

## AUTOREFERAT

---

### 1. Imię i nazwisko.

---

**Łukasz Drewniak**

---

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

---

- Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego z dnia 16.11.2009 Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka bakterii arsenowych wyizolowanych z kopalni złota w Złotym Stoku”. Promotorem w przewodzie doktorskim była prof. dr hab. Aleksandra Skłodowska (Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami: dr hab. Katarzyna Brzostek (Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski) oraz dr hab. Izabela Świącicka (Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet w Białymstoku).

Rozprawa doktorska uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Wydziału Biologii UW. Ponadto, została ona wyróżniona nagrodą indywidualną II stopnia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcie naukowe.

- Tytuł magistra biotechnologii w zakresie mikrobiologii (dyplom z wyróżnieniem) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; VI.2005. Tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja funkcjonalnych modułów plazmidu pAMI2 *Paracoccus aminophilus* i ich wykorzystanie do konstrukcji wektorów specyficznych dla *Alphaproteobacteria*”. Opiekunem pracy był dr Dariusz Bartosik.
- Tytuł licencjata biotechnologii w zakresie mikrobiologii (dyplom z wyróżnieniem) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; VI.2003. Tytuł pracy licencjackiej: „Próba konstrukcji kasety zawierającej podstawowy replikon plazmidu pAMI209 *Paracoccus aminophilus*”. Opiekunem pracy była dr Jadwiga Baj.

---

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

---

- 01.01.2010 do chwili obecnej: adiunkt w Pracowni Analizy Skażeń Środowiska na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- 01.10.2005-12.10.2009: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandry Skłodowskiej.
- 01.10.2003-29.06.2005: studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- 01.10.2000-25.06.2003: studia licencjackie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

---

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

---

a) Tytuł osiągnięcia naukowego.

**Mikrobiologiczne oczyszczanie środowisk zanieczyszczonych arsenem - charakterystyka i zastosowanie bakterii metabolizujących związki arsenu**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.

- 1) **Drewniak L., Sklodowska A.** 2013. Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 7728-7739.

IF<sub>2013</sub> – **2,757**; IF<sub>5-letni</sub> – **2,951**; punktacja MNiSW – **30**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **9**.

Wkład habilitanta: **80%**. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji pracy, autor większości rozdziałów (poza *The processing of ores as a source of arsenic in the environment*) i osoba odpowiedzialna za przygotowanie manuskryptu; przygotowanie wszystkich rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- 2) **Drewniak L., Dziewit L., Cieczkowska M., Gawor J., Gromadka R., Sklodowska A.** 2013. Structural and functional genomics of plasmid pSinA of *Sinorhizobium* sp. M14 encoding genes for the arsenite oxidation and arsenic resistance. *Journal of Biotechnology* (164, 479-88)

IF<sub>2013</sub> – **2,884**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,221**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **9**.

Wkład habilitanta: **60%**. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń (m.in. izolacja DNA plazmidowego, adnotacja sekwencji plazmidu pSinB, analizy filogenetyczne, konstrukcja i analiza szczepów niosących plazmid pSinA); opieka nad studentką (M. Ciężkowska) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, pozyskanie finansowania badań (Grant nr NN30208363).

- 3) **Drewniak L., Cieczkowska M., Radlinska M., Sklodowska A.** 2015. Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *Journal of Biotechnology*, 196, 42-51

IF<sub>2015</sub> – **2,667**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,108**; punktacja MNiSW – **30**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **2**.

Wkład habilitanta: **60%**. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentką (M. Ciężkowska) podczas wykonywania przez nią badań, analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, pozyskanie finansowania badań (Grant nr NN30208363)

- 4) **Drewniak L., Stasiuk R., Uhrynowski W., Sklodowska A.** 2015. *Shewanella* sp. O23S as a Driving Agent of a System Utilizing Dissimilatory Arsenate-Reducing Bacteria Responsible for Self-Cleaning of Water Contaminated with Arsenic. *International Journal of Molecular Sciences* 16(7), 14409- 14427

IF<sub>2015</sub> – **3,257**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,213**; punktacja MNiSW – **30**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **1**

Wkład habilitanta: **60%**. Autor korespondencyjny. Pomysłodawca koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentem (R. Stasiuk) podczas wykonywania

przez niego badań; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów, pozyskanie finansowania badań (Grant nr 0107/IP1/2015/73)

- 5) **Drewniak L.**, Krawczyk P.S., Mielnicki S., Adamska D., Sobczak A., Lipinski L., Burec-Drewniak W., Sklodowska A. 2016. Physiological and metagenomic analyses of microbial mats involved in self-purification of mine waters contaminated with heavy metals. *Frontiers in Microbiology* 7:1252. doi: 10.3389/fmicb.2016.01252.

IF<sub>2015</sub> – **4,165**; IF<sub>5-letni</sub> – **4,360**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **0**

Wkład habilitanta: **45%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; pobór próbek środowiskowych i wykonanie części doświadczeń; opieka nad doktorantem (S. Mielnickim) podczas wykonywania przez niego badań, analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie części rycin i tabel; udział w przygotowaniu manuskryptu (jego pierwszej wersji) jak również przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów (wspólnie z P. Krawczykiem).

- 6) Romaniuk K., Dziewit L., Decewicz P., Mielnicki S., Radlinska M., **Drewniak L.** 2016. Molecular characterization of the pSinB plasmid of the arsenite-oxidizing, metalotolerant *Sinorhizobium* sp. M14 – insight into the heavy metal resistome of sinorhizobial extrachromosomal replicons. *FEMS Microbiology Ecology*, DOI: 10.1093/femsec/fiw215

IF<sub>2015</sub> – **3,530**; IF<sub>5-letni</sub> – 4,004; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **0**

Wkład habilitanta: **40%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; wykonanie części doświadczeń (m.in. sekwencjonowanie i adnotacja plazmidu pSinB); analiza i interpretacja wyników badań; przygotowanie części rycin i tabel; udział w przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów, pozyskanie finansowania badań (Grant nr NN30208363)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z lat 2015/16 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF<sub>2015</sub>) – **19,26**

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **195**.

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **21**

c) *Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.*

## WSTĘP

---

Arsen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w skorupie ziemskiej (średnia zawartość 3,4 mg/kg) [1] i stanowi powszechne zagrożenie zdrowia w wielu częściach świata. Ze względu na silne działanie teratogenne, kancerogenne i mutagenne nieorganicznych związków arsenu, pierwiastek ten został zaliczony przez Międzynarodową Agencję do Badań nad Rakiem (IARC, International Agency for Research on Cancer) do I grupy substancji rakotwórczych. Najbardziej toksyczne są nieorganiczne związki arsenu na +3 i +5 stopniu utlenienia. Arseniny [(As(OH)<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>AsO<sub>3</sub><sup>-</sup>] wiążą się z grupami tiolowymi białek, zahamowując ich aktywność i funkcjonowanie. Z kolei arseniany [HAsO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub><sup>-</sup>] występują jako molekularne analogi fosforanów i blokują łańcuch oddechowy poprzez zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej [2]. Pomimo tak wysoce niekorzystnego

oddziaływania na procesy komórkowe, istnieje duża grupa mikroorganizmów, które potrafią radzić sobie z tym toksycznym pierwiastkiem. Wśród nich są przedstawiciele archeonów, bakterii oraz grzybów.

Podstawowym mechanizmem obronnym przed szkodliwym działaniem związków arsenu jest blokowanie dostępu do wnętrza komórek m.in. poprzez systemy transportu fosforanów i glicerolu [3]. Mikroorganizmy wykształciły też cały szereg mechanizmów detoksykacji bazujących na procesach redukcji, utleniania, metylacji oraz demetylacji [4]. Większość z tych systemów polega na aktywnym usuwaniu poza komórkę arseninów z wykorzystaniem permeaz błonowych oraz innych enzymów systemów typu *efflux* [5]. W przypadku obecności arsenianów wymagana jest ich uprzednia redukcja do arseninów bądź lotnych arsenków, które mogą być dalej metylowane. Poza systemami oporności na arsen mikroorganizmy wykształciły mechanizmy wykorzystujące ten toksyczny metaloid w procesach oddechowych. Bakterie i archeony potrafią wykorzystywać związki As(V), jako ostateczny akceptor elektronów w łańcuchu transportu elektronów. Dysymilacyjna redukcja arsenianów jest sprzężona z utlenianiem wodoru lub związków organicznych (zazwyczaj octan lub mleczan sodu), a końcowym efektem jest produkcja energii [6]. Bakterie czerpią korzyści energetyczne także z transformacji związków As(III). Arseniny mogą być wykorzystywane, jako donory elektronów (źródło energii) w procesach chemolitotroficznych [2].

