



**WYDZIAŁ  
AGROBIOINŻYNIERII**

**dr Justyna Bohacz**

**AUTOREFERAT  
przedstawiający opis dorobku  
i osiągnięć naukowych**

Katedra Mikrobiologii Środowiskowej  
Pracownia Mikologiczna

**LUBLIN 2019**

**SPIS TREŚCI**

1.	DANE OSOSOBOWE.....	3
2.	POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE.....	3
3.	INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTACJCH NAUKOWYCH.....	4
4.	WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST.2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ.U. Z 2016 R. POZ. 1311.....	4
4A.	Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4B.	Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego.....	5
4C.	Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	7
5.	OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	27
5A.	Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.....	27
5B.	Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora .....	31
6.	OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE, POPULARYZUJĄCE NAUKĘ I ORGANIZATORSKIE.....	41
7.	PLANY NAUKOWE I AKTUALNIE REALIZOWANE ZADANIA BADAWCZE.....	42
8.	PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH.....	43

## 1. DANE OSOBOWE

*Imię i Nazwisko:* **Justyna Bohacz** (nazwisko panieńskie **Ziaja**)

*Miejsce pracy:* Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej  
Pracownia Mikologiczna  
ul. Leszczyńskiego 7  
20-069 Lublin

## 2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

- **1996** - tytuł magistra biologii, specjalność biochemia, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biochemii; tytuł pracy magisterskiej „Dynamika przemian wolnorodnikowych podczas owocnikowania grzybów z rodzaju *Pleurotus* i gatunku *Agaricus bisporus*”  
Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Dernałowicz-Malarczyk  
Recenzent: prof. dr hab. Andrzej Leonowicz
- **2005** - stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii, specjalność mikrobiologia, Wydział Rolniczy, Akademia Rolnicza w Lublinie; tytuł rozprawy doktorskiej: „Badania nad procesem kompostowania odpadów keratynowych”  
Promotor: prof. dr hab. Teresa Kornilowicz-Kowalska  
Recenzenci: prof. dr hab. Jadwiga Furczak  
prof. dr hab. Wiesław Barabasz

Za wyróżniającą się pracę doktorską w 2005 r. otrzymałam indywidualną nagrodę III<sup>o</sup> JM Rektora.

**3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

- **1.12.1996 - 30.11.1997**- Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Rolniczy, Katedra Mikrobiologii Rolniczej, asystent
- **1.12.1997-28.02.2005** - Akademia Rolnicza/ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Rolniczy, Katedra Mikrobiologii Rolniczej/ Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Pracownia Mikologiczna, asystent
- **1.03.2005- do chwili obecnej** - Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Pracownia Mikologiczna, adiunkt

**4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003r. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1311.)****4A. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Moim osiągnięciem naukowym (habilitant), będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest jednotematyczny cykl sześciu publikacji naukowych (oryginalne prace twórcze) z lat 2012-2019 i jednej pracy przeglądowej (z 2011 r.) ujętych pod wspólnym tytułem:

***Wykorzystanie potencjału odpadowej biomasy ligninocelulozowej i pierza kurcząt na cele praktyki rolniczej***

**4B. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego**

Badania naukowe do osiągnięcia habilitacyjnego realizowałam w ramach:

- projektu badawczego własnego uzyskanego w 37 konkursie MNiSW w latach 2009-2012, pt. "Kompleksowa ocena procesu kompostowania odpadów ligninocelulozowych z odpadami keratynowymi w warunkach modelowych" Nr NN523 213737, którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą  
  
oraz
- częściowo ze środków finansowych MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego UP w Lublinie dla zadania badawczego RKM/DS/4 pt. „Badania nad ekologią i uzdolnieniami biochemicznymi saprotroficznych drobnoustrojów” w którym byłam wykonawcą.

W pięciu pracach doświadczalnych przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne jestem jedynym autorem. W dwóch pozostałych jestem pierwszym lub drugim autorem. We wszystkich pracach jestem autorem korespondencyjnym.

**Sumaryczny Impact factor (IF)/IF<sub>5-letni</sub>** ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania:

**18,635 / 22,477** IF<sub>5-letni</sub>

**Suma punktów** ww. publikacji zgodnie z wykazem MNiSW wg roku publikacji: **195**

**Liczba cytowań** łącznie według **Web of Science Core Collection (WoS)** **125\***

**Liczba cytowań** łącznie według **Scopus** **165 \***

**Liczba cytowań** łącznie według **Google Scholar** **239\***

\*stan na dzień 22.02.2019r.

Lp.	Dane bibliograficzne (prace doświadczalne)	IF/ IF 5-letni	Punkty MNIŚWwg roku publikacji	Liczba cytowań WoS* Core Collection	Liczba cytowań wg Scopus*	Liczba cytowań wg Google Scholar*
[1.]	<b>Bohacz J.</b> , Kornilłowicz-Kowalska T. Species diversity of keratinophilic fungi in various soil types. Central European Journal of Biology <b>2012</b> : 2, 259-266 <a href="https://doi.org/10.2478/s11535-012-0008-5">https://doi.org/10.2478/s11535-012-0008-5</a>	<b>0,818/</b> 0,975	<b>20</b>	7	5	6
[2.]	<b>Bohacz J.</b> Biodegradation of feather waste keratin by keratinolytic soil fungus of the genus <i>Chrysosporium</i> and statistical optimization of feather mass loss. World Journal of Microbiology and Biotechnology <b>2017</b> : 33:13, 1-16. <a href="https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2">https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2</a>	<b>2,100/</b> 2,031	<b>20</b>	9	11	20
[3.]	<b>Bohacz J.</b> Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. Science of the Total Environment <b>2017</b> : 580, 744-754. <a href="https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.021">https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.021</a>	<b>4,610/</b> 4,984	<b>40</b>	5	5	7
[4.]	<b>Bohacz J.</b> Microbial strategies and biochemical activity during lignocellulosic waste composting in relation to the occurring biothermal phases. Journal of Environmental Management <b>2018</b> : 206, 1052-1062. <a href="https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.077">https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.077</a>	<b>4,005/</b> 4,449	<b>35</b>	1	3	7
[5.]	<b>Bohacz J.</b> Composts and water extract of lignocellulosic composts in the aspect of fertilization, humus-forming, sanitary, phytosanitary and phytotoxicity value assessment. Waste and Biomass Valorization <b>2018</b> : <a href="https://doi.org/10.1007/s12649-018-0334-6">https://doi.org/10.1007/s12649-018-0334-6</a>	<b>1,874/</b> 1,787	<b>20</b>	-	1	1
[6.]	<b>Bohacz J.</b> Changes in mineral forms of nitrogen and sulfur and enzymatic activities during composting of lignocellulosic waste and chicken feathers. Environmental Science and Pollution Research <b>2019</b> : <a href="https://doi.org/10.1007/s11356-019-04453-2">https://doi.org/10.1007/s11356-019-04453-2</a>	<b>2,800/</b> 2,989	<b>30</b>	-	-	-
	Dane bibliograficzne (praca przeglądowa)	IF/ IF 5-letni	Punkty MNIŚW	Liczba cytowań WoS Core Collection	Liczba cytowań wg Scopus	Liczba cytowań wg Google Scholar
[7.]	Kornilłowicz-Kowalska T., <b>Bohacz J.</b> Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. Waste Management <b>2011</b> : 31(8)1689-1701 <a href="https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024">https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024</a>	<b>2,428/</b> 5,262	<b>30</b>	103	140	198

**4C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania****CEL NAUKOWY PRAC PRZEDSTAWIONYCH JAKO OSIĄGNIĘCIE****HABILITACYJNE:**

Nadrzędnym celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było poszukiwanie i ocena nowych możliwości w zakresie wykorzystania odpadowego pierza kurcząt i odpadów ligninocelulozowych.

Przeprowadzone badania miały doprowadzić do wyjaśnienia dwóch głównych problemów:

- 1. Przedstawienie nowych propozycji układów doświadczalnych mających na celu intensyfikację biodegradacji białka keratynowego o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym.* Element nowości dotyczył w opisanym przykładzie zarówno organizmów wybranych do badań, zastosowanych warunków stymulacji biodegradacji białka keratynowego (warunków hodowli kultur grzybowych) i przede wszystkim zaproponowania sposobu zastosowania otrzymanych po biodegradacji pierza kurcząt hydrolizatów.
- 2. Wykazanie nowych aspektów procesu kompostowania i możliwości zastosowania otrzymanych kompostów ocenianych głównie na podstawie przemian kompleksu ligninocelulozowego.* Element nowości dotyczył zarówno poznania przemian kompleksu ligninocelulozowego podczas 7 miesięcznego kompostowania odpadów ligninocelulozowych o różnym ilościowym i jakościowym składzie jak i zaproponowania mechanizmu biodegradacji tej trudnodegradowalnej materii organicznej oraz praktycznego zastosowania otrzymanych kompostów w produkcji rolniczej i ogrodniczej.

## WPROWADZENIE

Na świecie zagospodarowywanie trudnodegradowalnych odpadów wciąż stanowi ogromny problem. Istnieje wiele doniesień naukowych z różnych krajów z propozycjami recyklingu przemysłowych i rolniczych produktów ubocznych w użyteczny produkt (bioprodukt) (Kowalczyk i wsp., 2014; Lasekan i wsp., 2013; Rabemanolontsoa i Saka, 2016; Sánchez, 2009). Wynika to nie tylko z problemów natury ekonomicznej krajów oraz wzrastającej świadomości ekologicznej społeczeństw, ale przede wszystkim uwarunkowane jest regulacjami prawnymi w zakresie ochrony środowiska.

Duży odsetek ogółu trudnodegradowalnych, bogatych w węgiel organiczny odpadów, stanowi biomasa w tym odpady ligninocelulozowe, które powstają jako produkty uboczne rolnictwa, przemysłu m.in. spożywczego, włókienniczego, papierniczego i drzewnego. Kuhad i wsp. (2011) podają, że na Ziemi rocznie produkowane jest  $1.7-2.0 \times 10^{11}$  ton biomasy, z czego jedynie  $6 \times 10^9$  ton jest obecnie zagospodarowywane. W rolnictwie słoma pszena rocznie generowana jest w ilości  $154-185 \text{ ton} \times 10^6$  a odpady sosnowe  $3.8-4.6 \text{ ton} \times 10^6$  (Sánchez, 2009). W Polsce, przemysł tartaczny produkuje odpady stanowiące 63% wszystkich odpadów drzewnych. W grupie tych odpadów są trociny i wióry oraz kora, które stanowią odpowiednio 28% and 16% całkowitej ilości poprodukcyjnych odpadów przemysłowych (Szostak i Ratajczak 2003). W rolnictwie słoma zbóż, roślin strączkowych, lnu i rzepaku wytwarzana jest w ilości ponad 20 mln ton rocznie (Denisiuk, 2008).

Poza odpadami pochodzenia roślinnego w Polsce przetwórstwo zwierząt rzeźnych oraz drobiu rokrocznie dostarcza pulę odpadów będących rezerwuarem dużej ilości białka. Według danych statystycznych GUS z 2017r. produkcja mięsa drobiowego w 2016r. wyniosła 2797 tys. ton i była wyższa o ponad 100 % w porównaniu do 2005 roku i stale rośnie. Generuje to produkcję także produktów ubocznych w tym pierza kurcząt, które według Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 należą do odpadów 3 kategorii. Odpady keratynowe zawierają ok. 90 % białka, 15-18% N organicznego i 2-5% siarki organicznej (Onifade i wsp., 1998; Kornilowicz-Kowalska i Bohacz, 2011). Jak podają Kornilowicz-Kowalska i Bohacz (2011) w Polsce powstaje ok. 70 tys. ton pierza kurcząt a na świecie ponad 1mln ton rocznie.

Składowanie organicznych odpadów zwierzęcych prowadzi do niekontrolowanego mikrobiologicznego rozkładu podczas, którego uwalniane są duże ilości trujących gazów (Bernal i wsp., 2009). Song i wsp. (2015) podają, że w San Francisco w US i Australii składowanie odpadów jest ograniczone z uwagi na wdrożenie obowiązujących przepisów dotyczących recyklingu, ponownego użycia (reusing) i składowania. W Polsce warunkują to także znowelizowane przepisy prawne, opracowane w oparciu o założenia Ramowej Dyrektywy Odpadowej (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE) i o Dyrektywę Składowiskową (Dyrektywa Rady 1999/31/WE), które jak podaje Jakubus (2015) zobowiązują gminy do zwiększenia poziomu recyklingu odpadów komunalnych i do ograniczania kierowania na składowiska odpadów ulegających recyklingowi. Ponadto Rada



Unii Europejskiej 22 maja 2001 roku wprowadziła Rozporządzenie EC 999/2001 w sprawie sposobów zapobiegania, kontroli i niszczenia produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego o wysokim stopniu zagrożenia dla ludzi i Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 (które zastępuje Rozporządzenie EC 1774/2002 z dnia 3 października 2002 roku), zawierające przepisy w zakresie zbierania, przerobu oraz wykorzystania lub utylizacji wszystkich rodzajów produktów ubocznych z produkcji zwierzęcej.

Mając na uwadze zapobieganie marnotrawstwu wartościowej substancji organicznej oraz wspomniane aspekty toksykologiczne, ekonomiczne i prawne podjęłam badania mające na celu nie tylko zagospodarowanie powstających odpadów za pomocą przyjaznych środowisku, bezodpadowych technologii z udziałem mikroorganizmów, ale przede wszystkim pozwalające na ocenę wytworzonych podczas tych przemian bioproduktów pod kątem ich zastosowania w rolnictwie i ogrodnictwie.

#### ***Ad.1. Przedstawienie nowych propozycji układów doświadczalnych mających na celu intensyfikację biodegradacji białka keratynowego o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym***

Przegląd dotychczasowej wiedzy na temat odpadów keratynowych, pochodzenia, budowy keratyny, mechanizmów mikrobiologicznej biodegradacji i praktycznego aspektu wykorzystania odpadów keratynowych przedstawiłam jako jedną z prac wchodzących w cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Opracowanie to było pierwszą publikacją przeglądową o zasięgu międzynarodowym na temat biodegradacji pierza odpadowego [7], która cieszy się wzrastającym zainteresowaniem czytelników (wg liczby cytowań).

Przedstawione w przeglądowej pracy bogactwo szczepów mikroorganizmów keratynolitycznych, możliwości praktycznego ich wykorzystania i wydzielanych przez nie enzymów, skłaniało do poszukiwań możliwości stymulacji ich metabolizmu poprzez zastosowanie różnych czynników indukujących. Metodą często stosowaną w celu zwiększenia syntezy danego enzymu czy produktu jest modyfikacja warunków wzrostu danego szczepu, poprzez zmianę podłoża hodowlanego oraz czynników fizyko-chemicznych. W mojej pracy badawczej zajęłam się czynnikami indukującymi, które miałyby wpłynąć na tempo i wydajność procesu biodegradacji keratyny pierza odpadowego, mierzonej procentowym ubytkiem masy piór, który jest widocznym efektem biodegradacji tych odpadów.

Biorąc pod uwagę fakt, że od początku moja praca naukowa, zdobyta wiedza i umiejętności związane były z mikroorganizmami a zwłaszcza grzybami w tym grzybami keratynolitycznymi i ich udziałem w biodegradacji złożonej materii organicznej, postanowiłam wykorzystać te drobnoustroje jako narzędzie do zagospodarowania odpadów keratynowych w kierunku wytwarzania biopreparatów nawożeniowych dla celów praktyki rolniczej. Są to odpady wartościowe z aplikacyjnego punktu widzenia na co składa się wysoka zawartość azotu i siarki. Mają także duże znaczenie ogólnoprzyrodnicze, wynikające z ich wykorzystania

przez drobnoustroje jako źródła węgla i energii a także włączenia w procesy geochemiczne dotyczące krążenia N i S w przyrodzie.

Jednym z moich głównych celów było znalezienie nowych efektywnych szczepów keratynolitycznych, glebowego pochodzenia oraz opracowanie nowego układu doświadczalnego, dotyczącego optymalizacji procesu keratynolizy.

Zakres wykonywanych badań obejmował:

- 1) Izolację grzybów keratynofilnych z czterech gleb uprawnych różniących się zawartością węgla organicznego i wskazanie korelacji pomiędzy występowaniem tych grzybów a wybranymi parametrami chemicznymi tych gleb
- 2) Identyfikację gatunkową wytypowanych ze zgromadzonego materiału grzybowego pięciu szczepów grzybów keratynofilnych za pomocą tradycyjnych metod na podstawie cech makro- i mikromorfologicznych a także sekwencjonowania nukleotydów za pomocą pary starterów ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3) i ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3) co zaowocowało umieszczeniem otrzymanych sekwencji w GenBanku i publikacją szczepów grzybów pod numerami akcesyjnymi KY014757, KY014758, KY014759, KY014760, KY014761
- 3) Określenie aktywności enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych jako wskaźników aktywności metabolicznej tych szczepów oraz zawartości mineralnych produktów keratynolizy tj.: stężenia  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{SO}_4^{2-}$ , służącej ocenie wartości nawozowej hydrolizatów
- 4) Określenie ubytku masy piór kurcząt (przyjętego jako współczynnik ekonomiczny) oraz zoptymalizowanie warunków hodowli wytypowanego szczepu grzyba keratynolitycznego, opartego na planach Box'a-Behnken'a w połączeniu z metodologią powierzchni odpowiedzi (ang. Response Surface Methodology RSM).

