

Przemiany metanu w środowiskach torfowych

Transformation of methane in peatlands environments

Zofia Stępniewska, Weronika Goraj*, Agnieszka Kuźniar

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Instytut Biotechnologii,
Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, ul. Konstantynów II, 20–708 Lublin

* Tel. +48-81 475-94-61, e-mail: weronikagoraj@kul.pl

Abstract. Wetlands and particularly peatlands are the main natural source of methane. Data indicate that 10–45% of methane emission comes from these sources. Methane emission from wetlands is the result of the balance between methanogenesis and methanotrophic processes and is actively affected by the wetland plant community composition. There are many factors affecting the balance of CH₄: for instance, vegetation has a strong effect on CH₄ emissions from wetland ecosystems by influencing methane production, consumption and transport in the soil. The effects of plants on methane fluxes may be mediated by: molecular diffusion, internal transport through plant aerenchyma tissues and ebullition. Methane is formed in the process of methanogenesis under anaerobic conditions. It may then be emitted into the atmosphere directly from the soil or by internal transport through the plant. Alternatively, it may undergo methane oxidation by methanotrophic bacteria, both free-living in the root zone and associated with the host plant in symbiosis. *Sphagnum* moss is of particular importance for this processes as it contains methanotrophic bacteria in its endophytic system. Methanotrophic bacteria live inside the dead hyaline cells or on the surface of *Sphagnum* leaves and are able to oxidise methane produced in the soil during methanogenesis, making peatlands a natural biofilter for methane, one of the main greenhouse gases.

Key words: peatlands, methane, methanotrophic bacteria

1. Wstęp

Zależności między klimatem a ekosystemami torfowiskowymi, w tym również obszarami leśno-torfowiskowymi są dwukierunkowe, gdyż warunki klimatyczne wpływają na torfowiska, ale także torfowiska oddziałują w sposób aktywny na parametry klimatu. Relacja ta jest silniejsza niż mogłoby to wynikać z niewielkiego, bo tylko 3% udziału torfowisk w całkowitej powierzchni Ziemi. Opiera się ona głównie na procesach obiegu węgla w przyrodzie, których duża część zachodzi na terenie torfowisk i bezpośrednio łączy się z obiegiem węgla w atmosferze. W torfowiskach zgromadzona jest ogromna część, bo około 1/3, węgla organicznego znaj-

dującego się w glebach, która jest równa objętości węgla zawartego w atmosferze czy też w całej biomase obszarów lądowych i wynosi ok. 400–600 Pg (Gorham 1991). Spośród krajowych ekosystemów najczęściej torfowisk skupiają obszary leśne. Występowanie torfowisk na obszarach leśnych ma ogromne znaczenie ekologiczne z racji dużych możliwości akumulacji materii organicznej, jakich nie mają lasy na glebach nie-torfowych. Torfowiska na obszarach leśnych stanowią zatem swoiste zbiorniki osadów biogenicznych (Tobolski 2003).

Obszary podmokłe, w tym torfowiska, uznawane są za największe naturalne źródło metanu, emitują bowiem do atmosfery od 100 do 231 Tg CH₄ rocznie, co stanowi 10–45% całkowitej emisji tego gazu (IPCC 2007).

Tereny te, poprzez procesy metanogenezy, przyczyniają się do intensyfikacji tzw. efektu cieplarnianego, a zarazem efektywnie wychwytyją i zatrzymują CO₂, gromadząc go w postaci produktów fotosyntezy. Emisja zatem metanu z torfowisk jest efektem netto procesów metanogenezy i metanotrofii (Le Mer et Roger 2001).

Określenie całkowitej emisji metanu z różnych terenów podmokłych jest trudne. Stężenie CH₄ w powietrzu nad tymi obszarami wykazuje duże, zarówno czasowe, jak i przestrzenne zróżnicowanie. Emisja tego gazu zależy nie tylko od aktywności mikroorganizmów metanogenicznych i metanotroficznych, ale również od wielu innych czynników. Nawet na ekologicznie jednorodnych obszarach badawczych, współczynnik zmienności przestrzennej może zmieniać się w zakresie 30–100% na niewielkich odcinkach (Bartlett i Harris 1993). Przyczyną różnic wartości emisji jest różnorodność tych ekosystemów, pod względem warunków klimatycznych oraz składu gatunkowego roślin, który różni się znacząco nie tylko globalnie, ale i lokalnie. Może to być też spowodowane faktem, że aktywność mikrobiologiczna torfu zazwyczaj wykazuje duże zróżnicowanie sezonowe (Ding et al. 2004).

W niniejszej pracy wyjaśniono, co wpływa na emisję netto metanu na torfowisku. Na podstawie światowej literatury dość szczegółowo przedstawiono drogę metanu w środowiskach torfowiskowych, zaczynając od jego produkcji przez bakterie metanogenne, poprzez transport oraz utlenianie przez bakterie metanotroficzne. W omówieniu dwóch ostatnich zagadnień szczególną uwagę poświęcono roślinności torfotwórczej, zarówno roślinom naczyniowym, jak i mchowi torfowcowi.

2. Metan na torfowisku

Produkcja i utlenianie

Na bilans metanu ma wpływ wiele czynników, takich jak: temperatura, warunkująca aktywność mikroorganizmów (optimum temperaturowe zarówno dla metanogenów jak i metanotrofów wynosi 20–30°C (Dunfield et al. 1993; Le Mer et Roger 2001); poziom wody gruntowej (Moore i Roulet, 1993; Ding et al. 2002), co determinuje granicę strefy tlenowej i beztlenowej oraz potencjał redoks w glebie torfowej (metanogeneza ma miejsce przy niskim potencjale $Eh < 200$ mV) (Stralis-Pavese et al. 2006); rodzaj torfu (Christensen et al. 2003), zasobność w substancję organiczną; skład gatunkowy roślin (Whiting et Chanton, 1993; Ding et al. 2004), który wpływa na właściwości podłoża, tzn. ilość i jakość substancji organicznej oraz natlenienie (Bartlett i Harris 1993; Ström et al. 2003). Roślinność terenów torfowiskowych jest kluczowym czynnikiem wpływającym

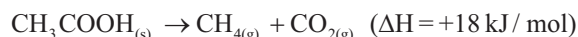
na emisję metanu z tych obszarów, ponieważ bierze udział zarówno w procesie formowania się tego gazu, jego transportu i utleniania (ryc. 1).