Mikroorganizmy mogą wykorzystywać rozpuszczalne w wodzie związki arsenu lub mogą korzystać z arsenu zdeponowanego w pierwotnych i wtórnych minerałach, przyczyniając się do jego rozprzestrzeniania w środowisku. Bakterie chemolitoautotroficzne mogą wykorzystywać pierwotne minerały arsenowe (tj. arsenopiryty, realgar, enargit), jako źródło energii, utleniając arsen bądź inne pierwiastki towarzyszące (głównie żelazo i siarkę) [7]. Bakterie zdolne do dysymilacyjnej redukcji arsenianów, mogą korzystać z wtórnych minerałów Fe lub Al, na których zdeponowany jest As(V). Arsen może być także uwalniany z minerałów Fe-As w warunkach beztlenowych w wyniku działalności bakterii redukujących żelazo [8].

Właściwości fizjologiczne mikroorganizmów zdolnych do transformacji związków arsenu mogą przyczyniać się nie tylko do mobilizacji arsenu z minerałów, ale także mogą prowadzić do jego usuwania z wód, gleb czy osadów dennych. W literaturze opisane są przykłady zastosowania mikroorganizmów do oczyszczania środowisk zanieczyszczonych arsenem z wykorzystaniem zabiegów inżynierskich. Jedną z proponowanych strategii bioremediacji zanieczyszczonych wód opiera się na stosowaniu dwuskładnikowych układów: mikrobiologicznego utleniania arseninów i fizyczno-chemicznego usuwania powstających arsenianów [9]. Kolejnym rozwiązaniem jest stosowanie bakterii redukujących siarczany i wytrącanie siarczków arsenu [10]. W oczyszczaniu gleb zanieczyszczonych arsenem można wykorzystać bakterie dysymilacyjnie redukujące As(V), które przyczyniają się do zwiększenia stopnia wypłukiwania arsenu, poprzez produkcję bardziej mobilnych arseninów [11].

W ramach pracy doktorskiej przeprowadziłem serię badań obejmujących charakterystykę mikroorganizmów arsenowych występujących w nieczynnej kopalni złota w Złotym Stoku. Na przykładzie bakterii wyizolowanych z biofilmów naskalnych oraz mat mikrobiologicznych występujących w osadach dennych i wodach transportowej sztolni Gertruda wyjaśniłem jaką jest rola bakterii w rozprzestrzenianiu się skażeń wód powierzchniowych i gruntowych. Zbadałem czy, jak i które mikroorganizmy są zdolne do wykorzystywania w procesach metabolicznych rozpuszczalnych nieorganicznych związków arsenu. Ponadto, określiłem zdolności (potencjał) wyizolowanych szczepów do mobilizacji arsenu z naturalnie występujących minerałów.

## CEL BADAŃ

---

Tematyka mojej pracy habilitacyjnej jest kontynuacją badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej i obejmuje charakterystykę mikroorganizmów metabolizujących arsen pochodzących z kopalni złota w Złotym Stoku, w kontekście ich roli w procesach samooczyszczania środowiska, jak

również ich praktycznego wykorzystania w procesach bioremediacji inżynieryjnej. W przedstawionym osiągnięciu naukowym (1) analizowano rolę mikrobiologicznych transformacji arsenu w procesach biogórnictwa, ze szczególnym uwzględnieniem udziału bakterii w procesach samooczyszczania wód kopalnianych, oraz (2) przeprowadzono charakterystykę i propozycję zastosowania plazmidów oraz bakterii utleniających arseniny w procesach bioremediacji inżynieryjnej zanieczyszczonych środowisk.

## (1) MIKROBIOLOGICZNE TRANSFORMACJE ARSENU W PROCESACH (BIO)GÓRNICZYCH – ROLA BAKTERII W PROCESACH (SAMO)OCZYSZCZANIA ŚRODOWISKA

---

### **PUBLIKACJA:**

Drewniak L., Skłodowska A. 2013. Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. *Environ Sci and Pollut R* 20, 7728-7739.

---

Zrozumienie roli mikroorganizmów w procesach transformacji metali ciężkich jest podstawą do ich potencjalnego wykorzystania w praktyce. Z tego powodu pierwsza praca (Drewniak, Skłodowska 2013) wchodząca w skład osiągnięcia naukowego miała na celu zestawienie najważniejszych informacji z zakresu biogórnictwa związanego z transformacjami biogeochemicznymi arsenu. Głównym założeniem tej pracy było podsumowanie informacji na temat: (i) czy i jakie związki arsenu mogą podlegać transformacjom mikrobiologicznym, (ii) jakie są podstawowe mechanizmy mikrobiologicznych transformacji minerałów arsenowych. Ponadto, celem było przedstawienie całościowej koncepcji udziału bakterii w cyklach biogeochemicznych arsenu oraz przedstawienie propozycji wykorzystania mikroorganizmów w oczyszczaniu terenów zanieczyszczonych tym toksycznym pierwiastkiem.

Przeprowadzona analiza literaturowa pozwoliła wytypować i scharakteryzować 5 (spośród ponad 200) najpowszechniej występujących pierwotnych minerałów: arsenopiryty, energit, lollingit, orpiment oraz realgar. Właściwości, występowanie oraz przykłady zostały także opisane dla wtórnych minerałów, m.in. dla arsenolitu czy klaudetytu. Bazując na danych literaturowych wytypowano mikrobiologiczne utlenianie siarczków z arsenowych minerałów Fe-S jako główny mechanizm uwalniania arsenu do środowiska.

Najważniejszym elementem pracy było przedstawienie koncepcji mikrobiologicznych transformacji związków/minerałów arsenu w środowiskach górniczych w kontekście rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń arsenem. Głównym czynnikiem prowadzącym do mikrobiologicznego rozpuszczania minerałów arsenowych są procesy utleniania i redukcji. Roztworzenie pierwotnych minerałów arsenowych (np. arsenopiryty, energit) jest prowadzone przede wszystkim przez odporne na arsen mikroorganizmy zdolne do chemolitoautotroficznego utleniania żelaza i siarki, np. przez *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* czy *Leptospirillum ferrooxidans* [12]. Uwalnianie arsenu z pierwotnych minerałów może być także prowadzone bezpośrednio przez bakterie utleniające As(III) [13, 14]. Z kolei, procesy dysymilacyjnej redukcji są związane z rozpuszczaniem i biowietrzeniem wtórnych minerałów arsenowych (np. skorodytu, czy arsenu zabsorbowanego na getycie). W tym przypadku uwalnianie arsenu może być efektem działalności bakterii redukujących żelazo (np. *Shewanella* sp. ANA-3) [15] lub arsen (np. *Shewanella* sp. O23S) [14]. Czynnikiem prowadzącym do procesów biowietrzenia są także metabolity wtórne, tj. siderofory czy kwasy organiczne (np. kwas glukonowy), które odpowiadają za bezpośrednie lub pośrednie pobieranie metali oraz metolidów i rozpuszczanie minerałów [16].

Ważnym elementem pracy było także opisanie sposobów praktycznego wykorzystania mikroorganizmów uczestniczących w obiegu biogeochemicznym arsenu. Z punktu widzenia procesów biogórnictwa niezwykle istotnymi są procesy biolugowania i bioutleniania. Biolugowanie polega na bezpośrednich przemianach nierozpuszczalnych siarczków metali (np. CuS kowelin) do siarczanów metali (np. siarczan miedzi). Z kolei procesy bioutleniania polegają na wstępnym

trawieniu depozytu, w którym pożądanym związek metalu pozostaje nienaruszony, ale struktura minerału zostaje tak zmieniona, że ułatwione jest wnikanie czynników chemicznych i rozpuszczanie minerałów. Przykładem komercyjnego wykorzystania tego typu procesów jest BIOX™, który polega na wstępnej obróbce siarczkowych rud złota (tj. arsenopiryty) [17]. Podczas procesu bioutleniania arsen, żelazo i siarka są selektywnie usuwane ze złóż złota, dzięki czemu pozostały minerał może być łatwiej ekstrahowany poprzez traktowanie cyjankami [18]. Z środowiskowego punktu widzenia bioutlenianie jest dużo bardziej bezpieczne w porównaniu do tradycyjnych metod prażenia i wytapiania, ale podobnie jak inne procesy górnicze przyczynia się do emisji zanieczyszczeń, m.in. uwalniania arsenu do środowiska. Z tego względu niezwykle istotne są metody neutralizacji i usuwania związków arsenu, przede wszystkim z zanieczyszczonych wód.