W celu prawidłowego wnioskowania przeprowadzono analizę wariancji i wielowymiarową analizę składowych głównych (PCA).

Przeprowadzone analizy wykazały, że spośród 491 szczepów grzybów wyizolowanych z próbek glebowych czterech różniących się właściwościami gleb uprawnych 264 reprezentowało grzyby keratynofilne, w tym 77% izolatów zostało sklasyfikowane jako grzyby niedermatofityczne z grupy *Chrysosporium* a 33% jako geofilne dermatofity. Na podstawie obliczonego współczynnika Simpsona największą różnorodnością gatunkową tych grzybów charakteryzował się czarnoziem. Wśród badanej grupy grzybów do najczęściej izolowanych należał gatunek *Chrysosporium keratinophilum* D.Frey ex J.W.Carmich. wraz ze stadium doskonałym *Aphanoascus fulvescens* (Cooke) Apinis. Wśród dermatofitów geofilnych izolowano najczęściej *Trichophyton ajelloi* (Vanbreus.) Ajello. Udowodniono istotnie dodatnią korelację pomiędzy występowaniem grzybów z gatunku *Chrysosporium keratinophilum* D.Frey ex J.W.Carmich. wraz ze stadium doskonałym *Aphanoascues fulvescens* (Cooke) Apinis a cechami fizyko-chemicznymi gleb tj. zawartością  $\text{CaCO}_3$  i przyswajalnym fosforem [1].

Wśród ogółu szczepów keratinomycetes pięć szczepów *Aphanoascus keratinophilus* (= *Chrysosporium keratinophilum*), zostało przez mnie wytypowanych do badań efektywności

procesu keratynolizy w warunkach laboratoryjnych. Amplifikacja regionów ITS1, 5.8S i ITS2 za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i sekwencjonowania nukleotydów ostatecznie zweryfikowała szczepy do gatunku *Aphanoascus fulvescens* (teleomorfa *Chrysosporium keratinophilum* wg kolekcji szczepów ATCC) a jeden jako *Chrysosporium articulatum* Scharapov (synonim MycoBank *Chrysosporium queenslandicum* Apinis & R.G.Rees) [2].

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdziłam, że wszystkie 5 wyselekcjonowanych szczepów grzybów w hodowlach stacjonarnych na podłożu, płynnym z dodatkiem 1% natywnych piór kurcząt, użytych jako jedyne źródło C, N, S i energii, cechuje się wysoką aktywnością keratynolityczną, co znalazło wyraz w wartościach badanych wskaźników aktywności enzymatycznej, pH podłoża pochodowlanego, uwalniania mineralnych ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) oraz organicznych (rozpuszczalne białko i peptydy) produktów keratynolizy. Zastosowana analiza składowych głównych (PCA) wykazała, że uwalnianie podczas keratynolizy dużych ilości jonów amonowych powoduje istotny wzrost pH podłoża oraz spowalnia aktywność proteazy i keratynazy. Natomiast spadek stężenia tych jonów aktywuje wydzielanie aktywnych enzymów proteo- i keratynolitycznych, rozpuszczalnych białek i peptydów oraz siarczanów [2].

Monitorowanie zmian aktywności enzymatycznej i stężenia mineralnych produktów keratynolizy pozwoliło mi także jednoznacznie stwierdzić, że jeden z testowanych szczepów *Aphanoascus fulvescens* (szczep B21/4-5) jest najbardziej efektywnym szczepem grzybów z grupy *Chrysosporium* w biodegradacji keratyny pierza kurcząt. Odnotowany wysoki ubytek odpadowej masy piór (65,90%) i wysoka aktywność keratynazy, uwalnianie dużej ilości białek oraz akumulacja jonów  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{NH}_4^+$ , stanowiły podstawę do wykorzystania tego szczepu jako modelu badawczego w badaniach optymalizacji warunków biodegradacji natywnej keratyny piór przez keratynolityczne chrysosporia [2].

Z uwagi na to, że ubytek masy piór jest najwyraźniej widocznym i ważnym z ekonomicznego punktu widzenia, współczynnikiem biodegradacji pierza odpadowego, który nie był do tej pory optymalizowany, parametr ten przyjąłam jako miarodajny, ekonomiczny i wiarygodny wyznacznik wydajności utylizacji-zagospodarowania pierza kurcząt za pomocą grzybów keratynolitycznych. Pomimo wzrastającego zainteresowania biodegradacją pierza kurcząt z literatury przedmiotu wiadomo było, że optymalizację warunków hodowli grzybów przeprowadzano jedynie w odniesieniu do aktywności keratynazy, jako wskaźnika wydajności procesu biodegradacji piór (Anbu i wsp., 2005; Liang i wsp., 2011), bez przedstawienia szczegółowych badań pod kątem efektywności ubytku masy pierza.

W badaniach własnych, warunki optymalizacji zaprojektowano na podstawie danych podanych przez Kushwaha (2000) dla szczepów z rodzaju *Chrysosporium*. Użyte narzędzie modelowe pozwoliło mi na przeprowadzenie serii doświadczeń na podstawie, których mogłam ocenić wpływ trzech niezależnych zmiennych takich jak pH podłoża hodowlanego, temperatura hodowli ( $^{\circ}\text{C}$ ) i ilości piór (g) na efektywność biodegradacji pierza odpadowego,

mierzonych procentowym ubytkiem jego masy przez wytypowany szczep *Aphanoascus fulvescens* B21/4-5.

Uzyskane w tej części pracy wyniki okazały się jeszcze bardziej zadowalające niż otrzymane wcześniej dane doświadczalne. Wykazały bowiem, że można jeszcze poprawić warunki hodowli szczepu *Aphanoascus fulvescens* B21/4-5 tak aby osiągnąć maksymalny ubytek masy substratu (71,08%) w pH 7,58 i temperaturze 28,7°C przy użyciu 1,4 g sterylnych piór kurcząt w kolbach Erlenmayera o pojemności 300 mL zawierających 100 mL pożywki [2].

*Wymiernym efektem przeprowadzonych doświadczeń jest propozycja użycia nowego szczepu grzyba keratynolitycznego dla celów przemysłowego przetwarzania wartościowej, odpadowej masy keratynowej oraz zaproponowanie wykorzystania hydrolizatów otrzymanych po biodegradacji pierza jako naturalnych czynników wzbogacających glebę ubogą w mineralne formy azotu i siarki.*

## ***Ad.2. Wykazanie nowych aspektów procesu kompostowania i możliwości zastosowania otrzymanych kompostów, ocenianych na podstawie przemian kompleksu ligninocelulozowego***

Pierze kurcząt obok przetwarzania przy udziale grzybów na hydrolizaty zawierające przyswajalne dla roślin azotowe i siarkowe składniki mineralne może być także kompostowane, co przedstawiono we wcześniejszych moich pracach doświadczalnych i pracy przeglądowej. Kompostowanie to przede wszystkim jednak proces przetwarzania materii organicznej o szerokim stosunku C:N, jakim są odpady roślinne. Jest to bowiem proces prowadzony przez drobnoustroje heterotroficzne wymagające znacznych ilości C-organicznego jako substratu.

Równoległe więc z prowadzonymi powyżej doświadczeniami, zajęłam się bogatymi w C-organiczny odpadami ligninocelulozowymi pod kątem wykorzystania ich potencjału aplikacyjnego. W literaturze przedmiotu można znaleźć wiele sposobów zagospodarowania odpadowej biomasy roślin uprawnych np. do produkcji bioetanolu czy biogazu, kompostowania lub ko-kompostowania wraz z innymi odpadami organicznymi. Obecnie zagospodarowanie odpadów poprzez kompostowanie prowadzone jest nie tylko na dużą skalę, ale także w ogródkach przydomowych (Vázquez i Soto, 2017). Władze miast i wiosek coraz częściej znaczną część swoich środków przeznaczają na ochronę środowiska m.in. poprzez promowanie właściwego zagospodarowania odpadów. Tak więc w wielu okręgach zakładane są kompostownie a w wielu ogródkach przydomowych pojawiają się kompostowniki. Obok tego są rejony w Europie jak np. w południowoschodniej Hiszpanii, gdzie zagospodarowanie odpadów, pochodzących z rolnictwa poprzez kompostowanie, staje się obowiązkową technologią i jest stopniowo wdrażane (Jurado i wsp., 2014).

O ile sama technologia kompostowania jest znana o tyle przemiany materii organicznej poddanej procesowi kompostowania nie są do końca przebadane bowiem w zależności od zastosowanych odpadów, mają różny charakter i przebiegają w różnym tempie. Nie mniej

jednak w każdej przymie kompostowej znajdują się odpady ligninocelulozowe, jako jedyna kompostowana biomasa lub są dodawane dla zrównoważenia stosunku C/N albo jako czynnik strukturotwórczy. Stopień biodegradacji ligninocelulozy zawartej w kompostowanej masie ligninocelulozowej zazwyczaj decyduje o potencjalnym wykorzystaniu tych kompostów jako środków użyźniających glebę (Zeng i wsp., 2018). Wprowadzenie niedojrzałych i niestabilnych kompostów do gleby wiąże się z indukcją procesów beztlenowych podczas, których wydzielają się związki toksyczne ( $H_2S$ ,  $NH_3$ ,  $N-NO_2$ ) dla korzeni roślin i wielu drobnoustrojów glebowych. Ponadto może dochodzić do akumulacji w glebie niecałkowicie utlenionych związków organicznych tj. kwasów alifatycznych i fenolowych, które mają działanie fitotoksyczne i mogą zakłócać kiełkowanie, wzrost korzeni i nadziemnych części roślin.

Za ważne, dla każdego procesu kompostowania w którym stosowane są odpady ligninocelulozowe, uznałam dogłębne poznanie przemian kompleksu ligninocelulozowego a w rezultacie uzyskanie informacji dotyczących przebiegu procesu kompostowania oraz dokonanie oceny końcowych produktów przemian, istotnych z punktu widzenia produkcji rolniczej i ogrodniczej a także ustalenia długości procesu kompostowania, co z kolei ma znaczenie ekonomiczne.

Dlatego tę część badań przedstawianych w osiągnięciu naukowym rozpatrywałam w ujęciu całościowym to jest w kontekście *przemian mikrobiologicznych* [jtkg<sup>-1</sup>s.m. grzybów mezofilnych (26°C) i termofilnych (50°C), bakterii mezo- (26°C) i termofilnych (50°C), grzybów ksylanolitycznych, ligninolitycznych, keratynolitycznych, celulolitycznych, drobnoustrojów proteolitycznych, bakterii celulolitycznych i promieniowców]; *dynamiki aktywności enzymatycznych* (aktywności oddechowej, dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, celulazy typu endo-glukanazy, proteazy, ureazy, peroksydaz, ksylanazy, dysmutazy ponadtlenowej, lakazy, keratynazy), *przemian chemicznych* (zmian pH, ulatnianie gazowego amoniaku i siarkowodoru, zawartości fenoli, pH, substancji organicznej, C-organicznej, N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>3</sub>, N-ogólnego, S-ogólnego, S-SO<sub>4</sub>, P-fosforu, K-potasu, Ca-wapnia, Mg-magnezu, Cd-kadm, Cr-chromu, Cu-miedzi, Fe-żelaza, Mn-manganu, Ni-niklu, Pb-ołowiu, Zn-cynku, suchej masy), *stanu sanitarnego* (*Salmonella*, jaja pasożytów) i *fitosanitarnego* (grzyby potencjalnie antagonistyczne i fitopatogenne) a także *fitotoksyczności* (test na kiełkowanie rośliny testowej *Lepidium sativum* L. oraz przyrost długości korzenia), mających wpływ na ocenę procesu kompostowania i wartość końcową produktu.

W celu prawidłowego wnioskowania, uzyskane wyniki opracowałam statystycznie stosując: analizę wariancji, analizę kolacji *r*-Pearsona na trzech poziomach istotności  $\alpha=0,05$ ;  $\alpha=0,01$ ,  $\alpha=0,001$ ; oraz wielowymiarową analizę składowych głównych (PCA).

#### *Model doświadczalny*

Materiałem użytym do badań była kora sosnowa, słoma pszenna, trawa i trociny, jako źródło C i energii dla drobnoustrojów oraz pióra kurcząt stanowiące dodatkowo źródło N. Kompostowanie odpadów ligninocelulozowych prowadziłam w warunkach laboratoryjnych,

zakładając doświadczenie modelowe w dwóch wariantach, każdy o stosunku C:N=25. Procentowa zawartość składników w wariantach kompostowych (I-PGSF i II-PSSF) została ustalona na podstawie zawartości C-organicznego i N-ogólnego w poszczególnych komponentach.

Pierwszy wariant kompostowy (kompost I) zawierał: 42,86% kory sosnowej, 34,28% trawy, 20,0% trocin i 2,86% piór kurcząt brojlerów.

Drugi wariant kompostowy (kompost II) zawierał: 25,54% kory sosnowej, 10,63% słomy pszennej, 51,07% trociny, 12,76% piór kurcząt brojlerów [3,4,5,6].

Kryterium doboru odpadów do kompostowania była z jednej strony skala ich powstawania a z drugiej właściwości strukturotwórcze i energetyczne przy uwzględnieniu stopnia dostępności, jako źródła C i energii dla drobnoustrojów. Onwosi i wsp. (2017) donoszą, że trociny i zrębki są materiałem strukturotwórczym i po wprowadzeniu do gleby poprawiają ich właściwości fizyczne oraz zwiększają zawartość materii organicznej. Kora cechuje się dodatkowo dobrymi właściwościami fitosanitarnymi (Hoiting i wsp., 1997) a także jak donosiła Kornilowicz -Kowalska i Bohacz (2001) ogranicza ulatnianie amoniaku podczas kompostowania materiału roślinnego z piórami. Wybór trawy a także słomy jako komponentów kompostów wiązał się także z większą ich dostępnością dla drobnoustrojów (Anderson i Atkin, 2008; Sorek i wsp., 2014). Ponadto składniki te odznaczały się różną zawartością azotu (słoma pszena 5,9 g kg<sup>-1</sup> s.m. i trawa 36,4 g. kg<sup>-1</sup> s.m.). Umożliwiło to zróżnicowanie zawartości piór w przygotowywanych obu wariantach kompostowych, dla których przyjęto taki sam stosunek C:N=25 (w wariacie z niższą zawartością piór, poziom azotu uzupełniano trawą).

#### *Przemiany mikrobiologiczne i enzymatyczne*

W badanych kompostach ligninocelulozowych mikrobiologiczne wskaźniki rozpatrywałam w odniesieniu do zmieniających się zakresów temperatury podczas kompostowania, co opisałam jako 6 faz biotermicznych różniących się stosunkowo niewielkimi zmianami temperatury. W kompoście I (PGSF) i II (PSSF) fazy 1, 2 trwały do 2 tygodnia kompostowania; faza 3 od 2 do 6 tygodnia. Fazy 4 i 5 miały różny czas trwania tj. od 6-10 tygodnia i 10-18 tygodnia w kompoście I oraz 6-14 i 14-18 tygodnia, odpowiednio w w kompoście II. Ostatnia 6 faza biotermiczna trwała w obydwu kompostach do 30 tygodnia. Monitorowanie temperatury kompostowanej masy wykazało obecność fazy termofilnej z maksimum temperatury 44°C w kompoście I i 40°C w kompoście II [4].

Poza opisanymi zmianami temperatury i wyodrębnionymi fazami biotermicznymi w badanych kompostach, zawierających trudnodegradowalną frakcję ligninocelulozy i keratyny, zaobserwowałam bardzo ciekawe zjawisko, podobne do zachodzącego w glebie a nie rozpatrywane dotąd w kontekście przemian materii organicznej w kompostach. Polegało ono na tym, że zapoczątkowanie rozkładu trudnodegradowalnej węglowej materii organicznej przez mikroorganizmy uzależnione było od dodatkowego łatwo dostępnego źródła C, kontrolowanego przez poziom azotu, co Fontaine i wsp. (2003) i Chen i wsp. (2014) nazywają

„priming effect” (PE). Innymi słowy rozkład trudnodegradowalnej materii organicznej jest poprzedzony wzrostem aktywności mikroorganizmów wykorzystujących łatwo dostępną materię organiczną.