Produkcja CH₄

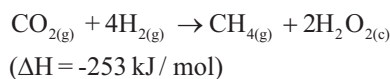
Na torfowiskach w warunkach anaerobowych, z niską zawartością siarczanów i azotanów, licznie nagromadzona materia organiczna przekształcana jest z udziałem bakterii metanogennych do CH₄ i CO₂, co można wyrazić prostym równaniem:



Reakcje przemiany materii są endoergiczne. Odpowiednia ilość energii potrzebna do ich przebiegu musi być więc dostarczona z reakcji egzergicznych, tj. reakcji tworzenia metanu. W procesie tym (metanogeneza) zaangażowane są cztery typy mikroorganizmów: (1) mikroorganizmy – hydrolizujące spolimeryzowane, nierozpuszczalne związki organiczne (białka, węglowodany, tłuszcze) przy współudziale zewnątrzkomórkowych enzymów; (2) acidogeny – rozkładające produkty hydrolizy; (3) acetogeny – przekształcające metabolity poprzedniej fazy, oraz (4) metanogeny – wykorzystujące powstałe produkty (głównie CO₂/H₂ i octany) do syntezy metanu. Tylko 14% gatunków bakterii metanogenicznych wykorzystuje octany jako źródło węgla i energii. Acetotrofy odpowiedzialne są za dwie trzecie formującego się metanu (Le Mer i Roger 2001) zgodnie z reakcją:



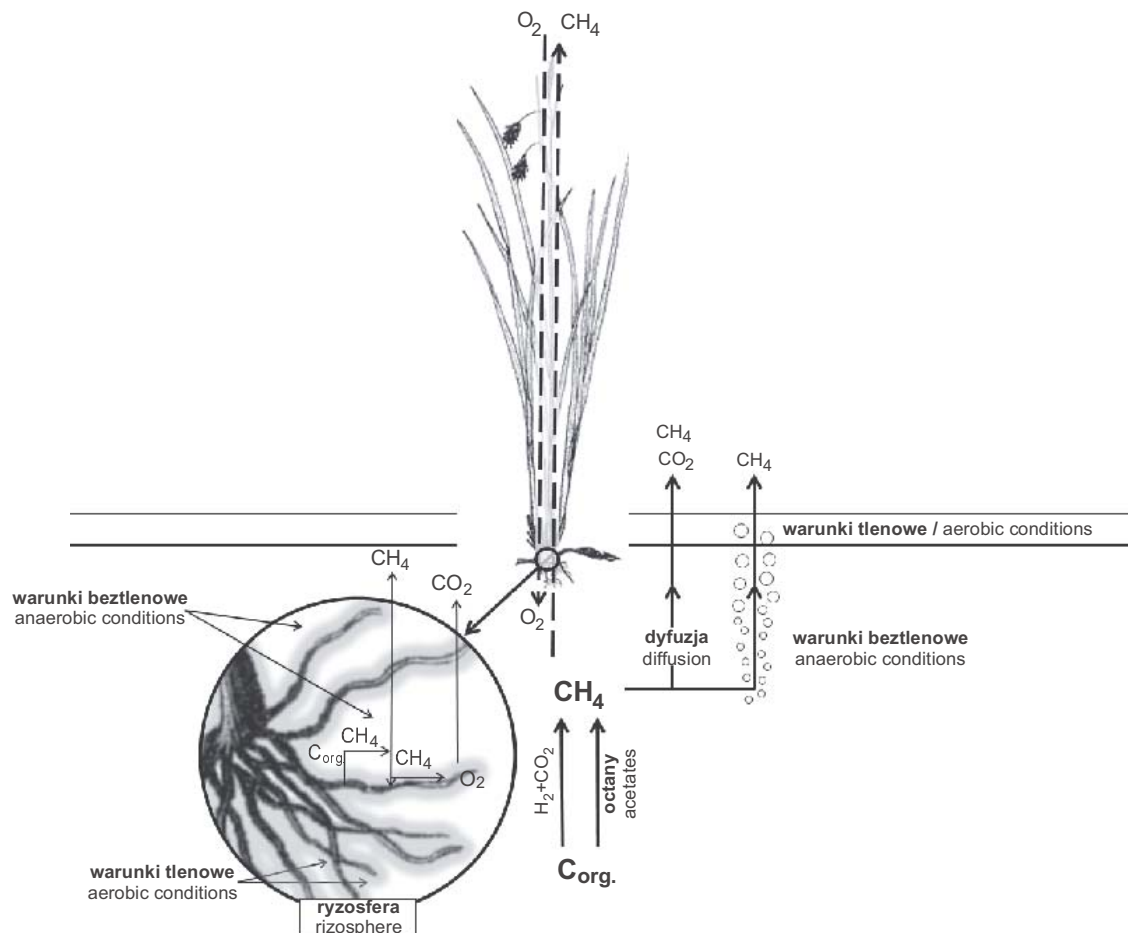
Jedna trzecia wytwarzanego metanu pochodzi z redukcji ditlenku węgla wodorem:



Według Houwelinga i in. (2006) ilość metanu uwalnianego rocznie z udziałem roślin wynosi 85 Tg, chociaż inni badacze przekonują, że roślinność na torfowiskach odpowiada za mniej niż 46 Tg CH₄ wyemitowanego w ciągu roku (Ferretti et al. 2007). Dyskusja na ten temat jest ważna, ponieważ dokładne szacunki mają znaczenie przy sporządzaniu bilansu emisji oraz planowaniu działań mających na celu ograniczenie emisji metanu jako jednego z głównych gazów cieplarnianych.

Transport

Rośliny pośredniczą w przemieszczaniu 55–85% metanu uwalnianego z torfowisk do atmosfery (Waddington et al. 1996). Według Chanton (2005), Berrittella i Huissteden (2011) oraz Green i Baird (2012) transport



Rycina 1. Schemat produkcji i transportu metanu w układzie ‘gleba-roślina-atmosfera’ (modyfikacja własna za Kiene 1991, Le Mer i Roger 2001)

Figure 1. CH₄ production, transport and consumption in soil-plant-atmosphere system (Kiene 1991, Le Mer and Roger 2001 with own modification)

metanu na drodze ‘gleba – atmosfera’ może zachodzić w postaci:

1) przepływu wywołanego gradientem stężeń zaistniałym pomiędzy powietrzem glebowym i atmosferycznym – dyfuzji zależnej od właściwości gleby, takich jak porowatość i przepuszczalność. Podczas dyfuzji może dochodzić do utleniania metanu przez bakterie metanotroficzne w natlenionej strefie gleby;

2) tzw. transportu wewnętrznego, kiedy roślina jest elementem pośrednim w emisji metanu z gleby. Gaz ze strefy korzeniowej poprzez aerenchymę roślin uwalniany jest do atmosfery. Taki rodzaj transportu zapewnia omińnięcie natlenionej strefy gleby, w której istnieje możliwość utleniania metanu przez bakterie metanotroficzne (układ ‘gleba – roślina – atmosfera’);

3) gwałtownego uwalniania się pęcherzyków metanu z gleby – przepływu wywołanego gradientem ciśnienia. Jest to przepływ lepki, zachodzący pod wpływem gradientu ciśnienia, wahań temperatury i wilgotności gleby. Przepływ ten może być wywołany przez deszcze,

zraszanie, parowanie, ruchy wody gruntowej czy wiatr. Ostatnie badania zebrane przez Coulthard i współautorów (2009) sugerują, że ten szlak CH₄ może być najważniejszą drogą uwalniania metanu z torfowisk, ważniejszą niż dyfuzja i transport wewnętrzny.

