

INSTYTUT AGROFIZYKI IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Adam Kubaczyński

**ROLA BIEWĘGLA W OGRANICZANIU EMISJI GAZÓW
CIEPLARNIANYCH Z GLEBY PŁOWEJ**

THE ROLE OF BIOCHAR IN REDUCING GREENHOUSE GAS
EMISSIONS FROM HAPLIC LUVISOL

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem
Promotora: prof. dr hab. Małgorzaty Brzezińskiej
oraz
Promotora pomocniczego: dr inż. Anny Walkiewicz

© Adam Kubaczyński

Lublin 2023

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis Promotora rozprawy

OŚWIADCZENIE PROMOTORA POMOCNICZEGO ROZPRAWY

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis Promotora pomocniczego rozprawy

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data Podpis autora rozprawy

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi
Pani prof. dr hab. Małgorzacie Brzezińskiej za poświęcony czas
i pomocne wskazówki przekazane w trakcie przygotowania niniejszej pracy*

*Dziękuję Pani dr inż. Annie Walkiewicz za cenne uwagi,
pomocne w przygotowaniu rozprawy doktorskiej*

*Dziękuję również wszystkim Pracownikom
Zakładu Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego,
z którymi miałem możliwość współpracować podczas realizacji niniejszych badań*



Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu „Woda w glebie - monitoring satelitarny w poprawie retencji wodnej przy użyciu biowęgla” (SoilAqChar), finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach strategicznego programu badawczo-rozwojowego "Środowisko, rolnictwo i leśnictwo" - BIOSTRATEG3/345940/7/NCBR/2017.

Streszczenie

Szybki rozwój gospodarczy, postępujący od końca XVIII w. i obejmujący również rolnictwo doprowadził do gwałtownego wzrostu stężenia gazów cieplarnianych (GHG) w atmosferze, takich jak metan (CH_4) i ditlenek węgla (CO_2), skutkując postępującym globalnym ociepleniem. Rolnictwo odpowiada za 10-12% całkowitej, antropogenicznej emisji gazów cieplarnianych, w tym za blisko połowę globalnej emisji metanu. Z drugiej strony, ditlenek węgla jako jeden z najistotniejszych gazów cieplarnianych również pochodzi w dużej mierze z produkcji rolniczej. Roczna, globalna emisja CO_2 , wynikająca ze zmian sposobów użytkowania gruntów jest oszacowana na około 1,3 Gt C. Stanowi to blisko połowę węgla, który w ciągu roku zostaje globalnie zdeponowany na łądzie tj. 3 Gt C.

Nasilające się zmiany klimatyczne wraz z intensyfikacją rolnictwa prowadzą do degradacji gleb. Rzutuje to na spadek produktywności pól uprawnych, lecz w pierwszej kolejności degradacja gleb objawia się w postaci pogorszenia ich struktury i właściwości fizykochemicznych, a także spadku bioróżnorodności i aktywności mikrobiologicznej. W dalszej perspektywie prowadzi to do zubożenia całych ekosystemów oraz problemów z zaopatrzeniem w żywność.

Postępująca degradacja gleb i nasilające się zmiany klimatyczne sprawiają, że coraz intensywniej poszukuje się rozwiązań, prowadzących do zatrzymania lub opóźnienia tych niekorzystnych zjawisk. Wzrost produkcji roślinnej doprowadził również do znacznego nagromadzenia resztek poźniwnych i odpadów roślinnych pochodzących z przemysłu przetwórczego, stąd poważnym wyzwaniem jest racjonalne zagospodarowanie rosnących ilości biomasy odpadowej. Produkcja biowęgla i wzbogacenie gleb biowęgłem może okazać się rozwiązaniem pozwalającym sprostać współczesnym wyzwaniom, przed którymi stoi obecnie rolnictwo, tj. ochrona gleb przed degradacją, ograniczenie emisji i zwiększenie pochłaniania gazów cieplarnianych z rolnictwa oraz racjonalne zagospodarowanie biomasy odpadowej.

W niniejszej rozprawie doktorskiej określono wieloaspektowy potencjał aplikacyjny wybranych biowęgli, jako materiału poprawiającego właściwości i aktywność metanotroficzną gleby płowej. Celem niniejszej pracy była charakterystyka biowęgli powstałych z biomasy odpadowej (zrębków drzewnych, łusek słonecznika, łądyg malin i łądyg ziemniaków), obejmująca m.in. właściwości fizykochemiczne i potencjał biowęgli do pochłaniania metanu z atmosfery, a także wieloaspektowa ocena roli i przydatności wybranych biowęgli w ograniczeniu emisji gazów cieplarnianych z gleby płowej.

Materiał badawczy stanowiły próbki biowęgla, powstałe w procesie pirolizy z wybranych rodzajów biomasy odpadowej tj. zrębków drzewnych, łusek słonecznika, a także łądyg malin i łądyg ziemniaków, stanowiących nową w tego typu zastosowaniach biomasę. Materiałem badawczym w kolejnych etapach pracy była gleba płowa (*Haplic Luvisol*), pobrana z poletek doświadczalnych utrzymywanych jako ugór, na których zaaplikowano biowęgiel ze zrębków drzewnych w dawkach 10, 20 i 30 Mg ha^{-1} , oraz biowęgiel z łusek słonecznika, zastosowany w szerokim zakresie dawek od 1 do 100 Mg ha^{-1} .

Wykonano zaplanowane analizy fizykochemiczne materiału badawczego tj. pomiar odczynu (pH) i potencjału oksydoredukcyjnego (Eh), wyznaczenie zawartości węgla organicznego w glebie (SOC), rozpuszczonego węgla organicznego (DOC), i azotu azotanowego (V) (N-NO_3) oraz zdolności zatrzymywania wody (pojemności wodnej, WHC). Próbki biowęgla oraz pobrane z poletek próbki gleby z dodatkiem biowęgla inkubowano w dwóch warunkach wilgotności (odpowiadającym 60% i 100% WHC) w temperaturze 25 °C, z dodatkiem 1% CH_4 (obj.). W tym czasie prowadzono regularne pomiary składu atmosfery gazowej w przygotowanych próbach za pomocą chromatografu gazowego. Wyizolowano również DNA z wybranych wariantów doświadczenia oraz przeprowadzono sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Przeprowadzona analiza pozwoliła na

scharakteryzowanie społeczności mikroorganizmów zasiedlających badaną glebę oraz lepsze poznanie zmian jakie zachodzą w mikrobiocie glebowej na skutek aplikacji biowęgla do gleby.

Badania wykazały, iż rodzaj biomasy, z której wytworzono biowęgiel (materiał wsadowy) oraz wilgotność karbonizatu silnie determinowały jego zdolność pochłaniania CH₄. Ponadto w obydwu testowanych wilgotnościach biowęgiel z łodyg ziemniaków (łętów) wykazywał największą szybkość pochłaniania CH₄, co wskazuje na wysoką użyteczność nowego biowęgla jako sorbentu CH₄, a innowacyjność i praktyczność tego rozwiązania znalazła swoje odzwierciedlenie w postaci osiągnięcia patentowego.

Oprócz badań samych biowęgla, oceniono także ich potencjał mitygacji globalnego ocieplenia po dodatku do gleby. Doświadczenie, w którym uboga gleba płowa została wzbogacona biowęgłem ze zrębków drzewnych, umożliwiło ocenę wpływu wybranych dawek biowęgla na środowisko glebowe z uwzględnieniem aspektu czasu oddziaływania biowęgla w glebie. Udowodniono, iż dodatek biowęgla w dawce 30 Mg ha⁻¹ podniósł m.in. pH i pojemność wodną gleby, zwiększył liczebność i bioróżnorodność zbiorowisk metanotroficznych, doprowadził do wzrostu udziału bakterii metanotroficznych z rodzaju *Methylocystis*, a w konsekwencji trwale poprawił aktywność metanotroficzną gleby płowej. Co również istotne, obserwowany początkowo wzrost emisji CO₂ nie utrzymał się po pięciu latach od wprowadzenia biowęgla do gleby.

Przedstawione w kolejnych badaniach efekty zastosowania biowęgla z łusek słonecznika w dawkach 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 Mg ha⁻¹ również potwierdziły wielowymiarowe korzyści wynikające z tego zabiegu. Gleba płowa wzbogacona biowęgłem z łusek słonecznika w dawkach ≥ 40 Mg ha⁻¹ w glebie o wilgotności odpowiadającej 60% WHC, a także ≥ 20 Mg ha⁻¹ w glebie wysyczonej wodą (100% WHC), charakteryzowała się zwiększoną zdolnością utleniania CH₄ w porównaniu z kontrolą. Podczas gdy dodatek biowęgla ze zrębków drzewnych wzbogacił zbiorowiska metanotroficzne o bakterie z rodzaju *Methylocystis*, wysokie dawki (60, 80, 100 Mg ha⁻¹) biowęgla z łusek słonecznika doprowadziły do znacznego wzrostu udziału metanotrofów z rodzaju *Methylobacter*. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń potwierdzają pozytywną rolę badanych biowęgla w kształtowaniu środowiska glebowego i stymulacji aktywności metanotroficznej gleby płowej.

Mimo, iż wprowadzanie biowęgla do gleby ma bardzo długą historię, to w naszej części świata, zabieg ten pozostają jak do tej pory głównie w sferze badań. Badania te są jak najbardziej uzasadnione, ponieważ biorąc pod uwagę trwałość biowęgla i potencjalny czas jego oddziaływania, szczególnie istotne jest poznanie długofalowego wpływu tego dodatku na środowisko glebowe. Przedstawiona praca doktorska, ukazująca różne aspekty działania biowęgla (wytworzonych zarówno z szeroko dostępnej, jak i dopiero testowanej, niszowej biomasy) dostarcza informacji pomocnych w podjęciu decyzji o stosowaniu wzbogacenia gleby biowęgłem, jak również może przyczynić się do upowszechnienia tego zabiegu.

Słowa kluczowe: gleba płowa (*Haplic Luvisol*), biowęgiel, efekt cieplarniany, metanotrofia, *Methylocystis*, *Methylobacter*

Abstract

Rapid economic development since the late 18th century, including in agriculture, has led to a sharp increase in the concentration of greenhouse gases (GHG) in the atmosphere, such as methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂), resulting in progressive global warming. Agriculture is responsible for 10-12% of total anthropogenic greenhouse gas emissions, including nearly half of global methane emissions. Furthermore, carbon dioxide, as one of the most important greenhouse gases, also comes largely from agricultural production. Annual global CO₂ emissions from changes in land use are estimated at around 1.3 Gt C. This accounts for nearly half of the carbon that is globally deposited annually on land, i.e., 3 Gt C.

Intensifying climate changes, together with the intensification of agriculture, lead to soil degradation. This affects the decline in the productivity of agricultural fields, however, degradation manifests itself initially in the deterioration of the structure and physicochemical properties of the soil, as well as in a decrease in biodiversity and microbiological activity. In the long run, this leads to the impoverishment of entire ecosystems and problems with food supply.

Progressive degradation of soils and intensifying climate changes mean that solutions are being sought more and more intensively to stop or delay these unfavourable phenomena. The increase in plant production has also led to a significant accumulation of post-harvest residues and plant waste from the processing industry, hence a serious challenge is the rational management of the growing amounts of waste biomass. The production of biochar and the enrichment of soils with biochar may prove to be a solution that can meet the challenges facing agriculture today, i.e. protection of soils against degradation, reduction of emissions and increased absorption of greenhouse gases from agriculture, as well as rational management of waste biomass.

In this doctoral dissertation, the multifaceted application potential of selected biochars as a material for improving the properties and methanotrophic activity of Haplic Luvisol was determined. The aim of this work was to characterise biochars produced from waste biomass (wood offcuts, sunflower husks, raspberry stems and potato stems), including its physicochemical properties and the potential of biochars to absorb methane from the atmosphere, in addition to a multi-faceted assessment of the role and usefulness of selected biochars in reducing greenhouse gas emissions from Haplic Luvisol.

The research material consisted of biochar samples, produced in the pyrolysis process from selected types of waste biomass, i.e. wood offcuts, sunflower husks, as well as raspberry stems and potato stems, which are a new biomass for this type of application. The research material in the subsequent stages of the work was lessive soil (Haplic Luvisol), taken from experimental plots kept fallow, on which biochar from wood offcut was applied in doses of 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹, as well as biochar from sunflower husks, used in a wide range of doses from 1 to 100 Mg ha⁻¹.

Planned physicochemical analyses of the test material were performed, i.e. measurement of pH, redox potential (Eh), determination of soil organic carbon (SOC), dissolved organic carbon (DOC), nitrate nitrogen (NO₃-N) and water holding capacity (WHC). Biochar samples and soil samples taken from the plots with the addition of biochar were incubated under two moisture conditions (corresponding to 60% and 100% WHC) at 25 °C, with the addition of 1% CH₄ (v/v). At that time, regular measurements of the composition of the gas atmosphere in the prepared samples were carried out using a gas chromatograph. DNA was also isolated from selected variants of the experiment and next generation sequencing (NGS) was performed. The analysis made it possible to characterise the community of microorganisms inhabiting the tested soil and better understand the changes that occur in the soil microbiota as a result of the application of biochar to the soil.

The research showed that the type of biomass from which the biochar was produced (feedstock) and the moisture content of the biochar strongly determined its ability to absorb CH₄. In addition, at both of the tested moisture levels, biochar from potato stems (shaws) showed the highest rate of CH₄ absorption, which indicates the high usefulness of the new biochar as a CH₄ sorbent, and the innovation and practicality of this solution was reflected in the patent achievement.

In addition to testing the biochars themselves, their global warming mitigation potential when added to soil was also assessed. The experiment in which poor lessive soil was enriched with biochar from wood offcuts made it possible to assess the impact of selected doses of biochar on the soil environment, taking into account the time aspect of biochar in the soil. It was proven that the addition of biochar at a dose of 30 Mg ha⁻¹ increased, among others, pH and water retention in the soil, increased the number and biodiversity of methanotrophic communities, led to an increase in the share of methanotrophic bacteria of the genus *Methylocystis*, and consequently permanently improved the methanotrophic activity of lessive soil. Another important point was that the initially observed increase in CO₂ emissions was not sustained five years after biochar addition to the soil.

The effects of using biochar from sunflower husks in doses of 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 Mg ha⁻¹, presented in subsequent studies, also confirmed the multidimensional benefits of this treatment. Haplic Luvisol enriched with sunflower husk biochar at doses ≥ 40 Mg ha⁻¹ in soil with a moisture content corresponding to 60% WHC, and ≥ 20 Mg ha⁻¹ in water-saturated soil (100% WHC), was characterised by increased CH₄ oxidation capacity compared to the control. While the addition of biochar from wood offcuts enriched methanotrophic communities with bacteria of the genus *Methylocystis*, high doses (60, 80, 100 Mg ha⁻¹) of sunflower husks biochar led to a significant increase in the share of methanotrophs of the genus *Methylobacter*. The results of the conducted experiments confirm the positive role of the tested biochars in shaping the soil environment and stimulating the methanotrophic activity of lessive soil.

Although the introduction of biochar into the soil has a very long history, in our part of the world this treatment has so far remained mainly in the field of research. These studies are justified, because taking into account the durability of biochar and the potential duration of its impact, it is particularly important to know the long-term impact of this additive on the soil environment. The presented doctoral thesis, showing various aspects of the operation of biochars (made both from widely available and only recently tested, niche biomass), provides information helpful when considering the use of biochar in soil enrichment, and may also contribute to the dissemination of this procedure.

Keywords: lessive soil (Haplic Luvisol), biochar, greenhouse effect, methanotrophy, *Methylocystis*, *Methylobacter*

Spis treści

Spis symboli	11
Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	14
1. Wprowadzenie	16
1.1. Problematyka	16
1.2. Znaczenie gazów cieplarnianych	19
1.2.1. Utlenianie i produkcja metanu	19
1.2.2. Rola, źródła i emisja ditlenku węgla	21
1.2.3. Udział środowiska glebowego w obiegu gazów cieplarnianych	23
1.3. Bakterie metanotroficzne w środowisku glebowym	24
1.3.1. Ogólna charakterystyka metanotrofów	24
1.3.2. Charakterystyka bakterii metanotroficznych z rodzaju <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylomicrobium</i> i <i>Methylocaldum</i>	29
1.4. Biowęgiel jako dodatek do gleby	31
1.4.1. Produkcja biowęgla - uzasadnienie i przebieg procesu	31
1.4.2. Charakterystyka gleby płowej (<i>Haplic Luvisol</i>)	37
1.4.3. Potencjał biowęgla w kształtowaniu środowiska glebowego	38
2. Hipotezy badawcze i cele rozprawy doktorskiej	41
3. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach i badaniach uzupełniających	43
3.1. Publikacja P.1	44
3.2. Publikacja P.2	46
3.3. Osiągnięcie patentowe P.433435	48
3.4. Badania uzupełniające P.3	49
3.4.1. Wstęp	49
3.4.2. Materiały i metody	53
3.4.2.1. Charakterystyka gleby i biowęgla	53
3.4.2.2. Opis eksperymentu	55
3.4.2.3. Obliczenia i analiza statystyczna	56
3.4.3. Wyniki	56
3.4.3.1. Właściwości fizykochemiczne gleby	56
3.4.3.2. Wymiana gazowa (CH ₄ , CO ₂ , O ₂)	58
3.4.3.2.1. Utlenianie CH ₄ i emisja CO ₂ z gleby o wilgotności odpowiadającej 60% WHC	58
3.4.3.2.2. Zmiany w wymianie gazowej gleby o wilgotności odpowiadającej 100% WHC	60
3.4.3.3. Struktura zbiorowisk mikrobiologicznych	60
3.4.3.3.1. Wpływ biowęgla na bakterie metanotroficzne	64
3.4.4. Dyskusja	65
3.4.4.1. Wpływ dodatku biowęgla z łusek słonecznika na właściwości fizykochemiczne gleby	65

3.4.4.2. Aktywność metanotroficzna i wymiana gazów cieplarnianych (CH ₄ i CO ₂) pomiędzy glebą z biowęgłem a atmosferą	69
3.4.5. Podsumowanie	73
4. Podsumowanie i wnioski.....	75
5. Tekst publikacji P.1	77
6. Tekst Publikacji P.2	87
7. Tekst osiągnięcia patentowego P.433435.....	104
8. Bibliografia	109
9. Oświadczenia.....	123
10. Aneks - życiorys naukowy	145

Spis symboli

Skrót	Termin	Termin angielskojęzyczny
Bo	biowęgiel ze zrębków drzewnych	<i>wood offcuts biochar</i>
Bp	biowęgiel z łodyg ziemniaków (łętów)	<i>potato stems biochar</i>
Br	biowęgiel z łodyg malin	<i>raspberry stems biochar</i>
Bs	biowęgiel z łusek słonecznika	<i>sunflower husk biochar</i>
CEC	pojemność wymiany kationowej	<i>cation exchange capacity</i>
CytC	cytochrom C	<i>cytochrome C</i>
DOC	rozpuszczony węgiel organiczny	<i>dissolved organic carbon</i>
dt	decytona, kwintal (100 kg)	<i>quintal</i>
EPFRs	rodniki o wysokiej trwałości w środowisku	<i>environmentally persistent free radicals</i>
FADH	dehydrogenaza formaldehydowa	<i>formaldehyde dehydrogenase</i>
FDH	dehydrogenaza mrówczanowa	<i>formate dehydrogenase</i>
GHG	gaz cieplarniany	<i>greenhouse gas</i>
Gt	gigatona (1 000 000 000 000 kg)	<i>gigaton</i>
GWP	potencjał tworzenia efektu cieplarnianego	<i>global warming potential</i>
IC	węgiel nieorganiczny	<i>inorganic carbon</i>
LAI	wskaźnik pokrycia liściowego	<i>leaf area index</i>

Skrót	Termin	Termin angielskojęzyczny
MDH	peryplazmatyczna dehydrogenaza metanolowa	<i>periplasmic methanol dehydrogenase</i>
Mg	megagram (1 000 kg)	<i>megagram</i>
MMO	monooksygenaza metanowa	<i>methane monooxygenase</i>
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji	<i>next generation sequencing</i>
pMMO	monooksygenaza błonowa	<i>particulate methane monooxygenase</i>
ppm	części na milion	<i>parts per million</i>
ppb	części na miliard	<i>parts per billion</i>
RuBP	szlak rybulozo-bisfosforanowy	<i>ribulose biphosphate pathway</i>
RuMP	szlak rybulozo-monofosforanowy	<i>ribulose monophosphate pathway</i>
sMMO	cytoplazmatyczna rozpuszczalna monooksygenaza metanowa	<i>soluble methane monooxygenase</i>
SOC	węgiel organiczny w glebie	<i>soil organic carbon</i>
SOM	glebowa materia organiczna	<i>soil organic matter</i>
SWC	zawartość wody w glebie	<i>soil water content</i>

Skrót	Termin	Termin angielskojęzyczny
TC	węgiel całkowity	<i>total carbon</i>
WFPS	wypełnienie wodą przestrzeni porowatej	<i>water-filled pore space</i>
WHC	zdolność zatrzymywania wody (pojemność wodna)	<i>water holding capacity</i>

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na cyklu dwóch publikacji, osiągnięciu patentowym oraz badaniach uzupełniających na temat:

„Rola biowęgla w ograniczaniu emisji gazów cieplarnianych z gleby płowej”:

Publikacja P.1: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364.