Jako *novum* w odniesieniu do przemian mikrobiologicznych w kompostach uważam także odbiegające od dotychczasowego, spojrzenie na dynamikę rozwoju mikroorganizmów w kompostach ligninocelulozowych pozwalające wyróżnić 2 strategie ekologiczne drobnoustrojów, uwidocznione jako sukcesja grup pokarmowych [4]. Do pierwszej strategicznej grupy drobnoustrojów „first-strategist microorganisms” czyli nie wyspecjalizowanej pokarmowo, zaliczyłam mikroorganizmy wykorzystujące łatwiej dostępną frakcję organiczną ligninocelulozy i odpadów keratynowych, reprezentowaną przez mezofilne i termofilne bakterie i grzyby. Do drugiej strategicznej grupy drobnoustrojów “second-strategist of microorganisms” tj. mikroorganizmów wyspecjalizowanych pokarmowo zaliczyłam drobnoustroje proteolityczne, grzyby ksylanolityczne, keratynolityczne, celulolityczne bakterie i grzyby, grzyby ligninolityczne oraz promieniowce. Drobnoustroje te zaczęły się rozwijać wtedy, gdy łatwo dostępne substraty (np. cukry proste) zostały wyczerpane (spadek stężenia) czyli w 3 i 4 fazie biotermicznej tj. pomiędzy 2 a 6 oraz pomiędzy 6 a 10 tygodniem kompostowania, odpowiednio w kompoście I i II. Towarzyszyło temu istotne zmniejszenie dynamiki rozwoju niewyspecjalizowanych pokarmowo bakterii i grzybów mezofilnych i termofilnych co potwierdzało również słuszność postawionej tezy. Za przyczynę tego zjawiska uznałam także fakt, że łatwo dostępny azot uwalniany przez drobnoustroje proteolityczne, najliczniej występujące w kompostach, był immobilizowany przez mikroorganizmy w późniejszych fazach kompostowania zwłaszcza w obecności wysokiej zawartości C organicznego (zmniejszenie stężenia  $\text{NH}_4^+$ ). Istotna zaś korelacja pomiędzy wyspecjalizowanymi pokarmowo mikroorganizmami a aktywnością dehydrogenazy i aktywnością oddechową, szczególnie w kompoście I (PGSF), jasno wskazała na udział tych mikroorganizmów w inicjacji trudnodegradowalnej materii organicznej w kompostach ligninocelulozowych pomimo, że ilość wydzielonego  $\text{CO}_2$  pod koniec okresu kompostowania znacznie zmalała. Wiązało się to poniekąd także ze spadkiem pH, który działa selekcyjnie na naturalne zespoły drobnoustrojów. Dodatkowo, wysoka aktywność fosfatazy od końca 3 do połowy 6 fazy biotermicznej, (enzymu który jest akceptowalnym wskaźnikiem wielkości populacji drobnoustrojów), wskazała na wzrost liczebności drobnoustrojów wyspecjalizowanych pokarmowo. Pojawienie się promieniowców w 4 fazie biotermicznej w kompoście I (PGSF) mogło także świadczyć o pojawieniu się monomerów i oligomerów tworzonych po zainicjowaniu w fazie 3 rozkładu ligninocelulozy przez wyspecjalizowane pokarmowo drobnoustroje. Promieniowce są bowiem uznawane za biodegradatory prostszych połączeń ligniny [4].

Z sukcesją zespołów drobnoustrojów w kompostowanej masie sprzężona była sukcesja aktywności enzymatycznej co wiązało się z enzymatycznym dostosowaniem drobnoustrojów do składu substratowego kompostów [3,6]. Świadczył o tym wzrost aktywności celulazy typu endo-glukanaza (CA), powiązany z istotnym wzrostem aktywności ligninazy (LiP). Zbieżność

maksimów aktywności celulolitycznej (CA) oraz ligninazy (peroksydazy ligninowej) w kompoście I i II, wskazywała natomiast na postępujący rozkład kompleksu ligninocelulozowego. Przyjmując aktywność proteazy jako wskaźnik aktywności enzymów hydrolizujących wiązania peptydowe białek w kompostach ustalono, że w obu kompostach aktywność tego enzymu wzrastała aż do piątej fazy biotermicznej tj. do 14 tygodnia kompostowania co należy wiązać z syntezą biomasy mikroorganizmów [6]. Jest to zjawisko analogiczne do zmian zachodzących w glebie po wprowadzeniu dodatkowego źródła azotu, określane jako priming effect (Fontaine i wsp., 2003). Dodatek azotu w postaci białek piór do kompostów ligninocelulozowych aktywizuje bowiem populacje drobnoustrojów proteolitycznych a w konsekwencji powoduje nasilenie biologicznej sorpcji uwalnianych prostych źródeł azotu co prowadzi do namnażania drobnoustrojów w kompostowanej masie i w efekcie immobilizację tego składnika. Efekt ten przyczynia się do uruchomienia dalszych procesów rozkładu i mineralizacji kompostowanych materiałów organicznych co obejmuje przede wszystkim frakcje trudniej dostępnej ligninocelulozy, przy jednoczesnym spadku aktywności proteolitycznej a wzroście aktywności ureazy w (6 fazie biotermicznej) zarówno w kompoście I jak i II. Ze względu na znaczne ilości siarki organicznej (pióra kurcząt) w kompostowanych materiałach oznaczałam arylosulfatazę [6]. Enzym ten odgrywa ważną rolę w procesach mineralizacji siarki organicznej i udostępniania jej roślinom w formie siarczanów. Uzyskane wyniki wykazały, że w kompoście I o niższej zawartości S-organicznej (2,86% piór) aktywność tego enzymu rosła do końca 4 fazy biotermicznej. Natomiast w kompoście II (PSSF) zawierającym ponad 4 krotnie więcej tej komponenty aktywność tego enzymu rosła wolniej osiągając maksimum w 6 fazie biotermicznej, po czym gwałtownie spadła. Dynamika zmian aktywności tego enzymu miała zbliżony przebieg, zwłaszcza w kompoście I (PGSF), do aktywności proteazy w badanych kompostach. Sugerowałoby to równoległy przebieg proteolizy i mineralizacji S-organicznej piór podczas procesu kompostowania [6].

Z uwagi na to, że środowisko kompostowe charakteryzuje się różnorodnością substratów organicznych a to warunkuje uruchomienie bardziej złożonego układu enzymatycznego, postanowiłam prześledzić dynamikę aktywności enzymatycznej nie tylko w kompostowanej masie, ale i w ekstraktach wodnych kompostów [3]. Zeng i wsp. (2018) w swoich badaniach nad kompostowaniem odpadów ligninocelulozowych wykazali, że płynny rozwór zawierający kompleks enzymów, dodany do kompostów, nie tylko poprawia biodegradację substancji organicznej w tym trudnodegradowalnych materiałów, ale także promuje wzrost mikroorganizmów. Jak dotychczas ekstrakty wodne kompostów są mało zbadaną frakcją pomimo, że zawierają nie tylko enzymy, ale i produkty katabolizmu i anabolizmu drobnoustrojów. Stanowiło to dla mnie przesłankę, żeby w toku badań skupić się także na dynamice aktywności enzymów ligninolitycznych i związków niskocząsteczkowych w ekstraktach wodnych kompostów [3].

Opierając się na uzyskanych wynikach stwierdziłam, że spadek w pierwszych dwóch fazach biotermicznych stężenia glukozy był powiązany z aktywnością peroksydaz i oksydazy glukozy (GOD) w analizowanych ekstraktach wodnych [3]. Oksydaza glukozy odgrywa



kluczową rolę w łączeniu procesów degradacji ligniny, celulozy i ksylanu (Leonowicz i wsp., (2001). Wykazałam, że aktywność oksydazy glukozy w ekstraktach kompostu I wzrastała od końca fazy 3 i istotnie różniła się od początkowego okresu kompostowania. W kompoście II aktywność tego enzymu w ekstraktach była istotnie wyższa tylko na początku procesu kompostowania, co mogło być związane ze składem chemicznym masy kompostowej, która zawierała więcej trudnodegradowalnych polimerów organicznych. W późniejszym okresie aktywność tego enzymu utrzymywała się na podobnym poziomie. Taka dynamika, jak się okazało, ma związek z aktywnością lakazy (LAC) i ligninazy (LiP), która uwidoczniła się w późniejszym okresie kompostowania w przeciwieństwie do aktywności peroksydazy typu chrzanowego (HRP) [3]. Indukcja aktywności peroksydaz jak i lakazy oznaczanych w ekstraktach wodnych kompostów mogła być powodowana akumulacją produktów rozkładu ligniny uwalnianych pod wpływem działania oksydazy glukozy (Leonowicz i wsp. 1999, 2001). Dodatkowo wyraźna zbieżność w przebiegu aktywności lakazy i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w procesie kompostowania badanych odpadów ligninocelulozowych, świadczy o sprzężeniu reakcji katalizowanych przez te enzymy, polegających na usuwaniu przez SOD toksycznych anionorodników ponadtlenkowych ( $O_2^{\cdot-}$ ), powstałych w trakcie oksydacyjnej depolimeryzacji jednostek ligniny przez lakazę. Z uwagi na obecność grup metoksylowych w strukturze ligniny, jako wskaźnik biodegradacji mikrobiologicznej tego polimeru w kompostowanej masie, obok aktywności enzymów ligninolitycznych, przyjąłam również zmiany zawartości metoksyfenoli i hydroksyfenoli [3]. Jak podają Leonowicz i wsp. (2001) rozkład ligniny związany jest z powstawaniem niskocząsteczkowych związków fenolowych, metoksyfenolowych, aldehydów i metoksyaldehydów. Przeprowadzone badania własne wykazały, że populacje mikroorganizmów obecnych w kompostowanej masie powodowały zmiany w zawartości związków fenolowych w trakcie kompostowania odpadów ligninocelulozowych [3]. Aktywności enzymów uczestniczących w biodegradacji ligniny, jak również stężenie niskocząsteczkowych fenoli oraz wolnych rodników, generowanych w tym procesie utrzymywały się na wyższym poziomie w ekstraktach kompostu I niż II. Spostrzeżenie to wskazuje na intensywniejszy przebieg biodegradacji i biotransformacji ligniny w kompoście I. Wydaje się, że zasadniczą przyczyną tych różnic był ponad 4x niższy poziom biodostępnego azotu (białka keratynowe) w kompoście I, który silniej aktywizował enzymy ligninolityczne (peroksydazę i lakazę) w porównaniu z kompostem II. Poza opisanymi parametrami, ciekawe informacje otrzymałam obserwując przemiany komponenty keratynowej podczas kompostowania. W kompoście II (PSSF) zawierającym więcej pierza kurcząt (12,86%) i trudnodegradowalnej frakcji ligninocelulozy, rozkład komponenty białkowej był powolniejszy [3]. Świadczył o tym wzrost aktywności keratynazy uwidoczniiony dopiero pod koniec okresu kompostowania oraz niższe aktywności proteazy i ureazy [3,6]. Na odrębną uwagę zasługuje podobny wzrost aktywności keratynazy w ekstraktach wodnych w początkowej fazie kompostowania (1,2 faza) w obydwu wariantach kompostowych. Efekt ten może tłumaczyć fakt, że z piórami w początkowym okresie kompostowania zostaje wprowadzona pula dostępnego nie-keratynowego azotu, która uruchamia priming effect w

kompostach w tej frakcji. W początkowym okresie kompostowania azot potrzebny jest bowiem mikroorganizmom do syntezy białek strukturalnych i enzymatycznych (Tuomela i wsp., 2000). Nasilenie zaś keratynolizy w 6 fazie procesu kompostowania, kiedy istotnie rosła również ligninoliza mierzona wzrostem aktywności lakazy wskazuje na tworzenie substancji humusowych w ostatniej fazie kompostowania odpadów ligninocelulozowych.

#### *Ocena jakości użytkowej kompostów*

Biodegradacji materii organicznej podczas procesu kompostowania z udziałem wyspecjalizowanych grup drobnoustrojów towarzyszą zmiany chemiczne i fizyczne kompostowanej masy, które są wyznacznikiem użyteczności produktu końcowego, jakim jest dojrzały kompost. Do ważnych parametrów, służących ocenie produktu końcowego, jako środka nawożeniowego oraz strukturotwórczego, oznaczanych w badaniach własnych należały: właściwości fizyczne, zawartość makro – i mikroelementów, mineralnych form azotu i siarki, suma kationów zasadowych  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , całkowita pojemność wodna (CEC), wskaźnik humifikacji [ $\text{Q}_4:\text{Q}_6$  ( $\text{E}_4/\text{E}_6$ )] w kompostach i ich ekstraktów wodnych [3,5].

Przeprowadzone badania wykazały, że tempo mineralizacji C organicznego w kompoście I (PGSF), wzbogaconym dodatkiem łatwo dostępnej frakcji materii organicznej (trawa), było szybsze niż w kompoście II (PSSF), zawierającym głównie trudniej dostępne frakcje materii organicznej tj. trociny o wysokiej zawartości ligniny. Wyrażało się to dwukrotnie większym spadkiem zawartości C organicznego w obu kompostach odpowiednio o 32,0 % i 11,0 %. O różnicach w przemianach C organicznego świadczyły także różnice stosunku C:N otrzymanych kompostów wynoszące jak 15:1 i 20:1, odpowiednio w kompoście I i II przy C:N surowego kompostu jak 25:1. W świetle danych przedstawionych w pracy przeglądowej Onwosi i wsp. (2017) kwalifikuje to kompost I za „gotowy do użycia” po 30 tygodniowym okresie kompostowania.

Dodatkowo dobre właściwości fizyczne tj. połowa pojemność wodna, gęstość objętościowa i porowatość ogólna, otrzymanego produktu końcowego świadczą o dobrym jego napowietrzeniu oraz wskazują że jest to produkt lekki co jest ważne z punktu widzenia produkcji rolniczej, ogrodniczej oraz pod względem ekonomicznym [5].

Komposty powszechnie postrzegane są jako ważne źródło próchnicy. Stopień „dojrzenia” swoistych związków próchnicznych, mierzony całkowitą pojemnością sorpcyjną (w skrócie CEC) obu otrzymanych kompostów ligninocelulozowych: PGSF (kompost I) i PSSF (kompost II) był zaawansowany. Wykazano, że uzyskane wartości CEC zawierały się w granicach 75,45-106,15  $\text{cmol}(+)\cdot\text{kg}^{-1}$  (co jest równoważne  $\text{meq}/100\text{g}$  kompostu) i były niższe od CEC humusu (150  $\text{meq}/100\text{g}$ ) (Mathur i wsp. 1993) a suma kationów zasadowych:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  osiągała nieco wyższe wartości niż optymalne wartości sumy kationów wymiennych dla gleb. Intensywność procesu humifikacji w badanych kompostach odzwierciedlał współczynnik  $\text{Q}_4/\text{Q}_6$ . Przyjmując za Haddad i wsp. (2015), że niskie wartości  $\text{E}_4/\text{E}_6$  dowodzą wyższego stopnia aromatyzacji substancji humusowych a w konsekwencji dojrzałości kompostów uznano, że uzyskany produkt końcowy jeszcze nie

należał do w pełni dojrzałych. Autorzy Ci podają bowiem, że  $E_4/E_6$  powyżej 5 wskazuje na niższy stopień rozkładu kompostowanej masy oraz obecność kwasów fulwowych czyli labilnej frakcji substancji humusowych. Wartość tego ilorazu w kompoście I była niższa (9,02) niż w kompoście II (15,06), co świadczyłoby o większym stopniu dojrzałości [3]. Można więc przypuszczać, że tworzące się w badanych kompostach związki próchniczne „reprezentują” tzw. próchnicę kwaśną, w biogenezie której uczestniczą głównie grzyby.

Z uwagi na zastosowanie kompostów do celów nawozowych, końcowy produkt procesu kompostowania powinien zawierać także niezbędne dla roślin makro- i mikroelementy a także brak lub niskie zawartości metali ciężkich co ma wpływ na ich wartość aplikacyjną i w konsekwencji na oddziaływanie na rośliny i glebę. Wykazano, że zawartość N, P, K w biomacie obydwu otrzymanych kompostach I (PGSF) i II (PSSF) kształtowała się na poziomie zbliżonym lub wyższym niż przewidują to wymagania jakościowe nawozów organicznych, powstałych w wyniku kompostowania, podane w opracowaniu Ministerstwa Środowiska (2008). Zawartość analizowanych makroelementów (N, P, K, S, Ca, Mg) po zakończeniu kompostowania w kompostowanej masie uległa zwiększeniu w obu kompostach [5].

Przyjmując za niewystarczające dla oceny przebiegu procesu kompostowania zmiany zawartości makroelementów we frakcji stałej, przeprowadzone zostały również oznaczenia tych składników w wyciągach wodnych kompostów. Dodatkowym celem jakim przyświecał tym badaniom, była ocena wyciągów z kompostów jako potencjalnych środków do dolistnego stosowania. Zastosowanie ekstraktów do dolistnego odżywiania roślin (opryskiwanie) zmniejsza, jak wiadomo, zużycie nawozów i chemicznych środków ochrony roślin oraz zapobiega niedoborom żywieniowym roślin. Ekstrakty wodne kompostów zawierają bowiem rozpuszczalne polisacharydy i białka, enzymy i mineralne produkty rozkładu, których stężenie decyduje o aplikacji tych kompostów. Stwierdzono, że w końcowej fazie kompostowania (30 tydzień) stężenie wszystkich badanych makroelementów tj. N, P, K, Ca i Mg z wyjątkiem stężenia P uległo obniżeniu w kompoście I i były to wartości niższe niż podane w pracy Szewczuk i Sugier (2009) dla dolistnych nawozów wieloskładnikowych.