Utlenianie

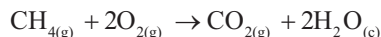
W środowisku aerobowym metan jest utleniany przez bakterie metanotroficzne, wykorzystujące jedną z dwóch możliwości (1) utlenianie o wysokim powinowactwie wobec substratu (stężenie CH₄ < 12 ppm), co odpowiedzialne jest za 10% całkowitej konsumpcji metanu, i (2) o niskim powinowactwie (stężenie CH₄ > 40 ppm) (Whalen et al. 1990).

Utlenianie metanu jest procesem egzoergicznym, uwalniana w nim energia może być wykorzystana do syntezy materiału komórkowego, np. asymilacji węglowodanów. Całkowita ilość energii, jaka zostaje wytwo-

rzona podczas utleniania metanu, jest sumą energii uwalnianej na poszczególnych etapach procesu:



Uproszczony zapis reakcji utleniania CH_4 , który wyraża bilans substratów i produktów, jest następujący:



($\Delta H = -890 \text{ kJ/mol}$)

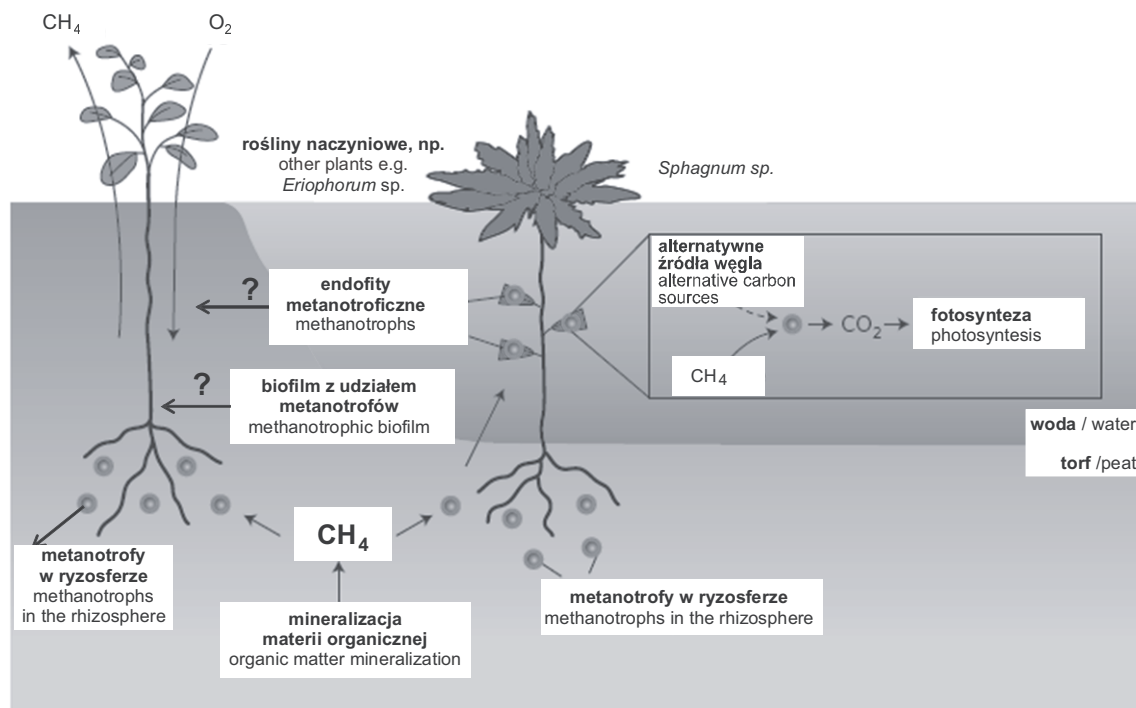
Metanotrofy występować mogą w natlenionej warstwie gleby, w ryzosferze roślin posiadających aerenchymę, a także wewnątrz tkanek roślin (Le Mer i Roger 2001; Raghoebarsing et al. 2005). Ponadto Chen i Murrell (2010) ustalili, że udział roślinności w zmniejszeniu całkowitej emisji CH_4 może wynosić 30–35%. Wykazali oni, że wewnątrz rośliny może być niszą ekologiczną dla bakterii metanotrophicznych, utleniających transportowany przez roślinę metan, znacznie ograniczając jego emisję do atmosfery.

Rośliny naczyniowe wpływają na dynamikę metanu na torfowisku (ryc. 2) poprzez:

- 1) uwalnianie węgla do ryzosfery;
- 2) budowę morfologiczną – strukturę miększu powietrznego;
- 3) transport tlenu do ryzosfery;
- 4) produkcję metanu.

Uwalnianie węgla do ryzosfery powoduje stymulację procesu metanogenezy poprzez wzrost dostępności substratu – C. Rośliny naczyniowe uwalniają do ryzosfery szereg związków węgla: kwasy organiczne, cukry, ektoenzymy, fenole, aminokwasy. Uważa się, że funkcje tych składników związane są interakcjami z innymi roślinami oraz mikroorganizmami (Bais et al. 2006). Niektórzy autorzy sugerują, że octany powstałe w procesie fermentacji związków organicznych (np. uwalnianych przez rośliny) są ważnym substratem w metanogenezie (Ferry 1997, Avery et al. 2003). Potwierdzają to badania izotopowe z użyciem octanu znakowanego węglem ^{14}C (Ström et al. 2003, 2005). Pomimo, że torfowiska stanowią dużą pulę węgla, jest on jednak trudniej dostępny dla metanogenów niż węgiel pochodzący ze związków wydzielanych przez rośliny naczyniowe. Ilość związków węgla uwalnianych przez rośliny jest różna zależnie od gatunku i może stanowić od 10% aż do 44% zasymilowanego węgla. Wydzielanie substancji przez korzenie jest również zależne od dostępności substancji odżywczych, w szczególności od dostępności fosforu (Bais et al. 2006). Skład ilościowy i jakościowy związków węgla wydzielanych przez rośliny acidofilne i alkalifilne jest różny, np. te ostatnie wydzielają więcej kwasu cytrynowego (Ström 1997).