Punktacja MNiSW: 70 pkt.; IF 2,317.

Indywidualny wkład: wybór biomasy i produkcja części spośród badanych biowęgla, oznaczenie parametrów fizykochemicznych biowęgla, inkubacja próbek i pomiary chromatograficzne, analiza uzyskanych wyników, statystyczne i graficzne opracowanie wyników, współprzygotowanie manuskryptu.

Publikacja P.2: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259.

Punktacja MEiN: 200 pkt.; IF 7,963.

Indywidualny wkład: pobór próbek gleby z poletek doświadczalnych, oznaczenie parametrów fizykochemicznych próbek gleby wzbogaconych biowęgłem ze zrębków drzewnych, zaprojektowanie i przeprowadzenie doświadczenia laboratoryjnego, inkubacja próbek i pomiary chromatograficzne, izolacja DNA glebowego, analiza uzyskanych wyników, statystyczne i graficzne opracowanie wyników, współprzygotowanie manuskryptu.

Osiągnięcie patentowe P.433435: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganowski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Indywidualny wkład: produkcja biowęgla z łodyg ziemniaków (łętów), oznaczenie właściwości fizykochemicznych biowęgla, inkubacja próbek i pomiary chromatograficzne

umożliwiający określenie potencjału biowęgla do pochłaniania metanu, analiza uzyskanych wyników, współprzygotowanie wniosku patentowego.

W celu jak najpełniejszego przedstawienia uzyskanych rezultatów, w niniejszej rozprawie przedstawiono również badania uzupełniające, obejmujące efektywność stosowania biowęgla z łusek słonecznika jako dodatek do gleby pólowej. Badania uzupełniające zostały przygotowane do wydania i zatytułowane:

Badania uzupełniające P.3: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.

Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Indywidualny wkład: pobór próbek gleby z poletek doświadczalnych, oznaczenie właściwości fizykochemicznych gleby wzbogaconej szerokim zakresem dawek biowęgla z łusek słonecznika, oznaczenie właściwości fizykochemicznych gleby, inkubacja próbek i pomiary chromatograficzne, izolacja DNA glebowego, analiza uzyskanych wyników, statystyczne i graficzne opracowanie wyników, współprzygotowanie manuskryptu.

1. Wprowadzenie

1.1. Problematyka

Na początku XIX wieku globalna populacja wynosiła około 1 miliard ludzi, lecz wystarczyło zaledwie 200 lat, by liczba ludności Świata uległa zwielokrotnieniu do poziomu 8 miliardów (Van Bavel, 2013). Dalsze predykcje są równie dynamiczne i szacują globalną liczbę ludności w roku 2050 na bliską 9,8 miliarda (Sadigov, 2022). Rosnąca liczba ludności będzie wymuszać dalszą eksploatację zasobów naszej planety na niespotykanym dotychczas poziomie. Rolnictwo jest jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi gospodarki, ze względu na swoją strategiczną rolę tj. produkcję żywności. Dowodem na to są dane z lat 1960-2019, wskazujące na wzrost powierzchni pól uprawnych i pastwisk odpowiednio o 1 i 0,9 miliona km², co jednocześnie zostało okupione utratą około 0.8 miliona km² lasów (Winkler i in., 2021). Jednak wzrost powierzchni upraw o około 15% to nie jedyny wyznacznik intensyfikacji rolnictwa. Kluczowa jest tutaj produktywność upraw, która w analogicznym okresie wzrosła o blisko 250%. Udało się to osiągnąć, dzięki rozwojowi mechanizacji, pracom nad udoskonaleniem odmian roślin uprawnych, intensyfikacji nawożenia oraz stosowania środków ochrony roślin (Blomqvist i in., 2020; Duke, 2020). Jednak nasilenie zabiegów agrotechnicznych niesie za sobą szereg negatywnych konsekwencji w postaci pogorszenia właściwości fizykochemicznych gleb. Objawia się to m.in. spadkiem zawartości węgla organicznego oraz materii organicznej w glebie, wzrostem zakwaszenia i zasolenia gleby, niszczeniem agregatów glebowych, a co za tym idzie zmianą porowatości gleby, wzrostem zagęszczenia przy jednoczesnym spadku natlenienia gleby (Hamza i Ierson, 2005; Rajkai i in., 1997; Tkaczyk i in., 2017). Dalszymi efektami nie zrównoważonej produkcji roślinnej jest obniżenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych oraz zaburzenie procesów metabolicznych zachodzących w glebie (Qiu i in., 2021; Seghers i in., 2005). Wzrost produkcji roślinnej został okupiony obniżeniem jakości gleb, która w skrajnych przypadkach prowadzi do ich degradacji. Według obecnych szacunków około 25% gruntów zostało zdegradowanych, a zjawisko to dotyczy w dużej mierze obszarów zamieszkałych przez najuboższą część populacji. Ponadto, jeśli obecna szybkość degradacji gleby zostanie utrzymana, do roku 2050 nawet 95% gleb może ulec degradacji lub być nią poważnie zagrożona (GEF Secretariat, 2022). Poszukiwanie i wprowadzanie do praktyki rolniczej zabiegów poprawiających parametry jakościowe oraz utrzymujące produktywność gleb to globalne wyzwanie, któremu rolnictwo współpracujące z nauką musi sprostać.

Wzrost produkcji roślinnej prowadzi do coraz większego nagromadzenia resztek poźniwnych i organicznych odpadów poprodukcyjnych, które wymagają dalszego zagospodarowania. Światowa produkcja słomy już przekroczyła wartość 7 miliardów ton rocznie, a prognozy wskazują na dalszy wzrost dostępności tego surowca (He i in., 2022). Część biomasy jest pozostawiana na polu jako nawóz organiczny i ulega wymieszaniu z glebą podczas kolejnych zabiegów agrotechnicznych po zbiorze plonów. To praktyka umożliwiająca sekwestrację węgla i wzbogacenie gleby w materię organiczną. Słoma charakteryzuje się wysokim współczynnikiem reprodukcji glebowej materii organicznej (ang. *soil organic matter* - SOM) wynoszącym około 100 kg SOM z 1 t słomy (Chen i in., 2022; Kuś, 2015). Jest również używana w gospodarstwach rolnych jako pasza i ściółka dla zwierząt, materiał do produkcji podłoża dla grzybów hodowlanych oraz do celów opałowych, co częściowo rozwiązuje kwestię zagospodarowania nadwyżek tego surowca (Gradziuk i in., 2020; Palmieri i in., 2017). Pozostałe odpady poźniwne nie mają tak szerokiego zastosowania, a fragmenty roślin są częstym nośnikiem patogenów i szkodników upraw, dlatego też, by bezpiecznie wprowadzić skażoną biomasę do gleby i ograniczyć rozprzestrzenianie się chorób roślin, potrzebna są odpowiednie zabiegi, takie jak obróbka termiczna, mające na celu sterylizację biomasy (Guo i in., 2019; Vincent i in., 2003). Problemem pozostają jednak ogromne ilości odpadów powstających w zakładach produkcji i przetwórstwa żywności. Przykładem takiej biomasy odpadowej są chociażby łuski słonecznika z przemysłu olejarskiego. Dokładna ilość odpadowych łusek słonecznika jest trudna do oszacowania, lecz warto odnotować, że w sezonie 2020/2021 na świecie zebrano około 49,27 milionów ton nasion słonecznika (USDA Foreign Agricultural Service, 2022). Masa łuski słonecznika stanowi około 50% masy ziarna, zatem ilość łusek słonecznika pozostających w zakładach przetwórczych sięga milionów ton rocznie (Shaukat i in., 2021). Wobec powyższego, poważnym wyzwaniem jest korzystne zagospodarowanie odpadowej biomasy.

Kolejną konsekwencją szybkiego rozwoju cywilizacyjnego jest gwałtowny wzrost emisji gazów cieplarnianych, takich jak ditlenek węgla (CO₂) i metan (CH₄) (IPCC, 2022). W celu zobrazowania tego procesu warto prześledzić zmiany stężeń tych gazów na przestrzeni ostatnich 10 000 lat. Dane zawarte w raporcie IPCC z 2001 roku określają stężenie CO₂ i CH₄ na przestrzeni ostatnich kilku tysiącleci jako pozostające na niskim, stabilnym poziomie (IPCC, 2001). Stężenia CO₂ i CH₄ w atmosferze jeszcze sprzed industrializacji oszacowano odpowiednio na 278 ppm (ang. *parts per million*, czyli części na milion) i 722 ppb (ang. *parts per billion*, czyli części na miliard) (Ciais i in., 2013). W listopadzie 2022 średnia zawartość CO₂ w powietrzu wyniosła już 417,5 ppm, przekraczając tym samym o 50% poziom

koncentracji tego gazu sprzed roku 1750. Na przestrzeni tych lat wzrost stężenia CH₄ był jeszcze dynamiczniejszy, gdyż jego poziom sięgnął już 1909 ppb i jest o 164% większy, niż przed industrializacją. Mimo, że zawartość metanu w atmosferze, jest około 220 razy mniejsza, niż ditlenku węgla, to nie należy go bagatelizować, ponieważ przyrost jego stężenia w omawianym czasie jest kilkukrotnie wyższy, a potencjał tworzenia efektu cieplarnianego (ang. *global warming potential* - GWP) metanu w ujęciu stuletnim jest 30-krotnie wyższy, niż GWP CO₂ (IPCC, 2022). Efektem zaistniałych zmiany w składzie atmosfery jest wzrost temperatury o $1,08 \pm 0,13$ °C w porównaniu z temperaturą z lat 1850-1900 (World Meteorological Organization, 2021). Wydaje się to niewiele, jednak najnowsze prace wskazują, że zmiany klimatu o podłożu antropogenicznym doprowadziły do degradacji około 5,5 miliona km² suchych terenów, co wpłynęło na pogorszenie jakości życia około 213 milionów ludzi. Dla lepszego zobrazowania skali tego zjawiska, warto zauważyć, że zdegradowany obszar ma powierzchnię zbliżoną do połowy kontynentu europejskiego (Burrell i in., 2020). Rośnie również ilość ekstremalnych zjawisk pogodowych, takich jak deszcze ulewne i nawałne, powodujące lokalne podtopienia (Tabari, 2020). Warto tu wspomnieć, że tereny podmokłe odpowiadają za 20% globalnej emisji metanu. Ponadto rolnictwo odpowiada za blisko połowę emisji metanu (około 228-262 Mt rocznie), a dalsze przewidywania mówią o wzroście emisji CH₄ o około 40% do roku 2050 (Searchinger i in., 2021). Prognozy są zdecydowanie pesymistyczne, a odwrócenie tego trendu i w efekcie obniżenie emisji metanu jest ważne z kilku powodów. Z pewnością będzie to pomocne w osiągnięciu celów strategii klimatycznych przyjętych w ramach porozumienia paryskiego, zakładających zatrzymanie wzrostu globalnej temperatury na poziomie nie większym niż 1,5 °C (Pachauri i Meyer, 2014). Rosnące stężenie metanu jest również powiązane ze wzrostem ilości ozonu w atmosferze, który według szacunków odpowiada za nawet milion przedwczesnych zgonów rocznie, wynikających z chorób układu oddechowego. Szacuje się, że zredukowanie poziomu metanu w środowisku, znajdzie swoje odzwierciedlenie w obniżeniu zawartości ozonu w atmosferze i ochroni tysiące ludzi rocznie przed poważnymi konsekwencjami zdrowotnymi oraz przedwczesną śmiercią (Abernethy i in., 2021). Gleba pełni rolę skutecznego pochłaniacza metanu, globalnie jest w stanie pochłoniąć około 30 Mt CH₄ rocznie, jednak wraz z postępującą degradacją terenów uprawnych, jej efektywność w tym zakresie gwałtownie spada (Pachauri i Meyer, 2014).

Biorąc pod uwagę powyższe wyzwania branży rolniczej i przetwórczej, jak również postępujące zmiany klimatyczne ważne jest poszukiwanie i wdrażanie działań mających na celu poprawę jakości gleb, racjonalne zagospodarowanie odpadów rolniczych i poprodukcyjnych oraz ograniczenie emisji gazów cieplarnianych.

1.2. Znaczenie gazów cieplarnianych

Globalne ocieplenie wywołane jest działalnością człowieka i powoduje zmiany klimatu (IPCC, 2022). Jednak dzięki obecności gazów cieplarnianych w atmosferze ziemskiej, życie na naszej planecie mogło rozwinąć się w takiej formie, jaką obecnie znamy. Aktualnie średnia globalna temperatura Ziemi wynosi około 14 °C. Według szacunków efekt cieplarniany generowany przez te gazy powoduje, że średnia temperatura Ziemi jest o około 33 °C wyższa od tej, która panowałaby na Ziemi bez ich obecności w atmosferze. Do najważniejszych gazów cieplarnianych, oprócz pary wodnej, należą ditlenek węgla (CO₂), metan (CH₄) i podtlenek azotu (N₂O). Gdyby nie ich obecność, średnia temperatura na naszej planecie byłaby na poziomie -19 °C (Cassia i in., 2018), co można zaobserwować w górnej części troposfery, gdzie stężenie gazów cieplarnianych jest niewielkie, a temperatura około 30 °C niższa, niż na powierzchni planety (Niu i in., 2019). Nie oznacza to jednak, że szeroko pojęty efekt cieplarniany jest zjawiskiem jedynie pozytywnym, a wzrost zawartości gazów szklarniowych w atmosferze jest oczekiwany. Przy obecnych poziomach ich emisji jest wręcz przeciwnie. Nadmiar gazów cieplarnianych w atmosferze jest równie niebezpieczny, co ich brak. Wraz z ciągle rosnącą zawartością gazów w atmosferze globalne ocieplenie będzie się pogłębiało, powodując dalszy niekontrolowany wzrost temperatury. Wiąże się to z podniesieniem poziomu mórz i oceanów, pustynnieniem obszarów lądowych, nasilonym występowaniem anomalii pogodowych, a w konsekwencji niszczeniem siedlisk ludzi, roślin i zwierząt (Burrell i in., 2020; IPCC, 2014). Chociaż wrażliwość ekosystemów i społeczności na zmiany klimatu jest specyficzna dla regionu, w naszym warunkach odczuwalne są coraz częstsze i bardziej intensywne ekstremalne zjawiska pogodowe, takie jak fale upałów, gwałtowne deszcze, czy susze skutkujące pożarami (IPCC, 2022). W świetle prognoz na najbliższe dziesięciolecie, obejmujących trendy przekształcania ekosystemów, ograniczenie dalszych zmian klimatycznych, jest jednym z największych współczesnych globalnych wyzwań, którym musimy podjąć, chcąc przetrwać na Ziemi wraz z innymi gatunkami.

1.2.1. Utlenianie i produkcja metanu

Metan jest najprostszym przedstawicielem węglowodorów nasyconych, zbudowany z umieszczonego centralnie atomu węgla oraz czterech atomów wodoru, tworzących kształt tetraedru, a jego masa molowa wynosi 16,04 g mol⁻¹. W temperaturze pokojowej metan jest bezbarwnym i bezwonny gazem, łatwo ulegającym zapłonowi i posiadającym właściwości wybuchowe przy wyższych jego stężeniach w atmosferze (Deng i in., 2019). Te właściwości

metanu doprowadziły do jego odkrycia, gdy w roku 1776, gdy Alessandro Volta zainteresował się łatwopalnym gazem wydobywającym się bagien i mokradeł, stąd jego pierwotne określenie, tj. gaz bagienny (Ledakowicz i Krzystek, 2005). Utworzone w ten sposób złoża gazu ziemnego, składającego się głównie z metanu (stanowi on ponad 90% gazu ziemnego) w 2008 roku zostały oszacowane na 185 bln m³, a z uwagi na rosnące zapotrzebowanie na energię, eksploatacja złóż gazu ziemnego ciągle rośnie (Janusz, 2010). Jest to jednak pula metanu, która ze względu na swoją lokalizację w głębszych warstwach skorupy ziemskiej, do czasu wydobycia ma niewielki wpływ na efekt cieplarniany. O wiele istotniejsze w tym aspekcie są źródła metanu zlokalizowane na powierzchni Ziemi, które można podzielić na biogenne oraz antropogeniczne, przy czym dominują emisje ze źródeł biogenicnych, stanowiące nawet 80% całkowitej globalnej emisji CH₄ (Szafranek-Nakonieczna i in., 2019). Najważniejszymi źródłami emisji CH₄ są wspomniane wcześniej tereny podmokłe, uprawy ryżu, oceany, wysypiska śmieci, a także zwierzęta hodowlane (w szczególności przeżuwacze) i termity. Metan ulega fotochemicznemu utlenieniu, zachodzącemu w wyższych warstwach troposfery przy udziale rodników hydroksylowych i tlenków azotu, a także biologicznemu utlenianiu, prowadzonemu przez mikroorganizmy zasiedlające m. in. gleby czy osady dennie (Guerrero-Cruz i in., 2021; Rigby i in., 2017).

