłam współpracę naukową z Zakładem Mikrobiologii Eötvös Lorand University w Budapeszcie.

- Współpraca zaowocowała powstaniem pięciu publikacji naukowych wchodzących w skład opisywanego osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym.
- Planowana jest dalsza współpraca naukowa z Zakładem Mikrobiologii Eötvös Lorand University w Budapeszcie w postaci 3-miesięcznego stażu podoktorskiego dra Attili Szabó na UMK w roku akademickim 2020/21 w ramach projektu Mobilności, Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza. Pod moją opieką naukową Dr Attila Szabó będzie prowadził badania dotyczące wpływu środków ochrony roślin na bioróżnorodność mikroorganizmów glebowych oraz na ekspresję genów związanych z obiegiem azotu.

W roku 2015 uzyskałam stypendium finansowane przez The Swedish Institute, w ramach programu The Visby Programm 2015/2016 którego celem było nawiązanie współpracy pomiędzy środowiskiem naukowym w Szwecji a środowiskiem naukowym krajów nadbałtyckich, w tym Polski. Półroczny staż odbyłam w Uppsali w Swedish University of Agricultural Sciences w Zakładzie Mikrobiologii oraz w Zakładzie Mykologii Leśnej i Patologii Roślin w grupie badawczej zajmującej się mikrobiologią gleby pod kierownictwem prof. Sary Hallin.

- Prowadziłam tam badania, których celem było opracowanie oligonukleotydów pozwalających na wykrycie i zidentyfikowanie wysokowydajnej lipazy syntetyzowanej przez niektóre szczepy pozyskane z wapna posodowego oraz gleby z otoczenia składowiska wapna posodowego w Janikowie wykazującej tolerancję zarówno na wysoki odczyn środowiska, jak i na wysokie zasolenie. Ta część wyników została już opracowana merytorycznie, opisana i stanowi część przyszłej publikacji pt. „Ocena potencjału enzymatycznego alkalohalotolerantnej lipazy pozyskanej z *Bacillus luteus* H11 pod kątem bioremediacji gleb słonych, skażonych substancjami ropopochodnymi”. Jej finalizacja wymaga przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów. Obecnie trwają jeszcze badania biochemiczne i molekularne prowadzone we współpracy naukowej z dr hab. Urszulą Jankiewicz z SGGW w Warszawie, niezbędne dla pełnego scharakteryzowania nowego enzymu lipolitycznego produkowanego przez *Bacillus luteus* H11.

### Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

#### Wykłady

- Ekstremofile (wykład monograficzny, 6 wykładów w roku akademickim 2009/2010)
- Biotechnologia środowiskowa (2 wykłady, 2009/2010)

- Bakterie i grzyby. Identyfikacja i rola w środowisku (kierunek: Ochrona Środowiska, 2018/19)
- Diagnostyka mikrobiologiczna w laboratoriach przemysłowych (kierunek: Diagnostyka Mikrobiologiczna 2019/20)

### Ćwiczenia

Współdział w opracowaniu programu i prowadzenie następujących ćwiczeń:

- Mikrobiologia ogólna (kierunek: Ochrona Środowiska, Chemia Kosmetyczna)
- Mikrobiologia środowiskowa (kierunek: Ochrona Środowiska)
- Biotechnologia środowiskowa (kierunek: Ochrona Środowiska)
- Mikrobiologia wody i ścieków (kierunek: Ochrona Środowiska)
- Biotechnologia w ochronie środowiska (kierunek: Biotechnologia)
- Mikrobiologia przemysłowa (kierunek: Biotechnologia)
- Utylizacja odpadów (kierunek: Ochrona Środowiska)
- Bioaugmentacja - zastosowanie mikroorganizmów w remediacji i ochronie środowiska (kierunek: Ochrona Środowiska)
- Sukcesja mikroorganizmów na zwłokach kręgowców (kierunek: Diagnostyka Mikrobiologiczna)
- Metagenomics (w jęz. angielskim, kierunek: Biologia, studenci programu Erasmus +)
- Biostatistics (w jęz. angielskim, studenci programu Erasmus +)