Obecność aerenchymy (miększ powietrzny) tworzy w roślinie system kanałów wentylacyjnych, które u roślin naczyniowych służą również jako kanały do trans-



Rycina 2. Utlenianie metanu na torfowisku (modyfikacja własna za Chen i Murrell 2010)

Figure 2. Methane oxidation (Chen and Murrell 2010 with own modification).

portu CH₄. System ten odgrywa istotną rolę w transporcie metanu i innych gazów w różnych ekosystemach, co zostało udokumentowane przez szereg wcześniejszych badań (np. Aulakh et al. 2000; Henneberg et al. 2012). Korzenie wielu (ale nie wszystkich) roślin występujących na terenach zalanych posiadają znaczne ilości miększu powietrznego. Badania Sun i współpracowników (2012) wskazują, że 38% całkowitej emisji metanu w sezonie wegetacyjnym jest transportowane przez aerenchymę roślin. Wartość ta jest niższa niż we wcześniejszych doniesieniach (np. Morrissey et al. Livingston 1992; Schimel 1995; Ding et al. 2004). Ding i współautorzy (2005), badając emisję z tych samych stanowisk, wskazali, że *Carex lasiocarpa* (turzyca nitkowata) transportuje 72–82% wyemitowanego CH₄. Tak duże różnice w udziale roślin w transporcie CH₄ mogą wynikać w tym przypadku z bardzo dużej, ok. 4,5-krotnej, różnicy biomasy nadziemnej, stwierdzonej w badaniach Ding i współautorów (2005). Pozytywną korelację między emisją metanu a biomasa roślin wykazali również inni badacze (Whiting i Chanton 1993; Joabsson i Christensen 2001).

Utlenianie metanu w ryzosferze zachodzi poprzez skierowaną przeciwnie do metanu dyfuzję tlenu do strefy korzeniowej. Ponad 30–40% tlenu transportowanego przez aerenchymę może dyfundować do gleby (Armstrong 1979). W rezultacie dostarczony jest substrat umożliwiający bakteriom metanotroficznym bytującym w strefie korzeniowej utlenianie CH₄, zanim zostanie on wyemitowany do atmosfery. Istnieją dowody, że wprowadzenie tlenu do ryzosfery powoduje również ochronę przed powszechnie spotykanymi w glebach podmokłych fitotoksynami, do których należą np. siarczki, zredukowane żelazo i mangan, a także lotne kwasy tłuszczowe (Pedersen et al. 2004). W przekształceniach tych związków w formy mniej toksyczne biorą udział mikroorganizmy tlenowe. Zdolność utleniania metanu przez ryzosferę zależy więc od wielu czynników, głównie jednakże od dostępności tlenu, co warunkowane jest gatunkiem rośliny i stopniem rozwinięcia systemu korzeniowego.

Asocjacja roślin z bakteriami metanotroficznymi

Analiza obiegu metanu wymaga uwzględnienia aspektu występowania asocjacji roślin z bakteriami metanotroficznymi. Jest to nowatorskie ujęcie tematu, pokazujące możliwości utleniania metanu na drodze gleba–roślina–atmosfera. Liczne bakterie pochodzące z ryzosfery nie tylko kolonizują ryzosferę i/lub ryzoplano, ale mogą także zasiedlać wnętrza roślin, bardzo często działając stymulująco na ich wzrost (Hallmann 2001; Hallmann i Berg 2007; Compant et al. 2008). Już w 1887 r. Victor Galippe uważał, iż mikroorganizmy glebowe mogą przenikać do zdrowych tkanek roślin i że

konieczne jest zbadanie mechanizmów tej kolonizacji (Galippe 1887).

Szczególne znaczenie w zakresie utleniania metanu można przypisać roślinom terenów podmokłych, przedstawianym do tej pory jako „kanał” dla strumienia gazów (między innymi metanu). Światowe badania nad tym zjawiskiem wskazują, iż istotną rolę w emisji CH₄ odgrywają bakterie metanotroficzne, zarówno wolno żyjące w ryzosferze, związane na powierzchni korzeni roślin w postaci biofilmu (ryzoplana), jak i bytujące wewnątrz tkanek gospodarza (endofity), zasiedlające zarówno części podziemne, jak i nadziemne (głównie *Sphagnum* sp.).

Metanotrofy zdolne do utleniania metanu, który jest dla nich źródłem węgla i energii, należą do gram-ujemnych metylotrofów. Występowanie metanotrofów stwierdzono w różnych ekosystemach. Od ponad 30 lat bakterie utleniające metan skupiały uwagę wielu badaczy. Badania doprowadziły do wyizolowania metanotrofów zasiedlających wiele środowisk, tj. wody słodkie, osady, gleby, wody morskie, torfowiska i gorące źródła (Le Mer i Roger 2001; Knief et al. 2003; Bodelier i Laanbroek 2004; Regina et al. 2007). Mikroorganizmy utleniające metan znane są już od 1906, kiedy Söhngen jako pierwszy wyizolował organizm zdolny do wzrostu na metanie, jako źródle węgla i energii, nazwany *Bacillus methanicus* (Söhngen 1906). Whittenbury wyizolował ponad 100 nowych bakterii metanotroficznych oraz stworzył ich pierwszą klasyfikację, która stała się podstawą do dalszych badań (Whittenbury et al. 1970; Bussmann et al. 2004). Asocjacje bakterii z różnymi organizmami zostały wykazane m.in. na podstawie symbiozy z małżami (Fisher et al. 1987; Cavanaugh et al. 1987; Robinson et al. 1998; Barry et al. 2002; Duperron et al. 2005), z gąbkami (Vacelet et al. 1996), ze *Sphagnum* sp. (Raghoebarsing et al. 2005). Doniesienia o endosymbiontach, utleniających metan i siarkę, pojawiły się również w odniesieniu do gatunku wieloszczeta *Riftia pachyptial*. Endosymbioza ta, odkryta w kominach hydrotermalnych na dnie morza, stała się najlepszym modelem do badań nad chemosyntetyczną symbiozą (Stewart et al. 2005).