Analiza danych literaturowych oraz rozwiązań komercyjnych pozwoliła wyróżnić dwie dominujące strategie bioremediacji terenów zanieczyszczonych związkami arsenem. Pierwsza z nich dotyczy aktywnych systemów remediacji (bioreaktorów) i zastosowania bakterii utleniających As(III) do As(V), a następnie fizyczno-chemicznej immobilizacji powstałych arsenianów. Przykładem jest wykorzystanie szczepu *Herminiimonas arsenicoxydans* immobilizowanego na złożu alginanowym oraz kutnahorytu jako minerału do sorpcji As(V) [19]. Drugim typem strategii jest wykorzystanie bakterii redukujących arseniany i siarczany w pasywnych systemach remediacji. Aktywność wspomnianych grup mikroorganizmów w pH neutralnym lub lekko zasadowym może prowadzić do powstawania biogenego siarczku arsenu. Interesującym przykładem są szczepy *Desulfomicrobium* Ben-RB oraz *Desulfotomaculum auripigmentum*, które potrafią jednocześnie redukować As(V) do As(III) oraz S(VI) do S(II), co prowadzi do wewnątrz i zewnątrzkomórkowej precipitacji As<sub>2</sub>S<sub>3</sub> [20].

Podsumowując, niniejsza praca miała charakter przeglądowy, wprowadzający do tematu biogórnictwa arsenu, a jej najważniejszym efektem było przedstawienie zagrożeń środowiskowych związanych z rozpuszczaniem minerałów i uwalnianiem arsenu do wód.

#### **PUBLIKACJA:**

Drewniak L., Uhrynowski W., Stasiuk R., Skłodowska A. 2015. *Shewanella* sp. O23S as a driving agent of a system utilizing dissimilatory arsenate-reducing bacteria responsible for self-cleaning of water contaminated with arsenic. *International Journal of Molecular Sciences* 16(7), 14409- 14427

---

Bakterie redukujące arseniany w procesach oddechowych (ang. DARBs - dissimilatory arsenate reducing bacteria) są jedną z kluczowych grup mikroorganizmów zaangażowanych w biogeochemiczny obieg arsenu. Poprzez redukcję As(V) do As(III) zwiększają mobilność arsenu w środowisku, jednocześnie przyczyniając się do uwalniania bardziej toksycznej formy. Bakterie z grupy DARBs mogą być także zaangażowane w procesy oczyszczania środowiska poprzez pośredni lub bezpośredni udział w immobilizacji (poprzez wytrącanie) arsenu z wody. Charakter i efekt środowiskowy aktywności DARBs jest ściśle uzależniony od warunków biogeochemicznych występujących w danym środowisku.

W pracy przedstawiono szczegółową charakterystykę fizjologiczną szczepu *Shewanella* sp. O23S zdolnego do dysymilacyjnej redukcji arsenianów, w kontekście jego potencjalnej roli w procesach samooczyszczania wód kopalnianych w sztolni Gertruda w Żłotym Stoku (w miejscu jego izolacji). Szczep ten został wybrany jako modelowy DARBs ze względu na fakt, że jest jednym z głównych reprezentantów DARBs w strukturze mat mikrobiologicznych zaangażowanych w transformację arsenu w kopalni w Żłotym Stoku [21] oraz jest on jednym z przedstawicieli DARBs, który wykazuje zdolności do mobilizacji arsenu ze skał [14].

Głównym celem pracy było sprawdzenie, w jakich warunkach może przebiegać redukcja As(V) do As(III) i czy jest to proces preferencyjnie prowadzony przez *Shewanella* sp. O23S, jakie są czynniki ograniczające proces redukcji, oraz czy i jak proces redukcji może wpływać na oczyszczanie środowiska.

Badania donorów elektronów wykazały, że procesy dysymilacyjnej redukcji arsenianów przez *Shewanella* sp. O23S mogą być efektywnie sprzężone jedynie z utlenianiem mleczanów i octanów. Tylko dla wspomnianych donorów elektronów zaobserwowano intensywny wzrost oraz kompletną redukcję arsenianów. Analizy porównawcze nieorganicznych ostatecznych akceptorów elektronów wykazały, że proces oddychania arsenianowego może być preferencyjnym sposobem pozyskiwania energii przez szczep *Shewanella* sp. O23S. Tempo redukcji As(V) do As(III) oraz tempo wzrostu w warunkach beztlenowych na podłożu minimalnym wzbogaconym w arseniany, było kilkukilkunastokrotnie wyższe niż w przypadku redukcji żelaza, manganu, tiosiarczanów czy azotanów. Czas wymagany do pełnej redukcji arsenianów wynosił 4h, z kolei dla żelaza to 24h, dla tiosiarczanów 48h, dla azotanów 72h, zaś dla manganu 144h. Testy wzrostowe wykazały, że dysymilacyjna redukcja As(V) do As(III) może być prowadzona przez szczep O23S w szerokim zakresie temperatur (10-30°C) i pH (4-8), a także w obecności wielu metali ciężkich (m.in. Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Zn). Badania sorpcji statycznej i testy na akumulację wykazały, że *Shewanella* sp. O23S nie wykazuje zdolności do zatrzymywania na powierzchni oraz wewnątrz komórki wysokich stężeń arsenu (poniżej 10 000 mg/kg), ale może wydajnie sorbować Cu i Fe (na poziomie ~80 000mg/kg s.m.) i jest w stanie akumulować znaczne ilości żelaza (~70 000mg/ kg s.m.).

Najważniejszym eksperymentem prezentowanym w pracy była symulacja warunków środowiskowych i sprawdzenie zdolności szczepu O23S do redukcji arsenianów w obecności siarczanów lub tiosiarczanów. Przeprowadzone analizy wykazały, że obecność związków siarki nie zaburza procesów redukcji arsenianów, co więcej w przypadku wariantu z tiosiarczanami oraz arsenianami zaobserwowano produkcję żółtego osadu. Analiza XRD wytrąconego osadu wykazała, że jest to drobnokrystaliczny siarczek arsenu, co sugeruje jednoczesną lub sekwencyjną redukcję As(V) do As(III) oraz redukcję  $S_2O_3^{2-}$  do  $S^{2-}$  przez *Shewanella* sp. O23S, a następnie chemiczne strącanie wtórnego minerału.

Uzyskane wyniki pozwoliły odpowiedzieć na postawione wcześniej pytania dotyczące preferencyjności i zakresu aktywności dysymilacyjnej redukcji arsenianów prowadzonej przez *Shewanella* sp. O23S. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano model pasywnych systemów oczyszczania, w których aktywność DARBs (opcjonalnie) wspomaga bakterie redukujące siarczany i prowadzi do usuwania arsenu ze środowiska poprzez wytrącanie siarczków.

Uzupełnieniem osiągnięcia związanego z charakterystyką i zastosowaniem szczepu *Shewanella* sp. O23S jest wynalazek zgłoszony do ochrony patentowej krajowej (nr zgłoszenia P.404376 z dn. 19.06.2013, nr patentu PAT.220839) i międzynarodowej (nr zgłoszenia WO 2014/203046 A1 z dn. 30.10.2013, nr patentu EP 2 882 851 oraz US 9,328,397). Przedmiotem wynalazku jest ~81 kbp plazmid pSheB, który jest jednym z 5 pozachromosomalnych elementów genomu *Shewanella* sp. O23S. Analiza sekwencji nukleotydowej plazmidu, wykazała, że niesie on wyspę genową kodującą białka odpowiedzialne za dysymilacyjną redukcję arsenianów oraz oporność na As(III) i As(V). Usunięcie plazmidu pSheB z komórek gospodarza skutkuje zanikiem zdolności do oddychania arsenianowego i obniżeniem tolerancji na związki arsenu. Aby wykazać, które geny zlokalizowane na plazmidzie pSheB kodują białka odpowiedzialne za dysymilacyjną redukcję arsenianów, sklonowano moduł *arr*, obejmujący m.in. geny dysymilacyjnej reduktazy arsenianowej *arrAB*, w wektorze pBBR1-MCS2 (Km<sup>r</sup>) w szczepie *Escherichia coli* TOP10 i sprawdzono jego funkcjonalność. Przeprowadzone analizy wykazały, że wprowadzenie genów modułu *arr* plazmidu pSheB, na wektorze pBBR1MCS do szczepu *E. coli* TOP10 prowadzi do nabycia zdolności do dysymilacyjnej redukcji arsenianów

#### **Główne osiągnięcia:**

- Wykazanie przewagi energetycznej wykorzystania arsenianów nad innymi ostatecznymi akceptorami elektronów utylizowanymi przez *Shewanella* sp. O23S
- Wyznaczenie czynników organiczających proces oddychania arsenianowego *Shewanella* sp. O23S
- Przedstawienie modelu pasywnych systemów oczyszczania bazujących na zdolności *Shewanella* sp. O23S do produkcji siarczku arsenu

- Uzyskanie sekwencji plazmidu pSheB i identyfikacja wyspy genowej kodującej białka zaangażowane w oddychanie arsenianowe i oporność na arsen (w ramach patentu)
- Sklonowanie genów *arr* dysymilacyjnej reduktazy arsenianowej i wykazanie ich funkcjonalności w komórkach *E. coli* (w ramach patentu)

## **PUBLIKACJA:**

Drewniak L., Krawczyk P.S., Mielnicki S., Adamska D., Sobczak A., Lipinski L., Burec-Drewniak W., Sklodowska A. 2016. Physiological and metagenomic analyses of microbial mats involved in self-purification of mine waters contaminated with heavy metals. *Front. Microbiol.* 7:1252. doi: 10.3389/fmicb.2016.01252

---

W pracy przeprowadzono fizjologiczną i metagenomiczną analizę porównawczą mat mikrobiologicznych zasiedlających wody kopalni uranu i złota w celu identyfikacji kluczowych procesów i grup fizjologicznych mikroorganizmów zaangażowanych w procesy (samo)oczyszczania zanieczyszczonych wód kopalnianych.