### Zajęcia fakultatywne

Współdział w opracowaniu i prowadzeniu następujących zajęć do wyboru:

- Zastosowanie mikrobiologii w ochronie środowiska (kierunek: Biologia)
- Mikrobiologia środowiskowa (kierunek: Biotechnologia, Biologia)
- Sukcesja mikrobiologiczna na zwłokach kręgowców (kierunek: Biologia Sądowa)
- Bioaugmentacja (kierunek: Biologia, Biotechnologia)

### Projekty edukacyjne

- Współdział w organizacji wraz z Izbą Gospodarczą „Wodociągi Polskie” kursów „Mikrobiologiczne metody badania wody” oraz „Analizy mikrobiologiczne ścieków, osadu czynnego i osadów ściekowych” (kurs 3-dniowy w latach 2013 – 2015)
- Prowadzenie we współpracy z Ideas4Biology kursu dla pracowników naukowych Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego pt.: Analiza strukturalna i funkcjonalna zbiorowisk mikroorganizmów w oparciu o dane metagenomiczne i metatranskryptomomiczne (17-19 czerwca, 2019)
- Współprowadzenie kursu: Identyfikacja molekularna enzymów pochodzenia mikrobiologicznego. Wykorzystanie chromatografii GC/MS do diagnostyki metabolitów, w ramach projektu: Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro – modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu Uczelni (projekt nr POWR.03.05.00-00-Z302/17-00) realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.
- Opiekun projektu: Wpływ środków ochrony roślin na bioróżnorodność gleby, w ramach projektu: Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro (koordynator dr hab. Maria Swiontek Brzezinska, prof. UMK).

### Opieka naukowa nad studentami

- W ramach zajęć Pracownia dyplomowa po uzyskaniu stopnia doktora sprawowałam opiekę naukową nad przygotowaniem **prac dyplomowych** wykonywanych w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii UMK w Toruniu przez studentów studiów stacjonarnych i niestacjonarnych z kierunków Biotechnologia, Biologia i Ochrona Środowiska.
- W ramach zajęć Pracownia specjalizacyjna byłam opiekunem naukowym przy wykonywaniu **prac magisterskich** (9 przed uzyskaniem tytułu doktora, 30 po uzyskaniu tytułu doktora) obronionych w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii UMK w Toruniu przez studentów studiów stacjonarnych i niestacjonarnych z kierunków Biotechnologia, Biologia i Ochrona Środowiska.

### Współautorstwo skryptu

- Maciej Walczak, Aleksandra Burkowska, Maria Swiontek Brzezinska, Agnieszka Kalwasińska. Podstawy mikrobiologii w teorii i praktyce, Toruń: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, 2013.

### Działalność popularyzatorska

- Prowadzenie warsztatów w ramach Toruńskiego Festiwalu Nauki i Sztuki (2017)
- Prowadzenie warsztatów w ramach Nocy Biologów, Fascynującego Dnia Roślin i Dnia Otwartego Wydziału BiOŚ (2012-2017, 2020)
- Zajęcia pokazowe dla uczniów szkoły podstawowej (2016, 2018).

### Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Przed uzyskaniem tytułu doktora moje zainteresowania badawcze dotyczyły przede wszystkim poznania funkcji mikroorganizmów w ekosystemach jeziornych oraz wpływu antropopresji na zbiorowiska mikroorganizmów. Prowadziłam badania nad liczebnością, produkcją wtórną, aktywnością enzymatyczną mikroorganizmów oraz nad właściwościami fizjologiczno-biochemicznymi, w tym nad zdolnością do rozkładu ksenobiotyków (pestycydów i środków powierzchniowo-czynnych) przez izolaty bakteryjne pozyskane z różnych stref ekologicznych Jeziora Chełmżyńskiego (litoral, toń wodna, osady denne, mikrowarstwa powierzchniowa). Dodatkowo, w celu określenia stopnia wpływu działalności człowieka na jezioro wyrażonego jego stanem sanitarnym badałam występowanie mikroorganizmów wskaźnikowych, takich jak bakterie grupy coli, *Escherichia coli*, enterokoki kałowe oraz *Clostridium perfringens*.