Obecność mikroorganizmów stwierdzono w różnych częściach roślin, zarówno w korzeniach, łodygach i liściach, jak i w owocach, nasionach, a nawet kwiatach. Sposoby, za pomocą których drobnoustroje wchodzą w asocjacje z roślinami, są zróżnicowane. Niektóre wynikają z bezpośrednich oddziaływań między mikroorganizmami a tkankami roślin, inne mają charakter pośredni i są spowodowane modyfikacjami środowiska glebowego (Kalama 2004). Należy zwrócić uwagę, że każdy typ asocjacji ma własną specyfikę, zależną od budowy współdziałających partnerów. Bakterie metanotroficzne zasiedlać mogą różne organizmy wyższe, a ich zdolność

do utleniania metanu przekonuje o słuszności prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

Występowanie bakterii endofitycznych (wewnątrz komórek roślinnych) znane było już ponad 120 lat temu (Hardoim et al. 2008). Pierwsze opisy endofitów pochodzą z przełomu XIX/XX wieku, dotyczą grzybowego endofitu bytującego w ziarnie życicy rocznej (Freeman 1904). W roku 1926 wzrost endofitów w roślinie rozpoznano, jako określony etap w życiu bakterii, zaawansowaną infekcję mającą bliski związek z mutualizmem (Perotti 1926). Później endofity zdefiniowano jako mikroorganizmy, które mogą być wyizolowane z powierzchni organów roślinnych (Henning et al. 1940). Zjawisko występowania populacji bakterii towarzyszących roślinom wskazuje na to, że zdrowe rośliny zawierają zespoły tzw. bakterii endofitycznych, dla których stanowią swoistą niszę. Szereg najnowszych badań wydaje się potwierdzać hipotezę, że w świecie roślin nie występują gatunki, które byłyby pozbawione specyficznej mikroflory endofitycznej (Strzelczyk 2001).

Mechanizm asocjacji metanotrofów z roślinnością torfotwórczą jest słabo poznany i obecnie stanowi temat badań poruszany przez wielu naukowców na całym świecie. W Polsce, poza badaniami Stępniewskiej i współpracowników (2013), brak jest danych odnośnie identyfikacji endofitów metanotroficznych. W światowej literaturze wykazano obecność ekstremofilnych bakterii w różnorodnych środowiskach. Po raz pierwszy acidofilne metanotrofy (z rodzaju *Methylocella* i *Methylocapsa*) wyizolowano z torfowisk wschodniej Syberii i północnej Rosji (Dedysh et al. 1998, 2004). Badania prowadzone nad glebami leśnymi w Niemczech przyczyniły się do izolacji szczepu *Methylocella silvestris* (Dunfield et al. 2003). Następnie odkryto szczep *Methylocella tundrae*, wyizolowany z kwaśnych torfowisk tundry w północnej części Eurazji i Ameryki Północnej (Dedysh et al. 2004). Dedysh i współautorzy na materiale pobranym w tundrze stwierdzili również obecność bakterii należących do rodzaju *Methylosinus* i *Methylocystis* (Dedysh et al. 2003). Wcześniej znane były doniesienia na temat izolacji bakterii z rodzaju *Methylosinus* z torfowiskowego jeziora o kwaśnym odczynie (Heyer i Suckow 1985). Zajmowano się również roślinami wodnymi (Trotsenko et al. 2001) oraz telomowymi (*Sphagnum* sp. – Raghoebarsing et al. 2005; Heyer et al. 2002).

Enzymem odpowiedzialnym u metanotrofów za utlenianie CH_4 jest monooksygenaza metanowa, która może występować w dwóch formach, jako sMMO i pMMO. Enzym sMMO, obecny w cytozolu, ulega aktywacji tylko wówczas, gdy stężenie miedzi w biomacie jest niskie. sMMO może brać udział w procesach biotransformacji i bioremediacji substancji, tj. alkanów,

substancji alifatycznych i aromatycznych. Enzym pMMO, związany z błoną komórkową, ulega aktywacji tylko wówczas, gdy stężenie miedzi w biomacie jest wysokie. Enzym ten, o względnie wysokiej aktywności substratowej, ma zdolność utleniania alkanów i alkenów, zawierających ponad 5 atomów węgla w łańcuchu. Dzięki temu może mieć zastosowanie w bioremediacji (Muller 2000; Semrau 2011). Te dwie postacie monooksygenazy mogą występować równocześnie, a ich aktywność bezpośrednio zależy od stężenia jonów miedzi (Cu^{2+}).

Utlennianie metanu przez kompleks endofityczny ‘metanotrofy – roślina’

W ostatnich latach naukowcy na całym świecie skupiali szczególną uwagę na roli torfowisk z dominacją *Sphagnum* sp. w emisji metanu. Asocjacja bakterii metanotroficznych została rozpoznana przez Raghoebarsing i współpracowników (2005), którzy pokazali, że bakterie metanotroficzne żyjące jako endosymbionty oraz epibionty, występują zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórek *Sphagnum* sp. Powodują one efektywne wychwytywanie metanu powstałego na torfowisku, ograniczając w ten sposób jego emisję. Według naszego rozpoznania do tej pory nie zidentyfikowano jednak endofitycznych powiązań bakterii metanotroficznych z torfowiskowymi roślinami naczyniowymi.

Analizując aktywność metanotroficzną *Sphagnum* sp. pobranego z torfowiska w Syberii, wykazano utlenianie metanu na poziomie $80 \mu\text{mol} \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ dziennie, natomiast badania prowadzone na fińskich torfowiskach sfagnowych wskazują dzienną aktywność metanotroficzną w zakresie $0\text{--}62 \mu\text{mol} \text{CH}_4 \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ (Larmola et al. 2010). Inni badacze odnotowali konsumpcję metanu w ciągu doby na poziomie $23,5 \pm 20 \mu\text{mol} \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ w temperaturze 10°C , a ponad dwukrotnie wyższą ($46,7 \pm 39 \mu\text{mol} \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) w temperaturze 20°C (Kip et al. 2010).

Stępniewska i współautorzy (2013), którzy badali zdolność utleniania metanu przez bakterie metanotroficzne związane z mchem z rodzaju *Sphagnum* występującym na torfowiskach Poleskiego Parku Narodowego, wykazali zależność między aktywnością metanotroficzną a poziomem wody na torfowisku. Rośliny zalane wodą miały większą zdolność do utleniania CH_4 , wynoszącą $7,6 \pm 0,1 \mu\text{mol} \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ na dzień, niż rośliny porastające kępki ($2,5 \pm 0,1 \mu\text{mol} \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$).

Raghoebarsing i współautorzy (2005) również zaobserwowali tę zależność i odnotowali wartości utleniania metanu na poziomie od $0,5$ do $30 \mu\text{mol} \times \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ na dobę.

Stępniewska wraz z zespołem (2013) badali również zdolność utleniania metanu przez kompleks ‘*Sphagnum* sp. – bakterie metanotroficzne’, inkubowany w różnych

temperaturach oraz przy różnym stężeniu substratu (CH_4). Przeprowadzone badania wykazały proporcjonalny wzrost aktywności metanotroficznej wraz ze wzrostem temperatury w zakresie temperatur od 10 do 30°C oraz pozytywną zależność pomiędzy zdolnością utleniania metanu a stężeniem CH_4 , w przypadku zakresu stężeń 1–10%, natomiast przy stężeniu CH_4 20% obserwowano obniżenie aktywności metanotroficznej, związane z wyczerpaniem tlenu. Największą zdolność do utleniania metanu wykazano w próbach inkubowanych w temperaturze 30°C przy stężeniu CH_4 10% (Stępniewska et al. 2013).