Wody występujące w nieczynnych już kopalniach uranu w Kowarach i złota w Złotym Stoku są zanieczyszczone metalami ciężkim (głównie arsenem), a jednym z czynników przyczyniających się do ich oczyszczania są maty mikroorganizmów zdeponowane w sztolniach transportowych tych kopalni. Wspomniane zespoły mikroorganizmów tworzą naturalne bariery, które wychwytyują metale ciężkie z wód wypływających z kopalni.

Analizy składu pierwiastkowego potwierdziły, że struktury mat zawierają ekstremalnie wysokie stężenia metali ciężkich. Przykładem jest żelazo, którego zawartość w matach była na poziomie 5.8-6.2%. Wysokie zawartości zanotowano także dla arsenu (~6 500 - 19 500 mg/kg s.m) oraz manganu (0.1-7.7%). Ponadto, wysokie stężenia zanotowano dla uranu (152-195 mg/kg), ołowiu (49-252 mg/kg), cynku (415-461mg/kg), kobaltu (15-111 mg/kg) i miedzy (57-77 mg/kg). Badania w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) wykazały, że maty mają wielowarstwową strukturę, której szkielet tworzą mikroorganizmy nitkowate poprzęplątane innymi formami morfologicznymi oraz macierzą zewnątrzkomórkową. Analiza SEM-EDS potwierdziła, że w matach zdeponowane są głównie arsen, glin oraz żelazo, a większość z wykrytych pierwiastków jest równomiernie rozłożona w strukturze badanych zgrupowań mikroorganizmów.

Badania sorpcji statycznej wykazały, że maty mikrobiologiczne z obu kopalni nie są całkowicie wysyczone metalami ciężkimi (As, Cd, Cu, Co i Fe) i mogą jeszcze przyjąć dodatkowe porcje jonów metali. Dla przykładu, arsenem były wysyczone w 46,7%, żelazem na poziomie 76,8%, zaś wysycenie pozostałymi pierwiastkami nie przekraczało 1% pojemności sorpcyjnej. Potwierdzeniem znaczącej roli mat w oczyszczaniu wód kopalnianych były analizy desorpcji, które wykazały, że jedynie silne eluenty (np. EDTA), zazwyczaj nieobecne w warunkach środowiskowych, są w stanie uwolnić zaadsorbowane metale.

W celu wyjaśnienia, które mikroorganizmy i w jaki sposób mogą przyczyniać się do opisanych powyżej zdolności do wychwytywania i wytrącania metali z wód przeprowadzono kompleksową analizę metagenomiczną z wykorzystaniem technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego (Illumina HiSeq2000). Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazały, że charakteryzowane mikrobiocenozy różnią się od dotychczas prezentowanych zespołów mikroorganizmów reprezentujących środowiska zanieczyszczone metalami ciężkimi. Szkielet mat mikrobiologicznych występujących w wodach kopalnianych w Złotym Stoku i Kowarach jest zdominowany przez nitkowate bakterie z rodzaju *Leptothrix*, *Thiothrix* i *Beggiatoa*, a najliczniej reprezentowanym gatunkiem zidentyfikowanym w obu zespołach jest *Methylobacter tundripaludum*. Zestawienie struktury taksonomicznej z funkcjami metabolicznymi zidentyfikowanymi na poziomie metagenomu wskazało, że kształt zespołów tworzących maty mikrobiologiczne w wodach kopalnianych w Złotym Stoku i Kowarach jest determinowany, głównie przez obecność odpowiedniego źródła węgla (np. CH<sub>4</sub> i inne związki C1).

Porównanie różnorodności i bogactwa genów metabolizmu oraz genów strukturalnych pozwoliło na wyróżnienie kluczowych funkcji związanych z transformacjami metali ciężkich: (i) tworzenie biofilmów, (ii) oporności na metale ciężkie, (iii) donory i akceptory elektronów, (iv) kwasy i ligandy organiczne zaangażowane w kompleksowanie i mobilizację metali. Spośród wyróżnionych grup najbardziej liczną stanowiły funkcje związane z tworzeniem biofilmów (z 2% przypisanych odczytów metagenomowych) oraz opornością na metale ciężkie (~1,5% przypisanych odczytów metagenomowych). Wśród genów oporności na metale najliczniej reprezentowane (~95%) były



elementy systemów CZC (oporności na Cd, Zn, Co). Istotną grupę funkcji związanych z homeostazą metali stanowiły także geny kodujące białka potencjalnie zaangażowane w procesy utleniania i redukcji żelaza, siarki oraz arsenu w procesach oddechowych. W puli zidentyfikowanych funkcji istotne były także te związane z produkcją sideroforów oraz syntezą innych ligandów i kwasów organicznych (np. syntaza cytrynianowa) zaangażowanych w mobilizację metali.

Analiza funkcjonalna mat mikrobiologicznych potwierdziła obecność bakterii redukujących żelazo, siarczany i arseniny, grup mikroorganizmów zaangażowanych w procesy immobilizacji i wytrącania metali ciężkich z wód kopalnianych.

Na podstawie przeprowadzonych analiz fizjologicznych i metagenomicznych zaproponowano mechanizm opisujący procesy i rolę poszczególnych grup mikroorganizmów wchodzących w skład mat i zaangażowanych w oczyszczanie wód kopalnianych.

#### **Główne osiągnięcia:**

- Wykazanie, że struktura filogenetyczna zespołów mikroorganizmów występujących w środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi nie jest determinowana przez obecność tych toksycznych pierwiastków, lecz jest uzależniona od dostępności związków będących podstawowym źródłem węgla i nieorganicznych donorów elektronów
- Wykazanie, że funkcje związane z tworzeniem biofilmów oraz opornością na metale ciężkie są bardziej istotne w kontekście procesów oczyszczania niż zdolności do wykorzystywania metali ciężkich w procesach oddechowych
- Wykazanie dominacji oraz większej roli mikroorganizmów zaangażowanych w procesy immobilizacji metali (głównie w wyniku procesów beztlenowych) nad mikroorganizmami odpowiedzialnymi za procesy związane z mobilizacją metali

## **(2) CHARAKTERYSTYKA PLAZMIDÓW BAKTERII UTLENIAJĄCYCH ARSENINY I ICH WYKORZYSTANIE W BIOREMEDIACJI**

---

#### **PUBLIKACJA:**

**Drewniak L.,** Dziewit L., Cieżkowska M., Gawor J., Gromadka R., Skłodowska A. 2013. Structural and functional genomics of plasmid pSinA of *Sinorhizobium* sp. M14 encoding genes for the arsenite oxidation and arsenic resistance. *Journal of Biotechnology* (164, 479-88)

---

*Sinorhizobium* sp. M14 jest jednym z pierwszych wyizolowanych i opisanych szczepów zdolnych do chemilitoautotroficznego utleniania arseninów [22]. Szczep ten niesie dwa pozachromosomalne replikony: plazmid pSinA wielkości ~109 kbp oraz plazmid pSinB wielkości ~300kbp. W publikacji została przedstawiona strukturalna i funkcjonalna charakterystyka plazmidu pSinA *Sinorhizobium* sp. M14, niosącego m.in. geny kodujące białka transportujące arsen do/z komórek, geny oporności na arsen oraz geny kodujące oksydazę arseninową.