Przed uzyskaniem stopnia doktora 2-krotnie (2002 i 2004) kierowałam grantami finansowanymi z funduszy UMK oraz grantem finansowanym przez Komitet Badań Naukowych KBN (okres realizacji 2005-2007). Wyniki badań uzyskane w powyższych grantach były prezentowane na konferencjach naukowych i w formie publikacji (zał. 4), a także wykorzystałam je do przygotowania rozprawy doktorskiej pod tytułem „Studium mikrobiologiczne Jeziora Chełmżyńskiego” której promotorem był prof. dr. hab. Wojciech Donderski. Moja dysertacja doktorska na wniosek recenzentów została uznana za wyróżniającą się.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe omawianego okresu:

- Wykazanie, że mikroorganizmy planktonowe jeziora to bardzo czuły wskaźnik, który może być wykorzystywany w praktyce w celu monitorowania zmian powodowanych przez człowieka w ekosystemach naturalnych.
- Porównanie stopnia antropopresji w części przymiejskiej Jeziora Chełmżyńskiego i w części pozamiejskiej; wykazanie, że stopień antropopresji w obydwu obszarach był podobny i warunkowany odpowiednio oddziaływaniem miasta (wpływ kanałów burzowych i kąpielisk) oraz wpływem rolniczej działalności człowieka (spływy biogenów, brak sprawnie działającego systemu kanalizacji we wsi Pluskowęsy).
- Określenie klasy czystości wód jeziora oraz stanu sanitarnego jego najważniejszych kąpielisk. Z przeprowadzonych badań wynikało, że wody Jeziora Chełmżyńskiego można było zaliczyć do III klasy czystości, w których parametry mikrobiologiczne przyjmowały wartości dopuszczalne, zgodne z wymogami, którym powinny odpowiadać wody w kąpieliskach oraz wody rekreacyjne.
- Wykazanie, że mikroorganizmy heterotroficzne są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy środowiska i wskazanie, które konkretnie rodzaje i gatunki bakterii występujących w środowisku wodnym aktywnie rozkładają badane ksenobiotyki. Badania wykazały, że izolaty bakteryjne należące do gatunków *Pseudomonas luteola*, *Burkholderia cepacia* i *Aeromonas hydrophila* należały do najskuteczniejszych organizmów pod względem tempa redukcji zarówno karbendazymu, jak i delatmetryny.

Po uzyskaniu stopnia doktora w roku 2008 kontynuowałam pracę w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii początkowo na etacie asystenta, a od roku 2010 na stanowisku adiunkta. Zajmowałam się badaniami dotyczącymi szeroko pojętej mikrobiologii środowiskowej obejmującej monitoring mikrobiologiczny wody, gleby i powietrza, wykorzystaniem mikroorganizmów w biotechnologii, a także prowadziłam badania w obszarze mikrobiologii przemysłowej.