Badania prowadzone przez Kölbener i współautorów (2010) na torfowiskach południowej Szwecji ukazały zależność między emisją metanu a roślinnością pokrywającą teren badań. Wykazano, że całkowita dzienna emisja CH_4 z udziałem *Eriophorum* sp. wyniosła $7,42 \times 10^{-3} \text{ g m}^{-2}$, a z udziałem *Sphagnum* sp. zaledwie $2,204 \times 10^{-3} \text{ g m}^{-2}$. Zaobserwowali oni pięciokrotnie wyższą emisję metanu z obszaru porośniętego *Eriophorum latifolium* (wełnianka szerokolistna), *Potentilla palustris* (siedmiopalecznik błotny), *Carex rostrata* (turzyca dzióbekowata), *Anthoxanthum odoratum* (tomka wonna), *Carex elata* (turzyca sztywna) i *Carex acutiformis* (turzyca błotna) niż z punktu kontrolnego pozbawionego roślinności (Kölbener et al. 2010).

Chen i współautorzy (2008) wykazali, iż usunięcie z badanego terenu roślin z rodzaju *Calluna* (wrzos) powoduje spadek zdolności wychwytywania metanu przez glebę i pięciokrotny spadek zasobności gleby w mikroorganizmy metanotroficzne (Chen et al. 2008). Emisja metanu z terenów torfowiskowych opisana przez Goraj i współpracowników (2013) wskazuje na zwiększoną emisję netto metanu do atmosfery ze stanowisk, w których dominowała roślinność *Vaccinium* sp. (borówka), *Carex* sp. (turzyca). Wielkość emisji z tych stanowisk była wyższa odpowiednio o 26% i 2% w stosunku do emisji z powierzchni, z której usunięto roślinność. Przeciwną tendencję odnotowano na stanowiskach z dominacją *Eriophorum* sp. (wełnianka) i *Sphagnum* sp., gdzie zarejestrowano spadek wartości emisji netto metanu, a emisja była niższa odpowiednio o 25% i 10% niż emisja z powierzchni bez roślinności.

Zaobserwowano również zmianę wielkości emisji w poszczególnych porach roku. W okresie wiosennym stwierdzono intensyfikację procesu utleniania metanu we wszystkich badanych stanowiskach (z wyjątkiem *Carex* sp.), podczas gdy latem i jesienią zarejestrowano różną intensywności metanogenezy i metanotrofii na tych samych stanowiskach. Na sezonowe zmiany udziału kompozycji roślinnej w ograniczaniu emisji metanu z torfowiska wpływało nie tylko obniżenie temperatury, ale również stan fizjologiczny roślin. W wyniku słabszej kondycji roślin, związanej z końcem okresu

wegetacyjnego, mniej dogodne były warunki do funkcjonowania bakterii metanotroficznych, związanych z roślinami, co ograniczyło transport gazów poprzez rośliny (Goraj et al. 2013).

3. Podsumowanie

Przemiany metanu w środowiskach torfowych są złożone. Emisja netto tego gazu zależy od intensywności procesów metanogenezy i metanotrofii oraz od składu florystycznego i asocjacji bakterii metanotroficznych z roślinnością torfowisk. Kompleksowe spojrzenie na oddziaływanie roślin terenów podmokłych, a szczególnie torfowisk na emisję metanu, pozwoli podkreślić ich rolę, a jednocześnie umożliwi dokładniejszą ocenę torfowiskowych zbiorowisk roślinnych jako naturalnych reduktorów produkowanego metanu. Poruszana tematyka nierozzerwalnie wiąże się z globalnym problemem, jakim jest zwiększony efekt cieplarniany, co ma szczególne znaczenie w ochronie środowiska. Badania prowadzone w tym kierunku mogą być przydatne do sporządzenia bilansu węgla z terenów torfowiskowych oraz do oceny roli szaty roślinnej w obniżeniu stężenia metanu w atmosferze. Wzrost stężenia gazu cieplarnianego, jakim jest CH_4 , wpływa efektywnie na wzrost temperatury (jedna cząsteczka metanu powoduje taki sam efekt radiacyjny jak 21 cząsteczek ditlenku węgla), co z kolei powoduje wzrost aktywności metanotroficznej. Torfowiska mogą funkcjonować zatem, jako naturalne zbiorniki CH_4 o dużej zdolności wiązania metanu i ditlenku węgla. Ochrona ekosystemów torfowiskowych wydaje się być uzasadniona i konieczna ze względu na stały wzrost stężenia gazów cieplarnianych, powodowany działalnością człowieka. Ogromną rolę odgrywa tu, jak się okazuje, nie tylko roślinność, ale też związane z nią mikroorganizmy. Jednym z istotnych czynników podkreślających rolę torfowisk w zmianach klimatu może być obecność specyficznych asocjacji intensyfikujących efekt utleniania CH_4 do CO_2 , a następnie wiązania węgla w procesie fotosyntezy. Identyfikacja zależności pomiędzy roślinnością torfowisk a rozpoznaniem ogromnej bioróżnorodności bakterii metanotroficznych przyczynia się do poznania naturalnych możliwości tych cennych obszarów. Ponadto naturalne systemy 'roślina – metanotrofy' stanowią o możliwości zastosowania roślinności terenów podmokłych jako reduktorów stężenia metanu w technologiach oczyszczania środowiska, np. w systemach wykorzystujących fitoremediację, a szczególnie rizofiltrację, m.in. w oczyszczalniach ścieków, na składowiskach odpadów, na gruntach przeznaczonych pod rekultywację, głównie terenach pokopalnianych. Perspektywy wykorzystania dają rozpoznanie zarówno układu endofitycznego 'rośliny – metanotrofy', jak

i występowania bakterii metanotroficznych w postaci biofilmu na powierzchni korzeni, a także zasiedlania przez bakterie utleniające metan strefy korzeniowej roślin.

Podziękowania

Tematyka badawcza dotycząca emisji metanu z torfowisk realizowana jest przez Katedrę Biochemii i Chemii Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II w ramach projektu NCN (N305 29 94 40).