Procesem biologicznym odpowiedzialnym za powstawanie metanu jest metanogeneza, zachodząca w środowisku beztlenowym, którego potencjał redoks jest poniżej -150 mV (Chowdhury i Dick, 2021). Mikroorganizmami prowadzącymi metanogenezę są archeony metanogenne, które w toku reakcji biochemicznych przekształcają substraty takie jak metanol i kwas mrówkowy w metan. W fermentacji metanowej można wyróżnić kilka etapów poprzedzających powstanie metanu. Pierwszym z nich jest hydroliza, w której następuje podział łańcuchów polimerowych polisacharydów, białek i lipidów na krótsze fragmenty tj. cukry, aminokwasy, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz powstanie lotnych kwasów tłuszczowych (propionianu i maślanu). Kolejnym etapem jest przekształcenie kwasów karboksylowych (propionianu i maślanu) przez bakterie acetogenne do octanu, wodoru i ditlenku węgla. W końcowej fazie procesu, grupy metanogennych *Archaea* przekształcają octan, ditlenek węgla i wodór w metan, co przebiega według następujących reakcji (Conrad, 1996; Ledakowicz i Krzystek, 2005):



Z uwagi na to, że warunki sprzyjające metanogenezie występują na terenach podmokłych lub w głębszych, niedotlenionych warstwach gleby, to właśnie gleby obszarów takich jak pola ryżowe czy torfowiska odpowiadają za blisko 50% emisji CH₄ (Malyan i in., 2016;

Serrano-Silva i in., 2014). Co więcej, metan jest odpowiedzialny za około 16% efektu cieplarnianego mimo, iż w atmosferze występuje w niewielkim stężeniu 1909 ppb. Jest to spowodowane wysokim potencjałem GWP, który jest 30-krotnie wyższy od GWP ditlenku węgla (IPCC, 2022).

Jednak aktywność bakterii metanotroficznych pozwala na usunięcie jedynie do 10% CH₄ zawartego w atmosferze (Feng i in., 2018). Większość cząsteczek tego gazu (85-90%) ulega rozpadowi w troposferze na skutek reakcji z rodnikiem hydroksylowym (OH) (IPCC, 2007; Szafranek-Nakonieczna i in., 2019). Dzięki tym reakcjom średni czas bytowania cząsteczki metanu w atmosferze to około 12 lat, co jest aktywnością znacznie krótszą, niż cząsteczki CO₂ (szacowaną na ponad 100 lat) (IPCC, 2022). Zwiększanie aktywności metanotroficznej gleb poprzez poprawę ich właściwości, przyniesie wymierne efekty w postaci szybszego usuwania metanu z atmosfery, ograniczając tym samym efekt cieplarniany (Sengupta i Dick, 2017).

1.2.2. Rola, źródła i emisja ditlenku węgla

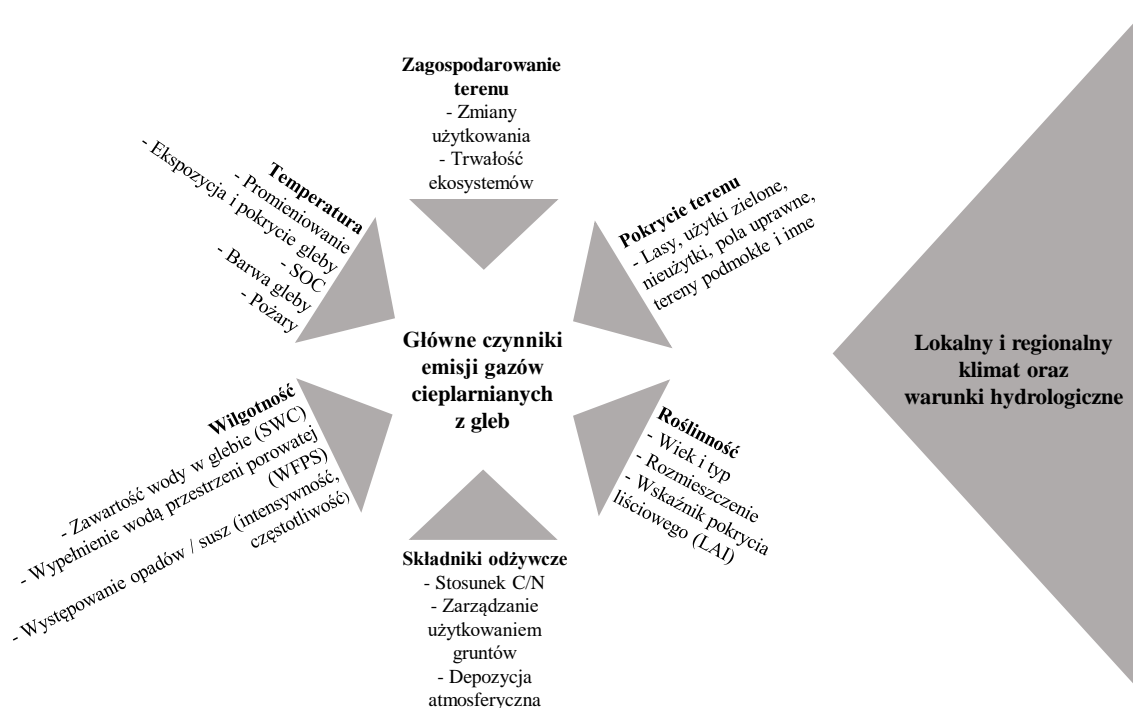
Ditlenek węgla (CO₂) został odkryty przez brytyjskiego chemika Josepha Blacka w 1755 roku. W toku dalszych eksperymentów badaczowi udało się określić naturalne źródła emisji tego gazu takie jak oddychanie tlenowe oraz proces fermentacji (West, 2014). Masa molowa CO₂ to 44,01 g mol⁻¹. W temperaturze pokojowej jest bezbarwnym i bezwonny gazem o niskiej reaktywności, niepalnym, cięższym od powietrza i dobrze rozpuszczalnym w wodzie (National Center for Biotechnology Information, 2005). Właściwości te sprawiają, że znajduje on szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym (np. przy produkcji napojów gazowanych), hutniczym (przy spajaniu metali), ratownictwie (jako środek gaśniczy), czy przechowalnictwie (jako chłodziwo i składnik atmosfery w przechowalniach żywności). Ditlenek węgla przyczynia się do wzrostu temperatury na Ziemi. Dzięki swojej wysokiej przepuszczalności dla promieniowania krótkofalowego (o długości fali poniżej 4 nm) docierającego ze Słońca i ogrzewającego Ziemię, przy jednoczesnej zdolności do intensywnego pochłaniania promieniowania podczerwonego (o długości fali w zakresie 14-16 μm), które zostaje wypromieniowywane z powierzchni Ziemi i zatrzymywane w troposferze, ditlenek węgla, prowadzi do spotęgowania efektu cieplarnianego (Donohoe i in., 2014). Szacunkowy wpływ CO₂ na efekt cieplarniany wynosi około 20%, przy czym jest to jednocześnie najwyższa wartość wpływu, spośród wszystkich antropogenicznych gazów cieplarnianych (Cassia i in., 2018; Popkiewicz i in., 2021).

Podobnie jak w przypadku metanu, źródła emisji ditlenku węgla do atmosfery (biorąc pod uwagę jego pochodzenie) można podzielić na dwie główne grupy tj. źródła biogeniczne i antropogeniczne. Emisja biogenicznego CO₂ z gleby jest uwarunkowana szeregiem procesów biologicznych, spośród których możemy wyróżnić m.in. wymianę gazową (respirację) prowadzoną przez korzenie; aktywność metaboliczną mikroorganizmów glebowych, związaną z rozkładem glebowej materii organicznej oraz respirację heterotroficzną fauny glebowej (Kuzyakov, 2006; Oertel i in., 2016). Procesy te warunkują obieg materii i przepływ energii w ekosystemie, a oznaczanie poziomów emisji CO₂, powstających w toku tych procesów stanowi cenne źródło informacji o kondycji i funkcjonowaniu środowiska glebowego. Gleba, będąca źródłem CO₂ odpowiada również za pochłanianie tego gazu, gdyż CO₂ pełni rolę substratu w szeregu reakcji prowadzonych przez organizmy autotroficzne. Opracowanie pełnych bilansów CO₂ z gleby jest bardzo trudne, ze względu na złożoność środowiska glebowego, specyfikę procesów glebowych i rozproszenie źródeł emisji i pochłaniania CO₂. Szacuje się, że gleba odpowiada za od 5% do nawet 20% globalnej emisji CO₂ (Wu i in., 2019).

Jest jednak druga grupa źródeł CO₂ związana z działalnością człowieka (antropogeniczna), która według szacunków odpowiada za 65% globalnej emisji tego gazu (Pachauri i Meyer, 2014). Wśród tej puli źródeł można wyróżnić produkcję energii elektrycznej i cieplnej z paliw kopalnych (24% wkładu w antropogeniczną emisję CO₂), na kolejnych miejscach jest użytkowanie terenów rozumiane głównie jako rolnictwo i leśnictwo (24%), przemysł (21%), transport (14%), emisje związane z innymi źródłami energii (10%) oraz budownictwo (6%) (Ciais i in., 2013; IPCC, 2014). Według danych z 2021 roku, globalna, roczna emisja CO₂ osiągnęła poziom 34,9 Gt (Liu i in., 2022). Średnia roczna pula węgla, wyemitowanego w wyniku spalania paliw kopalnych i zmian w sposobie użytkowania gruntów jest na poziomie 10,7 Gt C. Według szacunków rocznie do oceanów trafia około 2,4 Gt C (22,4% antropogenicznej emisji), podczas gdy na lądzie zostaje zdeponowane około 3 Gt C (28%). W atmosferze pozostaje nieco mniej, niż połowa z tej puli, czyli 5,3 Gt C i to właśnie ta część ma największy potencjał w tworzeniu efektu cieplarnianego (Redlin i Gries, 2021; Watson i in., 2020). W świetle tych danych ważne są wszelkie środki zaradcze, prowadzące do ograniczenia emisji CO₂ do atmosfery. Jednak ograniczenie emisji to jedna z możliwości, drugą, równie potrzebną drogą są działania zwiększające pochłanianie i magazynowanie C w glebach, które wykazują ku temu spory potencjał.

1.2.3. Udział środowiska glebowego w obiegu gazów cieplarnianych

Gleba jest jednym z naszych najcenniejszych zasobów. Stanowi środowisko życia edafonu, jest miejscem uprawy roślin, umożliwiając produkcję żywności, pełni ważną rolę w retencji wody oraz jest rezerwuarem węgla i azotu (Nannipieri i in., 2003; Nieder i Benbi, 2008). Złożoność procesów zachodzących w glebie warunkuje funkcję gleby, która może być zarówno źródłem, jak i pochłaniaczem gazów cieplarnianych. Na to, który z procesów będzie dominujący ma wpływ szereg czynników, takich jak: wilgotność, temperatura, natlenienie i pH gleby, dostępność składników odżywczych, rodzaj gleby, sposób użytkowania gruntów oraz klimat (Rysunek 1). Mnogość czynników, które mają wpływ na bilans gazów cieplarnianych sprawia, że by określenie charakteru danej gleby wymaga indywidualnych badań wykonanych na konkretnym obszarze występowania tej gleby (Ludwig i in., 2001; Oertel i in., 2016).



Rysunek 1. Czynniki warunkujące emisję gazów cieplarnianych z gleby (na podstawie Oertel i in., 2016).

Gleby nie odpowiadają jedynie za emisję gazów cieplarnianych. Szczególnie gleby naturalne lub utrzymane w dobrej kondycji, o wysokiej bioróżnorodności i bogate w materię organiczną mogą pełnić rolę pochłaniaczy CO₂, CH₄ i N₂O, mogąc tym samym zrównoważyć ilość wyemitowanego CO₂ ilością pochłoniętego C (Serrano-Silva i in., 2014; Topp, 1993).

Jednym z procesów, dzięki którym gleby przyjmują rolę pochłaniaczy gazów cieplarnianych jest metanotrofia. Proces biologicznego utleniania metanu zachodzi w natlenionych, wierzchnich warstwach gleby. Prowadzony jest przez bakterie metanotroficzne, dla których metan jest źródłem węgla i energii.

Gleby użytkowane rolniczo wykazują często podwyższoną emisję CO₂ oraz zredukowaną lub zahamowaną aktywność metanotroficzną, jako efekt stosowanego nawożenia azotowego (Ray i in., 2020; Saari i in., 2004). W obliczu postępujących zmian klimatu stwarza to konieczność poszukiwania praktyk obniżających emisję i zwiększających pochłanianie gazów cieplarnianych przez ekosystem gleby. Przegląd obszarów lądowych Europy wykazał, że w latach 2000-2005 większość gleb pochłaniała zbliżone ilości C, do tych emitowanych, wykazując neutralność klimatyczną. Jednocześnie odnotowano, że intensyfikacja rolnictwa i zwiększenie puli azotu w glebie może prowadzić do odwrócenia tego trendu (Schulze i in., 2009). Mając na uwadze wpływ gleb na emisję gazów cieplarnianych, ważne jest racjonalne gospodarowanie, umożliwiające wysoką produktywność przy jednoczesnym podtrzymaniu jakości i neutralności gleby bilansie gazów cieplarnianych.

1.3. Bakterie metanotroficzne w środowisku glebowym

1.3.1. Ogólna charakterystyka metanotrofów

Gleba stanowi wierzchnią warstwę skorupy ziemskiej, jest układem trójfazowym w którym faza stała, ciekła i gazowa wzajemnie się przenikają i na siebie oddziałują. Glebę tworzą przede wszystkim cząstki mineralne, organiczne oraz organiczno-mineralne, woda i powietrze wypełniające przestrzenie pomiędzy cząstkami stałymi (Bednarek i in., 2011; Kuś, 2015). Gleba nie jest jednak wyłącznie zbiorem materii nieożywionej, lecz jest kształtowana przez mikroorganizmy i zwierzęta bytujące w jej przestrzeni. Stanowi również miejsce wzrostu i rozwoju flory, która w znacznym stopniu wpływa na kondycję gleby (Blume i in., 2016).

Mikrobiota glebowa stanowi zdecydowanie najliczniejszą, najróżnorodniejszą, lecz jednocześnie najslabiej rozpoznaną grupę organizmów tworzących edafon. Rozwój technik biologii molekularnej pozwala na coraz lepsze poznanie bioróżnorodności środowiska glebowego (Guerrero-Cruz i in., 2021). Gleba jest rezerwuarem zarówno pożytecznych, jak i potencjalnie niebezpiecznych mikroorganizmów, stanowiących cenne obiekty badawcze dla naukowców zajmujących się badaniami środowiskowymi. Mając na uwadze współczesne wysiłki na rzecz sprostania założeniom Europejskiego Zielonego Ładu, mówiącym o osiągnięciu neutralności klimatycznej przez kraje Wspólnoty Unii Europejskiej do roku 2050,

szczególnie istotne jest poszerzenie wiedzy o mikroorganizmach mogących być naszymi „sprzymierzeńcami” w ograniczeniu emisji gazów cieplarnianych oraz ochronie jakości gleb uprawnych (Conrad, 1996; Komisja Europejska, 2022).

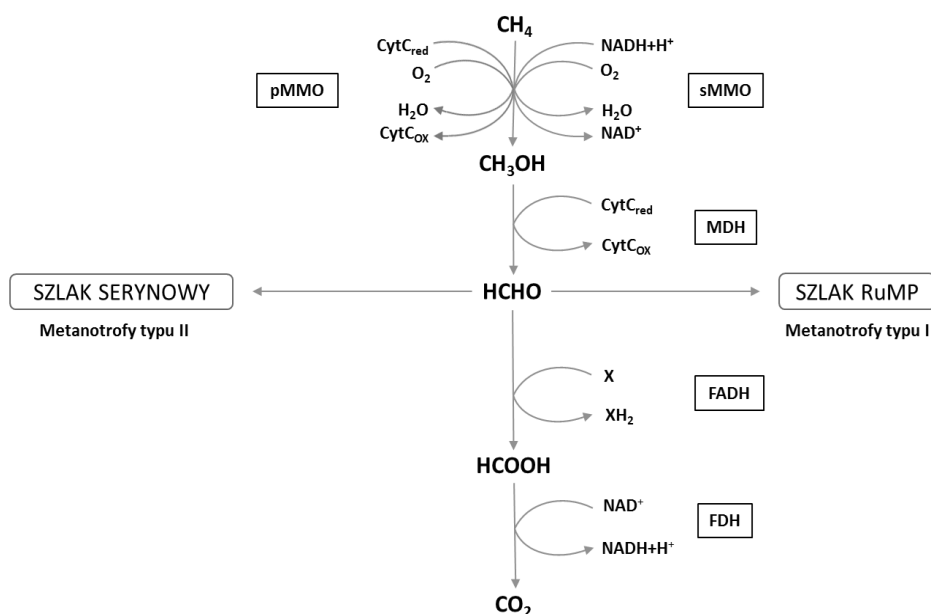
Takimi mikroorganizmami są z pewnością tlenowe bakterie metanotroficzne (metanotrofy), o których pierwsze wzmianki w literaturze pojawiły się już w 1906 roku (Chistoserdova, 2018). Metanotrofy tlenowe to Gram-ujemne bakterie, wykorzystujące metan jako główne źródło węgla i energii, dzięki czemu odgrywają kluczową rolę w globalnym cyklu tego gazu. Pod względem taksonomicznym, metanotrofy tlenowe zaliczane są do *Proteobacteria* (tj. *Gammaproteobacteria* i *Alphaproteobacteria*) oraz *Verrucomicrobia* (Guerrero-Cruz i in., 2021).

Różnice w strukturze i położeniu rozwiniętych błon wewnątrzplazmatycznych, umiejscowionych w komórkach bakterii metanotroficznych pozwoliły na wyróżnienie ich trzech głównych typów: I, II i X. Bakterie należące do typu I oraz X charakteryzują się centralnym ułożeniem błon wewnątrzplazmatycznych, tworzących charakterystyczne stosy, natomiast w metanotrofach typu II rozwinięte błony wewnątrzplazmatyczne są położone peryferyjnie, wzdłuż błony komórkowej. Analiza filogenetyczna wykazała powiązanie typu I i typu X z *Gammaproteobacteria*, a typu II z *Alphaproteobacteria* (Daszczyńska i Matlakowska, 2021; Furtak, 2017; Hanson i Hanson, 1996). *Gammaproteobacteria* reprezentują bakterie z rodzaju *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylosarcina*, *Methylocaldum*, *Methylogea*, *Methylosoma*, *Methyloparacoccus*, *Methyloglobulus*, *Methyloprofundus*, *Methylomarinum*, *Methylovolum*, *Methylomagnum*, *Methylosphaera*. *Methylothermus*, *Methylolhalobius* i *Methylomarinovum*. Do *Alphaproteobacteria* należą metanotrofy z rodzaju *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylocapsa*, *Methyloferula*. *Verrucomicrobia* obejmują bakterie z rodzaju *Methylacidiphilum* i *Methylacidimicrobium* (Felice i in., 2018; Guerrero-Cruz i in., 2021; La i in., 2018a; Oshkin i in., 2020; Strong i in., 2015).