Zawartość metali ciężkich i pierwiastków śladowych Cd, Pb, Cr, Cu, Mn, Ni i Zn w badanych kompostach była niska, w większości znacznie niższa niż dopuszczalne ilości tych pierwiastków w kompostach podane w opracowaniu Ministerstwa Środowiska przez Departament Gospodarki Odpadami w Polsce (2008). Ponieważ wiadomo, że zawartość metali ciężkich we frakcji wodnej kompostów jest ważniejsza niż ogólne stężenie metali w kompostowanej masie (Tiquia, 2010) oraz, że wyekstrahowane związki chemiczne w ekstraktach wodnych kompostów mają istotny wpływ na kiełkowanie nasion, postanowiłam zbadać wpływ ekstraktów wodnych kompostów na kiełkowanie rzeżuchy siewnej *Lepidium sativum* L. i ocenić fitotoksyczność otrzymanych kompostów na podstawie wyliczonego germination index (GI). *Lepidium sativum* L. uważana jest za roślinę testową wrażliwą na toksyczne metabolity zaś germination index według wielu autorów jest czułym wskaźnikiem toksyczności kompostów. Tiquia (2010) podaje, że GI jest ściśle zależny od poziomu w ekstraktach wodnych kompostów rozpuszczalnych związków chemicznych. Oceny

fitotoksycznego oddziaływania kompostów (komposty 30 tygodniowe) dokonywałam w oparciu o wyniki testów kiełkowania nasion rzeżuchy *Lepidium sativum* L. (nasiona szybko kiełkujące) w obecności wzrastających stężeń (1-15%) wyciągów wodnych kompostów. Wykazałam, że wzrastające stężenia wyciągów wodnych kompostów nie wpływały znacząco na energię kiełkowania nasion. Po 4 dniach, w obecności wszystkich zastosowanych dawek, średni odsetek wykiełkowanych nasion był bardzo wysoki zarówno w kompoście I jak i II (odpowiednio 89-99% i 97-99%). Dodatkowo ustaliłam także, że w kompoście I (PGSF) indeks kiełkowania (GI) przyjmuje wartości od 70-195% a w kompoście II (PSSF) od 95-195%. W świetle badań Cui i wsp. (2017) którzy przedstawiają cztery stopnie fitotoksyczności kompostów (Poziom I-IV) ustalone w oparciu o wartości GI, badane komposty nie są fitotoksyczne, bo należą do poziomu I dla którego  $GI \leq 80$ . Potwierdziła to także przeprowadzona analiza składowych głównych PCA [5].

W kompostowanej masie po zakończeniu kompostowania rozpatrywałam także biologiczne czynniki dojrzałości, dokonując oceny stanu fitosanitarnego i sanitarnego kompostów [5]. Jak wykazałam otrzymane komposty są dobrej jakości pod względem fitosanitarnym co oceniałam na podstawie stosunku liczby grzybów potencjalnie antagonistycznych do potencjalnie fitopatogenicznych, wyizolowanych na początku wzrostu (termin 0) i po zakończeniu procesu kompostowania (30 tygodni). Wyrazem tego była dominacja grzybów potencjalnie antagonistycznych. Stosunek liczbowy tych grzybów do potencjalnych fitopatogenów na koniec kompostowania w kompoście I wynosił 15:1 a w kompoście II 59:1. Wśród grzybów potencjalnie fitopatogennych, wyizolowanych z kompostów uzyskano następujące gatunki: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. oraz *Fusarium oxysporum* Schltd.. Grzyby potencjalnie antagonistyczne reprezentowały takie gatunki jak: *Clonostachys rosea f. catenulata* (J.C. Gilman & E.V. Abbott) Schroers (dawniej *Gliocadium catenulatum*), *Penicillium* sp., *Trichoderma viride* Pers.. Do najliczniej występujących zaliczyć można *Trichoderma viride* w kompoście I i II oraz *Clonostachys rosea f. catenulata* w kompoście II – grzyby zaliczane do silnych antagonistów wielu fitopatogenów [5]. Jest to jedna z niewątpliwych zalet kompostów sporządzonych z kory drzew iglastych, która jest źródłem grzybów antagonistycznych i warunkuje odporność kompostów wobec patogenów odglebowych.

W trakcie procesu kompostowania odpadów lignocelulozowych wykazano ponadto zmniejszenie frekwencji *Aspergillus fumigatus* Fresen., zaliczanego do oportunistycznych patogenów człowieka [5].

Badane komposty cechowały się brakiem patogenicznych dla ludzi i zwierząt bakterii jelitowych oraz pasożytniczych robaków *Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura*. Fakt ten pozwala sądzić, że komposty sporządzone z odpadów lignocelulozowych z dodatkiem pierza kurzego są bezpieczne pod względem sanitarnym [5].

Za ważne z punktu widzenia wartości nawozowej kompostów, zwłaszcza w kontekście użycia natywnej keratyny piór bogatej w N i S-organiczną, uznałam także oznaczenie w kompostowanej masie i w ekstraktach wodnych kompostów zawartości mineralnych form tych

pierwiastków, przyswajalnych przez rośliny ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{S-SO}_4^{2-}$ ) [6]. Stwierdziłam, że w odniesieniu do przemian azotu w materiale stałym kompostów, wzrost stężenia  $\text{N-NO}_3$  oraz spadek stężenia  $\text{N-NH}_4$  przy jednoczesnym spadku poziomu  $\text{N}$ -ogólnego (zwłaszcza w kompoście I) wskazywał na postępujący rozkład i mineralizację złożonej materii organicznej a także postępującą dojrzałość kompostów. Obniżenie stężenia jonów amonowych podczas kompostowania jest rezultatem nitryfikacji, ulatniania amoniaku i immobilizacji przez mikroorganizmy, podczas rozkładu materii organicznej. W kompoście I zawierającym trawę straty azotu w formie gazowego amoniaku wynosiły od 0,5-1,6% azotu organicznego natomiast w kompoście II od 0,1 do 2,0%. Zjawisko to dowodzi intensywnej amonifikacji białek piór w kompoście I, mimo ich 4,5 krotnie mniejszej zawartości w porównaniu z kompostem II (odpowiednio 2,85% i 12,76%). Odnotowany efekt świadczył o dużym zapotrzebowaniu na azot populacji drobnoustrojów kompostu I, spowodowanym większą zawartością łatwo dostępnego  $\text{C}$  organicznego (trawa). Natomiast w kompoście II, z większą zawartością pierza, wzmożone ulatnianie amoniaku zaznaczyło się jedynie w początkowym okresie kompostowania (faza 1,2), kiedy to była jeszcze pewna ilość prostych źródeł węgla, zawartych w kompostowanych odpadach, przyczyniająca się do intensywnego wzrostu drobnoustrojów a więc biologicznej sorpcji  $\text{N}$ -amonowego. W niniejszych badaniach także wykazano korelacje ( $\alpha=0,05$ ) pomiędzy temperaturą a ulatnianiem amoniaku, na poziomie 0,729 i 0,761 \*\*\* odpowiednio w kompoście PGSF i PSSF [6]. Wzrost odczynu kompostowanej masy do obojętnego przez 3 fazy biotermiczne, zwłaszcza w kompoście I [3], dodatkowo nasilał ten proces .

Poza azotem, siarka jest jednym z ważniejszych pierwiastków biogenych, który uczestniczy w metabolizmie roślin, m.in. jako składnik enzymów uczestniczących w procesie fotosyntezy (Droux, 2004) a słabe odżywianie roślin siarką skutkuje słabym pobieraniem azotu z gleby. Wysoka zawartość aminokwasów siarkowych w białkach keratynowych skłaniała także do zbadania poziomu siarczanów jako produktów mikrobiologicznej transformacji przemian siarki organicznej, ważnych w żywieniu roślin. Stwierdziłam, że podczas kompostowania odpadów ligninocelulozowych z odpadami keratynowymi akumulacja siarczanów w kompoście I (PGSF) była wyższa niż w kompoście II (PSSF). Przyjmując, że siarczany mogą być wskaźnikiem dojrzałości kompostów w których odpady keratynowe są składnikiem kompostowym (Bohacz i Kornilowicz-Kowalska, 2007) w świetle uzyskanych danych ustaliłam, że w kompostach o niskiej zawartości piór, jak kompost I, parametr ten nie może być brany pod uwagę w ocenie dojrzałości kompostu, gdyż poziom tych związków spadał w trakcie kompostowania w obu frakcjach: wodnej i stałej. Natomiast w kompostach z większym udziałem pierza, jak kompost II, zawartość siarczanów można uznać za wskaźnik biodegradacji komponenty keratynowej i wskaźnik dojrzałości, ponieważ poziom tego składnika wzrasta, aczkolwiek nie w sposób ciągły [6].

Wydaje się, że jest to ważna informacja nie tylko w odniesieniu do glebowego stosowania kompostów, otrzymanych z materiałów ligninocelulozowych oraz natywnej keratyny piór, ale także jako preparatów dolistnych w postaci ekstraktów wodnych. Z

nielicznych doniesień literaturowych (Tea i wsp. 2004) na ten temat wiadomo, że dokarmianie dolistne roślin siarką i siarczanami ma istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju roślin. Cytowani autorzy uważają, że wiązane przez siarczany mikroelementy są łatwiej dostępne, tańsze i mniej szkodliwe dla roślin niż w postaci innych soli. Dlatego ekstrakty wodne badanych kompostów, mogą być rozpatrywane jako spreje w dolistnym odżywianiu roślin, zwłaszcza ekstrakty wodne kompostów o wyższej zawartości S organicznej i mineralnej, takie jak kompost II [6].

*Wymiernym efektem tej części badań jest dogłębna ocena przemian kompleksu ligninocelulozowego i białka keratynowego podczas kompostowania, wyjaśnienie mechanizmu biodegradacji tej złożonej materii organicznej, podobnego do priming effect w glebie oraz propozycja użycia kompostów ligninocelulozowych i ich ekstraktów wodnych do zastosowania w rolnictwie i ogrodnictwie do glebowo i jako środków do dolistnego dokarmiania roślin.*

#### **Najważniejsze rezultaty naukowe wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. Odpadowe pierze kurcząt ze względu na wysoką zawartość azotu i siarki stanowi wartościowy odpad organiczny o dużym potencjale nawożeniowym i dlatego powinno być zagospodarowane dla celów produkcji roślinnej, po uprzedniej mykologicznej biodegradacji z wykorzystaniem aktywnych szczepów grzybów keratynolitycznych.
2. Ocena gleb uprawnych różniących się właściwościami fizyko-chemicznymi pod kątem pozyskiwania aktywnych keratynolitycznie szczepów grzybów wyłoniła czarnoziem-glebę zasobną w materię organiczną,  $\text{CaCO}_3$  i przyswajalny fosfor, zasiedlaną przez keratynolityczne chrysozporia tj. *Chrysosporium keratinophilum* i jego stadium doskonale *Aphanoascus fulvescens*, jako środowisko sprzyjające występowaniu aktywnych keratynolitycznie szczepów grzybów.
3. Spośród wyselekcjonowanych z w/w gleby keratynolitycznych szczepów z grupy *Chrysosporium* jeden: *A. fulvescens* B21/4-5, odznaczał się najwyższą efektywnością biodegradacji natywnej keratyny piór, mierzonych ubytkiem masy tego substratu, akumulacją w podłożu produktów keratynolizy: rozpuszczalnego białka i peptydów oraz  $\text{N-NH}_4^+$  i  $\text{S-SO}_4^{2-}$ . Optymalizacja warunków hodowli tego szczepu grzyba (różne pH podłoża, temperatura hodowli i ilość piór kurcząt) oparta na statystycznym modelu Boxa-Behnkena łącznie z Response Surface Methodology (RSM) zwiększyła efektywność procesu biodegradacji keratyny piór, mierzonej najbardziej miarodajnym i ekonomicznym wskaźnikiem jakim jest ubytek masy piór.
4. Otrzymane grzybowe hydrolizaty natywnej keratyny piór, z uwagi na zawartość przyswajalnych dla roślin mineralnych form N i S oraz N-organicznego łatwo hydrolizującego (rozpuszczalne białko i peptydy), aktywizującego drobnoustroje

glebowe, posiadają potencjalną wartość aplikacyjną, jako preparaty nawożeniowe, zwłaszcza dla roślin o wysokich wymaganiach pod względem siarki.

5. Trudnodegradowalna w postaci odpadów drzewnych biomasa ligninocelulozowa ze względu na wysoką zawartość węgla organicznego, szeroki stosunek C:N i duży potencjał humusotwórczy może być przekształcana w kompost o dużym potencjale nawożeniowym i strukturotwórczym.
6. Proces kompostowania odpadów ligninocelulozowych można podzielić na 6 faz biotermicznych, różniących się zakresem temperatur oraz pod względem przemian mikrobiologicznych, biochemicznych i chemicznych. Stosunkowo niskotemperaturowy przebieg fazy termofilnej (40-44°C) w tych kompostach, odmiennie niż w większości procesów kompostowania ogranicza ulatnianie amoniaku, pochodzącego z rozkładu białek piór, zmniejszając straty azotu.
7. Mechanizm rozkładu ligninocelulozy w kompostach o różnym składzie ilościowym i jakościowym komponent użytych do kompostowania, jest podobny do zjawiska zachodzącego w glebie określanego jako priming effect. Efekt ten wiąże się z sukcesją dwóch grup drobnoustrojów o odmiennej strategii ekologicznej: niewyspecjalizowanych i wyspecjalizowanych pokarmowo i jest sprzężony z indukcją rozkładu złożonej ligninocelulozy, kontrolowanej poziomem azotu i łatwo dostępnego węgla. Wyczerpywanie zawartości łatwo dostępnego źródła C (glukoza) i N w obu kompostach stymulowało rozkład ligniny co wyrażało się w aktywności enzymów ligninolitycznych, zmianie poziomu fenoli i wolnych rodników.
8. Przeprowadzone badania wykazały różnice w liczebności drobnoustrojów, ich aktywności enzymatycznej oraz zawartości poszczególnych składników chemicznych w zależności od składu substratowego kompostów oraz analizowanej frakcji kompostu tj. masa kompostowa oraz ekstrakty wodne kompostów.
9. Wykazano, że wyższa aktywność enzymów uczestniczących w biodegradacji ligninocelulozy i keratyny pierza, jak również stężenie niskocząsteczkowych fenoli i wolnych rodników, mierzonych w ekstraktach wodnych kompostów, wskazuje na intensywniejszy przebieg biodegradacji i biotransformacji ligniny w kompoście z większą zawartością łatwiej dostępnego węgla organicznego (kompost I) w porównaniu z kompostem zawierającym trudniej dostępną frakcję tego składnika (kompost II).
10. Ustalono, że sprzężenie aktywności enzymów ligninolitycznych z zawartością niskocząsteczkowych związków fenolowych, aktywnością keratynazy i poziomem substancji peptydowych może wskazywać na syntezę substancji humusowych,

zwłaszcza w ostatniej fazie kompostowania, co ostatecznie znalazło potwierdzenie w wartościach współczynnika humifikacji  $E_4/E_6$  produktu końcowego.

11. W badanych kompostach ligninocelulozowych, po 7 miesięcznym okresie kompostowania, zawartość makro- i mikroelementów oraz stężenia mineralnych form azotu i siarki tj.  $N-NO_3^-$ ,  $N-NH_4^+$  i  $S-SO_4^{2-}$  wskazywały na postępujący proces mineralizacji substancji organicznej i osiągnięcie dojrzałości kompostów, co wyrażało się wzrostem stężenia  $N-NO_3^-$  oraz spadkiem stężenia  $N-NH_4^+$ . Na odrębne podkreślenie zasługuje nagromadzenie w otrzymanych kompostach siarczanów zwłaszcza wysokie w kompoście wzbogaconym większą ilością piór (kompost II) co jest szczególnie wartościowe w kontekście nawożenia gleb ubogich w siarkę oraz nawożenia roślin o dużym zapotrzebowaniu na siarkę.
12. Otrzymane komposty charakteryzują się dobrymi właściwościami fizycznymi co zapewnia utrzymanie dobrych stosunków powietrzno-wodnych, bardziej ustabilizowanym stosunkiem C:N, zwłaszcza w kompoście I, zbliżonym do C:N próchnicy (15:1), zawartością substancji organicznej i przyswajalnych dla roślin form azotu i siarki zarówno w kompostowanej masie jak i w ekstraktach wodnych kompostów. To ostatnie stwierdzenie, wskazuje dodatkowo na możliwość zastosowania ekstraktów kompostów w dolistnym dokarmianiu roślin.
13. Otrzymane komposty są bezpieczne pod względem sanitarnym, nie hamują kiełkowania nasion rośliny testowej *Lepidium sativum* L i nie są fitotoksyczne [współczynnik kiełkowania (GI) od 70-195%].
14. Badane komposty charakteryzują się bardzo dobrym stanem fitosanitarnym, uwarunkowanym dominacją grzybów antagonistycznych, zwłaszcza w kompoście z większą ilością odpadów drzewnych (kompost II) co ma znaczenie dla utrzymania lub poprawy zdrowotności gleb.