Literatura

- Armstrong W. 1979. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research*, 7: 225–332.
- Aulakh M. S., Wassmann R., Rennenberg H., Fink S. 2000. Pattern and amount of aerenchyma relate to variable methane transport capacity of different rice cultivars. *Plant Biology*, 2: 182–194.
- Avery G. B., Shannon R. D., White J. R., Martens C. S., Alperin M. J. 2003. Controls on methane production in a tidal freshwater estuary and a peatland: methane production via acetate fermentation and CO₂ reduction. *Biogeochemistry*, 62: 19–37.
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233–266.
- Bartlett K. B., Harris R. C. 1993. Review and assessment of methane emissions from wetlands. *Chemosphere*, 26: 261–320.
- Barry J. P., Buck K. R., Kochevar R. K., Nelson D. C., Fujiwara Y., Goffredi S. K., Hashimoto J. 2002. Methane-based symbiosis in a mussel, *Bathymodiolus platifrons*, from cold seeps in Sagami Bay, Japan. *Invertebrate Biology*, 121(1): 47–54.
- Berrittella C., Huissteden J. 2011. Uncertainties in modelling CH₄ emissions from northern wetlands in glacial climates: the role of vegetation parameters. *Climate of the Past*, 7: 1075–1087.
- Bodelier P. L. E., Laanbroek H. J. 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 265–277.
- Bussmann I., Pester M., Brune A., Schink B. 2004. Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 179–189.
- Cavanaugh C. M., Levering P. R., Maki J. S., Mitchell R., Lidstrom M. E. 1987. Symbiosis of methylophilic bacteria and deep-sea mussels. *Nature*, 325: 346–347.
- Chanton J. P. 2005. The effect of gas transport on the isotope signature of methane in wetlands. *Organic Geochemistry*, 36: 753–768.
- Chen Y., McNamara N. P., Dumont M. G., Bodrossy L., Stralis-Pavese N., Murrell J. C. 2008. The impact of burning and Calluna removal on below-ground methanotroph diversity and activity in a peatland soil. *Applied Soil Ecology*, 40: 291–298.
- Chen Y., Murrell J. C. 2010. Methanotrophs in moss. *Nature Geoscience*, 3: 595–596.
- Christensen T. R., Joabsson A., Ström L., Panikov N., Mastezanov M., Öquist M. et al. 2003. Factors controlling large scale variations in methane emissions from wetlands. *Geophysical Research Letters*, 30(7): 1414.
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., Ait Barka E., Clément C. 2008. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology*, 63: 84–93.
- Coulthard T.J., Baird A.J., Ramirez J., Waddington J.M. 2009. Methane dynamics in peat: importance of shallow peats and a novel reduced-complexity approach for modeling ebullition, w: Baird A.J., Belyea L.R., Comas X., Reeve A., Slater L. (red.) Carbon Cycling in Northern Peatlands, American Geophysical Union, Washington, 173–185. ISBN: 978-0-87590-449-8.
- Dedysh S. N., Panikov N. S., Tiedje J. M. 1998. Acidophilic methanotrophic communities from Sphagnum peat bogs. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 922–929.
- Dedysh S. N., Dunfield P.F., Derakshani M., Stubner S., Heyer J., Liesack W. 2003. Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 299–308.
- Dedysh S. N., Berestovskaya Y. Y., Vasylieva L. V., Belova S. E., Khmelenina V. N., Suzina N. E. 2004. *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 151–156.
- Dunfield P., Knowles R., Dumont R., Moore T.R. 1993. Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils: response to temperature and pH. *Soil Biology & Biochemistry*, 25: 321–326.
- Dunfield P. F., Khmelenina V. N., Suzina N. E., Trotsenko Y. A., Dedysh S. N. 2003. *Methylocella silvestris* sp. nov. a novel methanotrophic bacterium isolated from an acidic forest cambisol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1231–1239.
- Duperron S., Nadalig T., Caprais J.C., Sibuet M., Fiala-Médioni A., Amann R., Dubilier N. 2005. Dual Symbiosis in a *Bathymodiolus* sp. Mussel from a Methane Seep on the Gabon Continental Margin (Southeast Atlantic): 16S rRNA Phylogeny and Distribution of the Symbionts in Gills. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1694–1700.
- Ding W. X., Cai Z. C., Tsuruta H. 2005. Plant species effects on methane emissions from freshwater marshes. *Atmospheric Environment* 39: 3199–3207.
- Ding W. X., Cai Z. C., Tsuruta H. 2004. Methane concentration and emission as affected by methane transport capacity of plants in freshwater marsh. *Water, Air, and Soil Pollution*, 158: 99–111.
- Ding W. X., Cai Z. C., Tsuruta H., Li X. P. 2002. Effect of standing water depth on methane emissions from fresh-