Analiza sekwencji nukleotydowej plazmidu pSinA pozwoliła wyróżnić szkielet plazmidu (36 ORF obejmujących systemy replikacyjne, stabilizujące i system transferu koniugacyjnego) oraz moduły fenotypowe (47 ORF obejmujących moduł metabolizmu arsenu i moduł oporności na metale ciężkie). Wśród modułów szkieletu plazmidu wyróżniono system replikacyjno-stabilizujący *repABC* (typowy dla plazmidów bakterii z grupy *Rhizobium/Agrobacterium*) oraz dwu genowy system z genem *parB*.

Analiza minireplikonów plazmidu wykazała, że systemy replikacyjno-stabilizujące pSinA są funkcjonalne i umożliwiają namnażanie oraz utrzymanie się w komórkach gospodarzy reprezentujących *Alpha-* i *Gammaproteobacteria*. Usunięcie plazmidu pSinA z wykorzystaniem minireplikonu pMSA10 potwierdziło funkcjonalność modułów fenotypowych zlokalizowanych na plazmidzie. Komórki *Sinorhizobium* sp. M14 pozbawione plazmidu pSinA nie były zdolne do utleniania arseninów oraz miały obniżony poziom tolerancji na arsen i inne metale ciężkie. Szczegółowa analiza sekwencji plazmidu pSinA wykazała, że w obrębie modułu ARS są zlokalizowane wszystkie geny niezbędne do pobierania arsenu, oporności na arsen, a także utleniania arseninów. Dodatkowo na plazmidzie zidentyfikowano moduł HMR, zawierający geny kodujące białka potencjalnie zaangażowane w oporność na Cd, Zn i Co (system CZC) oraz Hg (system MER).

Badanie systemu koniugacyjnego składającego się z 29 otwartych ramek odczytu (obejmujących potencjalne geny *tra* i *trb*) pozwoliło potwierdzić jego funkcjonalność. W wyniku dwu- oraz trój-rodzicielskiej koniugacji skutecznie przeniesiono plazmid pSinA z komórek *Sinorhizobium* sp. M14 do dwóch innych przedstawicieli *Alphaproteobacteria*: *Paracoccus alcaliphilus* JCM7364R oraz *Agrobacterium tumefaciens* LBA288. Po wprowadzeniu plazmidu pSinA do komórek biorców, nabywają one zdolności do utleniania arseninów i zwiększają swoją tolerancję na arsen oraz inne metale ciężkie (m.in. Zn, Cd, Co). Dodatkowo, w ramach eksperymentu w mikrokosmach z glebą zanieczyszczoną arsenem wykazano, że bioaugmentacja szczepem *Sinorhizobium* sp. M14 prowadzi do przekazywania plazmidu pSinA do komórek autochtonicznej mikroflory z klasy *Alpha- i Gammaproteobacteria*.

Możliwość transferu koniugacyjnego plazmidu pSinA do komórek bakterii mikroorganizmów autochtonicznych stała się podstawą wynalazku opatentowanego w kraju (PAT. 219153) oraz za granicą (Europa - EP 2 800 808; USA - US 9,243,255). Konstrukcja szczepów zdolnych do utleniania arseninów bazujących na naturalnej mikroflorze oraz na plazmidzie pSinA pozwala na przezwycięzenie niedogodności związanej ze stosowaniem szczepów allochtonicznych (szczególnie pochodzenia laboratoryjnego), które zazwyczaj mają niewielkie szanse na przetrwanie w nowym środowisku. Weryfikacja funkcjonalności i skuteczności wynalazku, a więc zastosowania praktycznego szczepów niosących plazmid pSinA, jest aktualnie prowadzona w skali pilotażowej w instalacji do oczyszczania wody. W ramach programu LIDER IV NCBR została opracowana technologia i skonstruowana mobilna instalacja dwustopniowego usuwania arsenu z zanieczyszczonych wód. W pierwszym etapie technologii wykorzystywane są szczepy (niosące plazmid pSinA) zdolne do utleniania arseninów do arsenianów, które w drugim etapie są wychwytywane na złożach żelazowo-glinowych.

#### **Główne osiągnięcia:**

- Uzyskanie sekwencji i opisanie pierwszego naturalnego plazmidu niosącego geny kodujące białka zaangażowane w utlenianie arseninów
- Usunięcie plazmidu pSinA z komórek *Sinorhizobium* sp. M14 i wykazanie jego roli w utlenianiu arseninów
- Identyfikacja i charakterystyka strukturalna „arsenowej” wyspy genowej
- Transfer plazmidu pSinA z komórek *Sinorhizobium* sp. M14 do komórek gospodarzy bakterii z klasy *Alphaproteobacteria* i wykazanie funkcjonalności w komórkach gospodarzy
- Przedstawienie dowodów na horyzontalny transfer plazmidu pSinA i rozpowszechnianie genów oksydazy arseninowej wśród mikroflory glebowej

#### **PUBLIKACJA:**

**Drewniak L.**, Ciekowska M., Radlinska M., Skłodowska A. 2015. Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *Journal of Biotechnology*, 196, 42-51

---

Zdolność do utleniania arseninów do arsenianów, jak również sama oporność na związki arsenu jest cechą pożądaną dla mikroorganizmów wykorzystywanych w procesach bioremediacji czy bioługowania. W ramach niniejszej pracy skonstruowano i zweryfikowano funkcjonalność dwóch wektorów o szerokim zakresie gospodarza, niosących geny metabolizmu arsenu.

Do konstrukcji wektorów wykorzystano moduły fenotypowe zlokalizowane na plazmidzie pSinA *Sinorhizobium* sp. M14. Moduł AIO (10 077 pz) zawierający geny oksydazy arseninowej, syntazy molibdopterynowej, cytochrom C oraz geny regulatorowe został sklonowany w wektorze o szerokim zakresie gospodarza pBBR1MCS-2 ( $Km^r$ ) w komórkach *E. coli* TG1, w rezultacie, czego skonstruowano plazmid pAIO1. Z kolei moduł ARS (7 742 pz) zawierający m.in. gen cytoplazmatycznej reduktazy arsenianowej oraz permeazy ArsB również został sklonowany w wektorze o szerokim zakresie gospodarza pCM62 ( $Tc^r$ ) (reprezentującym inną grupę niezgodności) w komórkach *E. coli* TG1, prowadząc do powstania plazmidu pARS1. Oba skonstruowane szczepy wprowadzano (samodzielnie lub razem) do komórek gospodarzy filogenetycznie odległych

(reprezentujących *Alpha*-, *Beta*-, i *Gammaproteobacteria*) oraz różniących się fenotypem (wrażliwych i opornych na arseniany i arseniny, oraz zdolnych i niezdolnych do utleniania arseninów).

Przeprowadzone analizy wykazały, że wprowadzenie plazmidu pARS1 do komórek gospodarzy o niskiej tolerancji na związki As(III) powoduje jej istotne zwiększenie. Przykładem są szczepy *A. tumefaciens* LBA288 (MIC dla As(III) 1mM) i *Stenotrophomonas* sp. LM24R (MIC dla As(III) 5mM), które po nabyciu plazmidu pARS1 zwiększyły swoją oporność na arseniny do 20mM. Podwyższenie tolerancji na As(III) zaobserwowano także w przypadku szczepów posiadających wydajne systemy usuwania arseninów poza komórkę (np. *Alcaligenes* sp. LM16R zwiększył oporność z 17,5 mM do 20mM). Zupełnie inny efekt fenotypowy zaobserwowano w przypadku oporności na związki As(V). Po wprowadzeniu plazmidu pARS1 do komórek gospodarzy nie obserwowano podwyższenia poziomu oporności, a jedynie spowolnienie wzrostu komórek.

Analiza funkcjonalna plazmidu pAIO1 wykazała, że jego wprowadzenie do komórek gospodarzy pierwotnie niezdolnych do utleniania arseninów (np. *A. tumefaciens* LBA288) prowadzi do nabycia zdolności do transformacji As(III) do As(V). Z kolei, wprowadzenie pAIO1 do komórek bakterii posiadających zdolność do utleniania arseninów (np. *Alcaligenes* sp. LM16R) nie objawia się żadnym efektem fenotypowym. Największe zmiany fenotypowe są obserwowane w przypadku układów dwu plazmidowych z pAIO1 oraz pARS1. Obecność obu plazmidów przyczynia się do zmniejszenia czasu wymaganego do całkowitego utlenienia arseninów.

Ostatnim etapem pracy była weryfikacja funkcjonalności szczepów niosących skonstruowane wektory. Szczepy zawierające plazmid pAIO1 oraz szczepy zawierające oba wektory (pAIO1 i pARS1) były zdolne do wzrostu na próbkach wody kopalnianej zawierającej ~3.0 mg As/L [w tym ~0.25 mg As(III)/L i ~2.75 mg As(V)/L], ale ich tempo wzrostu było uzależnione od dodatku organicznego źródła węgla.