**Literatura**

- Anbu P., Gopinath S.C.B., Hilda A., Lakshmi Priya T., Annadurai G. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme Microb. Technol.*, 36: 639-647.
- Anderson W.F., Akin D.E. 2008. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 355-366.
- Bernal M.P., Alburquerque J.A., Moral R., 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technol.*, 100: 5444-5453.
- Bohacz J., Kornilowicz-Kowalska T. 2007. Choice of Maturity Indexes for feathers-Plant Material Composts on a Base of selected Microbiological and Chemical Parameters- Preliminary research. *Polish J. Environ. Stud.*, Vol.16, no.2 A, Part III, s. 719-725.
- Chen R., Senbayram M., Blagodatsky S., Myachina O., Dittert K., Lin X., Blagodatskaya E., Kuzyakov Y., 2014. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biol.*, 20: 2356-2367.
- Cui H.-Y., Zhao Y., Chen Y.-N., Zhang X., Wang X.-Q., Lu Q., Jia L.-M., Wei Z.-M. 2017. Assessment of phytotoxicity grade during composting based on EEM/PARAFAC combined with projection pursuit regression. *J. Hazard. Mater.*, 326: 10-17.
- Denisiuk W., 2008. Straw-mass and Energy potentials. *Inżynieria Rolnicza* 2: 23-29.
- Droux M., 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth Res.*, 79: 331-348.
- Fontaine S., Mariotti A., Abbadie L. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biol. Biochem.*, 35: 837-843.
- Haddad G., El-Ali F., Mouneimne A.H. 2015. Humic matter of compost: Determination of humic spectroscopic ratio ( $E_4/E_6$ ). *Curr. Sci. Int.*, 4: 56-72.
- Hoitink H.A.J., Stone A.G., Han D.Y. 1997. Suppression of plant diseases by composts. *HortScience* 32: 184-187.
- Jakubus M. 2015. Management of biodegradable wastes in the light of polish and european obligatory legislation. *Nauka Przyr. Technol.* 9, 4, #52.
- Jurado M.M., Suárez-Estrella F., Vargas-García M.C., López M.J., López-González J.A., Moreno J. 2014. Evolution of enzymatic activities and carbon fractions throughout composting of plant waste. *J. Environ. Manag.*, 133: 355-364.
- Kornilowicz-Kowalska T., Bohacz J. 2001. Ocena skuteczności dwóch różnych sposobów ograniczania strat azotu podczas mikrobiologicznego rozkładu odpadów pierza. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 477: 381-388.
- Kornilowicz-Kowalska T., Bohacz J. 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manage.*, 31(8): 1689-1701.
- Kowalczyk K., Kołodziej B., Kornilowicz-Kowalska T., Bohacz J., Leśniewska-Nowak J., Nowak M., Okoń S., Matras-Bolibok A., Zapalska M. 2014. Bioproducts for agriculture and environmental protection. *Wyd. Perfekta, Polska, ISBN 978-83-63657-43-7.*
- Kuhad R.C., Chandna P., Singh L., Singh A. 2011. Composting of lignocellulosic waste material for soil amendment, [w:] Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R.C. (Eds.), *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol. Soil Biology* 28, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 107-128.
- Kushwaha R.K.S. 2000. The genus *Chrysosporium*, its physiology and biotechnological potential. [w:] Kushwaha R.K.S., Guarro J (ed) *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, 1st edn. *Revista Iberoamericana de Micología (Suppl.)* Bilbao, Spain, s. 66-76.
- Lasekan A., Bakar F.A., Hashim D. 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Manage.*, 33: 552-565.
- Leonowicz A., Grzywnowicz K. 1981. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb. Tech.*, 3: 55-58.

- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtaś-Wasilewska M., Cho N.S., Hofrichter M., Rogalski J. 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 27: 175-185.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic. Microb.* 41: 183-225.
- Liang J.D., Han Y.F., Zhang J.W., Du W., Liang Z.Q., Li Z.Z. 2011. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. *J. Appl. Microbiol.*, 110: 871-880.
- Mathur S.P., Owen G., Diné H., Schnitzer M. 1993. Determination of compost biomaturity. I. Literature Review. *Biol. Agric. Hortic.*, 10: 65-85.
- Ministry of the Environment. Department of Waste Management. 2008: Guidelines on requirements for composting, fermentation and mechanical and biological treatment of wastes (according to the legal status as of December 15), Warsaw [https://www.mos.gov.pl/g2/big/2009\\_07/ffc492d741b261340b1e263cd1c05c85.pdf](https://www.mos.gov.pl/g2/big/2009_07/ffc492d741b261340b1e263cd1c05c85.pdf)
- Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban S. 1998. A review: Potentials for applications of keratin- degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technol.*, 66: 1- 11.
- Onwosi C.O., Igbokwe V.C., Odimba J.N., Ifeanyichukwu E.E., Nwankwoala M.O, Iroh I. N., Ezeogu L.I. 2017. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *J. Environ. Manage.*, 190: 140-157.
- Rabemanolontsoa H., Saka S. 2016. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technol.*, 199: 83-91.
- Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, 27: 185-194.
- Song Q., Li J., Zeng X. 2015. Minimizing the increasing solid waste through zero waste strategy. *J. Clean. Prod.*, 104: 199-210.
- Sorek N., Yeats T.H., Szemenyei H., Youngs H., Somerville C.R. 2014. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. *BioScience*, 64: 192-201.
- Szewczuk Cz., Sugier D. 2009. General characteristics and types of foliar fertilizers offered on the Polish market. *Annales UMCS sec E Agriculture*, 64: 29-36.
- Szostak A., Ratajczak E. 2003. Wood waste resources in Poland (industrial wastes, postconsumer waste) *Czysta Energia*, 6: 21-23.
- Tea I., Genter T., Naulet N., Boyer V., Lummerzheim M., Kleiber D. 2004. Effect of foliar sulfur and nitrogen fertilization on wheat storage protein composition and dough mixing properties. *Cereal Chem.*, 81: 759-766.
- Tiquia S.M. 2010. Reduction of compost phytotoxicity during the process of decomposition. *Chemosphere*, 79: 506-520.
- Tuomela M., Vikman M., Hatakka A., Itävaara M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technol.*, 72: 169-183.
- Vázquez M.A., Soto M. 2017. The efficiency of home composting programmes and compost quality. *Waste Manage.*, 64: 39-50.
- Zeng Z., Guo X., Xu P., Xiao R., Huang D., Gong X., Cheng M., Yi H., Li T., Zeng G. 2018. Responses of microbial carbon metabolism and function diversity induced by complex fungal enzymes in lignocellulosic waste composting. *Sci. Total Environ.*, 643: 539-547.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

W ogólnym ujęciu moje zainteresowania naukowo-badawcze przez cały okres mojej pracy zawodowej dotyczyły dwóch obszarów nawzajem się uzupełniających a mających istotne znaczenie dla szeroko pojętej praktyki rolniczej.

- Pierwszy dotyczył biologii i ekologii grzybów ze szczególnym uwzględnieniem grzybów keratynofilnych
- Drugi dotyczył mikrobiologicznego zagospodarowywania odpadów organicznych w tym wykorzystania dla tych celów grzybów.

Wymienione główne nurty badawcze zostały podzielone na szczegółowe grupy problematyczne i omówione poniżej jako osiągnięcia przed i po uzyskaniu stopnia doktora.

### 5 A. Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Działalność naukową rozpoczęłam już w czasie studiów realizując zadania badawcze dotyczące enzymatyki grzybów wyższych. Wyniki eksperymentalne w trakcie wykonywania pracy magisterskiej stały się podstawą do zgłoszenia komunikatu na dorocznym zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie (1996r.) (Załącznik 3, III.B.2) a także na Międzynarodowym Sympozjum z zakresu biotechnologii drewna i pulpy drzewnej w USA (Załącznik 3, III.B.1). Brałam także udział w pracach badawczych Studenckiego Koła Naukowego Biochemików oraz w obozach naukowych na Półwyspie Helskim pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Elżbiety Dernałowicz-Malarczyk.

Będąc pod wrażeniem wiedzy i zaangażowania Pani Profesor Elżbiety Dernałowicz-Malarczyk w rozwiązywanie słabo poznanych problemów naukowych, za Jej przykładem, głównym obszarem badawczym w całym okresie mojej pracy naukowej stała się biotechnologia środowiska i biotechnologia grzybów.

W początkowych latach pracy naukowej w Katedrze Mikrobiologii Rolniczej (obecnie Katedra Mikrobiologii Środowiskowej) zostałam włączona w jeden z głównych nurtów badań prowadzonych w jednostce a mianowicie w badania dotyczące biodegradacji odpadowej biomasy organicznej przy udziale mikroorganizmów glebowych a przede wszystkim grzybów strzępkowych. Badania prowadzone pod kierunkiem Pani Profesor Teresy Kornilowicz-Kowalskiej utwierdziły mnie w przekonaniu, że grzyby stanowią nie tylko integralną część naturalnych środowisk i odgrywają istotne znaczenie w rozkładzie złożonej materii organicznej, ale przede wszystkim mogą być aplikowane w różnych gałęziach przemysłu jako efektywne biokatalizatory.

W tym okresie pracy skoncentrowana byłam na uczeniu się, a w dalszych latach na doskonaleniu warsztatu badawczego na który składało się:

- Opanowanie metodyki pomiaru aktywności enzymatycznej w środowiskach naturalnych jak gleba, kompost,

- Opanowanie technik pomiaru aktywności enzymatycznej w czystych kulturach mikroorganizmów przy wykorzystaniu metod spektrofotometrycznych i testów API
- Opanowanie technik elektroforetycznych oraz techniki oczyszczania białek
- Opanowanie metod izolacji mikroorganizmów wyspecjalizowanych pokarmowo i identyfikacji gatunkowej grzybów z zastosowaniem tradycyjnych i molekularnych metod
- Opanowanie metod statystycznych i wykorzystania programów komputerowych do opracowania wyników badań.

Nabyte umiejętności z zakresu technik pomiarowych i metod stosowanych w mikrobiologii i mikrobiologii środowiska, pozwoliły mi zgłębiać wiedzę i poszerzać zainicjowane i rozpoznane przez Panią Profesor Teresę Korniłowicz-Kowalską badania z obszaru biologicznych sposobów zagospodarowania odpadowej masy piór.

Pierwsze moje współautorskie prace badawcze dotyczyły wyjaśnienia trzech słabo dyskutowanych wcześniej w literaturze przedmiotu zagadnień badawczych realizowanych w ramach działalności statutowej w Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej.

**1. Badania mające na celu wskazanie określonych suplementów organicznych i nieorganicznych, dodawanych do hodowli grzybów keratynolitycznych mogących przyspieszyć proces keratynolizy a zarazem zmniejszyć straty azotu organicznego.**

Badania prowadzone były w hodowlach grzybów keratynolitycznych *Aphanoascus fulvescens* (Cooke) Apinis, *Anixiopsis stercoraria* EC.Hansen, *Chrysosporium asperatum* J.W.Carmich. i *Chrysosporium kreiselii* Dominik zawierających w jednym wariacie pióra kurcząt brojlerów jako jedyne źródło węgla, azotu, siarki i energii oraz w drugim wariacie wzbogacone 2% glukozą (Załącznik 3, II.D.1). Drugi model badawczy zawierał pióra brojlerów wymieszane z piaskiem kwarcowym z dodatkiem gliny oraz pióra brojlerów wymieszane z korą sosnową (Załącznik 3, II.D.2). Te dwie ostatnie kombinacje wzbogacone były solami magnezu i fosforu oraz zaszczepione grzybem keratynolitycznym *Arthroderma quadridum* C.O.Dawson & Gentles. W badanych układach doświadczalnych analizowano biodegradację keratyny pierza przez grzyby w oparciu o oznaczanie aktywności oddechowej, proteolitycznej, uwalniania gazowego amoniaku, mineralnych form azotu, siarki oraz pomiar pH. Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek łatwo przyswajalnego źródła węgla i energii jakim jest glukoza do hodowli grzybów keratynolitycznych, pomimo przyspieszenia wzrostu grzybni i procesów oddechowych spowolnił tempo keratynolizy, czego dowodem było obniżenie aktywności proteolitycznej. Jednakże suplementacja glukozą nie spowodowała obniżenia uwalniania mineralnych form azotu i siarki co było istotne z punktu widzenia praktycznej oceny procesu keratynolizy (Załącznik 3, II.D.1). I co najważniejsze: wykazano, że suplementacja hodowli grzybów łatwo przyswajalnym źródłem węgla i energii a także gliny i kory sosnowej znacząco obniża straty azotu w formie gazowej (amoniak) oraz przeciwdziała ulatnianiu tego toksycznego związku. Dodatkowo wykazano, że dodatek kory sosnowej przyspieszał keratynolizę i amonifikację odpadów pierza (Załącznik 3, II.D.2). Uzyskane dane

były na tyle znaczące, że stały się inspiracją do podjęcia kolejnego wyzwania naukowego dotyczącego zagospodarowywania odpadów keratynowych na cele użytkowe.

## **2. Określenie wpływu różnych glebowych czynników fizyko-chemicznych na występowanie grzybów keratynolitycznych w glebie.**

W oparciu o dane literaturowe oraz o wyniki z powyżej przedstawionych prac własnych wiadomo było, że obecność populacji mikroorganizmów i ich aktywność biologiczna nieodłącznie wiąże się z zawartością materii organicznej i właściwościami chemicznymi środowiska bytowania. Niewiele było jednak doniesień naukowych, które informowały o istotnych zależnościach pomiędzy abiotycznymi parametrami środowiska wzrostu drobnoustrojów a występowaniem różnych grup mikroorganizmów wyspecjalizowanych w rozkładzie trudnodostępnych frakcji glebowej substancji organicznej. Podjęte badania skoncentrowano na ustaleniu korelacji pomiędzy częstością występowania i rozmieszczeniem w glebach uprawnych grzybów keratynolitycznych wyspecjalizowanych w rozkładzie natywnej keratyny a wybranymi właściwościami tych gleb. Wytypowano 17 gleb różniących się parametrami fizyko-chemicznymi tj. gleby biellicowe, brunatne, czarnoziemy, czarne ziemie, mady i rędziny z terenu środkowo-wschodniej Polski (Załącznik 3, II.D.4).

Wyniki tych doświadczeń wykazały, że frekwencja występowania w glebach grzybów keratynofilnych uwarunkowana jest przede wszystkim poziomem frakcji o  $\phi$  0,02mm. Stwierdzono przy tym, że częstość występowania populacji dermatofitów geofilnych, najsilniejszych destruentów natywnej keratyny w glebie, jest ujemnie istotnie skorelowana z zawartością  $\text{CaCO}_3$  co wskazywało na preferencję gleb kwaśnych. Natomiast grupa chrysosporium (określenie umowne dla pokrewnej dermatofitom geofilnym grupy grzybów keratynofilnych) (*Ctenomyces serratus* Eidam, *Chrysosporium keratinophilum* D.Frey ex J.W.Carmich., *Ch. pannicola* (Corda) Oorschot & Stalpers, *Ch. tropicum* J.W.Carmich., *Ch. tuberculatum* Dominik) była istotnie dodatnio skorelowana z zawartością azotu ogólnego, zawartością próchnicy i pH gleby. Ustalono także niektóre korelacje między występowaniem określonych gatunków a właściwościami badanych gleb np. poziomem próchnicy, fosforu, węglanu wapnia i pH gleby. Znajomość ekologii tych grzybów okazała się przydatna do podjęcia rozwiązania problemu środowiskowego dotyczącego zagospodarowania i utylizacji odpadów keratynowych (Załącznik 3, II.D.4).

## **3. Wstępna ocena zastosowania micromycetes jako szczepionek w przetwarzaniu odpadów keratynowych**

Z literatury przedmiotu wiadomo było, że z produktów ubocznych powstających podczas przetwórstwa zwierząt rzeźnych oraz drobiu w tym pierza kurcząt wytwarzane są za pomocą termohydrolizy mączki na cele paszowe, które charakteryzują się niskim współczynnikiem strawności podstawowych dla ptactwa domowego aminokwasów. Zaś inne chemiczne sposoby zagospodarowania pierza wiązały się z dodatkowymi nakładami finansowymi co z punktu widzenia ekonomicznego nie było opłacalne. Moje zainteresowanie biologicznym zagospodarowaniem odpadów keratynowych wynikało nie tylko z braku

szerszych doniesień naukowych na temat bardziej racjonalnej metody ich utylizacji, ale jednocześnie i bardziej bezpiecznej dla zdrowia zwierząt i ludzi. Wiązało się to z pojawieniem wymogów prawnych w krajach Unii Europejskiej. Rada Unii Europejskiej 22 maja 2001 roku wprowadziła rozporządzenie EC 999/2001 w sprawie sposobów kontroli, usuwania i niszczenia produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego o wysokim stopniu zagrożenia dla ludzi i Rozporządzenie EC 1774/2002 z dnia 3 października 2002 roku (obecnie zastąpione przez Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009), które zawierało przepisy w zakresie zbierania, przerobu oraz wykorzystania lub utylizacji wszystkich rodzajów produktów ubocznych z produkcji zwierzęcej. Wspomniane aspekty ekonomiczne i prawne skłoniły mnie do poszukiwania przyjaznych środowisku metod zagospodarowywania odpadów keratynowych z udziałem mikroorganizmów. Z uwagi na ogromne ilości odpadów pierza kurcząt jako produktu ubocznego z chowu i przetwórstwa drobiu, skoncentrowałam się na mikrobiologicznym przetwarzaniu tych odpadów keratynowych. Rozpoznawcze doświadczenia miały na celu poszukiwanie najbardziej optymalnych warunków utylizacji pierza odpadowego poprzez ich kompostowanie. W tym celu zostały zastosowane plastikowe pojemniki, które zawierały 1280 g kompostowanego materiału tj. pierza kurcząt i kory sosnowej z dwoma wariantami inokulacji (tylko grzybem keratynolitycznym *Arthroderma quadrifidum* C.O. Dawson & Gentles oraz *Arthroderma quadrifidum* C.O. Dawson & Gentles i grzybem ligninolitycznym *Geotrichum* sp. oznaczonym później jako stadium anamorficzne typu *Geotrichum-like* podstawczaka *Bjerkandera adusta* (Willd.) P.Karst.) (Załącznik 3, II.D.3). W wyniku wstępnych prac nad kompostowaniem pierza odpadowego wykazano, że o ile sam proces kompostowania może być skutecznym sposobem utylizacji trudnodegradowalnych odpadów o tyle inokulacja kompostowanej masy grzybami pochodzenia glebowego o silnych uzdolnieniach keratynolitycznych lub ligninolitycznych nie przyspiesza przemian materii organicznej w badanych kompostach (Załącznik 3, II.D.3). Ponadto uzyskane wyniki wskazały, że biocenozę grzybów zasiedlających kompostowane pióra brojlerów z korą sosnową reprezentuje populacja rodzimych (autochtonicznych) grzybów związanych z kompostowanymi materiałami, która to przyczynia się do zahamowania rozwoju grzybów wprowadzonych w formie inokulum. Jako wyjaśnienie tego zjawiska podano lepsze przystosowanie „miejscowych” mikroorganizmów do naturalnie występujących czynników fizyko-chemicznych w porównaniu z drobnoustrojami wprowadzanymi (Załącznik 3, II.D.3,5,6). Ten istotny fakt, nie dyskutowany w literaturze przedmiotu, zaważył na podjęciu przeze mnie badań dotyczących rozpoznania i wyjaśnienia sukcesji różnych grup fizjologicznych mikroorganizmów podczas procesu kompostowania odpadów keratynowych a także zbadania przemian biochemicznych i chemicznych keratynowej materii organicznej (pierce kurcząt) oraz wpływu uzyskanych kompostów na glebę. Wyniki przeprowadzonych analiz stały się treścią dysertacji doktorskiej pt. „Badania nad procesem kompostowania odpadów keratynowych”, którą opublikowałam w kilku renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym ujętych w bazie JCR. Opis

najważniejszych wyników przedstawiłam w rozdziale 5B. Badania realizowałam w ramach dotacji MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego na UP w Lublinie.