W latach 2010-2012 byłam kierownikiem kolejnego grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. Ocena wpływu nowo powstałego oraz rekultywowanego składowiska odpadów komunalnych w Toruniu na jakość mikrobiologiczną powietrza i gleby. Celem tego projektu było poznanie oddziaływania składowiska odpadów komunalnych na środowisko, wyznaczenie stref jego wpływu, a także zidentyfikowanie potencjalnych zagrożeń związanych ze zdrowiem człowieka, zarówno w bezpośrednim otoczeniu terenu składowania, jak i w miejscu pracy na terenie składowisk.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe projektu uważam:

- Przeprowadzenie długotrwałych (2 lata, comiesięczny pobór prób) i kompleksowych badań mikrobiologicznych obejmujących powietrze i glebę na stanowiskach badawczych zlokalizowanych na terenie nowo powstałego składowiska oraz na terenie składowiska rekultywowanego, a także poza zasięgiem oddziaływań składowisk.
- Określenie negatywnego wpływu jaki wywiera funkcjonująca kwatera deponowania odpadów na jakość powietrza i gleby zarówno na miejscu składowania jak i w jego sąsiedztwie, co może być powodem do kwestionowania strategii lokalizacji składowisk odpadów komunalnych w gęsto zaludnionych obszarach oraz wykazanie potrzeby wprowadzenia regularnych monitoringowych badań mikrobiologicznych w sąsiedztwie obiektów gospodarki komunalnej.

- Wykazanie, że emitowany przez składowisko bioaerozol jest źródłem potencjalnych patogenów stanowiących zagrożenie dla ludzi, wskazanie obszarów szczególnie niebezpiecznych dla zdrowia pracowników składowiska oraz konieczności przedsięwzięcia środków zaradczych, ograniczających narażenie na czynniki biologiczne w miejscu pracy.
- Udowodnienie, że rozprzestrzenianie się bioaerozoli, deponowanie odpadów oraz powstawanie odcieków wydostających się z nieszczelnych systemów rowów opaskowych może powodować mikrobiologiczne skażenie gleby w sąsiedztwie składowiska odpadów. Wykazanie konkretnych miejsc, w których obserwowano przekroczenie dopuszczalnych wartości parametrów mikrobiologicznych.
- Wykazanie, że odpowiednio prowadzony proces rekultywacji znacznie ogranicza ewentualny negatywny wpływ składowiska, którego eksploatację już zakończono.

Raport z przeprowadzonych badań został przekazany Wojewódzkiemu Inspektoratowi Ochrony Środowiska w Bydgoszcy oraz Zakładowi Utylizacji Odpadów Komunalnych w Toruniu.

Oprócz zagrożeń biologicznych na terenie obiektów gospodarki komunalnej badałam także możliwość narażenia ludzi na bioaerozol bakteryjny i grzybowy w pomieszczeniach użyteczności publicznej m.in. w Bibliotece Uniwersyteckiej UMK.

- Przeprowadzone badania ujawniły, że powietrze w ogólnodostępnych pomieszczeniach bibliotecznych, w oparciu o kryteria biologicznej czystości pomieszczeń nieprzemysłowych, uznano za zanieczyszczone bakteriami w stopniu co najmniej średnim lub wysokim. Najniższe mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza (w stopniu małym) stwierdzono jedynie w Magazynie Starodruków, w którym rygorystycznie przestrzega się odpowiednich parametrów klimatycznych. Wyniki naszych badań wykazały, że prostym i skutecznym sposobem poprawy mikrobiologicznej jakości powietrza w pomieszczeniach zamkniętych jest przede wszystkim sprawnie działający system klimatyzacji lub wentylacji.

Interesował mnie również wpływ dużych, otwartych inhalatoriów funkcjonujących w Ciechocinku i Inowrocławiu na obecność w powietrzu różnych grup drobnoustrojów, dlatego uczestniczyłam w pracach dr hab. Aleksandry Burkowskiej-But, prof. UMK których celem było określenie zagrożeń związanych z potencjalną emisją przez te obiekty chorobotwórczych bakterii i grzybów pleśniowych stanowiących ważne alergeny wziewne.