#### **Główne osiągnięcia:**

- Konstrukcja wektora pAIO warunkującego zdolność do utleniania arseninów oraz konstrukcja wektora pARS warunkującego oporność na arsen
- Konstrukcja szczepów niosących plazmid pAIO oraz pARS
- Weryfikacja funkcjonalności skonstruowanych szczepów niosących plazmid pAIO na próbkach środowiskowych

#### **PUBLIKACJA:**

Romaniuk K., Dziewit L., Decewicz P., Mielnicki S., Radlinska M., **Drewniak L.** 2016. Molecular characterization of the pSinB plasmid of the arsenite-oxidizing, metallotolerant *Sinorhizobium* sp. M14 – insight into the heavy metal resistome of sinorhizobial extrachromosomal replicons. *FEMS Microbiology Ecology*.

---

Ostatnia praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego jest dopełnieniem badań mających na celu charakterystykę i praktyczne zastosowanie szczepu *Sinorhizobium* sp. M14. W ramach pracy przeprowadzono szczegółową strukturalną i funkcjonalną analizę ~300 kbp plazmidu pSinB. Analiza sekwencji plazmidu pSinB pozwoliła na wyróżnienie genów odpowiedzialnych za utrzymanie się plazmidu w komórkach gospodarza oraz potencjalnych modułów fenotypowych.

Szkielet plazmidu pSinB tworzą: (i) system replikacyjny *repABC* (3 geny), (ii) system stabilizujący *phd-vapC* (TA1) (2 geny), (iii) system stabilizujący typu *hipAB* (2 geny) oraz (iv) system transferu koniugacyjnego (23 geny). Analiza funkcjonalna wektorów wahadłowych, pochodnych plazmidu pABW1, niosących geny systemu replikacyjnego oraz systemów stabilizujących wykazała, że gen *repC* jest wymagany do replikacji, ale nie zapewnia on stabilnego dziedziczenia w komórkach gospodarza. Kompletny system *repABC* gwarantuje stabilność w komórkach gospodarza na poziomie 77%, zaś do 100% stabilności wymagana jest dodatkowo obecność systemu *phd-vapC*. W ramach badania systemu replikacyjnego *repABC* sprawdzono jego zakres gospodarza. W żadnym z testowanych szczepów, poza *A. tumefaciens* system *repABC* nie był aktywny, co świadczy o wąskim zakresie gospodarza plazmidu pSinB. Niepowodzeniem zakończyły

się także próby koniugacji dwu- i trój-rodzicielskiej plazmidu pSinB do komórek *A. tumefaciens* LB288. Usunięcie plazmidu pSinB za pomocą minireplikonów także się nie powiodło, co może sugerować, że pSinB jest chromidem.

Analiza *in silico* plazmidu pSinB pozwoliła wyróżnić w jego obrębie 8 modułów (HMR1-HMR8) kodujących białka potencjalnie zaangażowane w oporność na metale ciężkie. Wśród wyróżnionych modułów były geny kodujące m.in. pompy typu efflux, transportery i oksydazy miedziowe, które zapewniają oporność na arsen, cynk, kadm, miedź, nikiel, rtęć, srebro oraz żelazo. Analiza funkcjonalna wyróżnionych genów wykazała, że większość z nich (poza HMR6) jest aktywna w komórkach gospodarzy innych niż *Sinorhizobium* sp. M14. Funkcjonalność wyróżnionych modułów wyrażała się poprzez obniżenie bądź podwyższenie tolerancji na metale i była zależna od badanego szczepu oraz metalu ciężkiego. Badanie rozpowszechnienia genów oporności na metale ciężkie (tzw. rezystomu) wśród plazmidów bakterii z rodzaju *Sinorhizobium* wykazały, że wyróżnione w pracy moduły HMR nie są unikatowe i powszechnie występują w tych replikonach.

**Główne osiągnięcia:**

- Uzyskanie sekwencji plazmidu pSinB i identyfikacja modułów fenotypowych warunkujących oporność na metale ciężkie
- Wykazanie funkcjonalności wyróżnionych *in silico* modułów oporności na metale ciężkie

---

## PODSUMOWANIE

Przedstawione we wniosku prace dotyczyły rozpoznania fizjologicznego oraz genetycznego mikroorganizmów występujących w środowiskach zanieczyszczonych związkami arsenu. Ich charakterystyka była prowadzona w celu wyjaśnienia ich potencjalnej roli w procesach samooczyszczania środowiska, jak również ich praktycznego wykorzystania w technologiach bioremediacji inżynierskiej. Prowadzone prace miały charakter badań podstawowych (obejmujących analizy z zakresu biogeochemii, mikrobiologii oraz biologii molekularnej) jak i aplikacyjnych. Badania mikroorganizmów zaangażowanych w procesy transformacji związków arsenu były prowadzone zarówno na poziomie pojedynczych komórek jak i całych zespołów mikroorganizmów, na poziomie fizjologicznym oraz (meta)genomicznym. Uzyskane wyniki pozwoliły na poznanie mikrobiologicznych mechanizmów prowadzących do usuwania arsenu z wód, jak również umożliwiły konstrukcję nowych narzędzi (wektorów, szczepów), które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w biotechnologii.

Prace dotyczące wyjaśnienia roli bakterii dysymilacyjnie redukujących arseniany w procesach oczyszczania wód kopalnianych oraz ich możliwości zastosowania w biogórnictwie zakończyły się uzyskaniem ochrony patentowej wynalazku w 8 krajach (Polska, Bułgaria, Niemcy, Francja, Wielka Brytania, Węgry, Rumunia, USA). Z kolei, charakterystyka szczepu *Sinorhizobium* sp. M14 i jego plazmidów pozwoliła na opracowanie wynalazku (opatentowanego w PL, EU i USA) stanowiącego podstawy technologii do oczyszczania wód zanieczyszczonych arsenem. Wspomniana technologia jest obecnie na etapie prac przedwdrożeniowych testowana w gminie Złoty Stok. W celu rozwijania i dalszego komercjalizowania opisanych wynalazków w 2014 roku została założona spółka RDLS Sp. z o.o – pierwsza spółka typu „spin-off” na Uniwersytecie Warszawskim.

---

## PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję kontynuację projektów badawczych i prac rozwojowych z zakresu biotechnologii środowiskowej, obejmującej następujące zagadnienia:

- *utyliczacja osadów ściekowych oraz innych materiałów odpadowych w procesie fermentacji metanowej* – badania te są kontynuacją rozpoczętych prac B+R i dotyczą opracowania oraz wdrożenia biopreparatów przyspieszających produkcję biogazu z osadów ściekowych

- *biodegradacja związków ropopochodnych* oraz innych toksycznych związków organicznych – badania te mają charakter prac aplikacyjnych i są prowadzone w odpowiedzi na realne potrzeby remediacyjne sektora paliwowego
- *biodeterioracja obiektów muzealnych* – prace te dotyczą identyfikacji i charakterystyki bakterii oraz grzybów odpowiedzialnych za niszczenie obiektów muzealnych
- *charakterystyka i zastosowanie rud darniowych* – badania te obejmują zagadnienia związane z praktycznym wykorzystaniem rud darniowych w procesach oczyszczania wód zanieczyszczonych metalami ciężkimi
- *bioremediacja i biolugowanie metali ze składowisk odpadów przemysłowych* – badania dotyczą opracowania i wdrożenia biotechnologii oczyszczania i odzyskiwania metali z materiałów odpadowych z wykorzystaniem potencjału bakterii