Biologiczne utlenianie metanu jest złożonym procesem, w którym pierwszy etap to utlenienie metanu do metanolu katalizowane przez specyficzny dla metanotrofów enzym - monooksygenazę metanową (ang. *methane monooxygenase* - MMO). MMO może występować w dwóch wariantach, jako: cytoplazmatyczna rozpuszczalna monooksygenaza metanowa (ang. *soluble methane monooxygenase* - sMMO) lub monooksygenaza błonowa (ang. *particulate methane monooxygenase* - pMMO). pMMO ze względu na swoją powszechność (występuje w niemal wszystkich typach metanotrofów, wyjątek stanowią bakterie z rodzaju *Methylocella*), wysoką specyficznością substratową oraz aktywność w utlenianiu metanu jest uznawana za

funkcjonalny biomarker bakterii metanotroficznych (Bédard i Knowles, 1989; Chowdhury i Dick, 2021). W metanotrofach typu II i X występuje pMMO oraz sMMO. Aktywność pMMO jest determinowana dostępnością jonów miedzi w środowisku, natomiast aktywność sMMO jest zależna od puli jonów żelaza, które zajmują miejsca w centrach aktywnych poszczególnych enzymów. Wykazano, że optymalna dostępność Cu^{2+} jest skorelowana z wysoką aktywnością pMMO, lecz w warunkach niedoboru Cu^{2+} wzrastała aktywność sMMO (Zhang i in., 2009; Zhu i in., 2022).

MMO rozrywa podwójne wiązanie w cząsteczce tlenu, a powstałe w ten sposób atomy tlenu są przyłączane do metanu, prowadząc do powstania metanolu oraz cząsteczki wody. Następnie metanol zostaje utleniony do formaldehydu przez peryplazmatyczną dehydrogenazę metanolową (ang. *periplasmic methanol dehydrogenase* - MDH), a powstały formaldehyd ulega konwersji do mrówczanu przy udziale dehydrogenazy formaldehydowej (ang. *formaldehyde dehydrogenase* - FADH). Końcowym etapem utleniania metanu jest enzymatyczna kataliza kwasu mrówkowego (mrówczanu) do ditlenku węgla i wody, prowadzona przez dehydrogenazę mrówczanową (ang. *formate dehydrogenase* - FDH) (Bédard i Knowles, 1989; Hanson i Hanson, 1996; Zhang i in., 2011). Cały proces został przedstawiony na Rysunku 2.



Rysunek 2. Przebieg szlaków metabolicznych prowadzonych przez metanotrofy typu I i II. Objasnienie powyższych skrótów: pMMO - monooxygenaza metanowa związana z błoną; sMMO - cytoplazmatyczna rozpuszczalna monooxygenaza metanowa; NADH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; CytC - cytochrom c; MDH - peryplazmatyczna dehydrogenaza metanolowa; FADH - dehydrogenaza formaldehydowa; FDH - dehydrogenaza mrówczanowa (na podstawie Hanson i Hanson, 1996).

Bakterie metanotroficzne mogą prowadzić asymilację węgla z metanu z wykorzystaniem szlaku rybulozo-monofosforanowego (ang. *ribulose monophosphate pathway* - RuMP) lub serynowego (Rysunek 2). Metanotrofy typu I prowadzą dalszą transformację formaldehydu szlakiem RuMP, podczas gdy bakterie należące do typu II używają do tego celu szlaku serynowego. Bakterie typu X charakteryzują się możliwością wykorzystania obu tych szlaków asymilacyjnych oraz dodatkowo szlaku rybulozo-bisfosforanowego (ang. *ribulose bisphosphate pathway* - RuBP), przy czym wiodącą rolę pełni szlak RuMP. Niektóre opracowania różnicują typ I metanotrofów na podtypy Ia i Ib (Danilova i in., 2016; Furtak, 2017; Shiau i in., 2018). Różnice metaboliczne pomiędzy typami metanotrofów mają swoje przełożenie na ich możliwości asymilacji CH₄, które są znacznie większe u bakterii typu II (Strong i in., 2015).

Metanotrofy są zdolne do bytowania w warunkach szerokiej palety stężeń metanu. Można wyróżnić bakterie o wysokim powinowactwie do CH₄, które zasiedlają środowiska o niskim (atmosferycznym) stężeniu tego gazu oraz metanotrofy o niskim powinowactwie do metanu, preferujące bytowanie w warunkach podwyższonego, nawet kilkudziesięcioprocentowego stężenia CH₄ (Bédard i Knowles, 1989; Pytlak i in., 2012). Tradycyjnie przyjmowano, że bakterie metanotroficzne typu I charakteryzują się wysokim powinowactwem wobec metanu, preferując za to środowiska bogate w tlen. Natomiast typ II reprezentowały metanotrofy o niskim powinowactwie, zasiedlające środowiska w których to podwyższone stężenie CH₄ kontrastowało z obniżoną zawartością tlenu (Strong i in., 2015). Obecnie jednak coraz więcej wskazuje na potencjalną zmienność powinowactwa w grupie bakterii typu II, uzależnionego od warunków dostępności substratu (Dunfield i in., 1999; Strong i in., 2015; Walkiewicz i in., 2012). Bakterie metanotroficzne preferują środowiska, w których występuje swoista równowaga pomiędzy warunkami tlenowymi i beztlenowymi. Proces metanotrofii prowadzony przez te bakterie polega na utlenianiu metanu do ditlenku węgla w obecności tlenu atmosferycznego. Okresowe warunki beztlenowe, sprzyjają procesowi metanogenezy i tym samym zwiększają dostępność substratu dla metanotrofów. Z drugiej strony istotny jest dostęp tlenu pełniącego rolę terminalnego akceptora elektronów. Z tego względu bakterie metanotroficzne licznie zasiedlają zarówno lądowe, wodne, jak i podziemne ekosystemy, w których strefy tlenowe i beztlenowe przenikają się, takie jak bagna, torfowiska, podmokłe pola uprawne (pola ryżowe), wysypiska śmieci, osady jeziorne, a nawet złoża geologiczne (Guerrero-Cruz i in., 2021; Pytlak i in., 2014; Reim i in., 2012).

Ostatnie trzydzieści lat badań zaowocowało poznaniem wielu ekstremofilnych bakterii metanotroficznych, mogących funkcjonować w skrajnie niskich (np. panujących na torfowiskach Arktyki, około 10 °C) lub wysokich temperaturach (np. w środowiskach geotermalnych, sięgających około 70 °C) (Chistoserdova, 2018). Odkryto, iż niektóre metanotrofy są zdolne przetrwać w warunkach wysokiego zasolenia (halofile) i/lub zakwaszenia (pH < 5) (Stępniewska i in., 2014). Środowiska o ekstremalnie wysokiej temperaturze i kwaśnym odczynie są możliwe do zasiedlenia przez bakterie typu *Verrucomicrobia* (Daszczyńska i Matlakowska, 2021). Niemniej większość poznanych bakterii metanotroficznych wykazuje optimum wzrostu w temperaturze 20-30 °C (Hanson i Hanson, 1996) oraz przy zbliżonym do obojętnego odczynie (6,8-7,0) (Amaral i in., 1998; Reddy i in., 2020). Wilgotność optymalna dla procesu metanotrofii jest trudna do wskazania, ponieważ jest zależna od czynników takich jak rodzaj gleby oraz zasobność w materię organiczną. Źródła podają wartość w zakresie od 50 do 70% WHC (zdolność zatrzymywania wody z ang. *water holding capacity*), jako optymalną dla mikrobioty glebowej (Gul i in., 2015; Skopp i in., 1990; Walkiewicz i in., 2020).

Optymalne stężenie metanu jest zależne od wielu czynników, będzie różne chociażby dla bakterii metanotroficznych należących do I i II typu. Optymalną wartość w danych warunkach glebowych można wskazać posługując się kinetyką Michaelisa-Mentena (Reddy i in., 2014; Walkiewicz i in., 2012). W kwestii stężenia O₂ - podobnie jak w przypadku CH₄, wartość ta jest trudna do jednoznacznego wskazania oraz zależna chociażby od powinowactwa do metanu bakterii zasiedlających określone środowisko. Metanotrofy wykazujące wysokie powinowactwo do metanu (typ I) preferują na ogół wyższe stężenia tlenu, natomiast bakterie typu II ze względu na niskie powinowactwo do CH₄ z powodzeniem prowadzą reakcje metaboliczne w niższych stężeniach tlenu (Strong i in., 2015). Wykazano, iż gleby orne charakteryzowały się wyższą aktywnością metanotroficzną w warunkach umiarkowanie ograniczonej dostępności O₂ w atmosferze (5-10% obj.), niż przy skrajnie niskich (2% obj.) lub wysokich stężeniach O₂ (20% obj.) (Walkiewicz i in., 2018). Niektóre metanotrofy należące do *Gammaproteobacteria* np. z rodziny *Methylobacter* są przystosowane do utleniania metanu w warunkach bardzo ograniczonej zasobności środowiska w O₂ rzędu kilku nM (Guerrero-Cruz i in., 2021). Możliwe jest utlenianie metanu w warunkach trwale beztlenowych, mowa wówczas o procesie beztlenowego utleniania metanu (Daszczyńska i Matlakowska, 2021; Strong i in., 2015). Odpowiadające za nie mikroorganizmy stanowią jednak odrębną, zróżnicowaną grupę, zarówno pod względem metabolicznym jak i taksonomicznym.

Pewną rolę w regulacji aktywności metanotrofów odgrywa także stężenie CO₂, jednak informacje w tej kwestii są niejednoznaczne. Z jednej strony wykazano pozytywny wpływ CO₂ na wzrost aktywności metanotroficznej (Acha i in., 2002), jednak pojawiają się również informacje o jej obniżeniu w glebach leśnych w warunkach podwyższonego stężenia CO₂ (Philips i in., 2001). Z drugiej strony długotrwałe badania prowadzone na użytkach zielonych nie wykazały istotnego wpływu wysokiego stężenia CO₂ na strumień CH₄ (Karbin i in., 2015).

Ważnym czynnikiem warunkującym funkcjonowanie bakterii metanotroficznych jest dostępność azotu (np. nawożenie). Wiele prac wskazuje na stymulującą rolę azotu dla rozwoju społeczności metanotroficznych, a niski poziom tego pierwiastka jest podawany jako jeden z głównych czynników limitujących aktywność metanotroficzną w glebie (Bodelier i in., 2000; Fang i in., 2014; La i in., 2018a). Jednocześnie mocznik jest uważany za nawóz niesprzyjający metanotrofii, ze względu na zawartość azotu w formie amidowej, która w pierwszym etapie po aplikacji do gleby przechodzi w formę amonową (Zheng i in., 2008). Ze względu na podobną strukturę chemiczną metanu i jonu amonowego, NH₄⁺ może konkurować z metanem o wiązanie przez monooksygenazę metanową (Bédard i Knowles, 1989; Zheng i in., 2008). Stąd nawożenie azotowe często powoduje inhibicję lub redukcję aktywności metanotroficznej w glebach uprawnych.

Niestety intensyfikacja rolnictwa może wywoływać niekorzystny wpływ na warunki bytowania mikroorganizmów w środowisku glebowym. Mając na uwadze klimatotwórczą rolę mikroorganizmów glebowych, należy dążyć do opracowania technik agronomicznych o neutralnych, bądź o pozytywnym wpływie na bakterie metanotroficzne.

1.3.2. Charakterystyka bakterii metanotroficznych z rodzaju *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* i *Methylocaldum*

Dla lepszego zobrazowania różnorodności bakterii metanotroficznych, poniżej przedstawiono charakterystykę wybranych rodzajów bakterii metanotroficznych o kluczowym charakterze dla prowadzonych badań.

Bakterie z rodzaju *Methylosinus* należą do rodziny *Methylocystaceae* klasy *Alphaproteobacteria*. Bakterie te zostały wyizolowane z szerokiej gamy siedlisk, w tym m.in. gleb wyżynnych i terenów podmokłych (Oshkin i in., 2020). Są to Gram-ujemne, katalazododatnie, wytwarzające oksydazę cytochromową, przetrwalnikujące bakterie o gruszkowatym kształcie i wielkości ok 0,5-1,5 μm. Mikroorganizmy te są mezofilne i neutrofilne, wykazują zdolność wzrostu w temperaturze od 10 do 40 °C

(przy optimum w 30 °C) oraz w szerokim zakresie pH 5,5-9,0 (optymalnie przy pH 6,5-7,0). Wyizolowane dotychczas szczepy *Methylosinus* są ściśle metanotroficzne i bezwzględnie tlenowe, ich wzrost zostaje ograniczony gdy poziom tlenu spadnie poniżej 0,5%. Bakterie z rodzaju *Methylosinus* są zdolne metabolizować amoniak i azotany, a także są zdolne do wiązania azotu atmosferycznego. Bakterie te są także zdolne do produkcji zarówno rozpuszczalnej monooksygenazy metanowej, jak i związanej z błonami formy MMO. Są metanotrofami typu II, czyli charakteryzują się peryferyjnym, równoległym do błony komórkowej rozmieszczeniem rozwiniętych błon wewnątrzplazmatycznych (Daszczyńska i Matlakowska, 2021; Furtak, 2017). Najlepiej poznanymi gatunkami z rodzaju *Methylosinus* są m.in. *M. trichosporium* oraz *M. sporium* (Bowman i in., 2015; Stein, 2018).

Methylocystis to rodzaj bakterii pod wieloma względami bardzo podobny do *Methylosinus*. Bakterie *Methylocystis* to mezofilne, neutrofilowe i niehalofilowe pręciki o wymiarach 0,3-0,5 × 0,5-1,5 μm. Są to aeroby obligatoryjne, przetrwalnikujące, wykorzystujące metan i metanol jako źródło węgla i energii, należą do metanotrofów typu II i wytwarzają sMMO (Bowman, 2015; Dedysh i Knief, 2018). Do tej pory wyizolowano i opisano 6 gatunków *Methylocystis*: *Mc. parvus*, *Mc. echinoides*, *Mc. rosea*, *Mc. heyeri*, *Mc. hirsuta* i *Mc. bryophila* sp. (Oshkin i in., 2020).

Metanotrofy z rodzaju *Methylobacter* są kolejnym przykładem bakterii tlenowych, niemniej jednak przedstawiciele tego rodzaju chętnie rozwijają się również w warunkach hipoksji. Bakterie te kolonizują osady słodkowodnych jezior i rzek, tereny podmokłe, osad czynny oraz ścieki (Chistoserdova, 2018). Są to Gram-ujemne mikroby o kształcie kulistym lub eliptycznym o wymiarach 0,8-1,5 × 1,2-3,0 μm, które mogą występować pojedynczo, parami lub w formie łańcuszków w fazie logarytmicznego wzrostu. Niektóre wykazują zdolność do ruchu dzięki obecności wici polarnej. Szczepy te mają zdolność sporulacji z wytworzeniem struktury spoczynkowej - cysty. Bakterie te są oksydazo- i katalzododatnie oraz wykazują optimum wzrostu w temperaturze 30 °C i pH ok 7. Niektóre bakterie z tego rodzaju są halofilne. Metan jest utleniany z udziałem pMMO, nie wykazano obecności sMMO. Jako źródło azotu *Methylobacter* mogą wykorzystywać sole azotanowe i amonowe, ekstrakt drożdżowy i różne aminokwasy, nie są jednak zdolne do wiązania azotu atmosferycznego (Collins i in., 2017).

Bakterie z rodzaju *Methylomicrobium* należą do *Gammaproteobacteria*, rzędu *Methylococcales*, rodziny *Methylococcaceae*. To Gram-ujemne pałeczki, chociaż występują także w formie ziarniaków i elipsoid o wymiarach 1,2-1,3 μm × 2,0-3,0 μm. Posiadają pojedynczą wicę polarną bądź są urzęsione peritrichalnie, co zapewnia im zdolność do ruchu.

Często związane z ekosystemami o dużym zasoleniu (oceanami, słonymi jeziorami sodowymi), lecz są też obecne także w wodach słodkich i glebach. *Methylomicrobium* nie wytwarzają form spoczynkowych. Są to bakterie przeważanie mezofilne, preferujące wysokie pH środowiska w przedziale 9-10,5. Posiadają dwie formy monoooksygenazy metanowej (pMMO i sMMO). Jako źródła azotu wykorzystują azotany i sole amonowe, a niektóre gatunki mogą wykorzystywać mocznik, metyloaminę i aminokwasy (Dedysh i Knief, 2018; Kalyuzhnaya, 2016).

Methylocaldum to Gram-ujemne, występujące w formie pałeczkowatej lub kokoidalnej, termofilne (rozwijają się w temperaturze > 20 °C) bakterie. Są przetrwalnikujące, wykazują zdolność do wytwarzania cyst. W późnej fazie wzrostu wykładniczego występują w postaci łańcuszka. Zazwyczaj są to bakterie zdolne do ruchu, kolonizujące glebę, gorące źródła i osady morskie. Jako źródło węgla i energii wykorzystują metan, który utleniają dzięki pMMO. Szczepy te nie posiadają zdolności wiązania azotu atmosferycznego (Dedysh i Knief, 2018; Takeuchi, 2016).

1.4. Biowęgiel jako dodatek do gleby

1.4.1. Produkcja biowęgla - uzasadnienie i przebieg procesu

Globalne trendy populacyjne wyraźnie wskazują, iż wzrost produkcji i konsumpcji żywności jest nieunikniony (Sadigov, 2022; Van Bavel, 2013). Rolnictwo, które już teraz mierzy się z wieloma wyzwaniami takimi jak: wzrost kosztów produkcji, spadek produktywności gleb, czy coraz częstsze klęski żywiołowe, będzie musiało szukać kolejnych sposobów na podniesienie produkcji przy jednoczesnym zachowaniu jakości gleby (Jastrzębska i in., 2022). Wysiłki rolników sprawiają, że wraz z powierzchnią upraw oraz plonem wzrasta ilość reszek poźniwnych, wymagających racjonalnego zagospodarowania (Blomqvist i in., 2020; Malorgio i Marangon, 2021). Pomocne w ukazaniu skali tego zjawiska może być prześledzenie zmian powierzchni wybranych upraw, jakie zaszły na obszarze naszego kraju w ciągu ostatnich 17 lat (od 2004 do 2021 roku). W 2004 roku Polska wstąpiła do Unii Europejskiej, zapoczątkowując tym samym konkurencję rodzimego rolnictwa z branżą rolniczą pozostałych państw Wspólnoty Europejskiej. Z jednej strony zmiany w strukturze zasiewów, które zaszły na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat, odpowiadają potrzebom rodzimego rolnictwa, zaś z drugiej ukazują ogólnoeuropejskie trendy i dostarczają pośrednich informacji o zapotrzebowaniu na racjonalne sposoby zagospodarowania odpadów w najbliższych latach.