- Przeprowadzone badania wykazały, że tężnie zlokalizowane w obu badanych uzdrowiskach miały pozytywny wpływ na mikrobiologiczną jakość powietrza. Na terenach objętych ich oddziaływaniem liczebność drobnoustrojów była bowiem niższa niż na pozostałych obszarach, zarówno na terenach rekreacyjnych, jak i typowo miejskich. Jednocześnie w miarę oddalania się od inhalatorów obserwowano wzrost liczebności bakterii mezofilnych, wśród których mogą znaleźć się mikroorganizmy potencjalnie chorobotwórcze. W związku z tym funkcjonowanie otwartych inhalatorów solankowych można uznać za skuteczny sposób poprawy jakości powietrza w sanatoriach, a ich budowę za działanie wspierające funkcjonowanie uzdrowisk.

Badania dotyczące bioerozolu emitowanego przez tężnie skłoniły mnie również do podjęcia badań zmierzających do określenia wpływu zanieczyszczenia solanki na strukturę zbiorowisk bakteryjnych i archeonowych w trakcie przepływu solanki przez system tężni w Ciechocinku.

- Przeprowadzone badania wykazały, że wzrastające zasolenie było pozytywnie skorelowane zarówno z liczebnością mikroorganizmów, jak i różnorodnością zbiorowisk bakteryjnych oraz

archeonowych. Przedstawiciele rodzajów *Idiomarina*, *Psychrofexus*, *Roseovarius* i *Marinobacter* występowały na wszystkich etapach zatężania solanki stąd uznano je za organizmy zaadaptowane do nagłych zmian zasolenia o szerokiej tolerancji na NaCl. *Sphingobium* i *Sphingomonas* uznano za organizmy o wąskim zakresie tolerancji na zasolenie, preferujących niskie jego poziomy, natomiast *Faibacter* i *Fodinibius* za organizmy wymagające do swojego rozwoju obecności znacznych stężeń soli.

Uczestniczyłam również w badaniach kierowanych przez dr Elżbietę Lalke-Porczyk, których celem było określenie udziału mikroorganizmów glebowych i ryzosferowych w procesie oczyszczania ścieków bytowo – gospodarczych w oczyszczalni wierzbowej.

Oczyszczalnie hydrobotaniczne w zabudowie jednorodzinnej stanowią obiecującą alternatywę dla typowych miejskich oczyszczalni mechaniczno-biologicznych zarówno w kwestii ekonomicznej, jak i w aspekcie oddziaływania na środowisko. W tych badaniach wykorzystano m.in. pomiar aktywności enzymów hydrolitycznych wydzielanych do środowiska przez mikroorganizmy jako narzędzia umożliwiające ocenę skuteczności rozkładu materii organicznej dostarczanej do środowiska glebowego jako ładunek zanieczyszczeń w ściekach.

- W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że w miarę przepływu ścieków przez filtr korzeniowy, wraz ze wzrostem odległości od źródła zanieczyszczeń, aktywność enzymatyczna mikroorganizmów ryzosferowych oraz mikroorganizmów w glebie odległej od systemu korzeniowego wierzby energetycznej ulegała stopniowej i znaczącej redukcji. Aktywność ta zależała bezpośrednio od zawartości substancji organicznej w ściekach i była stymulowana obecnością systemu korzeniowego. Wyniki naszych badań potwierdziły, że dobrze zaprojektowane i zbudowane oczyszczalnie hydrobotaniczne mogą służyć jako wydajne systemy oczyszczania ścieków.

Uczestniczyłam też w opracowywaniu wyników badań prowadzonych przez zespół kierowany przez dra hab. Macieja Walczaka, prof. UMK, dotyczących wpływu pochodnych PHMG wbudowanych do biodegradowalnych polimerów na przeżywalność i aktywność enzymatyczną mikroorganizmów .