Wyniki wybranych badań w których uczestniczyłam przed uzyskaniem stopnia doktora zostały także przedstawione w postaci streszczeń na konferencjach międzynarodowych (3) oraz krajowych (10) (Załącznik 3, III.B.1-13),

## 5 B. Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Badania nad kompostowaniem odpadów keratynowych w szerokim zakresie analitycznym, pozwoliły na kompleksową ocenę przebiegu procesu ich kompostowania, którą prowadzono na małą skalę (całkowitą pojemność kompostowanej masy wynosiła 4 kg). Doświadczenie przygotowane zostało w czterech wariantach zawierających pierze kurcząt i korę sosnową o stosunku C/N=25 i C/N=35 (warianty I i II) a także zawierające pierze kurcząt, korę sosnową i słomę pszenną o stosunku C/N=25 i C/N=35 (warianty III i IV). Kompleksowe badania dotyczyły oznaczania liczebności mikroorganizmów w poszczególnych tygodniach kompostowania, oznaczania aktywności enzymów i parametrów chemicznych jako wskaźników oceny dojrzałości i stabilności kompostów a także wpływu uzyskanych kompostów na glebę spod monokultury roślin zbożowych i spod płodozmianu po fasoli zwyczajnej (Załącznik 3, II.A.1-3;II.D.7-9,14).

Badania doprowadziły do szeregu ważnych z punktu widzenia praktyki, rozwiązań. Zaproponowano, niewątpliwie istotny z punktu widzenia ochrony środowiska przyrodniczego i zapobieżenia marnotrawstwu wartościowej substancji organicznej, (duża zawartość N i S organicznej) sposób zagospodarowania odpadowego pierza kurcząt jakim jest kompostowanie. Na podstawie uzyskanych wyników opracowane zostały także wskaźniki dojrzałości kompostów wytworzonych na bazie odpadowego pierza kurcząt takie jak: kształtowanie się frekwencji czyli przebiegu dynamiki rozwoju autochtonicznych grzybów keatynolitycznych z maksimum pod koniec kompostowania, sprzężone z dynamiką biodegradacji natywnej keratyny piór w kompostach (Załącznik 3, II.A.3); przyjęcie kwaśnego odczynu końcowego bioproduktu jako wskaźnika nagromadzenia mineralnych form azotu i siarki (siarczan amonu), powstałych podczas mineralizacji keratyny pierza a co za tym idzie prostego wskaźnika tych przemian oraz poziomu siarczanów jako końcowego produktu przemian siarki piór podczas grzybowej keratynolizy (Załącznik 3, II.A.1; II.D.14) a także uznanie aktywności oddechowej i dehydrogenaz jako wskaźników transformacji łatwo dostępnej substancji organicznej, obecnej w początkowym okresie kompostowania (Załącznik 3, II.A.2). Za ważne w odniesieniu do wcześniejszych wyników, uzyskanych z procesu kompostowania z zastosowaną szczepionką mikrobiologiczną uznano sukcesję, czyli pojawienie się kolejno po sobie różnych grup mikroorganizmów kompostowych, świadczące o biodegradacji różnej i o zróżnicowanym stopniu dostępności materii organicznej. Wyniki eksperymentalnych badań wykazały, istotne z punktu widzenia rolniczej praktyki, znaczenie kompostów uzyskanych na bazie odpadowego pierza kurcząt. Wskazano, że dojrzałe kwaśne komposty keratynowo-korowe i keratynowo-

koro-słomowe są szczególnie cenne w uprawie wielu roślin kwasolubnych w tym ozdobnych, gdyż mogą zastępować torf co przyczyni się do ochrony mocno już wyeksploatowanych torfowisk. Udowodniono, że komposty uzyskane na drodze kompostowania odpadów keratynowych oddziałują aktywnie na rozwój różnych grup drobnoustrojów i na zachodzące w glebach procesy biochemiczne, związane z krążeniem węgla i azotu co wyrażało się w dynamice zmian aktywności enzymów glebowych a także wzrostem zawartości węgla organicznego, azotu ogólnego, azotu amonowego i azotanowego, siarczanów oraz przyswajalnego potasu i fosforu w glebach pobranych zarówno z gorszego (monokultura zbożowych) jak i lepszego (płodozmian) stanowiska. W odniesieniu do oceny stopnia mikrobiologicznej zdrowotności gleb uzyskano dane wskazujące, że komposty kwaśne (niewapnowane) w przeciwieństwie do wapnowanych mogą przyczynić się do poprawy stanu fitosanitarnego gleby z uwagi na ograniczenie częstości występowania populacji potencjalnie fitopatogennych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Natomiast bardziej dobroczynne oddziaływanie wapnowanych kompostów na glebę związane było z silniejszym przyrostem substancji organicznej i składników mineralnych w badanych glebach (Załącznik 3, II.D.7-9).

Uwzględniając fakt, że moja praca naukowa od początku związana była z ekologią i metabolizmem grzybów strzępkowych a także z zagospodarowywaniem odpadów organicznych na cele rolnicze oraz w związku z opanowaniem technik pomiarów aktywności enzymatycznej oraz tradycyjnych i nowoczesnych metod izolacji i identyfikacji mikroorganizmów możliwe było rozszerzenie problematyki badawczej na inne środowiska bytowania drobnoustrojów i przeprowadzenie serii badań dotyczących funkcji drobnoustrojów, głównie grzybów, w różnych środowiskach naturalnych.

Moje zainteresowania badawcze z opisywanego okresu pracy naukowej można podzielić na kilka grup tematycznych.

- 1. Kontynuacja nurtu badań dotyczących kompleksowej oceny procesu kompostowania głównie w kontekście przemian kompleksu ligninocelulozowego (co opisałam jako Osiągnięcie habilitacyjne) i odpadów z przemysłu tytoniowego pod kątem poznania możliwości ich praktycznego zastosowania a także a także ogólnej oceny bioproduktów.**

Rezultaty uzyskane w ramach pracy doktorskiej, skoncentrowane na przemianach mikrobiologicznych natywnej keratyny piór a z pominięciem przemian roślinnych składników kompostów skłoniły mnie do bliższego przyjrzenia się przemianom kompleksu ligninocelulozowego podczas kompostowania. Obrany przez mnie kierunek badawczy stał się zasadniczym przedmiotem moich zainteresowań i pozwolił mi na uzyskanie szeregu wyników, które zostały przedstawione w niniejszym autoreferacie w publikacjach, stanowiących moje główne osiągnięcie naukowe, realizowane częściowo jako projekt MNiSW/NCN (Nr NN523 213 737) oraz w formie komunikatów przedstawionych na konferencjach naukowych (Załącznik 3, III.B.23-27, 31, 34,40-41,45).

W tym obszarze badawczym zostałam włączona także w badania realizowane ze środków finansowych MNiSW na utrzymanie potencjału badawczego UP w Lublinie



dotyczących oceny wpływu nawozu organicznego otrzymanego po kompostowaniu odpadów tytoniowych z korą sosnową i słomą żytnią na właściwości gleby biellicowej (Załącznik 3, II.A.5). Zainteresowanie kompostowaniem odpadów tytoniowych wynikało z pojawienia się potrzeby zagospodarowania poprodukcyjnych odpadów o wysokiej zawartości azotu. Otrzymane komposty sprawdzano pod kątem ich wpływu na enzymatyczną aktywność i chemiczne właściwości gleby biellicowej oraz na wzrost testowanych roślin (kukurydza cv.Kosmo230) po zastosowaniu 1, 3 i 5% dawki. Doświadczenie prowadzono jako doświadczenie modelowe, realizowane w warunkach laboratoryjnych, stosując wazony o pojemności 5 dm<sup>3</sup>. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wprowadzone do gleby biellicowej wszystkie dawki kompostu miały korzystny wpływ na biochemiczne przemiany węgla, azotu i fosforu w glebie biellicowej. Zwiększały także zawartość substancji organicznej, N ogólnego oraz dostępnych form fosforu, potasu i magnezu a więc żyzność gleby co miało istotny wpływ na jej produktywność. Zwiększał się bowiem plon świeżej i suchej masy kukurydzy wraz z dawką zastosowanego kompostu (Załącznik 3, II.A.5).

Równoległe z prowadzonymi pracami badawczymi, dotyczącymi zagospodarowania odpadów organicznych, opracowywałam wraz z innymi współautorami monografię naukową, której treści przedstawiają możliwości recyklingu odpadowych substratów opartych na nowych technologiach, bioinżynierii związanej z modelowaniem organizmów w celu otrzymania bioproduktów mogących mieć zastosowanie w rolnictwie i w szeroko pojętej ochronie środowiska, wykorzystując przy tym osiągnięcia badań własnych. W opracowaniu podkreślone zostało znaczenie nie tylko stosowanych różnych molekularnych technik, inżynierii komórkowej i chromosomowej, ale także korzyści ekonomiczne płynące z recyklingu odpadowej biomasy oraz wytwarzania bioproduktów (Załącznik 3, II.D.10).

## **2. Wykorzystanie cech fenotypowych i genotypowych do oceny różnorodności grzybów keratynofilnych w glebach uprawnych różniących się właściwościami chemicznymi.**

W nawiązaniu do wcześniejszych badań prowadzonych przed obroną doktoratu, dotyczących wykazania zależności pomiędzy czynnikami fizyko-chemicznymi gleb a występowaniem grzybów keratynofilnych we współpracy z pracownikami Zakładu Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego, podjęłam badania dotyczące zróżnicowania wewnątrzgatunkowego populacji dominującego gatunku dermatofita geofilnego *T.ajelloi* (Vanbreus.) Ajello w trzech różnych glebach uprawnych (czarnoziem, gleba biellicowa, gleba brunatna). Nowym aspektem przytoczonych badań była charakterystyka genetycznej różnorodności wyizolowanych z badanych gleb szczepów dermatofita geofilnego *T. ajelloi* za pomocą metody MSP-PCR przy użyciu startera (GACA)<sub>4</sub>. Uzyskane wyniki (analizowano 75 szczepów) wskazały na pięć genotypów *T.ajelloi* (A-E) z czego genotypy A i D uzyskano z gleby biellicowej, z gleby brunatnej- genotyp C i E a z czarnoziemem genotyp B. Różnorodność wewnątrzgatunkową *T. ajelloi* początkowo wiązano ze zróżnicowaniem odczynu gleby, jednakże z powodu braku korelacji pomiędzy genotypami *T.ajelloi* a właściwościami fizyko-chemicznymi w tym także pH przyjęto, że stwierdzona różnorodność genotypowa wewnątrz

populacji *T.ajelloi* jest wypadkową wielu cech środowiska, charakteryzujących daną glebę (Załącznik 3, II.A.4).

**3. Poszukiwanie wzajemnych zależności pomiędzy środowiskiem bytowania ptaków (gniazda), niestrawionymi resztkami ich pokarmu (wypluwki) a występowaniem grzybów w tym grzybów keratynofilnych.**

Zainteresowanie badaniami obejmującymi biologię i ekologię ptaków wynikało nie tylko z dotychczasowych informacji o występowaniu drobnoustrojów w tym grzybów keratynofilnych w ich upierzeniu, ale przede wszystkim z braku szerszych doniesień naukowych dotyczących zależności pomiędzy środowiskiem bytowania i sposobem odżywiania ptaków a występowaniem grzybów w tym grzybów keratynofilnych i ich rozprzestrzenianiem się wraz z wędrówkami ptaków.

Współpraca naukowa z tego obszaru prowadzona była w ramach dwóch projektów MNiSW, z czego w jednym byłam wykonawcą (Nr NN304 099 039)-projekt pt.: „Badania składu gatunkowego i zróżnicowania wewnątrzgatunkowej struktury klonalnej dermatofitów oraz innych grzybów keratynofilnych przenoszonych w środowiskach naturalnych przez wybrane gatunki ptaków Polski.” -termin realizacji 2010-2013r. a w drugim współuczestniczyłam w badaniach naukowych (KBN/MNiSW projekt badawczy własny nr PO4GO3330 pt.” Występowanie i ekologia grzybów (*Micromycetes*) w gniazdach ptaków środowisk wodno-błotnych Lubelszczyzny.” -termin realizacji 2006-2009r.)

Podjęte we współpracy badania dotyczyły następujących środowisk bytowania grzybów związanych z ekologią i biologią ptaków:

- gniazda wolnożyjących ptaków wodno-błotnych (wetland birds), które uznano jako potencjalny rezerwuar grzybów w tym grzybów chorobotwórczych (Załącznik 3, II.A.12)
- wypluwki ptaków drapieżnych (predatory birds) zawierające niestrawione pozostałości pokarmu bogatego w keratynę (pióra, sierść) mogące zawierać potencjalnie patogenne mikroorganizmy w tym grzyby i stanowić ich nośnik (Załącznik 3, II.A.9)
- wypluwki gawrona, które mogą odgrywać istotną rolę w roznoszeniu potencjalnie chorobotwórczych grzybów w środowisku miejskim (Załącznik 3, II.D.11)

Jako podstawę do izolacji określonych grup ekologiczno-fizjologicznych mykobioty gniazd brano pod uwagę skład substratowy materiału konstrukcyjnego gniazd. W badaniach oznaczano skład gatunkowy i frekwencję populacji poszczególnych rodzajów i gatunków w obrębie badanych grup grzybów oraz badano przyczyny wyselekcjonowania się niektórych z nich. Kolekcjonowanie gniazd lub ich fragmentów odbywało się po opuszczeniu przez młode (5-7 dni) kiedy gniazda nie spełniały już żadnych funkcji behawioralnych. Badaniami objęto 35 gniazd należących do 8 gatunków wodno-błotnych ptaków.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że w ogólnym ujęciu spośród 96 zidentyfikowanych gatunków grzybów najczęściej występowało 9 gatunków tj.: *Talaromyces purpureogenus* Samson, N, Yilmaz, Houbraken, Spierenb., Seifert, Peterson, Varga & Frisvad (dawniej *Penicillium*

*purpurogenum* Stoll), *Trichoderma viride* Pers., *Chrysosporium tropicum* J.W.Carmich., *Chaetomium globosum* Kunze, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Chrysosporium pannorum* (Link) S. Hughes, *Fusarium sporotrichioides* Sherb., *Scopulariopsis acremonium* (Dellacr.)Vuill. i *Aspergillus fumigatus* Fresen.. Uzyskane wyniki wykazały związek pomiędzy biologią i ekologią ptaków wodno-błotnych a biologią i ekologią grzybów w gniazdach tych ptaków. Wykazano, że różnorodność grzybów tj. grzybów ubikwistycznych, grzybów celulolitycznych, potencjalnie zoo- i fitopatogenicznych była istotnie wyższa w dużych gniazdach takich jak gniazda czapli siwej (Grey heron) i łabędzia niemego (Cygnus olor). Gniazda czapli siwej i łabędzia niemego znacznie różniły od pozostałych gniazd liczebnością i składem gatunkowym grzybów jak i od siebie nawzajem na co wskazywała analiza składowych głównych (PCA). Taksonomiczna struktura rodzajowa i gatunkowa grzybów zależała od składu chemicznego i właściwości fizycznych gniazd co było uzależnione od preferencji lęgowych oraz pokarmowych ptaków (Załącznik 3, II.A.12).

Wyłonione zależności pomiędzy środowiskiem bytowania ptaków wodno-błotnych i pośrednio z ich sposobem odżywiania a występowaniem określonej mykocenozy grzybów skłoniły nas do zbadania bezpośrednich zależności pomiędzy odżywianiem się ptaków a występowaniem grzybów w tym grzybów potencjalnie chorobotwórczych. Dlatego obiektem badań stały się wypluwki (pellets) ptaków bytujących w środowisku miejskim tj. gawrony oraz wypluwki wolnożyjących ptaków drapieżnych.

Z uwagi na to że głównym pokarmem ptaków drapieżnych są drobne ssaki *Micromammalia* w tym nornik *Microtus* i małe ptaki głównie *Passeriformes* a gawronów w zależności od pory roku materiał roślinny, glebowe bezkręgowce i ich larwy, wolno-żyjące ptaki drapieżne i populacje gawrona rozpatrywano także jako wektory biologiczne przenoszące potencjalnie chorobotwórcze grzyby keratynofilne.