W Tabeli 1 przedstawiono porównanie areалу upraw oraz zebranych plonów dla 2004 oraz 2021 roku (Główny Urząd Statystyczny, 2022, 2005).

Tabela 1. Zestawienie areálu i plonów z wybranych upraw prowadzonych na terenie Polski w 2004 i 2021 r. (Główny Urząd Statystyczny, 2022, 2005).

Rodzaj uprawy	Areal w 2004 r. (ha)	Areal w 2021 r. (ha)	Zmiany w powierzchni upraw pomiędzy 2004 i 2021 r. (%)	Zbiory w 2004 r. (dt*)	Zbiory w 2021 r. (dt)	Zmiany w zbiorach pomiędzy 2004 i 2021 r. (%)
Pszenica (ogółem)	2 310 742	2 390 524	3,45	98 924 822	121 190 209	22,51
Żyto	1 549 637	761 641	-50,85	42 807 159	25 197 352	-41,14
Jęczmień	1 013 903	721 164	-28,87	35 707 872	30 177 856	-15,49
Owies	519 734	527 405	1,48	14 304 676	16 559 102	15,76
Pszennyto (ogółem)	1 058 193	1 281 601	21,11	37 232 712	54 508 343	46,40
Kukurydza (na ziarno)	411 704	998 469	142,52	23 440 274	74 607 050	218,29
Ziemniaki	713 250	235 829	-66,94	139 986 544	70 814 626	-49,41
Buraki cukrowe	292 402	250 569	-14,31	124 991 748	152 738 455	22,20
Rzepak i rzepik	538 222	993 412	84,57	16 329 189	31 911 770	95,43
Inne rośliny oleiste	21 869	37 979	73,67	283 015	596 768	110,86
Rośliny strączkowe (jadalne)	35 710	120 243	236,72	766 293	2 840 210	270,64
Maliny	14 169	19 752	39,40	568 347	1 038 860	82,79
RAZEM	8 479 535	8 338 588	-1,66	535 342 651	582 180 601	8,75

*dt - decytona (100 kg)

Na podstawie danych w powyższej tabeli można wysnuć kilka kluczowych trendów w produkcji roślinnej. Przede wszystkim można zaobserwować spadek areálu żyta, jęczmienia i roślin okopowych (ziemniaków i buraków cukrowych) na rzecz wzrostu powierzchni upraw pszenicy, owsa, pszenżyta, kukurydzy, rzepaku i rzepiku, innych roślin oleistych, roślin strączkowych oraz malin. W większości przypadków zwiększenie powierzchni upraw

koresponduje ze zwiększeniem zbiorów danej uprawy. W 2021 roku udało się wypracować większy zbiór buraków cukrowych, pomimo zmniejszenia areału upraw. Podsumowując w 2021 r. odnotowano niewielki spadek powierzchni wybranych upraw o 1,66%, przy jednoczesnym wzroście zbiorów o 8,75%. Niniejsze zestawienie dostarcza również pośrednich danych o rodzaju i dostępności resztek poźniwnych, wymagających zagospodarowania. Zwiększenie areału danej uprawy o każdy hektar oraz plonu o każdą decytonę wiąże się z wygenerowaniem od kilku do kilkunastu ton suchej masy resztek poźniwnych (He i in., 2022; Shaukat i in., 2021). Ogromnym zasobem biomasy wymagającej zagospodarowania są również odpady drzewne (będące głównie odpadami przemysłowymi, drewnem użytkowym, odpadami z gospodarki leśnej i upraw rolniczych), których roczna pula w Polsce jest szacowana na około 18 mln m³ (Kurowska, 2016).

Najczęściej stosowanymi metodami zagospodarowania biomasy odpadowej są spalanie lub pozostawienie na polu i zmieszanie ich z glebą podczas zabiegów agrotechnicznych prowadzonych po zbiorach plonów. Istnieje jednak kilka istotnych przeciwwskazań takiego postępowania. Spalanie pozostałości roślin po zbiorach, które zazwyczaj odbywa się na polu niszczy ekosystem wraz z zasiedlającymi go organizmami, powoduje wzrost zanieczyszczenia powietrza (poprzez emisję pyłów, dymów i gazów cieplarnianych), wyjaławia glebę i zwiększa ryzyko pożarów. Taka praktyka wiąże się również z wygenerowaniem wysokiego śladu węglowego, co jest sprzeczne z przyjętymi strategiami klimatycznymi (Chen i in., 2022). Pozostawienie odpadów w glebie również ma swoje słabe strony i w pewnych przypadkach jest niewskazane. Zwiększona podaż materii organicznej w postaci nawozów naturalnych i resztek poźniwnych jest obok nawożenia mineralnego jedną z głównych przyczyn dużego nagromadzenia azotu i pozostałych pierwiastków biogenych w glebie. Wysoki poziom azotu prowadzi do obniżenia pH gleby, dlatego też częste pozostawianie resztek poźniwnych na intensywnie użytkowanych kwaśnych glebach może przynieść dalsze pogłębienie problemu z zakwaszeniem gleb. Ponadto niskie pH gleby jest jednym z czynników ograniczających aktywność mikrobiologiczną i proces mineralizacji, tym samym zmniejszających szybkość dekompozycji materii organicznej i prowadząc do jej zalegania w glebie (Ritchie i Dolling, 1985; Zhang i in., 2020). Resztki poźniwne mogą być również siedliskiem patogenów i szkodników upraw, a w takim przypadku powinno unikać się wprowadzania ich do gleby, bez uprzedniej inaktywacji (Ma i in., 2020).

Tu z pomocą przychodzą techniki stosowane już przez Indian z czasów prekolumbijskich, którzy zainicjowali wyrób i wprowadzanie węgla drzewnego do ubogich gleb strefy międzyzwrotnikowej w celu poprawy ich produktywności (Lehmann, 2009).

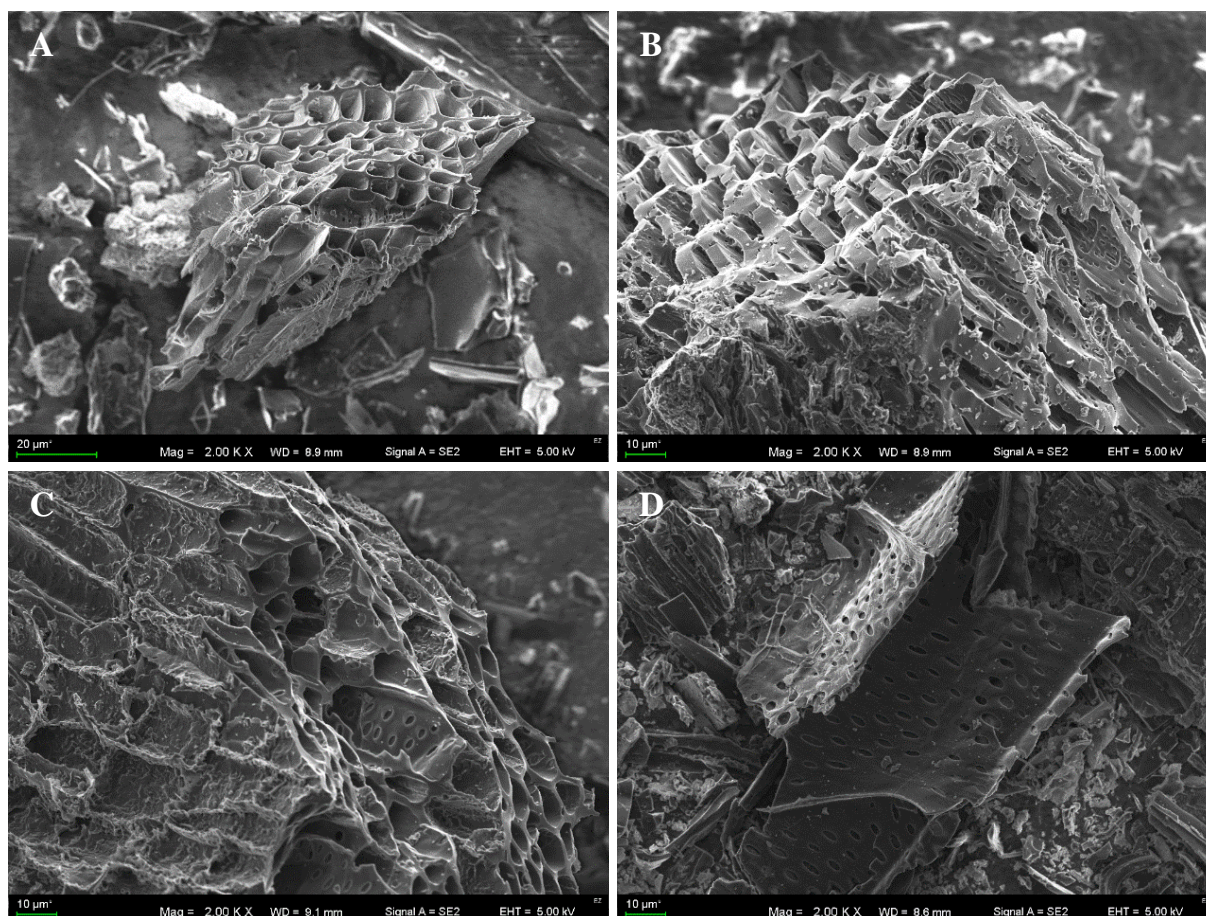
Powstanie gleb, nazwanych *Terra Preta* zostało zainicjowane około 2 500 lat temu i mimo, iż te tereny nie są już użytkowane i wzbogacane węglem drzewnym od setek lat, to nadal wyróżniają się wysoką zawartością węgla organicznego oraz żyznością w porównaniu z okolicznymi glebami regionu tropikalnego. *Terra Preta* to element dziedzictwa kulturowego, którego fenomen jest wciąż badany, a biowęgiel (stosowany obecnie jako alternatywa dla węgla drzewnego) służy ochronie i rekultywacji współcześnie użytkowanych gleb (Lehmann i Rondon, 2006; Schmidt i in., 2021; Trimble, 1851).

Biowęgiel jest produktem powstałym w wyniku poddania biomasy procesowi obróbki termicznej, prowadzonej przy niskiej dostępności lub bez dostępu tlenu (Chira i Bhattacharya, 2019; Lehmann, 2007). Najczęściej wykorzystywaną biomasą do produkcji biowęgla są resztki poźniwne, odpady poprodukcyjne pochodzące z rolnictwa, leśnictwa i przemysłu spożywczego, stałe odpady komunalne oraz nawozy organiczne. Ekonomicznie i etycznie nie jest uzasadniona produkcja biowęgla z materiałów, które mogą być wykorzystane w inny sposób, jak chociażby ziarno zdatne do celów konsumpcyjnych lub paszowych (Kubaczyński i in., 2020; Tomczyk i in., 2020). Biowęgiel jest produkowany w procesie pirolizy, karbonizacji, gazyfikacji i toryfikacji (Bridgwater, 2012). Piroliza to najwcześniej poznany i najpopularniejszy proces używany w produkcji biowęgla. Produkcja biowęgla z biomasy roślinnej polega na odparowaniu wody i termicznym rozkładzie złożonych związków organicznych (głównie: celulozy, hemicelulozy i ligniny) do prostszych i mniejszych cząsteczek, prowadzonym bez dostępu tlenu. Wraz z narastaniem temperatury procesu degradowane są kolejne składniki strukturalne biomasy roślinnej. Podgrzanie biomasy do temperatury około 200 °C skutkuje odparowaniem wilgoci i pozbyciem się substancji lotnych o niewielkiej masie cząsteczkowej. Dalszy wzrost temperatury do 500 °C prowadzi do degradacji celulozy i hemicelulozy, natomiast powyżej tej temperatury następuje rozkład ligniny oraz pozostałej trwałej materii organicznej (Ding i in., 2014; Lin i in., 2009). Piroliza prowadzi do otrzymania produktów będących w trzech stanach skupienia: stałym (biowęgiel), ciekłym (olej pirolityczny będący mieszaniną węglowodorów, woda) i gazowym (gaz pirolityczny będący mieszaniną lotnych węglowodorów, ditlenek węgla, tlenek węgla i wodór). O proporcjach między uzyskiwanymi produktami decydują głównie parametry prowadzonej pirolizy. Temperatura procesu, szybkość przyrostu temperatury (ogrzewania biomasy) oraz czas prowadzonego procesu decyduje o tym jakie są proporcje między otrzymywanymi produktami pirolizy. Biorąc pod uwagę te parametry można również wyróżnić pirolizę klasyczną (wolną), szybką i błyskawiczną (Demirbas i Arin, 2002; Yaashikaa i in., 2020). Najbardziej użyteczną w procesie produkcji biowęgla jest piroliza klasyczna, prowadzona na

ogół w temperaturze 350-800 °C, w której szybkość przyrostu temperatury jest najwolniejsza (0,1-1 °C s⁻¹), a sam proces przebiega najdłużej (powyżej 10 minut). Tak prowadzona piroliza pozwala na uzysk biowęgla na poziomie nawet 35%, a udział produktów w stanie ciekłym i gazowym to odpowiednio 35 i 30% (Demirbas i Arin, 2002; Sohi i in., 2010; Tomczyk i in., 2020).

Poprzez parametry pirolizy można kształtować zarówno ilość uzyskiwanych produktów, jak również ich właściwości. Rodzaj materiału wsadowego i parametry prowadzenia pirolizy w kluczowym stopniu determinują właściwości biowęgla, poprzez stopniową degradację struktury i wiązań chemicznych biomasy. Modelowanie parametrów procesu pozwala na produkcję biowęgla o pożądanym właściwościach, odpowiadającym wybranemu sposobowi zastosowania (Demirbas i Arin, 2002; Lu i in., 2021). Podwyższenie temperatury pirolizy prowadzi do zwiększenia m.in. zawartości węgla, powierzchni właściwej, objętości porów, pojemności wymiany kationowej (ang. *cation exchange capacity* - CEC) i popielności, jednocześnie powoduje obniżenie zawartości pierwiastków lotnych takich jak H, O i S oraz hydrofobowości. Wyższa temperatura powoduje również zwiększenie stabilności biowęgla, jednak kosztem zmniejszonego uzysku masy produktu (Beusch, 2021; Chatterjee i in., 2020; Xiao i in., 2018). Wpływ materiału wsadowego na właściwości biowęgla jest w głównej mierze determinowany przez wilgotność i różnice w składzie surowców, wykorzystywanych w procesie pirolizy. Dla zachowania wydajności procesu na wysokim poziomie ważne jest, by wilgotność biomasy była możliwie niska, a w razie potrzeby prowadzić dosuszanie biomasy (Tomczyk i in., 2020; Yaashikaa i in., 2020). Celuloza, hemiceluloza i lignina to związki budujące ścianę komórkową komórek roślinnych, ich zawartość jest mocno zróżnicowana i uzależniona od gatunku i stadia rozwojowego rośliny. Drewno z drzew liściastych zawiera od 38 do 51% celulozy, 17-38% hemicelulozy, natomiast lignina stanowi od 21 do 31% biomasy drzewnej. Gatunki drzew iglastych są uboższe w celulozę (33-42%), natomiast zawartości hemicelulozy i ligniny kształtują się odpowiednio na poziomie od 22 do 40% i od 27 do 32%. Ogromna grupa roślin zielnych charakteryzuje się jeszcze większą rozbieżnością omawianych składowych. Zawartość celulozy w tkankach roślin zielnych wynosi od 25 do 95%, hemiceluloza może stanowić od 20 do 50%, przy czym lignina może występować w ilości do 40% (Tarasov i in., 2018). W składzie biomasy pochodzącej z jednego gatunku rośliny również obserwowane są znaczne rozbieżności, determinowane odmianą oraz warunkami środowiskowymi towarzyszącymi wzrostowi roślin. Powyższe informacje są bardzo pomocne w zoptymalizowaniu procesu pirolizy. Mając na uwadze różnice w temperaturze degradacji celulozy i ligniny można założyć, że biomasa bogata w celulozę

i/lub zawierająca niewielkie ilości ligniny ulegnie efektywnej pirolizie w temperaturze znacznie niższej, niż materiał wsadowy o wysokiej zawartości ligniny (Ding i in., 2014; Lin i in., 2009). Jednocześnie resztki bogate w ligninę mogą nie ulec efektywnej konwersji do biowęgla w niskotemperaturowej i/lub krótkotrwałej pirolizie. Warto mieć na uwadze, że zarówno wzrost temperatury, jak również przyspieszenie przyrostu temperatury i wydłużenie czasu pirolizy przyczynia się do podniesienia kosztów procesu, zmniejszając jego ekonomiczne uzasadnienie. Z drugiej strony tak wielkie zróżnicowanie biomasy nie pozwala na dokładną optymalizację pirolizy, prowadząc do powstania produktów o dużym zróżnicowaniu (Lu i in., 2021; Yaashikaa i in., 2020). Na Rysunku 3 przedstawiono różnice w strukturze biowęgla powstałych z wybranych biomas roślinnych (zrębków drzewnych, łusek słonecznika, łodyg malin i łodyg ziemniaków) podczas pirolizy prowadzonej w temperaturze 550-600 °C.



Rysunek 3. Zdjęcia biowęgla wytworzonych w temperaturze 550-600 °C, zobrazowane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) w powiększeniu 2 000 (Mag = 2 000x).A: Biowęgiel ze zrębków drzewnych; B: Biowęgiel z łusek słonecznika; C: Biowęgiel z łodyg malin; D: Biowęgiel z łodyg ziemniaków.

Spokas i Reicosky (2009) przedstawili charakterystykę 16 biowęgli, zróżnicowanych pod względem materiału wsadowego (biomasy) i warunków pirolizy. Przebadane materiały odznaczały się dużą zmiennością pod względem właściwości fizykochemicznych takich jak zawartość C, N, O i H, powierzchni właściwej oraz zawartości popiołu. Zróżnicowanie pod względem materiału wsadowego pozwala na uzyskanie biowęgli o cennych właściwościach, mogących pomóc w realizacji współczesnych wyzwań i celów środowiskowych.

1.4.2. Charakterystyka gleby płowej (*Haplic Luvisol*)

Badania do niniejszej rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone na glebie płowej wytworzonej z lessu (*Haplic Luvisol*) (Usowicz i in., 2016). Gleba płowa powstaje głównie z przepuszczalnych glin zwałowych, wietrzeniowych i stokowych, utworów lessowych oraz pyłów lessopodobnych w warunkach klimatu wilgotnego. Dominującym procesem glebotwórczym jest proces płowienia (*lessivage*), podczas którego frakcje ilowe ulegają grawitacyjnemu przemieszczeniu do głębszych warstw gleby, czyli poziomu iluwialnego *argik*. Przemieszczający się il koloidalny determinuje pojemność wodną i właściwości sorpcyjne gleby płowej. Bezpośrednim skutkiem procesów zachodzących w profilu glebowym jest wyodrębnienie jasno popielatej/białej, zubożałej w węglany, tlenki żelaza, wapnia i manganu warstwy gleby, stanowiącej poziom wymywania *eluwik* oraz warstwy z wytrąconymi zredukowanymi tlenkami w postaci konkrecji. Poziomy *eluwik* oraz *argik* są poziomami diagnostycznymi tej gleby. Warto zaznaczyć, że gleby te posiadają dobrze wykształcony profil glebowy z charakterystycznym układem poziomów genetycznych w których można wyróżnić: poziom organiczny (ściółki; nie występujący w glebach uprawnych), poziom próchniczny (niespełniający kryteriów poziomów diagnostycznych), poziom *eluwik*, poziom iluwialny *argik*, skałę macierzystą oraz niekiedy poziom *kalcik* (Systematyka gleb Polski, 2019; Szymański i Nikorych, 2012).