Polilaktyd (PLA), polihydroksymaślan (PHB) oraz plikaprolaktan (PCL) to tworzywa produkowane z odnawialnych surowców naturalnych, stosunkowo łatwo ulegające rozkładowi powodowanemu przez mikroorganizmy, co ma duże znaczenie w dobie wyczerpywania się paliw kopalnych i narastających problemów ze składowaniem zużytych tworzyw sztucznych. Przykładem zastosowań biodegradowalnych kompozytów, o których mowa może być produkcja opakowań chroniących żywność oraz materiałów medycznych jednorazowego użytku. Ze względu jednak na ryzyko kolonizacji takich materiałów przez mikroorganizmy zdolne do tworzenia biofilmów, wśród których mogą być organizmy potencjalnie patogenne, ich zastosowanie jest często niemożliwe. Dlatego celowo wprowadza się do nich związki o charakterze biocydów, takich jak pochodne hydrochlorku polimetylenu guanidyny (PHMG), których zadaniem jest eliminacja drobnoustrojów na powierzchni materiału.

- Przeprowadzone badania wykazały, że pochodne PHMG w różnym stopniu, uzależnionym od stężenia i rodzaju substancji czynnej, hamowały powstawanie biofilmów przez potencjalne patogeny takie jak *Escherichia coli* oraz przez *Staphylococcus aureus* wpływały na aktywność produkowanych przez nie enzymów (hydrolaz i dehydrogenaz). Najsilniejszym inhibitorem

formowania się biofilmów bakteryjnych była pochodna PHMG i granulowanego wosku polietylenowego. Natomiast pochodna PHMG i stearynianu oraz soli kwasu sulfanilowego wbudowane w PLA i PHB nie wykazywały właściwości bakterioobójczych.

- Wszystkie pochodne PHMG hamowały kiełkowanie patogenów grzybowych takich jak *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* oraz *Candida albicans*. Co więcej, pochodna PHMG i granulowanego 1% wosku polietylenowego w stosunku do *C. albicans* wykazywała efekt biobójczy.

Brałam również udział w badaniach kierowanych przez dra hab. Macieja Walczaka, prof. UMK dotyczących występowania bakterii w wodach głębinowych na obszarze Niżu Polskiego, a także w badaniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego wód mineralnych przechowywanych w warunkach domowych w pojemnikach wykonanych z tworzyw sztucznych typu politereftalan etylenu (PET) pod kierownictwem dr hab. Aleksandry Burkowskaiej-But. Celem badań było określenie możliwości występowania mikroorganizmów w wodach utworów mezozoicznych wybranych miejscowości uzdrowiskowych północnej i środkowej Polski, a także analiza zmian w liczebności bakterii oraz wykrywanie powstawania biofilmu w wodzie głębinowej z ujęć publicznych, w zależności od czasu i sposobu jej przechowywania w warunkach domowych.

- Z przeprowadzonych badań wnika, że w wodach ujmowanych z osadów jurajskich i triasowych występowały bakterie zróżnicowane pod względem typu metabolizmu, zarówno heterotrofy, jak i chemolitoautotrofy, organizmy beztlenowe i tlenowe, przy czym wśród izolatów bakteryjnych dominowały bakterie należące do rodzaju *Bacillus* oraz *Micrococcus*.
- Badania wykazały, że liczebność bakterii heterotroficznych w wodzie z ujęć podziemnych wzrastała wraz z upływem czasu, szczególnie w wodzie przechowywanej w temperaturze pokojowej. Nieodpowiednie warunki przechowywania powodowały, że woda spełniająca pierwotnie kryteria mikrobiologiczne dla wód przeznaczonych do spożycia, może stanowić zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Wielokrotne wykorzystanie tego samego pojemnika prowadzi do rozwoju biofilmu na jego powierzchni, a to powoduje, że woda z ujęć głębinowych często już bezpośrednio po pobraniu nie spełnia wymagań stawianych wodzie przeznaczonej do spożycia.

Możliwość poznania struktury i funkcji mikroorganizmów w wodach głębinowych siarczkowych występujących w uzdrowiskach na południu Polski skłoniły mnie również do wzięcia udziału w badaniach prowadzonych przez dra hab. Arkadiusza Krawca, prof. UMK oraz przez dr Edytę Deję – Sikorę.