## LITERATURA

---

- [1] Wedepohl K.H.: The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals. In: Merian E, ed. Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance. New York, NY: VCH, s. 3-17, 1991
- [2] Drewniak L., Skłodowska A. 2007. Rola bakterii w biogeochemicznym cyklu arsenu. *Post Mikrobiol* 46(3): 275-285
- [3] Mukhopadhyay R., Rosen B.P., Phung L.T., Silver S. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 26: 311–325
- [4] Bentley R., Chasteen T.G. 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol Biol Rev* 66:250-71
- [5] Oremland R.S., Stolz J.F. 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300:939-944
- [6] Oremland R.S., Stolz J.F. 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews*.23:615-627.
- [7] Corkhill C.L., Wincott P.L., Lloyd J.R., Vaughan D.J. 2008. The oxidative dissolution of arsenopyrite (FeAsS) and enargite (Cu<sub>3</sub>AsS<sub>4</sub>) by *Leptospirillum ferrooxidans*. *Geochim Cosmochim Acta* 72:5616–5633
- [8] Zobrist J., Dowdle P.R., Davis J.A., Oremland R.S. 2000. Mobilization of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environ Sci Technol* 34:4747–4753
- [9] Mokashi S.A., Paknikar K.M. 2002. Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. *Lett Appl Microbiol* 34:258-262
- [10] Teclu D., Tivchev G., Laing M., Wallis M. 2008. Bioremoval of arsenic species from contaminated waters by sulphate-reducing bacteria, *Water Res* 42:4885–4893
- [11] Paez-Espino D., Tamames J., de Lorenzo V., Canovas D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biomaterials* 22:117-30
- [12] Hackl R.P., Jones L. 1997. Bacterial sulfur oxidation pathways and their effect on the cyanidation characteristics of biooxidised refractory gold concentrates. In: Proc. 16th Int. Biohydrometall. Symp., Australian Mineral Foundation, Glenside, South Australia, pp. M14.2.1.–M14.2.10
- [13] Rhine E.D., Onesios K.M., Serfes M.E., Reinfelder J.R., Young L.Y. 2008. Arsenic transformation and mobilization from minerals by the arsenite oxidizing strain WAO. *Environ Sci Technol* 42: 1423-1429
- [14] Drewniak L, Matlakowska R, Rewerski B, Skłodowska A. 2010. Arsenic release from gold mine rocks mediated by the activity of indigenous bacteria. *Hydrometallurgy* 104: 437-442
- [15] Tufano K.J., Reyes C., Saltikov C.W., Fendorf S. 2008. Reductive processes controlling arsenic retention: revealing the relative importance of iron and arsenic reduction. *Environ Sci Technol* 42:8283–8289

- [16] Mailloux B.J., Alexandrova E., Keimowitz A.R., Wovkulich K., Freyer G.A., Herron M., Stolz J.F., Kenna T.C., Pichler T., Polizzotto M.L., Dong H., Bishop M., Knappett P.S.K. 2009. Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic. *Applied and Environ Microbiol* 75:2558-2565
- [17] Rawlings D.E. 2011. Biomining (Mineral Bioleaching, Mineral Biooxidation). In: Reitner J, Thiel V (eds.), *Encyclopedia of Geobiology*, Springer Netherlands, pp. 182-185
- [18] Rawlings D.E. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 4:13
- [19] Lievremont D., N'Negue M.A., Behra P., Lett M.C. 2003. Biological oxidation of arsenite: batch reactor experiments in presence of kutnahorite and chabazite. *Chemosphere* 51:419-428
- [20] Newman D.K, Beveridge T.J, Morel F. 1997. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl Environ Microbiol* 63:2022-2028
- [21] Drewniak L., Maryan N., Lewandowski W., Sklodowska A. 2012. The contribution of microbial mats to the arsenic geochemistry of an ancient gold mine. *Environmental Pollution* 162, 190-2
- [22] Drewniak L, Matlakowska R, Sklodowska A. 2008. Arsenite and arsenate metabolism of *Sinorhizobium* sp. M14 living in the extreme environment of the Zloty Stok gold mine. *Geomicro J* 25: 363-370

---

#### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

---

#### OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

---

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłem współautorem 5 prac naukowych:

- 1) Dziewit L., M. Jazurek, **L. Drewniak**, J. Baj and D. Bartosik. 2007. SXT conjugative element and linear prophage N15 encode novel type of toxin-antitoxin stabilizing systems homologous to the *tad-ata* module of *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2. *J. Bacteriol.* 189: 1983-1997.
- 2) **Drewniak L.**, Sklodowska A. 2007. Rola bakterii w biogeochemicznym cyklu arsenu. *Postępy Mikrobiologii* 46 (3), 275-285
- 3) **Drewniak L.**, Styczek A., Majder-Lopatka M., Sklodowska A. 2008a. Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environ. Pollut.* 156(3):1069-74
- 4) **Drewniak L.**, Matlakowska R., Sklodowska A. 2008b. Arsenite and arsenate metabolism of *Sinorhizobium* sp. M14 living in the extreme environment of the Zloty Stok gold mine. *Geomicrobiol J* 25 (7- 8): 363-370
- 5) Matlakowska R., **Drewniak L.**, Sklodowska A. 2008. Arsenic-hypertolerant *Pseudomonads* isolated from ancient gold and copper-bearing black shale deposits. *Geomicrobiol J* 25 (7- 8) 357-362

Pierwsza z publikacji (Dziewit i wsp. 2007) była wynikiem realizacji pracy magisterskiej i dotyczyła charakterystyki nieopisanej wcześniej grupy systemów stabilizujących plazmidy bakterii. Modelowym systemem w badanej grupie był pochodzący z plazmidu pAMI2 *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 moduł *tad-ata* obejmujący geny kodujące białka toksyny i antytoksyny. Poza modułem *tad-ata* w pracy wyróżniono i zbadano 3 homologiczne *loci* pochodzących z (i) elementu SXT *Vibrio cholerae* (s045-s044), (ii) bakteriofaga N15 *Escherichia coli* (*gp49-gp48*) oraz (iii) wyspy genomowej enterokrwotocznego szczepu *E. coli* O157:H7 EDL933 (Z3230-Z3231). Przeprowadzone analizy pozwoliły zbadać: (i) zakresy gospodarzy, w których moduły są funkcjonalne, (ii) strukturę i funkcjonalność operonów oraz aktywności wyróżnionych promotorów, (iii) cel komórkowy i efekt bakteriostatyczny toksyny. Mój udział w pracy polegał na konstrukcji modułów i wektorów bazujących na systemach replikacyjnych i stabilizujących plazmidu pAMI2.

Pozostałe publikacje były bezpośrednio związane z realizacją pracy doktorskiej i dotyczyły izolacji, identyfikacji oraz wstępnej charakterystyki bakterii opornych na związki arsenu oraz bakterii

utleniających arseniny. Badania biofilmów naskalnych w sztolni Gertruda w kopalni złota w Złotym Stoku pozwoliły na izolację i identyfikację 22 szczepów heterotroficznych bakterii opornych na wysokie stężenia As(III) i As(V) (Drewniak i wsp. 2008a). Wyizolowane szczepy reprezentowały bakterie z rodzaju: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Desemzia*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Shewanella*, *Spenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Variovorax*. Na podstawie przeprowadzonych testów fizjologicznych wyizolowanych bakterii heterotroficznych zaproponowano mechanizm uwalniania arsenu z pierwotnych i wtórnych minerałów arsenowych. Mechanizm opiera się na produkcji sideroforów w warunkach deficytu jonów żelaza, a następnie na kompleksowaniu i transportowaniu wychwyconego żelaza do komórki bakteryjnej. Wraz z rozpuszczaniem minerałów i pobieraniem żelaza do środowiska zostają uwolnione współwystępujące pierwiastki, w tym arsen. W pracy Matlakowskiej i wsp., 2008 została przeprowadzona kompleksowa analiza porównawcza hiper-tolerancyjnych szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wyizolowanych z kopalni złota w Złotym Stoku oraz kopalni miedzi w Lubinie. Z kolei, publikacja Drewniak i wsp. 2008b dotyczy izolacji *Sinorhizobium* sp. M14, jednego z pierwszych opisanych szczepów bakterii zdolnych do wykorzystywania arsenu jako donor elektronów w procesach chemolitoautotroficznego metabolizmu.

## OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Prace prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora miały charakter zarówno badań podstawowych, jak i aplikacyjnych, i dotyczyły zagadnień związanych z (i) charakterystyką mikroorganizmów zasiedlających kopalnię złota w Złotym Stoku, (ii) optymalizacją procesu produkcji biogazu, oraz (iii) charakterystyką i wykorzystaniem darniowych rud żelazowych.

## MOLEKULARNA I FUNKCJONALNA CHARAKTERYSTYKA MIKROORGANIZMÓW ZASIEDLAJĄCYCH KOPALNIĘ ŻŁOTA W ŻŁOTYM STOKU

Kontynuując prace badawcze rozpoczęte podczas wykonywania pracy doktorskiej uczestniczyłem w badaniach dotyczących identyfikacji i charakterystyki mikroorganizmów zasiedlających kopalnię złota w Złotym Stoku.

W pracy Drewniak et al., 2010, na przykładzie pojedynczych szczepów reprezentujących bakterie utleniające arseniny, bakterie redukujące arseniany oraz bakterie produkujące siderofory wykazano jak poszczególne grupy fizjologiczne bakterii mogą przyczyniać się do rozpuszczania skał i rozprzestrzeniania zanieczyszczeń związkami arsenu w kopalni złota w Złotym Stoku.

Badania w mikroskopie skaningowym mat mikrobiologicznych występujących w wodach kopalnianych wykazały bogactwo form morfologicznych i pozwoliły zaobserwować sposób kolonizacji skał. Z kolei, analizy molekularne umożliwiły: (i) oszacowanie różnorodności filogenetycznej mikroorganizmów tworzących strukturę mat, (ii) identyfikację bakterii zaangażowanych w procesy utleniania i redukcji związków arsenu oraz (iii) wyróżnienie dominantów i kluczowych bakterii zaangażowanych w cykl biogeochemiczny w kopalni złota w Złotym Stoku (Drewniak et al., 2012).