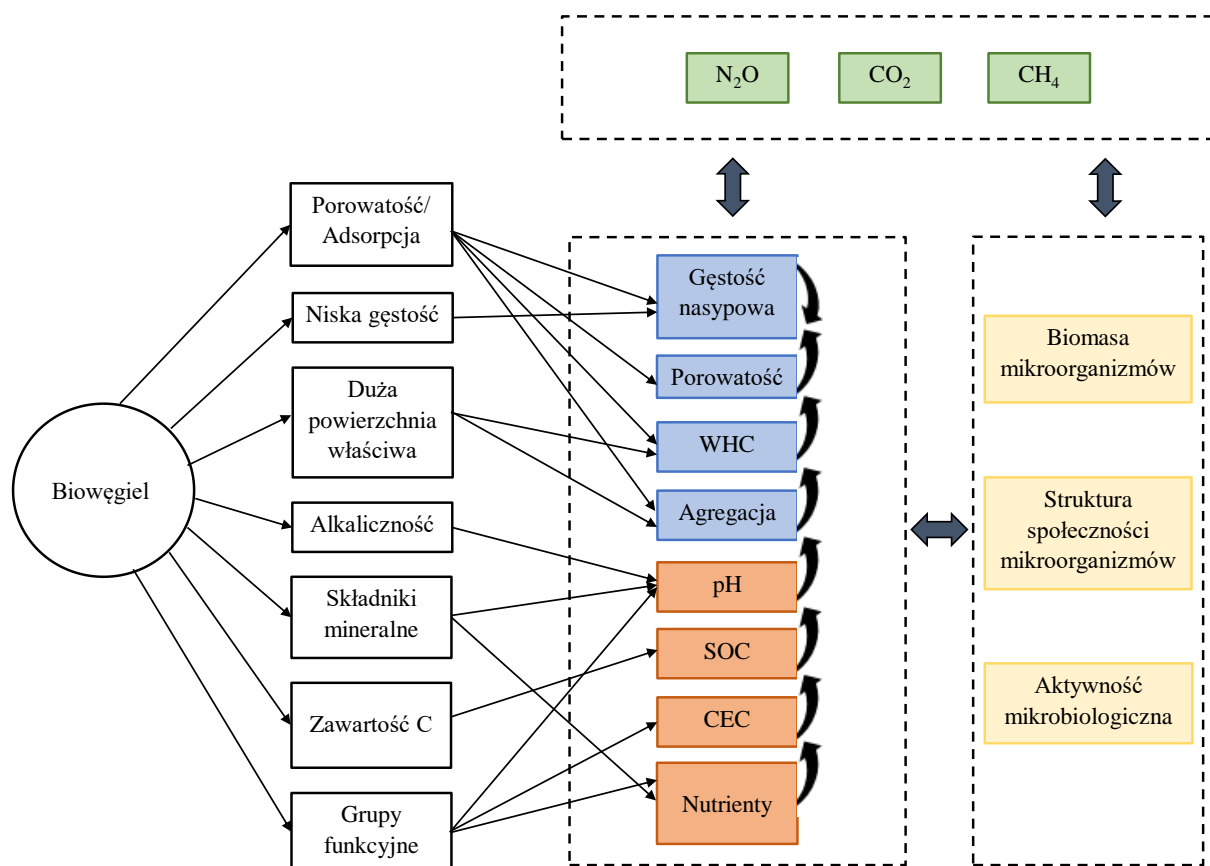
Ze względu na swą powszechność (zajmują ok. 45% powierzchni naszego kraju), dobrą zdolność zatrzymywania wody i zasobność w kationy zasadowe, gleby płowe w znacznym stopniu determinują produkcję rolną w Polsce i na świecie. Gleby płowe są uważana za produktywne i przydatne rolniczo. Grunty orne są często zaliczane do klas bonitacyjnych gleb ornych dobrych (IIIa) i gleb ornych średnio dobrych (IIIb), które w niewielkim stopniu są zagrożone erozją wodną (Paluszek, 2010; Systematyka gleb Polski, 2019).

1.4.3. Potencjał biowęgla w kształtowaniu środowiska glebowego

Biowęgiel jest surowcem wykorzystywanym m.in. w budownictwie, przemyśle energetycznym, kosmetycznym oraz odzieżowym. Znalazł również zastosowanie w gospodarce odpadami. Z powodzeniem pełni rolę sorbentu zanieczyszczeń i stabilizatora procesu kompostowania biomasy, jest wykorzystywany jako medium hodowlane dla mikroorganizmów (Saletnik i in., 2019; Schmidt i in., 2021). Jednak przede wszystkim biowęgiel znajduje coraz szersze zastosowanie w rolnictwie, leśnictwie i ochronie środowiska jako dodatek do gleby poprawiający jej właściwości fizyczne oraz zwiększający sekwestrację węgla (Coomes i Miltner, 2017; Kavitha i in., 2018; Luo i in., 2016; Nair i Mukherjee, 2022; Schmidt i in., 2021). Biowęgiel jako materiał charakteryzuje się dużą powierzchnią właściwą i dobrymi właściwościami sorpcyjnymi (Al-Wabel i in., 2018). Ponadto jest źródłem trwałej materii organicznej oraz pierwiastków biogennych m.in. węgla, azotu i fosforu, ogranicza wypłukiwanie odżywczych soli mineralnych w głąb profilu glebowego oraz spowolnia migrację wody w glebie (Karhu i in., 2011). Z tego powodu biowęgiel może pozytywnie wpływać na stabilność agregatów glebowych (strukturę) i porowatość, poprawiając tym samym stosunki wodno-powietrzne gleby. Jest to istotne nie tylko ze względu podejmowane próby ograniczenia nawożenia, ale również wobec nasilających się zjawisk suszy (Wang i in., 2019; Yoo i in., 2014). Oprócz wielu potencjalnych korzyści, zarówno piroliza jak i aplikacja biowęgla do gleby jest jednak szeroko dyskutowana np. ze względu na duże nakłady energetyczne procesu, znaczne zmniejszenie objętości użytej biomasy i trudności z aplikacją biowęgla na pola na większą skalę, wylesianiem na cele pirolizy, czy zwiększeniem erozji wietrznej gleb i ryzyka aplikacji zanieczyszczeń (Brtnicky i in., 2021; Nair i Mukherjee, 2022).

Postępująca degradacja środowiska oraz nasilające się zmiany klimatyczne sprawiają, że coraz intensywniej poszukuje się rozwiązań prowadzących do zatrzymania lub opóźnienia tych niekorzystnych zjawisk. Szczególnie istotne jest ograniczenie emisji gazów cieplarnianych w rolnictwie, odpowiadającym za około 50% globalnej emisji metanu (CH_4) (Jeffery i in., 2016a). Spokas i Reicosky (2009) w swojej pracy zbadali wpływ aż 16 różnych biowęgla na wymianę gazową, prowadzoną pomiędzy glebami z obszarów o różnym sposobie użytkowania (glebą uprawną, leśną oraz ze składowiska odpadów), a atmosferą. Mimo tak dużego zróżnicowania materiału badawczego, dodatek biowęgla przyczynił się w większości przypadków do obniżenia aktywności metanotroficznej gleb i wzrostu emisji CO_2 . W omawianej pracy zaznaczono, iż jest to jedno z pierwszych tak szeroko zakrojonych badań nad tym zagadnieniem. Kolejne lata przyniosły doniesienia literaturowe, świadczące zarówno

o negatywnym (Ribas i in., 2019; Zimmerman i in., 2011), zerowym (He i in., 2017), jak i pozytywnym (Lentz i in., 2014; Liu i in., 2011) wpływie biowęgla na ograniczenie emisji CH₄ i CO₂ z gleby, a dyskusja naukowa na ten temat jest ciągle otwarta (Hui, 2021; Li i in., 2018; Zhang i in., 2019) (Rysunek 4.).



Rysunek 4. Schemat oddziaływani biowęgla na właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne gleby oraz emisję gazów cieplarnianych (na podstawie Li i in., 2018).

Pojawiły się również prace naukowe, skupiające się na wpływie biowęgla na mikrobiom glebowy. Doniesienia literaturowe wykazują pozytywne aspekty w tym zakresie. Zwiększona porowatość gleby spowodowana dodatkiem biowęgla sprawia, że w glebie jest więcej przestrzeni, w której mogą bytować mikroorganizmy (tzw. mikrohabitatów) (Noyce i in., 2016; Ribas i in., 2019). W połączeniu z poprawą stosunków wodno-powietrznych, sprzyja to namnażaniu bakterii tlenowych oraz powstawaniu tzw. hot-spotów w glebie. Mikroorganizmy te w znacznym stopniu odpowiadają za procesy emisji i pochłaniania gazów w glebie (Curaqueo i in., 2017). Respiracja (oddychanie) gleby jest procesem prowadzonym przez mikroorganizmy, w wyniku którego powstaje CO₂. Proces biologicznego utleniania metanu, zachodzi w natlenionych, wierzchnich warstwach gleby. Prowadzony jest przez bakterie

metanotroficzne, dla których metan jest źródłem węgla i energii (Walkiewicz i in., 2012). Przebieg tych procesów glebowych wyrażany jest za pomocą aktywności respiracyjnej oraz aktywności metanotroficznej. Aktywność respiracyjna stanowi miarę aktywności ogółu mikroorganizmów zasiedlających dane środowisko i wyznaczana jest na podstawie ilości CO₂ wyemitowanego przez określoną masę gleby w jednostce czasu. Aktywność metanotroficzną stanowi ilość utlenionego CH₄ przez określoną masę gleby w czasie (Walkiewicz i in., 2020). Badania dotyczące wymiany gazowej w glebach wskazują na ich wysoki potencjał metanotroficzny (Walkiewicz i in., 2012; Zhao i in., 2021). Z tego względu gleby uważa się za jeden z najważniejszych pochłaniaczy metanu występującego w atmosferze (Huang i in., 2019). Aktywność metanotroficzna może być wzmocniona dodatkiem biowęgla. Wpływ biowęgla tłumaczony jest zazwyczaj zmianami fizykochemicznymi, jakie zachodzą w glebie po jego aplikacji do gleby (Jeffery i in., 2016a), z których najważniejszymi są (Rysunek 4):

- zmniejszenie zagęszczenia gleby;
- zwiększenie porowatości gleby, co wynika z silnie porowatej struktury biowęgla;
- zwiększenie zdolności do zatrzymywania wody w glebie;
- poprawa struktury agregatowej;
- podwyższenie pH gleby, spowodowane wprowadzeniem do gleby wraz z biowęglem, tlenków zasadowych zawartych w popiele;
- wzrost pojemności wymiany kationowej, co może wzmocnić odporność gleby na zakwaszenie i degradację chemiczną;
- zwiększenie dostępności węgla organicznego oraz pozostałych pierwiastków biogennych, niezbędnych dla roślin i bakterii autotroficznych.

Z uwagi na złożoną sieć zależności pomiędzy właściwościami gleby, liczebnością i aktywnością społeczności mikroorganizmów glebowych i przebiegiem wymiany gazowej pomiędzy glebą i atmosferą, jak również mając na uwadze wysoką trwałość biowęgla i potencjalny czas jego oddziaływania w glebie, istotne jest dokładne zbadanie zmian jakie zachodzą w emisji/pochłanianiu gazów cieplarnianych (CH₄, CO₂) z gleby pod wpływem aplikacji biowęgla, uwzględniając szeroki zakres dawek biowęgla oraz skuteczność wybranych dawek biowęgla w aspekcie czasu.

2. Hipotezy badawcze i cele rozprawy doktorskiej

Hipotezy badawcze

W odpowiedzi na rosnącą ilość biomasy odpadowej i wynikającej z tego potrzeby opracowywania metod jej racjonalnego zagospodarowania w rolnictwie, jak również na podstawie przeglądu literatury dotyczącego efektów wzbogacenia gleb biowęgłem oraz jego wpływu na wymianę gazów cieplarnianych między glebą i atmosferą, sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. P.1: Mając na uwadze fakt, iż materiał wsadowy (rodzaj biomasy odpadowej, z której wytworzono biowęgiel) determinuje właściwości biowęgla, w tym zdolność do pochłaniania CH_4 , postawiono hipotezę stanowiącą o tym, że biowęgłe produkowane z nowych, niestosowanych do tej pory surowców, mianowicie łodyg malin i ziemniaków mogą wykazywać potencjał do efektywnego usuwania CH_4 z atmosfery. Ponadto proces ten jest zależny od wilgotności materiału, ponieważ wysoka wilgotność biowęgla może utrudniać dyfuzję gazów.
2. P.2: Postawiono hipotezę, iż biowęgiel ze zrębków drzewnych może poprawić właściwości fizykochemiczne gleb (takie jak: pH, zdolność zatrzymywania wody w glebie, zawartość węgla organicznego), prowadząc do zwiększenia liczebności i bioróżnorodności zbiorowisk metanotroficznych w glebie płowej (*Haplic Luvisol*), a tym samym pozytywnie wpłynąć na szybkość utleniania CH_4 i aktywność metanotroficzną *Haplic Luvisol*. Postawiono również hipotezę, mówiącą o tym, że wpływ biowęgla na utlenianie CH_4 , emisje CO_2 i strukturę mikrobioty glebowej jest ujemnie skorelowany z czasem bytowania biowęgla w glebie oraz dodatnio skorelowany z jego dawką, z uwagi na różnice zawartości biowęgla w glebie, będącego (dzięki zjawisku adhezji) miejscem intensywnie zasiedlanym przez mikroorganizmy glebowe.
3. P.3: Postawiono hipotezę, iż wzbogacenie gleby biowęgłem z łusek słonecznika prowadzi do poprawy właściwości fizykochemicznych gleby płowej (*Haplic Luvisol*) oraz stanu mikrobioty glebowej, a tym samym stymulacji procesu utleniania metanu, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszonej emisji CH_4 z gleby. Założono, że szybkość utleniania metanu wzrasta wraz z wielkością dawki biowęgla. Jednocześnie podwyższonej aktywności metanotroficznej gleby towarzyszy wzrost emisji CO_2 .

Cele rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska składa się z cyklu 2 połączonych ze sobą tematycznie wydanych publikacji (P.1 i P.2), wyników doświadczenia, będących w trakcie procesu publikowania (P.3) oraz osiągnięcia patentowego (P.433435). Ich głównym celem jest poszerzenie wiedzy z zakresu potencjału biowęgla w aspekcie łagodzenia zmian klimatu poprzez zwiększanie zdolności gleb do utleniania metanu. Mając na uwadze badane aspekty, sformułowano następujące cele szczegółowe rozprawy doktorskiej:

1. Aspekt wpływu użytego substratu na właściwości biowęgla i ich potencjału ograniczania emisji gazów cieplarnianych (P.1) - celem doświadczenia było określenie potencjału pochłaniania metanu (CH_4) i tlenu (O_2) oraz emisji ditlenku węgla (CO_2) nowych biowęgla z odpadowej biomasy roślinnej (łodyg malin i ziemniaków), jak również popularnych biowęgla (ze zrębków drzewnych i łusek słonecznika). Ponadto dokonano charakterystyki właściwości fizykochemicznych badanych biowęgla.
2. Aspekt dodatku biowęgla do gleby i czasu jego pozostawiania w glebie (P.2) - celem doświadczenia było określenie wpływu biowęgla ze zrębków drzewnych ($10, 20$ i 30 Mg ha^{-1}) na właściwości fizykochemiczne gleb, utlenianie CH_4 , emisję CO_2 i ubytek O_2 , a także zmian w zbiorowiskach mikroorganizmów glebowych, wywołanych bezpośrednio po zastosowaniu biowęgla (efekt krótkoterminowy) oraz pięć lat po aplikacji biowęgla (efekt długotrwały) do gleby płowej (*Haplic Luvisol*).
3. Aspekt dawki zaaplikowanego do gleby biowęgla (P.3) - celem doświadczenia było określenie wpływu dawki biowęgla z łusek słonecznika (zastosowanego w szerokim zakresie dawek od 0 do 100 Mg ha^{-1}) na właściwości fizykochemiczne gleby oraz skład i aktywność jej mikrobioty, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii metanotroficznych. Tym samym podjęto ocenę możliwości ograniczenia emisji gazów cieplarnianych przy jednoczesnym przedstawieniu racjonalnej metody zagospodarowania biomasy odpadowej. Z uwagi na to, iż proces publikacyjny z tego zakresu jest w toku, treści te zostały dołączone do niniejszego opracowania jako badania uzupełniające w celu pełniejszego przedstawienia omawianego zagadnienia.
4. Ponadto, celem osiągnięcia patentowego P.433435 było opracowanie wydajnego sposobu otrzymywania biowęgla, posiadającego bardzo dobrą zdolność do samodzielnego pochłaniania metanu z atmosfery, w warunkach ciśnienia atmosferycznego oraz zaproponowanie zastosowania tego biowęgla do usuwania metanu.

3. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach i badaniach uzupełniających

W publikacjach P.1, P.2, badaniach uzupełniających P.3 oraz osiągnięciu patentowym P.433435 podjęto kompleksową ocenę roli wybranych biowęgla w ograniczeniu emisji gazów cieplarnianych (CO₂ i CH₄) z gleby pólowej.

Ograniczenie emisji gazów cieplarnianych, ochrona gleb przed degradacją, jak również racjonalne zagospodarowanie biomasy odpadowej pochodzącej z produkcji rolnej są jednymi z największych wyzwań współczesnego rolnictwa. Metodą o obiecujących rezultatach, mogącą pomóc w realizacji tych celów jest produkcja biowęgla i wzbogacanie gleb biowęgłem. Wciąż poszukiwane są surowce, pozwalające na produkcję biowęgla o użytecznych właściwościach i osiągnięcie jak najlepszych rezultatów ich stosowania. Przedmiotem badań jest zarówno efektywność, jak również potencjalnie negatywne skutki stosowania biowęgla jako dodatku do gleby.

W związku z powyższym, niezwykle istotne jest dokładne zbadanie zmian jakie zachodzą w emisji/pochłanianiu gazów cieplarnianych z gleby pod wpływem aplikacji biowęgla, uwzględniając szeroki zakres dawek biowęgla oraz skuteczność wybranych dawek biowęgla w aspekcie czasu. Istotnym uzupełnieniem prowadzonych badań jest scharakteryzowanie społeczności mikroorganizmów zasiedlających badaną glebę oraz lepsze poznanie zmian jakie zachodzą w mikrobiomie glebowym na skutek wzbogacenia gleby biowęgłem. Dodatkowym aspektem, pozwalającym na dobór optymalnego biowęgla pod względem ograniczenia efektu cieplarnianego, jest scharakteryzowanie wybranych biowęgla oraz określenie ich zdolności do samodzielnego pochłaniania CH₄ i emisji CO₂.