- Przeprowadzone badania umożliwiły wnioskowanie na temat roli mikroorganizmów w kształtowaniu chemizmu wód siarczkowych, co może być kluczowe dla zachowania ich leczniczego potencjału. Stosunek bakterii redukujących związki siarki (SRB) do bakterii utleniających związki siarki (SOB) różnił się pomiędzy próbkami z poszczególnych ujęć. W próbkach z najgłębiej zalegających warstw wodonośnych może mieć miejsce intensywna produkcja siarki elementarnej oraz siarkowodoru z powodu dominacji bakterii SRB i małej proporcji SOB. W próbce wody z najpłytszego ujęcia można oczekiwać wydajnego wytwarzania siarczanów, ponieważ SOB zdominowały nad SRB.
- Wody siarczkowe Buska i Solca-Zdroju uznano za bezpieczne pod względem mikrobiologicznym, a ich lecznicze zastosowanie za nie związane z ryzykiem zdrowotnym.

**Podczas pracy naukowej prowadziłam nie tylko badania podstawowe, ale także starałam się znaleźć zastosowania aplikacyjne dla swoich badań.**

W latach 2012-2013 (6 miesięcy) realizowałam projekt „Opracowanie metody pakowania świeżych warzyw” w ramach projektu „Staż Sukcesem Naukowca”, który odbywałam w przedsiębiorstwie produkcyjnym Marwit Sp. z o.o. Projekt był finansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu operacyjnego Kapitał Ludzki, Wsparcie Współpracy Sfery Nauki i Przedsiębiorstw.

- Dzięki przeprowadzonym badaniom mikrobiologicznym wykazałam, które pomieszczenia zakładu należy monitorować w celu poprawy jakości warunków produkcji i w jaki sposób poprawić trwałość gotowego produktu poprzez wprowadzenie odpowiednich procedur przygotowywania surowca, warunków jego pakowania (doboru parametrów gazów obojętnych) oraz rodzaju opakowań. Odbyty staż naukowy zaowocował późniejszą dwuletnią współpracą polegającą na przygotowywaniu na zlecenie firmy ekspertyz dotyczących mikrobiologicznej jakości surowców oraz gotowych produktów spożywczych.

W 2013 r. uczestniczyłam w badaniach w ramach projektu pt. "Opracowanie biotechnologiczne i wdrożenie do produkcji inokulantu mikrobiologicznego służącego do otrzymywania pasz wysokiej jakości". Projekt ten był finansowany z funduszy Unii Europejskiej w ramach programu Kapitał Ludzki, Wzmocnienie Regionalnego Potencjału Badań i Rozwoju Technologii. Badania prowadzone były we współpracy z firmą Polmass S.A. w Bydgoszczy.

- Przeprowadzone badania umożliwiły pozyskanie z różnych środowisk naturalnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus plantarum*, które wykorzystywane są do produkcji fermentowanych pasz. Badania pozwoliły zoptymalizować warunki wzrostu badanych szczepów oraz przygotować bioinokulant o pożądanym cechach użytkowych.

Oprócz prac związanych z poznaniem potencjalnych możliwości zastosowania w przemyśle enzymów pochodzenia mikrobiologicznego takich jak lipazy czy proteazy, prowadziłam również badania nad enzymami chitynolitycznymi. Enzymy te cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na to, że stanowią alternatywę dla stosowania pestycydów na polu walki z patogenami grzybowymi roślin. Wraz z zespołem kierowanym przez dr hab. Marię Swiontek Brzezinską zajmowałam się charakterystyką enzymów produkowanych przez szczep promieniowca wyizolowanego z ryzosfery pszenicy *Streptomyces luridiscabiei* U5.