Dopełnieniem prac mikrobiologicznych w środowisku kopalni złota w Złotym Stoku była charakterystyka bakterii tworzących biofilmy naskalne w sztolni Gertruda (Tomczyk-Żak et al., 2013). W ramach badań przeprowadzono analizę struktury morfologicznej, filogenetycznej (analiza genów 16S rRNA) i funkcjonalnej (w oparciu o analizę genów dysymilacyjnej reduktazy arsenianowej oraz oksydazy arseninowej) zespołu mikroorganizmów tworzących biofilmy. Uzyskane wyniki potwierdziły bogactwo różnorodności taksonomicznej bakterii zasiedlających ściany sztolni oraz pozwoliły zidentyfikować bakterie zdolne do transformacji arsenu w procesach oddechowych.

### **PUBLIKACJE:**

- 1) Tomczyk-Żak K, Kaczanowski S, **Drewniak L**, Dmoch L, Skłodowska A, Zielenkiewicz U. 2013. Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock biofilm from an ancient gold and arsenic mine. *Science of the Total Environment* (461-462,330-40)

- 2) **Drewniak L.**, Maryan N., Lewandowski W., Skłodowska A. 2012. The contribution of microbial mats to the arsenic geochemistry of an ancient gold mine. *Environmental Pollution* 162, 190-201.
- 3) **Drewniak L.**, Matlakowska R., Rewerski B., Skłodowska A. 2010. Arsenic release from gold mine rocks mediated by the activity of indigenous bacteria. *Hydrometallurgy* 104 (3-4), 437-442.

## **OPTIMALIZACJA I KONTROLA PROCESU PRODUKCJI BIOGAZU**

---

W ramach realizacji dwóch projektów aplikacyjnych uczestniczyłem w opracowaniu narzędzi biotechnologicznych do kontroli i optymalizacji procesu produkcji biogazu, zarówno z wykorzystaniem roślin energetycznych (kukurydza) jak i materiałów odpadowych (osadów ściekowych).

Jednym z dotychczasowych osiągnięć jest opracowanie szczepionki mikroorganizmów "DigestPrep" charakteryzujących się podwyższoną aktywnością celulołityczną (Poszytek et al., 2016). Skonstruowana mieszanina składa się z 16 szczepów reprezentujących bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Ochrobactrum*, oraz *Providencia*. Szczepy te zostały wyselekcjonowane z różnych środowisk (biogazowni rolniczej, osad surowy z oczyszczalni ścieków, gnojowica oraz obornik bydły), wymagających wydajnego rozkładu biomasy ligninocelulozowej. Dla pojedynczych szczepów, jak również ich mieszany zostały zaproponowane instrukcje wykorzystania w procesach bioaugmentacji hydrolizerów w dwustopniowych reaktorach fermentacji metanowej pracujących na substratach roślinnych (np. kiszonka kukurydzy).

Kolejnym osiągnięciem jest wyselekcjonowanie konsorcjum bakterii specjalizującego się w hydrolizie białek i tłuszczu (Zgłoszenie patentowe P.413998). W skład szczepionki "LipoPrep" wchodzi szczepy reprezentujące bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Staphylococcus*, *Brevundimonas*, *Klebsiella*, *Brevibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Solibacillus*, *Lysinibacillus*. Szczepionka ta charakteryzuje się m.in. zdolnością do wydajnego upłynnia osadów ściekowych, co znajduje zastosowanie w przyspieszaniu procesu fermentacji metanowej w wydzielonych komorach fermentacyjnych oczyszczalni ścieków.

Wśród opracowanych narzędzi dedykowanych optymalizacji procesu produkcji biogazu jest seria biomarkerów, zdegenerowanych starterów do reakcji PCR, do amplifikacji wybranych genów szlaku metanogenezy. Skonstruowane biomarkery mogą zostać wykorzystane w: (i) badaniach podstawowych dotyczących analizy różnorodności archeonów metanogennych zaangażowanych w produkcję biogazu (Dziewit et al., 2015) oraz (ii) bezpośrednio w przemyśle, jako narzędzie do prowadzenia monitoringu kontrolnego i przeglądowego w rolniczych i przemysłowych komorach fermentacyjnych.

### **PUBLIKACJE I OCHRONA PATENTOWA:**

#### *Publikacje:*

- 1) Poszytek K., Ciekowska M., Skłodowska A., **Drewniak L.** 2016. Microbial Consortium with High Cellulolytic Activity (MCHCA) for enhanced biogas production. *Frontiers in Microbiology*. 7: 324..
- 2) Dziewit L., A. Pyzik, K. Romaniuk, A. Sobczak, P. Szczesny, L. Lipinski, D. Bartosik, **L. Drewniak**. 2015. Novel molecular markers for the detection of methanogens and phylogenetic analyses of methanogenic communities. *Frontiers in Microbiology* 6: 694.
- 3) Palige J., Roubinek O., Wawryniuk K., Modzelwski Ł. Jakowiuk A., Dobrowolski A., **Drewniak L.** Ciekowska M. 2014. Badania procesu fermentacji metanowej z wykorzystaniem metod radioizotopowych i technik gamma skaningu. *Inżynieria i aparatura chemiczna*. 2014, 53, 4: 280-281

#### *Zgłoszenia patentowe/patenty:*

- 1) **Drewniak L.**, Poszytek K., Ciekowska M., Skłodowska A. 2015. Consortium and preparation of microorganisms for catalyzing cellulose hydrolysis, preparation for methane fermentation supplementation, combination preparation, use thereof and method using the same. **Zgłoszenie patentowe międzynarodowe PCT/IB2015/054299** (zgłoszone 7.06.2015)
- 2) **Drewniak L.**, Poszytek K., Ciekowska M., Skłodowska A. 2015. Consortium and preparation of microorganisms for catalyzing cellulose hydrolysis, preparation for methane fermentation supplementation, combination preparation, use thereof and method using the same. **Zgłoszenie patentowe US 14/675,17** (zgłoszone 31.03.2015)



- 3) **Drewniak L.,** Poszytek K., Dziewit L., Skłodowska A. 2015. Lipo-Prep – preparat mikrobiologiczny do katalizowania rozkładu białek, tłuszczu oraz trudno rozkładalnych związków organicznych. **Zgłoszenie patentowe krajowe: P.413998**
- 4) Dziewit L., Bartosik D., Romaniuk K., **Drewniak L.,** Pyzik A., Sobczak A., Lipinski L. 2014. Markery molekularne do identyfikacji oraz badania obecności konsorcjów metanogennych. **Zgłoszenie patentowe krajowe: P.408466**

#### CHARAKTERYSTYKA RUD DARNIOWYCH - SORBENTÓW MINERALNYCH PRZEZNACZONYCH DO USUWANIA METALI CIĘŻKICH Z WODY

---

W ramach pracy Rzepa et al., 2016 oraz realizacji projektu LIDER NCBR uczestniczyłem w charakterystyce rud darniowych, naturalnych sorbentów mineralnych zawierających tlenki i wodorotlenki żelaza oraz glinu. Darniowe rudy żelazowe powszechnie występują w środowisku, są łatwo dostępne do eksploatacji i charakteryzują się zdolnościami do sorpcji fizycznej i chemisorpcji wielu metali i metaloidów, dzięki czemu mogą zostać zastosowane w systemach remediacji zanieczyszczonych wód. Głównym aspektem rozpoczętego cyklu badań było sprawdzenie stabilności i właściwości rud darniowych po ich wyprażeniu, a więc usunięciu materii organicznej, która w sposób pośredni może pomagać w kolonizacji i rozpuszczaniu rud przez mikroorganizmy. Przeprowadzone badania wykazały, że pozbycie się materii organicznej w wyniku wysokotemperaturowego prażenia nie przyczynia się do istotnej zmiany struktury rud darniowych, oraz to co najważniejsze nie wpływa na obniżenie ich właściwości sorpcyjnych.

#### PUBLIKACJA W TEMACIE:

- 1) Rzepa G., Bajda T., Gaweł A., Debiec K., **Drewniak L.** 2016. Mineral transformations and textural evolution during roasting of bog iron ores. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 123 (1), 615-630

#### 6. Dane bibliometryczne.

---

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z lat 2015/16 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość  $IF_{2015}$ ) – **49,898**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitanta – **565**
- Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta (wg bazy Web of Science) – **182**; bez autocytowań **151**
- Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy Web of Science) – **8**.