- water marshes in northeast China. *Atmospheric Environment*, 36: 5149–5157.
- Ferretti D. F., Miller J. B., White J. W. C., Lassey K. R., Lowe D. C., Etheridge D. M. 2007. Stable isotopes provide revised global limits of aerobic methane emissions from plants. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7:237–241.
- Ferry J. G. 1997. Methane: Small molecule, big impact. *Science*, 278: 1413–1414.
- Fisher C. R., Childress J. J., Oremland R. S., Bidigare R. R. 1987. The importance of methane and thiosulphate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Marine Biology*, 96: 59–71.
- Freeman E. M. 1904. The seed fungus of *Lolium temulentum* L. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (Biology)*, 196: 1–27.
- Galippe V. 1887. Note sur la présence de micro-organismes dans les tissus végétaux. *Comptes Rendus Hebdomadaires de la Société de Biologie*, Paris, 410–416.
- Goraj W., Kuźniar A., Urban D., Pietrzykowska K., Stępniewska Z. 2013. Influence of plant composition on methane emission from Moszne peatland. *Journal of Ecological Engineering*, 14(1): 53–57.
- Gorham E. 1991. Northern peatlands: Role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Journal of Applied Ecology*, 1(2): 182–195.
- Green S. M., Baird A. J. 2012. A mesocosm study of the role of the sedge *Eriophorum angustifolium* in the efflux of methane-including that due to episodic ebullition-from peatlands. *Plant and Soil*, 351: 207–218.
- Hallmann J. 2001. Plant interactions with endophytic bacteria, w: Biotic Interactions in Plante Pathogen Associations. Jeger M.J., Spence N.J. (red.). CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, 87–119. ISBN 9780851995120.
- Hallmann J., Berg B. 2007. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. w: Microbial Root Endophytes. Schulz B. J. E., Boyle C. J. C., Sieber T. N. (red.). Springer, Berlin Heidelberg, 15–31. ISBN 1613-3382.
- Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463–471.
- Henneberg A., Sorrell B. K., Brix H. 2012. Internal methane transport through *Juncus effusus*: experimental manipulation of morphological barriers to test above- and below-ground diffusion limitation. *New Phytologist*, 196: 799–806.
- Henning K., Villforth F. 1940. Experimentelle untersuchungen zur frage der bacteriesymbiose in höheren pflanzen und ihre beeinflussung durch 'Leitemente'. *Biochemische Zeitschrift*, 305: 299–309.
- Heyer J., Suckow R. 1985. Ecological studies of methane oxidation in an acid bog lake. *Limnologica*, 16: 247–266.
- Heyer J., Galchenko V. F., Dunfield P. F. 2002. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology*, 148: 2831–2846.
- Houweling S., Röckmann T., Aben I., Keppler F., Krol M., Meirink J., Dlugokencky E., Frankenberg C. 2006. Atmospheric constraints on global emissions of methane from plants. *Geophysical Research Letters*, 33: L15821.
- IPCC Climate Change 2007. The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Joabsson A., Christensen T. R. 2001. Methane emissions from wetlands and their relationship with vascular plants: an Arctic example. *Global Change Biology*, 7: 919–932.
- Kalama J. 2004. Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura*, 3(1): 19–28.
- Kiene R. P. 1991. Production and consumption of methane in aquatic systems. Proceedings of the International Symposium on State of Knowledge on Land Treatment of Wastewater, 2: 51–60.
- Kip N., van Winden J. F., Huub J. M. 2010. Methane-munching microbes. *Nature Geoscience*, 3: 660.
- Knief C., Lipski A., Dunfield P. 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6703–6714.
- Kölbener A., Ström L., Edwards P. J., Olde Venterink H. 2010. Plant species from mesotrophic wetlands cause relatively high methane emissions from peat soil. *Plant and Soil* 326, 147–158.
- Larmola T., Tuittila E. S., Tiirola M., Nykänen H., Martikainen P.J., Yrjälä K. 2010. The role of *Sphagnum* mosses in the methane cycling of a boreal mire. *Ecology*, 91: 2356–2365.
- Le Mer J., Roger P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils a review. *European Journal of Soil Biology*, 37: 25–50.
- Moore T. R., Roulet N. T. 1993. Methane flux: water table relations in northern wetlands. *Geophysical Research Letters*, 20 (7): 587–590.
- Morrissey L. A., Livingston G. P. 1992. Methane emissions from Alaska arctic tundra: an assessment of local spatial variability. *Journal of Geophysical Research*, 97 (D15): 16661–16670.
- Muller J. C., McDonald I. R., Gilbert B. 2000. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ionic. *Trends in Microbiology*, 5: 221–225.
- Pedersen O., Binzer T., Borum J. 2004. Sulfide intrusion in eelgrass (*Zostera marina* L.). *Plant Cell and Environment*, 27: 595–602.
- Perotti R. 1926. On the limits of biological inquiry on soil science. Proceedings of the International Society of Soil Science, 2(2): 146–161.
- Raghoebarsing A. A., Smolders A. J. P., Schmid M. C., Rijstra W. I. C., Wolters-Arts M., Derksen J et al. 2005. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. *Nature*, 436: 1153–1156.
- Regina K., Pihlatie, M., Esala, M., Alakukku, L. 2007. Methane fluxes on boreal arable soils. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 119: 346–352.
- Robinson J. J., Polz M. F., Fiala-Médioni A., Cavanaugh C. M. 1998. Physiological and immunological evidence for two distinct C1-utilizing pathways in *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), a dual endosymbiotic mussel from the Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology*, 132: 625–633.
- Schimel J. P. 1995. Plant transport and methane production as controls on methane flux from arctic wet meadow tundra. *Biogeochemistry*, 28: 183–200.

- Semrau J. D. 2011. Bioremediation via Methanotrophy: Overview of Recent Findings and Suggestions for Future Research. *Frontiers in Microbiology*, 2: 1–7.
- Söhnngen N. L. 1906. Über Bakterien, welche Methan ab Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 2, 15: 513–517.
- Stewart F. J., Newton I. L. G., Cavanaugh C. M. 2005. Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends in Microbiology*, 13(9): 439–444.
- Stępniewska Z., Kuźniar A., Pytlak A., Szymczycha J. 2013. Detection of methanotrophic endosymbionts in *Sphagnum* sp. originating from Moszne peatbog (East Poland). *African Journal of Microbiological Research*, 7(15): 1319–1325.
- Stralis-Pavese N., Bodrossy L., Reichenauer T. G., Weilharter A., Sessitsch A. 2006. 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidising bacteria – assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils. *Applied Soil Ecology*, 31: 251–266.
- Ström L. 1997. Root exudation of organic acids: importance to nutrient availability and the calcifuge and calcicole behaviour of plants. *Oikos*, 80: 459–466.
- Ström L., Ekberg A., Mastepanov M., Christensen T. R. 2003. The effect of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from a tundra wetland. *Global Change Biology*, 9: 1185–1192.
- Ström L., Mastepanov M., Christensen T. R., 2005. Species-specific effects of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from wetlands. *Biogeochemistry*, 75: 65–82.
- Strzelczyk E. 2001. Endofity. w: *Drobnoustroje środowiska glebowego, aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne*. H. Dahm, A. Pokojska-Burdziej (red.) Toruń, Wydawnictwo Adam Marszałek, 97–107.
- Sun X., Song C., Guo Y., Wang X., Yang G., Li Y., Mao R., Lu Y. 2012. Effect of plants on methane emissions from a temperate marsh in different seasons. *Atmospheric Environment*, 60: 277–282.
- Tobolski K. 2003. Stan badań paleoekologicznych w Borach Tucholskich. *Botanical Guidebooks*, 26: 95–103.
- Trotsenko Y. A., Khmelenina V. N. 2001. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Archives of Microbiology*, 177: 123–131.
- Waddington J. M., Roulet N. T., Swanson R. V. 1996. Water table control of CH₄ emission enhancement by vascular plants in boreal peatlands. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 101: 22775–85.
- Whalen S. C., Reeburgh W. S., Sandbeck K. A. 1990. Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3405–3411.
- Whiting G. J., Chanton J. P. 1993. Primary production control of methane emission from wetlands. *Nature*, 364: 794–795.
- Whittenbury R., Phillips K.C., Wilkinson J.F., 1970. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 61: 205–218.
- Vacelet J., Fiala-Médioni A., Fisher C.R., Boury-Esnault N. 1996. Symbiosis between methane-oxidizing bacteria and a deep-sea carnivorous cladorhizid sponge. *Marine Ecology Progress Series*, 145: 77–85.

Wkład autorów

Z.S. – pomysł podjęcia przedstawionej tematyki oraz opieka merytoryczna nad całością tekstu. W.G. – wykonanie przeglądu literatury, zebranie danych oraz przygotowanie manuskryptu. A.K. – współautor idei oraz przeglądu literatury zawartej w pracy.