- Przeprowadzone badania wykazały, że izolat *Streptomyces luridiscabiei* U5 charakteryzował się zdolnością rozkładu chityny stanowiącej budulec tkanek grzybów patogennych, takich jak *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Botrytis cinerea*, *F. culmorum* i *Penicillium verrucosum*. Oczyszczony enzym o masie 45 kDa i aktywności  $\beta$ -N-acetyloheksaminidazy wykazywał optimum aktywności w temperaturze 35–40°C i pH 7–8. Jego aktywność stymulowały jony wapnia, magnezu i miedzi, natomiast do silnych inhibitorów należały m.in. jony ołowiu. Wykazano ponadto, że płyn hodowlany tego promieniowca silniej hamował rozwój grzybni patogenów niż sam enzym oczyszczony, co wskazuje na synergistyczny efekt działania zarówno enzymu, jak i innych substancji ograniczających rozwój szkodników grzybowych, np. substancji antybiotycznych.

W grudniu 2019 r. zostałam zaproszona do współpracy przez prof. dr hab. Katarzynę Hrynkiewicz w ramach wyłaniających się na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu pól badawczych. Głównym celem pola badawczego „Nauki o glebie, mikrobiologia, genetyka w rolnictwie i jakość pożywienia” jest poznanie złożonych zależności zachodzących pomiędzy środowiskiem glebowym, mikroorganizmami i roślinami, które odpowiadają za produkcję i jakość pożywienia, a także szeroko pojęta współpraca międzynarodowa oraz kształcenie młodej kadry otwartej na pracę w instytucjach naukowych oraz w sektorze prywatnym. W ramach tego projektu realizowane będą przeze mnie trzy projekty:

- Ocena potencjału enzymatycznego halo- i termotolerancyjnej chitynazy pozyskanej z *Bacillus paralicheniformis* TS6 (solanka termalna) pod kątem wykorzystania w ochronie roślin uprawnych szklarniowych przed patogenami grzybowymi (w trakcie realizacji)
- Ocena potencjału enzymatycznego alkalohalotolerancyjnej lipazy pozyskanej z *Bacillus luteus* H11 (gleba technogeniczna) pod kątem bioremediacji słonych gleb skażonych substancjami ropopochodnymi (w trakcie realizacji)
- Badania nad wpływem środków ochrony roślin (pochodzenia naturalnego oraz syntetycznych) na bioróżnorodność mikroorganizmów glebowych (bakterie, archeony, grzyby pleśniowe) oraz na obecność i ekspresję w komórkach mikroorganizmów glebowych genów związanych z obiegiem azotu (rozpoczęcie realizacji projektu maj 2020).

#### **Ważniejsze szkolenia/kursy dokształcające**

- 26-27 czerwca 2001, Politechnika Gdańska, Kurs Technika PCR i jej zastosowania.
- 01.10.2014 – 31.01.2015 (1 semestr), Wydział Matematyki i Informatyki, UMK. Kurs dokształcający w zakresie nowoczesnych metod nauczania. Statystyka dla przyrodników i humanistów w ramach projektu Wzrost (Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych).
- 2018/2019, Wydział Nauki Ekonomicznych i Zarządzania, UMK. Szkolenia w ramach projektu Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 finansowanego przez Unię Europejską
  - Statystyka i eksploracja danych (1semestr)
  - Techniki i narzędzia wizualizacji dużych zbiorów danych (1 semestr)
  - Współczesne techniki wyszukiwania, przetwarzania i zarządzania informacją (1 semestr)

#### **Nagrody i wyróżnienia otrzymane za działalność naukową**

- Nagroda Rektora UMK II<sup>o</sup> w dziedzinie badań naukowych: 2002
- Wyróżnienie J.M Rektora UMK w dziedzinie badań naukowych: 2004
- Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w roku 2012
- Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w roku 2013

- Stypendium Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za wysoko punktowaną publikację naukową w roku akademickim 2018/2019.

Agnieszka Kalsom'ska