3.1. Publikacja P.1

Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364.

DOI: <https://doi.org/10.31545/intagr/126762>

Realizacja badań w ramach publikacji P.1 pozwoliła na charakterystykę właściwości fizykochemicznych, określenie szybkości emisji CO₂ oraz potencjału wybranych biowęgli do samodzielnego pochłaniania metanu. Na podstawie wymiany CH₄ i CO₂ między biowęglem i atmosferą oszacowano również GWP badanych biowęgli, wytworzonych w procesie pirolizy z czterech rodzajów odpadowej biomasy roślinnej: zrębków drzewnych, łusek słonecznika, łodyg malin i łodyg ziemniaków.

Wychodząc naprzeciw aktualnym wyzwaniom klimatycznym i środowiskowym poddano ocenie dwa komercyjne biowęgle wyprodukowane z powszechnie dostępnej biomasy odpadowej, czyli łusek słonecznika i zrębków drzewnych poddanych procesowi pirolizy w temperaturze odpowiednio 550 i 600 °C. Biowęgle z łusek słonecznika (Bs) i ze zrębków drzewnych (Bo) pozyskano w 2018 i 2019 roku i zostały one użyte w doświadczeniach polowych założonych na terenie IA PAN w ramach projektu BIOSTRATEG o akronimie SoilAqChar. Ponadto wyprodukowano, scharakteryzowano i poddano ocenie dwa nowe biowęgle z łodyg malin (Br) oraz łodyg ziemniaków (Bp). W tym celu zebrano biomasę pozostałą po uprawie malin i ziemniaków (łodygi skoszonych jesienią malin i łęciny pozostałe po zbiorze ziemniaków). Następnie z zebranej, powietrznie suchej biomasy wytworzono biowęgle w procesie pirolizy (temperatura: 600 °C, czas: 30 min, w atmosferze azotu). Wykonano szereg analiz fizykochemicznych, prowadzących do określenia zawartości całkowitego węgla (C) i azotu (N), oznaczenia stężenia DOC, gęstości nasypowej, WHC, pH i Eh. Uzyskane wyniki posłużyły do opracowania charakterystyki nowo wytworzonych (Br, Bp) oraz stosowanych uprzednio na poletkach doświadczalnych biowęgli (Bo, Bs). Badane biowęgle charakteryzowały się szeregiem właściwości użytecznych w ochronie i rekultywacji gleb. Wszystkie biowęgle okazały się bogatym rezerwuarem DOC, ponadto Bs, Br oraz Bp charakteryzowały się wysoce zasadowym odczynem o wartościach pH powyżej 9. Nowe biowęgle Br i Bp odznaczały się również wysoką zdolnością zatrzymywania wody, odpowiednio $4,31 \pm 0,16$ i $4,45 \pm 0,09$ g H₂O g⁻¹ biowęgla, podczas gdy WHC pozostałych biowęgli (Bo i Bs) wyniosło 2,58 g H₂O g⁻¹ biowęgla.

W celu przygotowania do inkubacji biowęgla przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm, naważono po 5 g do oddzielnych szklanych naczyń inkubacyjnych o pojemności 120 cm³, następnie próby uwilgotniono do poziomu 60% oraz 100% WHC i szczelnie zamknięto. Do tak przygotowanych prób wprowadzono ok. 1% CH₄ (obj.) i inkubowano je w ciemności w temperaturze 25 °C przez 28 dni. W tym czasie prowadzono regularne pomiary chromatograficzne, mające na celu zbadanie zmian składu atmosfery gazowej w przygotowanych próbach.

Biowęgłe z łądyg malin i ziemniaków wykazały zdecydowanie wyższe możliwości usuwania metanu z atmosfery, niż biowęgłe ze zrębków drzewnych oraz łusek słonecznika. Całkowity ubytek CH₄ w próbkach Bp, inkubowanych w warunkach 60% WHC odnotowano przed upływem 25 dnia inkubacji, przy jednoczesnej umiarkowanej emisji CO₂. Dla porównania biowęgiel Bo charakteryzował się około 10-krotnie większą szybkością emisji CO₂, niż Bp. Biowęgłe Br i Bp, inkubowane w wilgotności odpowiadającej 60% WHC wykazywały szybkości pochłaniania metanu na poziomach odpowiednio $8,01 \pm 0,47$ i $5,78 \pm 0,17$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹. Szybkości usuwania metanu, którymi odznaczały się pozostałe biowęgłe były istotnie statystycznie niższe: $0,17 \pm 0,06$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ dla Bo i $2,74 \pm 0,57$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ dla Bs. W warunkach wyższej wilgotności (100% WHC), szybkości pochłaniania metanu poszczególnych biowęgla były na ogół niższe, niż w warunkach odpowiadającym 60% WHC. Warto również zauważyć, że Bp charakteryzował się na najwyższymi szybkościami pochłaniania metanu z pośród wszystkich biowęgla, inkubowanych w obydwu warunkach wilgotności. Nowe biowęgłe (Br oraz Bp) charakteryzowały się ujemnymi wartościami net GWP, co świadczy o ich potencjalnie wysokiej przydatności w ograniczeniu emisji gazów cieplarnianych. Ważnym atutem Br i Bp jest również to, iż biomasa potrzebna do ich wytworzenia jest uznawana za odpad w produkcji rolniczej, który może zostać wartościowo zagospodarowany jako materiał wsadowy do produkcji biowęgla.

3.2. Publikacja P.2

Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

W ramach badań wykazanych w publikacji P.2 uwzględniono aspekt czasu i dokonano oceny wpływu krótko- i długotrwałego oddziaływania biowęglu ze zrębków drzewnych na właściwości fizykochemiczne i aktywność metanotroficzną oraz mikrobiotę gleby płowej (*Haplic Luvisol*).

Do tego celu wykorzystano poletka doświadczalne założone w 2013 roku, utrzymywane jako ugór, na których zastosowano dodatek biowęglu ze zrębków drzewnych w dawkach: 10, 20 i 30 Mg ha⁻¹ oraz poletko kontrolne, pozostawione bez dodatku biowęglu. W 2018 roku pobrano próbki gleby płowej z tychże poletek, przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm, naważono po 20 g do oddzielnych szklanych naczyń inkubacyjnych o pojemności 120 cm³, a następnie uwilgotniono do poziomu 60% WHC (odpowiadającego optymalnym dla mikroorganizmów warunkom wodno-powietrznym gleby) i 100% WHC (warunki całkowitego nasycenia gleby wodą). Po trzydniowej preinkubacji, butelki szczelnie zamknięto, dodano 1% CH₄ (obj.) i inkubowano w temperaturze 25 °C przez 28 dni. Podczas inkubacji prowadzono regularne pomiary stężenia CH₄, CO₂ oraz O₂ w przygotowanych próbach metodą chromatografii gazowej. Doświadczenie podzielono na dwa etapy, pozwalające uwzględnić aspekt czasu w zakresie wpływu biowęglu na wymianę wybranych gazów cieplarnianych (CH₄, CO₂). Wykonano zaplanowane analizy fizykochemiczne badanej gleby tj. pomiar pH, Eh (potencjał oksydoredukcyjny), oznaczenie zawartości węgla organicznego (ang. *soil organic carbon* - SOC), rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) oraz zdolności zatrzymywania wody (WHC). Z wybranych wariantów doświadczenia (obejmujących próbki gleby inkubowanej w warunkach 60% WHC) wyizolowano genomowe DNA, a uzyskane izolaty poddano sekwencjonowaniu następnej generacji (ang. *next generation sequencing* - NGS). Przeprowadzona analiza pozwoliła na scharakteryzowanie społeczności mikroorganizmów zasiedlających badaną glebę oraz lepsze poznanie zmian jakie zachodzą w mikrobiocie glebowej na skutek wprowadzenia biowęglu do gleby.

Przeprowadzony cykl eksperymentów potwierdził zarówno krótko-, jak i długotrwały, wielopoziomowy wpływ biowęglu na środowisko glebowe. Wzbogacenie gleby biowęglem

przyniosło pozytywne efekty w postaci podwyższenia pH i Eh gleby, zwiększenia zawartości SOC i DOC oraz poprawy zdolności zatrzymywania wody w glebie płowej, przy czym poprawę WHC odnotowano dopiero po pięcioletnim bytowaniu biowęgla w glebie. Poprawa właściwości fizykochemicznych gleby (pH, SOC i DOC) korelowała ze wzrostem udziału bakterii metanotroficznych w glebie płowej. Dodatek biowęgla zwiększył również różnorodność zbiorowisk metanotroficznych badanej gleby. Glebę kontrolną zasiedlały metanotrofy należące do jednego rodzaju - *Methylosinus*, podczas gdy po bezpośredniej aplikacji biowęgla zidentyfikowano bakterie metanotroficzne z rodzajów *Methylosinus* i *Methylocystis*. Najwyższa dawka biowęgla (30 Mg ha⁻¹) pozwoliła utrzymać wysoki udział i zróżnicowanie rodzajowe bakterii metanotroficznych, nawet po pięciu latach od jego aplikacji. Co również istotne, udział bakterii metanotroficznych był dodatnio skorelowany z aktywnością metanotroficzną gleby. Podczas gdy dodatek biowęgla w glebie płowej o wilgotności odpowiadającej 60% WHC przyczynił się do wielokrotnego zwiększenia jej aktywności metanotroficznej, wzbogacenie biowęgłem gleby o wyższej wilgotności (100% WHC) doprowadziło do blisko dwukrotnego obniżenia szybkości pochłaniania metanu. Bezpośrednio po aplikacji biowęgla w glebie o wilgotności 60% WHC, szybkość pochłaniania metanu wynosiła od $2,67 \pm 0,49$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ (po zastosowaniu 10 Mg ha⁻¹) do $4,23 \pm 0,76$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ (dla dawki 30 Mg ha⁻¹) i były to wartości sześć- do nawet dziesięciokrotnie wyższe, niż gleby kontrolnej ($0,43 \pm 0,01$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹). Najwyższa dawka biowęgla ze zrębków drzewnych (30 Mg ha⁻¹) utrzymała swoją skuteczność w poprawie aktywności metanotroficznej gleby nawet po pięciu latach od aplikacji biowęgla. Wprowadzenie biowęgla do gleby płowej początkowo zwiększyło emisję CO₂, jednak w dłuższej perspektywie ten negatywny efekt został zniwelowany i to w obydwu wariantach wilgotności gleby.

Przeprowadzone doświadczenie potwierdziło korzystny wpływ biowęgla ze zrębków drzewnych na właściwości fizykochemiczne, zbiorowiska bakterii metanotroficznych oraz aktywność metanotroficzną gleby płowej, a tym samym zasadność wprowadzania biowęgla do gleby w celu ograniczenia emisji gazów cieplarnianych z gleby.

3.3. Osiągnięcie patentowe P.433435

Osiągnięcie patentowe P.433435: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganowski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób otrzymywania biowęgla z biomasy, posiadającego dobrą zdolność pochłaniania metanu, a także sposób usuwania metanu z atmosfery z zastosowaniem tego biowęgla.

Biowęgla są obecnie coraz częściej rozpatrywane jako sorbenty zanieczyszczeń ciekłych i gazowych, jednak dotychczas niewiele doniesień literaturowych potwierdziło ich przydatność w usuwaniu metanu. Szeroko zakrojone badania, rozpatrujące kilkanaście biowęgla zróżnicowanych pod względem materiału wsadowego i warunków pirolizy wykazały, że jedynie trzy biowęgla są zdolne do usuwania metanu z atmosfery. Biowęgiel z łusek orzechów ziemnych i biowęgiel z pędów kukurydzy wykazały podobną szybkość pochłaniania metanu, na poziomie $2,6 \pm 0,6 \text{ ng CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, natomiast biowęgiel wytworzony z materiału BiosourceTM charakteryzował się szybkością usuwania metanu na poziomie $4,1 \pm 0,9 \text{ ng CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Spokas i Reicosky, 2009).

Badania będące podstawą osiągnięcia patentowego rozpatrywały zdolność do usuwania metanu czterech biowęgla, powstałych odpowiednio ze zrębków drzewnych, łusek słonecznika, łądyg malin i łądyg ziemniaków. Biowęgiel z łądyg ziemniaków odznaczał się zdecydowanie najlepszymi właściwościami w tym zakresie, spośród wszystkich badanych materiałów (Kubaczyński i in., 2020). Biowęgiel z łądyg ziemniaka (łącin), uwilgotniony w zakresie od 50 do 70% WHC, inkubowany z 1% CH₄ (obj.) w atmosferze odznaczał się wyższą skutecznością w usuwaniu metanu z atmosfery, niż podobne rozwiązania opisane dotychczas w literaturze, osiągając szybkość pochłaniania metanu na poziomie około $10\ 500 \text{ ng CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Łęciny stanowią odpad w produkcji rolniczej i są często usuwaną z pól po zbiorze ziemniaków. Niniejsze osiągnięcie patentowe ukazuje zasadność i potencjalne korzyści płynące z zagospodarowania tej biomasy jako materiał wsadowy w produkcji biowęgla.

3.4. Badania uzupełniające P.3

Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M. Zastosowanie bogatego w azot biowęglu z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.

Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

3.4.1. Wstęp

Słonecznik (*Helianthus annuus L.*) jest jedną z głównych roślin oleistych. Uprawa słonecznika jest uznawana za przyjazną środowisku. Mimo, iż najlepiej plonuje na glebach żyznych, to z powodzeniem może być również uprawiany na glebach lekkich, ubogich w materię organiczną. Ponadto uprawa słonecznika odznacza się niskim (w porównaniu do innych roślin oleistych) zapotrzebowaniem na składniki odżywcze (np. nawożenie azotowe na poziomie ok. 60 kg N ha⁻¹) oraz środki ochrony roślin. Ponadto słonecznik, podobnie jak rzepak jest jedną z kluczowych roślin miododajnych (Debaeke i in., 2017). Nasiona słonecznika są wykorzystywane głównie do produkcji oleju roślinnego i biodiesla oraz jako pasza (Kaya i in., 2012). Światowa powierzchnia upraw słonecznika wzrosła z 9,6 mln ha w 1975 roku do 27 mln ha w 2018 roku. W tym samym okresie światowy plon nasion słonecznika wzrósł ponad pięciokrotnie i tym samym w 2018 roku globalne zbiory przekroczyły 50 mln Mg. Prognozy wskazują na dalszy wzrost produkcji nasion oleistych (Pilorgé, 2020). Należy również spodziewać się wzrostu upraw słonecznika z uwagi na postępujące zmiany klimatu, prowadzące do pustosynnienia i zmniejszonej zasobności gleb uprawnych w materię organiczną oraz wzrostu kosztów prowadzenia upraw, zwłaszcza nawozów i pestycydów (Brunelle i in., 2015; Pfister i Saha, 2017; World Meteorological Organization, 2021). Wraz ze wzrostem plonu nasion słonecznika pojawiła się kwestia zagospodarowania biomasy odpadowej pochodzącej z tych właśnie upraw. Warto zaznaczyć, że ilość resztek, pozostałych po zbiorze i przetwórstwie nasion słonecznika jest jedną z najwyższych wśród wszystkich upraw. W sezonie 2020/2021 osiągnięto światowy plon nasion słonecznika na poziomie 49,27 mln Mg, przy czym masa łuski słonecznika stanowi około 50% masy nasiona (Shaukat i in., 2021; USDA Foreign Agricultural Service, 2022). Część odpadowych łusek słonecznika jest przetwarzana, a jednym z nielicznych sposobów ich zagospodarowania jest produkcja peletu wykorzystywanego w celach opałowych (Cui i in., 2019). Ze względu na rosnącą

produktywność upraw słonecznika, zagospodarowanie odpadowej biomasy słonecznika stanie się wkrótce dużym wyzwaniem dla gospodarstw rolnych oraz zakładów przetwórczych (López-Valdez i in., 2011).

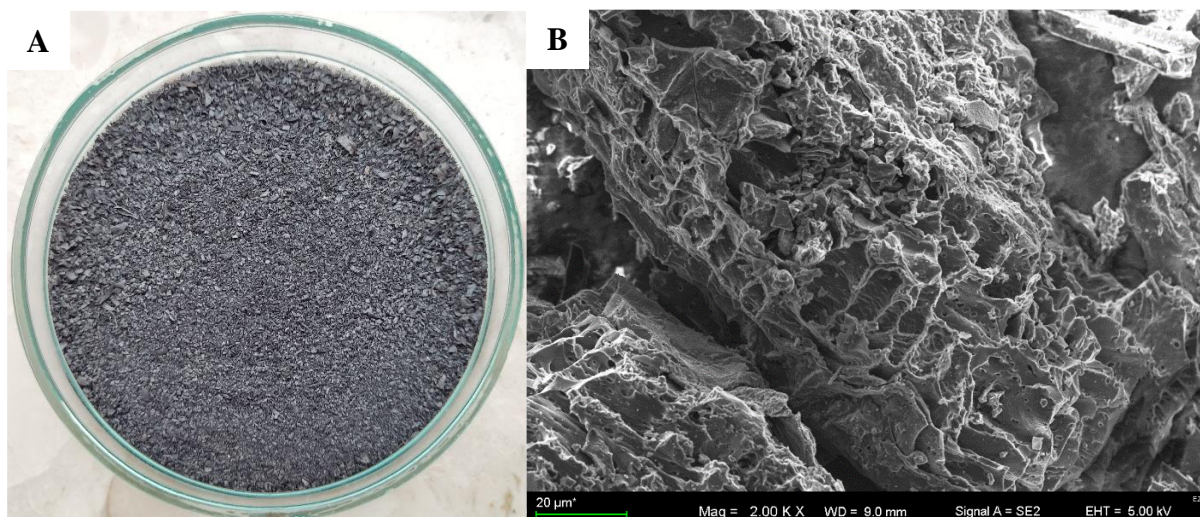
Kolejną kwestią jest rosnące stężenie gazów cieplarnianych w atmosferze, wzmagających efekt cieplarniany. Intensyfikacja rolnictwa, prowadząca do wzrostu zagęszczenia gleby oraz stosowanego nawożenia azotowego przy jednoczesnym ograniczeniu natlenienia i bioróżnorodności gleby przyczynia się tym samym do zwiększonej emisji gazów cieplarnianych, takich jak ditlenek węgla (CO₂), metan (CH₄) i podtlenek azotu (N₂O) (Wang i in., 2020). Aktualne dane wskazują na udział gleb w globalnej emisji CO₂ i CH₄ na poziomach wynoszących odpowiednio 20% i 30% (Wu i in., 2019). W związku z powyższym, poszukiwane są metody, umożliwiające prowadzenie produkcji rolnej na wysokim poziomie, przy jednoczesnym zmniejszeniu negatywnego wpływu rolnictwa na środowisko. Praktyką mogącą mieć pozytywny wpływ zarówno na jakość gleby, jak również na bilans wymiany gazów cieplarnianych pomiędzy glebą i atmosferą, jest wzbogacenie gleb biowęgłem (Palansooriya i in., 2019; Wang i in., 2012). Liczne prace badawcze potwierdzają pozytywny wpływ biowęgla na sekwestrację węgla (C), poprawę właściwości fizykochemicznych gleby (m.in. pH, zdolność zatrzymywania wody, natlenienia) i struktury poprzez tworzenie kompleksów organiczno-mineralnych (Ahmad i in., 2021; Coomes i Miltner, 2017; Lehmann i in., 2011). Biowęgiel znajduje również zastosowanie jako skuteczny sorbent zanieczyszczeń i z tego powodu może być stosowany do poprawy jakości gleb zanieczyszczonych i zagrożonych degradacją (Quan i in., 2020; Veni i in., 2017).