W toku badań zebrano 153 wypluwki 9 gatunków ptaków drapieżnych w tym 5 ptaków szponiastych (Falconiformes) oraz 4 gatunków sów (Strigiformes) oraz wypluwki produkowane przez kolonie gawronów (*Corvus frugilegus*). W oparciu o morfologiczne kryteria w wypluwkach ptaków drapieżnych zidentyfikowano 439 nie-dermatofityczne szczepy grzybów, które sklasyfikowano do rodzaju *Chrysosporium*. Nie wyizolowano dermatofitów. Rodzaj *Chrysosporium* był wykrywany w 63% badanych wypluwek kolonizowanych przez grzyby. Wykazano przy tym, że dwa potencjalnie patogenne gatunki grzybów z grupy *Chrysosporium*: *Aphanoascus keratinophilus* Punsola&Cano i *Chrysosporium tropicum* J.W. Carmich. kolonizują wypluwki badanych ptaków w 37,5% -91,7%. Najwyższa kolonizacja tych grzybów była w wypluwkach sowy uszatej (long-eared owl) (91,7%) a najniższa w wypluwkach błotniaka stawowego (western marsh harrier) (37,5%) i czapli siwej (grey heron) (41,2%). *Aphanoascus keratinophilus* Punsola&Cano reprezentował 45% (196 szczepów) podczas gdy *Ch. tropicum* 55% (243 szczepów) w obrębie całej populacji *Chrysosporium*.

Wykazano także, że dieta ptaków determinuje wypluwkowy mycobiom. Głównym źródłem wyodrębnionych z wypluwek ptaków drapieżnych szczepów *Chrysosporium* był

nornik (*Microtus*), którego pozostałości stwierdzono w 57-100% wypluwek. Ponadto wykazano, że przeżywalność i rozprzestrzenianie szczepów *A. keratinophilus* Punsola&Cano było podyktowane wyższą wilgotnością wypluwek, podczas gdy szczepów *Chrysosporium tropicum* J.W.Carmich. niższą co zależało od gatunku ptaka i jego trybu życia. Badania wykazały, że ptaki drapieżne są biologicznym wektorem przenoszącym szczep *A. keratinophilus* Punsola&Cano i *Ch. tropicum* J.W.Carmich. a wypluwki produkowane przez te ptaki są mechanicznymi nośnikami. Na podstawie dotychczasowej wiedzy i wyników uzyskanych w tej pracy zaproponowano drogi epidemiologicznego krążenia patogenów oportunistycznych jakimi są *A. keratinophilus* Punsola&Cano i *Ch. tropicum* J.W.Carmich. dla których wypluwki ptaków drapieżnych są nośnikami (Załącznik 3, II.A.9).

W odniesieniu do wypluwek gawronów pozyskanych w koloniach lęgowych ptaków w środowisku miejskim a których miejscem żerowania w sezonie są pola uprawne stwierdzono ponad 20,0 % zasiedlenie przez szczepy *Ch. keratinophilum*. Możliwości rozsiewania tego grzyba związane były bezpośrednio z wielkością żerowisk gawrona i były uwarunkowane biologią ptaków (Załącznik 3, II.D.11).

Obok aspektu ekologicznego i sanitarnego przytoczonych badań, miały one na celu porównanie identyfikacji gatunkowej grzybów keratynolitycznych przeprowadzonej metodami tradycyjnymi na podstawie cech fenotypowych, opartych na obserwacji cech makro- i mikroskopowych oraz metod nowoczesnych, przeprowadzonych za pomocą technik molekularnych. Zbiór zebranych i oznaczonych do gatunku grzybów tradycyjnymi metodami zweryfikowano za pomocą analizy PCR-RFLP (Polimorfizm Długości Fragmentów Restrykcyjnych) oraz w oparciu o sekwencjonowanie wybranych produktów PCR (ITS1-5.8S rDNA-ITS4). Otrzymane rezultaty porównano z bazą danych w GenBank. Uzyskane wyniki wykazały, że 48% szczepów zidentyfikowanych na podstawie cech fenotypowych, jako *A. keratinophilus* Punsola&Cano, po weryfikacji molekularnej należało do *A. keratinophilus* Punsola&Cano. Większy błąd popełniano przy tradycyjnej identyfikacji szczepów *Ch. pannicola* (Corda) Oorschot & Stalpers i *A. fulvescens* (Cooke) Apinis. 89% szczepów, które fenotypowo były oznaczone jako *A. fulvescens* (Cooke) Apinis zostały zaklasyfikowane do *Ch. tropicum* J.W.Carmich. po weryfikacji molekularnej a 100% szczepów *Ch. pannicola* (Corda) Oorschot & Stalpers do *Ch. tropicum* J.W.Carmich.. W ostatecznym wniosku stwierdzono, że błędy popełniane w identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Chrysosporium* za pomocą metod tradycyjnych przemawiają za koniecznością włączenia do identyfikacji metod molekularnych. Wiąże się to m.in. z trudnością odróżnienia gatunków grzybów z grupy *Chrysosporium*, za pomocą cech morfologicznych, zwłaszcza morfologii konidiów typu aleuriospory. Jednakże metody te nie wykluczają fenotypowej identyfikacji, która ma charakter wspomagający molekularną charakterystykę tych grzybów, doprowadzający do ich ostatecznej identyfikacji (Załącznik 3, II.A.9).

- 4. Badania zmierzające do określenia mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza i powierzchni stałych środowiska pracy pracowników medycznych i administracji oraz wpływu na ich zdrowie.**

Badania realizowane we współpracy z pracownikami z Pracowni Bakteriologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Puławach w ogólnym założeniu miały na celu oznaczanie jakości mikrobiologicznej powietrza atmosferycznego i powietrza pomieszczeń zamkniętych w środowisku pracy pracowników medycznych i administracji medycznej tj. szpitalne oddziały ratunkowe, biura, karetki (Załącznik 3, II.A.6,8,10). Analizę powietrza w karetkach i pomieszczeniach biurowych oraz powierzchni prowadzono w okresie wczesnowiosennym. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego w karetkach był satysfakcjonujący i przybliżony do powietrza przestrzeni biurowej. Jakościowa analiza wykazała obecność mikroorganizmów saprofitycznych a także patogenów w tym bakterii w badanym powietrzu i na powierzchniach a wśród grzybów *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp.. Uznano jednakże, że ich stosunkowo niewielka ilość nie powinna stanowić zagrożenia zdrowia personelu medycznego. Dodatkowo sprawdzano możliwy wpływ grzybów wyizolowanych z powietrza i powierzchni pomieszczeń Szpitalnych Oddziałów Ratunkowych (SOR) na aktywność granulocytów i monocytów w krwi personelu medycznego, które odgrywają istotną rolę w obronie przed infekcjami grzybiczymi (Załącznik 3, II.A.6). Badanie bioaerozolu powietrza pracy personelu medycznego i personelu administracji biurowej odbywało się także bezpośrednio za pomocą osobistego urządzenia do pobierania próbek powietrza Button Sampler zawierającego żelatynowy filtr (Załącznik 3, II.A.10). Ilościowa analiza bioaerozolu grzybowego wykazała obecność 20 rodzajów i 37 gatunków grzybów strzępkowych. W powietrzu przestrzeni biurowych *Aspergillus flavus* Link stanowił 82% ogólnej puli grzybów a 58% *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. Powietrze SOR charakteryzowało się mniejszą różnorodnością gatunkową grzybów a *A.flavus* Link i *A.fumigatus* Fresen. stanowiły odpowiednio 13% i 8 %. W powietrzu atmosferycznym nie notowano *A.flavus* Link.

Uzyskane wyniki wykazały, że w bezpośrednim miejscu pracy pracowników medycznych (personel SOR), karettek i biur nie istnieje silne zanieczyszczenie mikrobiologiczne z uwagi na niską liczebność mikroorganizmów mieszczącą się w zakresie wartości podanych przez panel ekspertów a skład gatunkowy zarówno bakterii jak i grzybów jest podobny (Załącznik 3, II.A.8,10).

##### **5. Badanie niektórych procesów grzybowej patogenezы roślin oraz grzybowej indukcji wzrostu roślin.**

Współdział w badaniach Instytutu Badawczego Leśnictwa (IBL) z zakresu grzybowej patogenezы drzew leśnych był skoncentrowany na poznaniu przyczyn obumierania drzewostanów leśnych zaatakowanych przez *Heterobasidion parviporum* (korzeniowiec drobnopory). Badania obejmowały wstępną charakterystykę właściwości ligninolitycznych korzeniowca zaliczanego do najgroźniejszych patogenów powodujących zniszczenia drzewostanów iglastych w Europie. Wyniki uzyskane w warunkach laboratoryjnych na inokulowanych zarodnikami korzeniowca drewniakach świerka wykazały, że grzyby te wydzielają zewnątrzkomórkowe enzymy uczestniczące w rozkładzie kompleksu lignocelulozowego a także fenole. Wydzielanie przez tego grzyba lakazy, chociaż o niskiej

aktywności, wskazywało na zależność pomiędzy metabolizmem korzeniowca a wywoływaną przez niego zgnilizną korzeni (Załącznik 3, II.A.7).

Kolejny udział w badaniach prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej UMCS w Lublinie dotyczył identyfikacji nierozpoznanych do tej pory 2 gatunków grzybów z rodzaju *Mortierella* sp. wyizolowanych z gleb z Spitsbergenu, i wydzielających związki stymulujące wzrost roślin. Wyizolowany po raz pierwszy z gleb Spitsbergenu gatunek *Mortierella* należał do *Mortierella verticillata* Linnem.. Drugim gatunkiem, który wykorzystano w badaniach była *Mortierella antarctica* Linnem.. Oba grzyby silnie stymulowały przyrost długości korzenia siewek pszenicy ozimej i biomasy roślin (Załącznik 3, II.A.11).

**6. Badania nad praktycznym wykorzystaniem hydrolizatów keratynowych jako środków nawożeniowych aktywizujących drobnoustroje glebowe i stymulujących wzrost roślin (zgłoszenie patentowe).**

Zaproponowany wynalazek opierał się na szeregu przeprowadzonych doświadczeń mających na celu ocenę wpływu zastosowanego biopreparatu na aktywność biologiczną gleby a tym samym na przyrost biomasy badanych roślin testowych. Wiadomym było, że rozkład natywnej keratyny piór przez bakterie prowadzi do uwalniania głównie organicznych produktów solubilizacji. W badaniach własnych opisanych jako Osiągnięcie habilitacyjne natomiast udowodniono, że biodegradacja tych odpadów z udziałem keratynolitycznych grzybów dostarcza przede wszystkim dużych ilości produktów mineralizacji keratyny tj.  $\text{N-NH}_4^+$  i  $\text{S-SO}_4^{2-}$ . Podjęte próby zastosowania tych hydrolizatów jako środka do użyźniania gleby i nawożenia roślin, mierzonych na podstawie wskaźników aktywności biologicznej gleby i przyrostu biomasy wykazały ich korzystny wpływ na aktywność enzymatyczną gleb, zwiększenie populacji drobnoustrojów a przede wszystkim przyczyniły się do silniejszego (w porównaniu z kontrolą) przyrostu biomasy roślin testowych. Obecnie badania te są kontynuowane.

**7. Badania dotyczące wpływu różnych systemów uprawy warzyw korzeniowych na aktywność hydrolityczną zasiedlających je pleśni.**

W kolejnych badaniach realizowanych wraz ze studentami Studenckiego Koła Mikrobiologów „Microbios”, którego jestem opiekunem, badano a następnie wykazano wpływ systemu uprawy i okresu przechowywania dwóch odmian marchwi ‘Nerac’ i ‘Bonfire’ na liczebność różnych grup drobnoustrojów zasiedlających korzenie tej rośliny. Uzyskane wyniki wykazały, że dwie odmiany marchwi uprawianej w systemie konwencjonalnym charakteryzowały się gorszą jakością mikrobiologiczną niż marchew pochodząca z uprawy ekologicznej co mogło wynikać z różnic w składzie chemicznym korzeni tej rośliny warunkowanej dostępnością pierwiastków biogennych zawartych w nawozach, ale także ze zmian w równowadze mikrobiocenotycznej drobnoustrojów glebowych w systemie konwencjonalnym w którym stosowane są chemiczne środki ochrony roślin. Wiadomo bowiem, że chemiczne środki ochrony roślin mogą jako efekt uboczny oddziaływać na drobnoustroje glebowe i przyczyniać się do nagromadzenia w glebie np. tzw. grzybów

korzeniowych, które oddziałują niekorzystnie na rośliny uprawne. Wykazano także, że dłuższy czas przechowywania przyczynił się do wzrostu liczebności zarówno bakterii jak i grzybów. Znacząco wzrosła także liczebność drobnoustrojów amylolytycznych na obu odmianach marchwi po jej dłuższym okresie przechowywania. Wzrost liczebności różnych drobnoustrojów uznano za ważną przyczynę przemawiającą za skróceniem czasu przechowywania marchwi (Załącznik 3, II.D.12). Na podstawie uzyskanych wyników pojawiła się także koncepcja badania enzymów hydrolitycznych wydzielanych przez drobnoustroje a obniżających jakość i skracających czas przechowywania badanych surowców. Oznaczanie aktywności pektynolitycznej prowadzono w czystych kulturach grzybów z rodzaju *Penicilium* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. i *Fusarium* sp. wyizolowanych z korzeni marchwi z różnych systemów uprawy. Wyższą aktywnością poligalakturonazy i pektynazy charakteryzowały się szczepy wyizolowane z uprawy konwencjonalnej niż z uprawy ekologicznej. Wśród tych szczepów najwyższą aktywności pektynolityczną charakteryzował się szczep z rodzaju *Alternaria* sp. wyizolowany z uprawy konwencjonalnej oraz *Fusarium* sp. i *Trichoderma* sp. pochodzące z uprawy ekologicznej (Załącznik 3, II.D.13).

#### **Najważniejsze rezultaty naukowe niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. Opracowanie po raz pierwszy wskaźników dojrzałości kompostów zawierających odpadowe pierze kurcząt.
2. Izolacja, identyfikacja gatunkowa i charakterystyka zbiorowisk grzybów keratynolitycznych z różnych środowisk.
3. Udowodnienie zależności pomiędzy biologią ptaków a biologią grzybów.
4. Przedstawianie możliwych dróg rozprzestrzeniania się potencjalnych patogenów grzybowych przy udziale wypluwek ptaków drapieżnych i gawrona.
5. Wykazanie możliwości zastosowania hydrolizatów keratynowych jako innowacyjnego preparatu użyźniającego glebę i poprawiającego wzrost roślin.
6. Wykazanie wpływu systemu uprawy roślin i czasu przechowywania na liczebność drobnoustrojów i aktywność hydrolityczną pleśni wybranych warzyw korzeniowych.
7. Wskazanie na udział enzymów ligninolitycznych huby korzeni (*Heterobasidion parviporum*) w rozkładzie drewna drzew iglastych i odnotowanie nowo wyodrębnionych szczepów *Mortierella* w stymulacji wzrostu roślin.

Wyniki wybranych badań w których uczestniczyłam po uzyskaniu stopnia doktora zostały także przedstawione na konferencjach międzynarodowych (11) oraz krajowych (25) (Załącznik 3, III.B.14-49).

Za ważny element mojej pracy naukowej poza opisanymi powyżej publikacjami naukowymi uważam udział (kierownik i główny wykonawca lub wykonawca) w 3 projektach badawczych własnych uzyskanych w ramach 37 (Nr NN523 213 737) i 39 (Nr NN304 099 039) konkursu MNiSW realizowanych odpowiednio w latach 2009-2012 i 2010-2013 a

rozliczanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) oraz w projekcie KBN/MNiSW nr PO4GO3330 (udział w badaniach) realizowanym w latach 2006-2009r. (Załącznik 3, II.I.); uczestnictwo w 14 międzynarodowych i 35 krajowych konferencjach naukowych (Załącznik 3, III.B.1-49); zgłoszenie łącznie 27 sekwencji nukleotydowych w tym 18 szczepów z rodzaju *Trichoderma* sp. wyizolowanych z kompostów lignocelulozowych, 5 glebowych grzybów keratynolitycznych *A.fulvescens* i *Chrysosporium articulatum* oraz 4 szczepów *Mortierella* sp., które zostały opublikowane w bazie danych GenBank. Za istotne z punktu widzenia praktycznego zastosowania prowadzonych badań uważam aplikację wytworzonych bioproduktów w ramach działalności naukowej na cele praktyki rolniczej. Wyrażało się to zgłoszeniem wynalazku (numer P.425554) tj. hydrolizatu keratynowego użyźniającego glebę i poprawiającego wzrost roślin oraz aplikacją produktu- kompostu wytworzonego w ramach realizacji projektu badawczego własnego (Nr NN523 213 737) w gospodarstwach rolnych na terenie trzech województw w Polsce tj. województwa lubelskiego, podkarpackiego i mazowieckiego (Załącznik 3, III.Q.2).

Jako moje zaangażowanie we współpracę z zagranicznymi jednostkami powiązаныmi z nauką uważam współpracę z redaktorami zagranicznych czasopism naukowych poprzez wykonanie 40 recenzji artykułów naukowych wymienionych w bazie JCR z listy A wykazu MNiSW (Załącznik 3, III.P.1).

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mykologicznego (PTMyk) (Załącznik 3, III.H.1).

Mój warsztat metodyczny i pogłębianie wiedzy z obszaru identyfikacji grzybów za pomocą metod molekularnych i badania próbek glebowych pod kątem ich aktywności metabolicznej realizowałam na łącznie 47 dniowych stażach w trzech jednostkach naukowych na terenie kraju tj. Uniwersytecie Warszawskim w Zakładzie Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Uniwersytecie Łódzkim w Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów a także na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej (Załącznik 3, III.L).

Za współpracę z przemysłem, oprócz wymienionej aplikacji kompostu w gospodarstwach rolnych uważam wystawienie opinii naukowej dla potrzeb przedsiębiorstwa Multichem Eko Sp. zo.o (Załącznik 3, III.M.1) oraz wieloletnią współpracę z Zakładami Drobiarskimi w Lublinie, która wiązała się i wiąże z pozyskiwaniem pierza kurcząt do badań naukowych.

Za działalność naukową zostałam wyróżniona nagrodą indywidualną III<sup>o</sup> JM Rektora za wyróżniającą się pracą doktorską pt. „Badania nad procesem kompostowania odpadów keratynowych” w 2005 r.; nagrodą zespołową JM Rektora za osiągnięcia naukowe w 2011 r. - II<sup>o</sup> i 2012 r. - III<sup>o</sup>. Otrzymałam wyróżnienie Dziekana Wydziału Agrobioinżynierii za osiągnięcia naukowe za rok 2017 i Srebrny Medal za Długoletnią Służbę. Na konferencji naukowej podczas Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymałam wraz z współautorami wyróżnienie za pracę przedstawioną na sesji plakatowej (Załącznik 3, II.J.1-6).



**6. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE, POPULARYZUJĄCE NAUKĘ I ORGANIZATORSKIE****Działalność dydaktyczna**

Znaczącą część mojej pracy zawodowej stanowią zajęcia dydaktyczne realizowane w wymiarze 240 godzin. Na przestrzeni lat pracy prowadziłam ćwiczenia w języku polskim z następujących przedmiotów: *Mikrobiologia* (kierunek: Towaroznawstwo I<sup>o</sup>), *Mikrobiologia ogólna* (kierunek: Biotechnologia, Bioinżynieria I<sup>o</sup>), *Mikrobiologia rolnicza* (kierunek: Rolnictwo I<sup>o</sup>, Ogrodnictwo I<sup>o</sup>, Agrobiznes I<sup>o</sup>), *Mikrobiologia zootechniczna* (kierunek: Zootechnika I<sup>o</sup>), *Mikrobiologia środowiskowa* (kierunek: Ochrona środowiska I<sup>o</sup>), *Mykologia* (kierunek: Rolnictwo II<sup>o</sup>), *Mikrobiologia żywności* (kierunek: Towaroznawstwo I<sup>o</sup>), *Mikologia i mikrobiologia* (kierunek: Leśnictwo I<sup>o</sup>), *Biologia* (kierunek: Inżynieria Środowiska I<sup>o</sup>).

Zdobywanie doświadczenia zawodowego w pracy naukowej i dydaktycznej zaowocowało opracowaniem 9 autorskich programów wykładów oraz ćwiczeń audytoryjnych i laboratoryjnych, które prowadziłam w języku polskim z następujących przedmiotów: *Mikologia stosowana* dla studentów studiów stacjonarnych I<sup>o</sup> na kierunku Biologia, *Mikrobiologia ogólna* dla studentów jednolitych studiów stacjonarnych i niestacjonarnych I<sup>o</sup> na kierunku Towaroznawstwo, *Mikrobiologia stosowana* i *Podstawy metabolizmu* dla studentów studiów stacjonarnych I<sup>o</sup> na kierunku Bioinżynieria, *Biotechnologiczne zagrożenia środowiska*-przedmiot do wyboru dla studentów studiów stacjonarnych II<sup>o</sup> na kierunku Bioinżynieria, *Mikroorganizmy w bioremediacji środowiska* -przedmiot do wyboru dla studentów studiów stacjonarnych II<sup>o</sup> na kierunku Inżynieria środowiska, *Seminaria dyplomowe* dla studentów I<sup>o</sup> i II<sup>o</sup> na kierunku Towaroznawstwo i Bioinżynieria, *Podstawy ekologii drobnoustrojów* dla studentów studiów stacjonarnych I<sup>o</sup> na kierunku Rolnictwo, *Edaficzne czynniki produkcji roślinnej* w ramach którego to przedmiotu opracowałam wykłady i ćwiczenia z mikrobiologii dla studentów studiów podyplomowych kierunków nierolniczych *Studia Rolnicze dla Absolwentów Kierunków Nierolniczych* (od 2012r.) oraz 1 w języku angielskim *General microbiology* dla studentów w ramach programu wymiany międzynarodowej ERASMUS+ na kierunku Bioinżynieria (Załącznik 3, III.I.1).

Moje zaangażowanie w działalność dydaktyczną na Uczelni wyraża się także coroczną opieką naukową nad studentami studiów stacjonarnych pierwszego stopnia i drugiego stopnia realizującymi prace dyplomowe z obszaru mikrobiologii i mikrobiologii środowiskowej. Byłam promotorem 21 prac inżynierskich, 18 prac magisterskich (Załącznik 3, III.J.1). Trzech moich dyplomantów zostało słuchaczami studiów doktoranckich w tym jedna podjęła pracę naukową; opieką naukową Studenckiego Koła Naukowego Mikrobiologów „Mikrobios” (do 2015 roku SKN Towaroznawstwa sekcja Mikrobiologia) w ramach którego studenci realizują zadania badawcze, wyniki badań prezentują na konferencjach naukowych (Załącznik 3, III.B.38,44), publikują (Załącznik 3, II.D.12-13), prowadzą stronę internetową Koła [www.skntm.up.lublin.pl](http://www.skntm.up.lublin.pl)., od 2015 roku aktywnie uczestniczą Dniach Otwartych Uczelni (Załącznik 3, III.I.5). Powoływana jestem jako opiekun studentów pierwszego roku studiów

(Załącznik 3, III.Q.5). W ramach dokształcania zawodowego uczestniczyłam w licznych kursach doskonalących mój warsztat naukowy i dydaktyczny (Załącznik 3, III.Q.3a-m).

### **Działalność popularyzatorska**

Ważnym elementem składowym mojej pracy naukowo-dydaktycznej jest działalność popularyzująca naukę. Z ogromną satysfakcją staram się przekazywać wiedzę uczniom/młodzieży szkół podstawowych i średnich na przygotowanych przeze mnie warsztatach. Od 2010 roku rokrocznie aktywnie uczestniczę w Lubelskim Festiwalu Nauki, gdzie jestem współautorem i kierownikiem a także głównym wykonawcą projektów z obszaru mikrobiologii (Załącznik 3, III.I.3). Prowadziłam warsztaty popularnonaukowe dla grupy młodzieży ponadgimnazjalnej- stypendystów Fundacji Dzieło Nowego Tysiąclecia w 2012r. a także wykładu z obszaru mikrobiologii na Uniwersytecie Trzeciego Wieku w 2011 roku oraz warsztaty popularnonaukowe z zakresu przygotowywania preparatów mikroskopowych dla grupy młodzieży ponadgimnazjalnej w 2014r (Załącznik 3, III.I.4).

### **Działalność organizacyjna**

Od 2005 roku do obecnej chwili jestem członkiem Rady Wydziału Agrobiotechnologii w grupie nauczycieli nie będących samodzielnymi pracownikami naukowymi.

Powoływana byłam jako inwigilant na egzaminach wstępnych w postępowaniu rekrutacyjnym na rok akademicki 2005/2006.

Na trzy kolejne kadencje (2009-2012; 2012-2016; 2016- do chwili obecnej) zostałam powołana jako członek i pracowałam w Wydziałowej Komisji ds. Oceny Jakości Kształcenia.

W 2012 roku zostałam powołana na członka Komisji Wyborczej Wydziału Agrobiotechnologii UP w Lublinie i jako Elektor do wyborów Władz Uczelni w latach 2008-2012 i 2016-2020.

W 2018 roku pracowałam w zespole przygotowującym Raport Samooceny dla Polskiej Komisji Akredytacyjnej na kierunku Biotechnologia (Załącznik 3, III.Q.9-15).

W Katedrze Mikrobiologii Środowiskowej byłam współorganizatorem stanowiska pracy do identyfikacji drobnoustrojów za pomocą metod molekularnych.

## **7. PLANY NAUKOWE I AKTUALNIE REALIZOWANE ZADANIA BADAWCZE**

Moje przyszłe plany naukowe dotyczą nie tylko pogłębienia wiedzy w obrębie dotychczas prowadzonych obszarów badawczych, ale także poszukiwania nowych rozwiązań związanych z zagospodarowaniem odpadów organicznych pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, mogących mieć istotne znaczenie dla praktyki rolniczej. Obejmują one:

1. Ocenę kompostów ligninocelulozowych otrzymanych poprzez kompostowanie z pierzem kurcząt w aspekcie ich wpływu na jakość biologiczną gleb oraz na wzrost i plonowanie wybranych roślin uprawnych.
2. Ocenę hydrolizatów piór otrzymanych po biologicznej degradacji pierza kurcząt, jako potencjalnych preparatów bionawożeniowych.

3. Pogłębienie wiedzy na temat mechanizmu keratynolizy ze szczególnym uwzględnieniem mikrobiologicznych przemian siarki keratyny.
4. Poszukiwanie nowych sposobów biologicznego zagospodarowania odpadów keratynowych i możliwości ich przemysłowego zastosowania.
5. Badania dotyczące wpływu czynników środowiskowych na biologię mikroorganizmów, przede wszystkim grzybów mikroskopowych, mających istotne znaczenie przemysłowe i w naturalnej ochronie roślin.
6. Rozszerzanie warsztatu badawczego o zastosowanie nowoczesnych technik badawczych i pomiarowych.

## 8. PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Sumaryczne zestawienie osiągnięć naukowo-badawczych przedstawiono w Tabelach 1 i 2.

Na dotychczasowy dorobek naukowo-badawczy składa się:

- 81 publikacji w tym:
  - 19 oryginalnych prac twórczych opublikowanych w 17 czasopismach uwzględnionych w bazie JCR o łącznym IF = 39,887 i sumie punktów MNiSW (w roku publikacji) = 548
  - 9 oryginalnych prac twórczych opublikowanych w czasopismach, nieposiadającym współczynnika wpływu IF, wymienionych w części B wykazu MNiSW
  - 1 praca pełnotekstowa praca opublikowana w recenzowanych suplementach
  - 1 monografia naukowa w języku angielskim,
  - 3 rozdziały w monografii (2 w języku polskim, 1 w języku angielskim)
  - 48 streszczeń w materiałach konferencyjnych (48 konferencji naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym)
- 2 doniesienia naukowe (wygłoszone na konferencji krajowej i międzynarodowej w tym 1 w języku angielskim)
- Kierowanie 1 projektem badawczym MNiSW/NCN (Nr NN523 213 737) którego byłam także głównym wykonawcą realizowanego w latach 2009-2012
- Wykonawca w projekcie MNiSW/NCN (Nr NN304 099 039) realizowanego w latach 2010-2013 i udział w badaniach w projekcie KBN/MNiSW nr PO4GO3330(2006-2009)
- Przygotowanie 1 opinii naukowej dla przemysłu i 2 ekspertyz naukowych
- Zrecenzowanie 43 artykułów naukowych w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym z listy A wykazu MNiSW (40 artykułów) z listy B (2) wykazu MNiSW i (1) rozdziału monografii
- 1 zgłoszenie patentowe P.425554
- 1 aplikacja produktu wytworzonego w ramach realizacji projektu Nr NN523 213 737
- 2 sprawozdania merytoryczne końcowe z realizacji projektów badawczych.
- zgłoszenie i współautorstwo łącznie 27 sekwencji nukleotydowych, które zostały opublikowane w bazie danych GenBank

Tabela 1. Sumaryczne zestawienie czasopism w których opublikowano artykuły naukowe (wraz z czasopismami w których opublikowano artykuły dokumentujące osiągnięcie naukowe- zaznaczone w tabeli poniżej \*).

Czasopismo	Liczba publikacji	Punktacja <sup>1</sup>	IF <sup>1</sup>	Obecnie (2017) IF <sub>5-letni</sub>
<b>Publikacje w czasopismach naukowych z części A wykazu MNiSW posiadających IF</b>				
Compost Science and Utilization	1	15	0,712 <sub>2009r.</sub>	0,921
Bioresource Technology	2	24 32	4,253 <sub>2009r.</sub> 4,365 <sub>2010r.</sub>	5,978
Waste Management*	1	30	2,428 <sub>2011r.</sub>	5,262
Central European Journal of Biology*	1	20	0,818 <sub>2012r.</sub>	0,975
Microbes and Environments	1	25	2,231 <sub>2014r.</sub>	2,551
Archives of Environmental Protection	1	15	0,855 <sub>2014r.</sub>	1,096
Central European Journal of Immunology	1	15	0,309 <sub>2015r.</sub>	1,031
World Journal of Microbiology and Biotechnology*	1	20	2,100 <sub>2017r.</sub>	2,031
Sylvan	1	15	0,481 <sub>2016r.</sub>	0,539
Science of the Total Environment*	1	40	4,610 <sub>2017r.</sub>	4,984
International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health	1	20	1,367 <sub>2017r.</sub>	1,422
Avian Biology Research	2	2x 25=50	2x 0,938= <sub>2017r.</sub>	1,216
Journal of Environmental Management*	1	35	4,005 <sub>2017r.</sub>	4,449
Annals of Agricultural and Environmental Medicine	1	30	1,116 <sub>2017r.</sub>	1,323
Waste and Biomass Valorization*	1	20	1,874 <sub>2017r.</sub>	1,787
International Journal of Molecular Science	1	30	3,687 <sub>2017r.</sub>	3,878
Environmental Science and Pollution Research*	1	30	2,800 <sub>2017r.</sub>	2,989
<b>SUMA</b>	<b>19</b>	<b>466</b>	<b>39,887</b>	<b>42,432</b>
<b>Publikacje w czasopismach naukowych z części B wykazu MNiSW nie posiadających IF</b>				
Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. Agricultura	1	1	- <sup>2</sup>	-
Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych	5	18	-	-
Acta Mycologica	1	5	-	-
Acta Agrophysica	2	8	-	-
<b>SUMA</b>	<b>9</b>	<b>32</b>	-	-
<b>Pozostałe publikacje naukowe</b>				
Monografia w języku angielskim	1	25	-	-
Rozdziały w monografii naukowej w języku polskim	2	10	-	-
w języku angielskim	1	5	-	-
Polish Journal of Environmental Science-recenzowany suplement	1	10	-	-
<b>SUMA</b>	<b>5</b>	<b>50</b>	-	-
<b>ŁĄCZNIE</b>	<b>33</b>	<b>548</b>	<b>39,887</b>	<b>42,432</b>

<sup>1</sup>zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku artykułów z roku 2018 i 2019 przyjęto punkty MNiSW z publikowanych wykazów za lata 2013-2016 a IF wg bazy JCR za rok 2017); „-”<sup>2</sup> „brak

Tabela 2. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych.

WYNIK AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ	PRZED DOKTORATEM	PO DOKTORACIE	ŁĄCZNIE
Publikacje w czasopismach z bazy Journal Citation Reports (JCR) lista A MNiSW	0	19	<b>19</b>
<b>Pozostałe publikacje</b>			
Publikacje z listy B MNiSW	6	3	<b>9</b>
monografie	0	1	<b>1</b>
rozdziały w monografii	0	3	<b>3</b>
Zgłoszone rekordy sekwencji nukleotydowych do GenBank	0	27	<b>27</b>
Kierownictwo projektów badawczych	0	1	<b>1</b>
Wykonawstwo (udział) projektów badawczych	0	1 (1)	<b>2</b>
Referaty konferencyjne (wygłoszone przez mnie)	0	2	<b>2</b>
Postery konferencyjne	13	30	<b>43</b>
Ekspertyzy/opracowania na zamówienie	0	3	<b>3</b>
Zgłoszenie patentowe	0	1	<b>1</b>
Aplikacja produktu	0	1	<b>1</b>
Recenzje publikacji naukowych z listy A MNiSW	0	40	<b>40</b>
Recenzje publikacji naukowych z listy B MNiSW	0	3	<b>3</b>
Suma punktów MNiSW lub jego odpowiednika <sup>1</sup>	32	516	<b>548</b>
Sumaryczny współczynnik wpływu IF (Impact Factor) <sup>1</sup>	0	39,887	<b>39,887</b>
<b>STATYSTYKA CYTOWAŃ</b>			
Liczba cytowań <sup>2</sup> według:			
Web of Science <i>Core Collection</i> (bez autocytowań)	- <sup>2</sup>	153	<b>153</b>
Scopus (bez autocytowań)	-	197	<b>197</b>
<b>LICZBA CYTOWAŃ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO</b>			
Web of Science <i>Core Collection</i> (bez autocytowań)	-	120	<b>120</b>
Scopus (bez autocytowań)	-	135	<b>135</b>
Index Hircha według:			
Web of Science <i>Core Collection</i>	-	5	<b>5</b>
Scopus	-	5	<b>5</b>

<sup>1</sup>zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku artykułów z roku 2018 i 2019 przyjęto punkty MNiSW z publikowanych wykazów za lata 2013-2016 a IF wg bazy JCR za rok 2017); „-”<sup>2</sup> „brak danych

<sup>2</sup>według kwerendy na dzień 18.02.2019r.

Justyna Bohacz