Wykazano również, że dodatek biowęgla wpływa na społeczność mikroorganizmów glebowych, w tym bakterii utleniających metan (Lehmann i in., 2011). Metan jest jednym z głównych gazów cieplarnianych, którego potencjał tworzenia efektu cieplarnianego jest 30 razy silniejszy, niż ditlenku węgla. Pomimo, iż stężenie metanu w atmosferze jest stosunkowo niskie (w listopadzie 2022 roku poziom CH₄ sięgnął 1909 ppb), odpowiada za 17% globalnego ocieplenia. Niepokojący jest także gwałtowny wzrost stężenia metanu notowany od czasów przedindustrialnych (IPCC, 2022; World Meteorological Organization, 2021; Zhang i in., 2021). Istnieją doniesienia literaturowe, potwierdzające pozytywną rolę biowęgla w poprawie bioróżnorodności zbiorowisk metanotroficznych oraz efektywności utleniania CH₄ w glebie (Jeffery i in., 2016; Malyan i in., 2016; Walkiewicz i in., 2020b). Badania pokazują, że dodatek biowęgla może mieć również neutralny lub nawet negatywny wpływ na emisje gazów cieplarnianych z gleby (Ribas i in., 2019; Thomazini i in., 2015). Wobec powyższego, wpływ biowęgla na bakterie metanotroficzne pozostaje niejasny, a mając na uwadze rosnące znaczenie

biowęgla w rolnictwie, jego wpływ na wymianę gazów cieplarnianych z gleby wymaga lepszego poznania (Hui, 2021).

Z uwagi na to, iż wzbogacenie gleb biowęgłem determinuje szereg procesów zachodzących w środowisku glebowym, przy czym kierunek tych procesów nie jest do końca poznany oraz ze względu na dużą trwałość oraz koszty biowęgla, kluczowe jest możliwie jak najbardziej kompleksowe przetestowanie i rozpatrzenie wpływu szerokiego zakresu dawek biowęgla, przed rozpowszechnieniem tego zabiegu w praktyce rolniczej (Lehmann, 2009). Wykazano, że dawka biowęgla rzędu 30 Mg ha⁻¹ umożliwi długoterminową poprawę właściwości gleby, zwiększenie bioróżnorodności mikroflory glebowej oraz ograniczenie emisji gazów cieplarnianych (Ahmad i in., 2021; Kubaczyński i in., 2022). Jednak wysokie dawki biowęgla (za zwyczaj o odczynie alkalicznym) mają potencjał do znacznego podwyższenia pH gleby do poziomu wartości przekraczających optymalne dla większości roślin uprawnych i mikroorganizmów glebowych (w tym bakterii metanotroficznych). Ponadto biowęgiel dodawany do gleby wnosi pulę wolnych rodników, powodujących stres oksydacyjny w mikrobioty glebowej (Liao i in., 2014; Odinga i in., 2020; Xiao i in., 2018). Konkludując, stosowanie wyższych dawek biowęgla może mieć negatywne konsekwencje oraz nie będzie uzasadnione ekonomicznie, gdy nie będzie za sobą niosło wyraźnej, dalszej poprawy parametrów gleby.

Produkcja biowęgla może być jednym ze sposobów racjonalnego zagospodarowania biomasy odpadowej w postaci łusek słonecznika, jednak efekty stosowania biowęgla z tego surowca (Rysunek 5) w glebach uprawnych nie zostały jeszcze szczegółowo opisane. Niewiele jest badań opisujących wpływ biowęgla z łusek słonecznika na środowisko glebowe (Gluba i in., 2021; Klimek-Kopyra i in., 2021; Rafalska-Przysucha i in., 2020). Mimo rosnącego zainteresowania tą kwestią, wpływ biowęgla z łusek słonecznika na strukturę zbiorowisk mikroorganizmów glebowych i jego rola w kształtowaniu bilansu wymiany gazowej pomiędzy glebą, a atmosferą (zwłaszcza CH₄) pozostaje nieznany.



Rysunek 5. Cząstki biowęgla przedstawione na zdjęciu (A) oraz struktura biowęgla zobrazowana za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (B). Powiększenie 2 000x.

W toku wcześniejszych badań wykazano korzystne właściwości biowęgla z łuski słonecznika, takie jak wysoka zawartość N (Kubaczyński i in., 2020). Ma to duże znaczenie w kontekście badanej gleby (*Haplic Luvisol*), która jest zaliczana do gleb ubogich w azot. Jak wynika z analizy użytkowania gruntów i pokrycia powierzchni (LUCAS) (Ballabio i in., 2019), mediana całkowitej zawartości N w europejskich glebach płowych wynosi ok. 1,8 g kg⁻¹. Zawartość N badanej gleby płowej wynosi 0,76 g kg⁻¹ (Siczek i in., 2020), czyli znacznie poniżej średniej. Warto zauważyć, że gleby płowe zajmują drugie miejsce w UE pod względem całkowitego pokrycia (266 017 km²), tym samym stanowiąc pokaźną grupę gleb uprawnych (Tkaczyk i in., 2017; Tóth i in., 2008). Aby utrzymać produkcję rolną na wysokim poziomie, gleby płowe wymagają regularnego nawożenia. Z drugiej strony potwierdzono negatywny wpływ nawożenia mineralnego, na stabilność substancji humusowych w *Haplic Luvisol*. W celu ochrony gleby płowej przed degradacją, zalecane jest stosowanie nawożenia organicznego (Šimanský i in., 2017).

Mając na uwadze rosnącą ilość biomasy odpadowej z łusek słonecznika oraz rolę gleby płowej w produkcji rolnej (Cui i in., 2019), celem niniejszej pracy było określenie wpływu dodatku biowęgla z łusek słonecznika (zastosowanego w szerokim zakresie dawek od 0 do 100 Mg ha⁻¹) na właściwości fizykochemiczne gleby oraz skład i aktywność jej mikrobioty, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii metanotroficznych. Tym samym podjęto ocenę możliwości ograniczenia emisji gazów cieplarnianych przy jednoczesnym przedstawieniu racjonalnej metody zagospodarowania biomasy odpadowej.

3.4.2. Materiały i metody

3.4.2.1. Charakterystyka gleby i biowęgla

Próbki gleby (*Haplic Luvisol*) zostały pobrane z 11 poletek doświadczalnych (51°15'N, 22°35'E) utrzymywanych jako ugór, z których każde miało powierzchnię równą 1,21 m². Na poletkach doświadczalnych zastosowano szeroki zakres dawek biowęgla z łusek słonecznika w ilościach odpowiadających 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 Mg ha⁻¹, natomiast poletko, pozostawione bez dodatku biowęgla stanowiło kontrolę. Doświadczenie polowe założono w kwietniu 2018 roku, prowadzony eksperyment został szczegółowo opisany przez Szewczaka i in. (2021). Glebę do badań pobrano we wrześniu 2018 r. (sześć miesięcy po aplikacji biowęgla do gleby), użyto do tego celu świdra glebowego, pozyskując wierzchnią warstwę gleby (0-15 cm), stanowiącą próbki referencyjne dla każdego poszczególnych poletek.

W oparciu o Klasyfikację Zasobów Glebowych Świata, gleba pobrana do badań została sklasyfikowana jako gleba płowa powstała z lessu (*Haplic Luvisol*) (IUSS Working Group WRB, 2015). Badana gleba charakteryzowała się zawartością węgla organicznego (SOC) rzędu 7,28 g kg⁻¹, natomiast poziom rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) odpowiadał 232,6 mg kg⁻¹. pH gleby (mierzone w H₂O) osiągnęło wartość 5,91 (Tabela 2), zaś udział frakcji piaszkowych, pyłowych i iłowych wyniósł odpowiednio 66%, 23% i 11% (Usovicz i in., 2016). Zawartość azotu (N) w glebie była na poziomie 0,76 g kg⁻¹ (Siczek i in., 2020).

Biowęgiel użyty w doświadczeniu został wyprodukowany przez przedsiębiorstwo New Technology Trade Sp. z o.o.. Powstał w procesie pirolizy, prowadzonej w zakresie temperaturowym rzędu 450-550 °C, zaś materiał wsadowy stanowiły łuski słonecznika. Uzyskany karbonizat charakteryzował się zasadowym odczynem (mierzonym w H₂O), przyjmującym wartość 9,19. Zawartość węgla (C) i azotu (N) całkowitego wyniosła odpowiednio 783 g kg⁻¹ i 9,8 g kg⁻¹, co oznacza, że stosunek C/N kształtował się na poziomie 80. Biowęgiel odznaczał się również stężeniem DOC równym 1065,7 mg kg⁻¹ oraz gęstością nasypową tego materiału na poziomie 350 kg m⁻³ (Kubaczyński i in., 2020; Szewczak i in., 2021).

Zarówno pH gleby, jak i biowęgla oznaczono metodą potencjometryczną za pomocą elektrody szklanej pH, połączonej z przenośnym multimetrem cyfrowym HQ40D (Hach Lange) (Sokołowska i in., 2020; Yoo i in., 2014). Zawartość azotu azotanowego (V) (N-NO₃) również oznaczono metodą potencjometryczną na przesączu glebowym przy użyciu elektrody jonoselektywnej sprzężonej z multimetrem HQ40D (Hach Lange) (Shaw i in., 2013). Gęstość

nasypową gleby i biowęgla oznaczono na podstawie masy próbek mierzonych w ustalonej objętości (10 cm³) i temperaturze (15 °C) (Kubaczyński i in., 2022; Özçimen i Karaosmanoğlu, 2004). Całkowitą zawartość C i N w biowęglu mierzono za pomocą analizatora elementarnego Perkin Elmer CHN 2400. Zasobność gleby w węgiel organiczny (SOC), jak również zawartość rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) w glebie i biowęglu określono na podstawie różnicy stężenia węgla całkowitego (ang. *total carbon* - TC) i węgla nieorganicznego (ang. *inorganic carbon* - IC). W pomiarach zawartości TC i IC badanych próbek posłużono się analizatorem całkowitego węgla organicznego TOC-VCPH (Shimadzu, Japonia) (Mao i in., 2019). Zdolność zatrzymywania wody w glebie (WHC) określono przy analizie wagowej, zmodyfikowanej przez Pramera i Schmidta (1964) i szczegółowo opisanej przez Yoo i in. (2014).

Tabela 2. Charakterystyka gleb pobranych z ugorowanych poletek doświadczalnych, prowadzonych bez dodatku biowęgla (kontrola) oraz z dodatkiem biowęgla z łusek słonecznika zastosowanego w dawkach: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 Mg ha⁻¹ (średnia ± odch. stand., n = 3).

Dawka biowęgla (Mg ha ⁻¹)	SOC (g kg ⁻¹)	DOC (mg kg ⁻¹)	pH
Kontrola	7,28 ± 0,53	232,6 ± 2,68	5,91 ± 0,07
1	9,18 ± 0,20	237,2 ± 1,10	5,81 ± 0,08
5	9,75 ± 0,44	240,4 ± 1,40	6,25 ± 0,06
10	10,66 ± 0,34	235,2 ± 0,24	6,57 ± 0,20
20	11,59 ± 0,24	265,5 ± 1,18	6,15 ± 0,04
30	13,38 ± 0,11	258,2 ± 1,20	6,72 ± 0,08
40	14,98 ± 0,14	258,3 ± 0,85	6,64 ± 0,04
50	16,99 ± 1,16	266,3 ± 1,56	6,86 ± 0,08
60	21,74 ± 0,93	277,4 ± 1,40	6,96 ± 0,12
80	31,35 ± 1,43	307,3 ± 2,28	6,95 ± 0,08
100	33,71 ± 0,79	328,7 ± 2,05	7,35 ± 0,12

3.4.2.2. Opis eksperymentu

Inkubacje gleb wzbogaconych biowęgłem prowadzono w temperaturze 25 °C, przy dwóch poziomach wilgotności: 60% i 100% WHC. Niższa wilgotność (60% WHC) jest uznawana za optymalną pod względem wilgotności i natlenienia dla mikrobioty glebowej (Huang i in., 2019; Skopp i in., 1990), podczas gdy 100% WHC odpowiada pełnemu wysyceniu gleby wodą, które może wystąpić po np. ulewnym deszczu i skutkuje ograniczeniem dyfuzji gazów w glebie (Walkiewicz i in., 2020a; Yu i in., 2013).

Przygotowano próbki gleby (w trzech powtórzeniach na wariant, każda o masie 20 g), które następnie umieszczono w butelkach szklanych o pojemności 120 cm³. Wilgotność gleb ustalono na poziomie 60% i 100% WHC, a następnie podano próbki 14-dniowej preinkubacji w temperaturze 25 °C. Po tym czasie butelki z glebą przewietrzono, zamknięto oraz dodano metan w ilości odpowiadającej 1% objętości naczynia inkubacyjnego. Systematyczne pomiary stężeń CH₄ i CO₂ w powietrzu zgromadzonym nad próbkami gleby, prowadzone przy użyciu chromatografu gazowego pozwoliły, na przedstawienie dynamik zmiany stężeń obserwowanych gazów w czasie oraz na wyznaczenie szybkości utleniania metanu i emisji ditlenku węgla (Chiu i Huang, 2020; Walkiewicz i in., 2020a).

Po zakończeniu inkubacji butelki z próbkami gleby otworzono, a następnie zmierzono pH gleb oraz stężenie N-NO₃. Za pomocą zestawu PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) przeprowadzono (w dwóch powtórzeniach) izolację genomowego DNA z próbek glebowych o wilgotności 60% WHC. Identyfikację mikroorganizmów zasiedlających glebę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami EMP (Earth Microbiome Project), zawartymi w 16S Illumina Amplicon Protocol (Thompson i in., 2017). Amplikony regionu V4 16S rRNA zsekwencjonowano (MiSeq Illumina, Genomed S. A., Polska) z wykorzystaniem pary starterów 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) i 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT). Uzyskane sekwencje były następnie przetwarzane z wykorzystaniem pakietu DADA2 (1.14) (Callahan i in., 2016) w języku programowania R (3.6.0) (R Core Team, 2016). Przynależność taksonomiczna została opracowana na podstawie najnowszej wersji zmodyfikowanej bazy danych Silva SSU v r138 (http://www2.decipher.codes/Classification/TrainingSets/SILVA_SSU_r138_2019.RData) przy użyciu IDTAXA (Murali i in., 2018). Szczegóły wykonanej analizy bioinformatycznej zostały przedstawione w pracy Kubaczyńskiego i in. (2022). W sumie w próbkach ze wszystkich wariantów zidentyfikowano 638 unikalnych taksonów (rozpoznane na poziomie

rodzaju oraz niesklasyfikowane klastry). Wskaźniki bioróżnorodności obliczono za pomocą programu PAST (Hammer i in., 2001).

Sekwencje amplikonów genu 16S rRNA, uzyskane w tym eksperymencie zostały udostępnione jako BioProject PRJNA852954 w bazie danych NCBI Sequence Read Archive (SRA).

3.4.2.3. Obliczenia i analiza statystyczna

Obliczenia wykonane na potrzeby wyznaczenia WHC, szybkości utleniania CH₄ i emisji CO₂ zostały szczegółowo przedstawione w pracy Kubaczyńskiego i in. (2022).

W celu określenia istotności statystycznej różnic pomiędzy szybkościami utleniania CH₄ i emisji CO₂ (rozpatrywanymi oddzielnie) przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z zastosowaniem testu Tukeya HSD (test post-hoc). Poszczególne warianty, różniące się dawkowaniem biowęgla przanalizowano osobno z uwzględnieniem dwóch stanów uwilgotnienia gleby (60% i 100% WHC). Wieloczynnikową analizę wariancji (MANOVA) wykorzystano do określenia wpływu dwóch czynników: (A) dawki biowęgla i (B) wilgotności gleby na szybkości utleniania CH₄ i emisji CO₂ w *Haplic Luvisol*. Do oceny zależności pomiędzy intensywnością wymiany gazów cieplarnianych (CH₄, CO₂) w układzie gleba-atmosfera, różnorodnością zbiorowisk metanotroficznych oraz właściwościami fizykochemicznymi gleby zastosowano współczynnik korelacji rang Spearmana. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 13 (TIBCO Software).

3.4.3. Wyniki

3.4.3.1. Właściwości fizykochemiczne gleby

W glebie o wilgotności 60% WHC, pH ($5,04 \pm 0,08$) zostało istotnie podwyższone przez niemal wszystkie dawki biowęgla z wyjątkiem najniższej (1 Mg ha^{-1}), a wzrost wartości pH gleby wyniósł od 0,24 do 1,71 (Tabela 3). Najwyższa dawka biowęgla (100 Mg ha^{-1}) poprawiła odczyn gleby, który z kwaśnego przyjął wartości odczynu obojętnego ($6,75 \pm 0,03$). Przy glebie uwilgotnionej na poziomie 100% WHC, wartości pH były na ogół wyższe niż w glebie inkubowanej w warunkach 60% WHC, a tendencja wskazująca na istotne podwyższenie pH została zaobserwowana również w glebie o wyższej wilgotności. Podobnie jak w warunkach odpowiadających 60% WHC, jedynie najniższa dawka biowęgla nie wywołała istotnego wzrostu pH gleby (Tabela 3).

Biowęgiel zastosowany w dawkach $\geq 10 \text{ Mg ha}^{-1}$ spowodował istotny wzrost zawartości azotu azotanowego (V) w glebie inkubowanej w warunkach 60% WHC. Stężenie azotu azotanowego (V) w glebie kontrolnej wynosiło $94,00 \pm 0,89 \text{ mg N-NO}_3 \text{ kg}^{-1}$, natomiast po aplikacji biowęglu jego zawartość wzrosła od $115,00 \pm 3,61 \text{ mg N-NO}_3 \text{ kg}^{-1}$ (10 Mg ha^{-1}) do nawet $194,00 \pm 2,65 \text{ mg N-NO}_3 \text{ kg}^{-1}$ (100 Mg ha^{-1}) (Tabela 3).

Biowęgiel z łusek słonecznika odznaczał się niemal sześciokrotnie wyższą zdolnością zatrzymywania wody (WHC) na poziomie $2,58 \pm 0,06 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$, niż gleba kontrolna ($0,444 \pm 0,009 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$). Niemniej jednak wzbogacenie gleby biowęgłem w dawkach od 1 do 50 Mg ha^{-1} nie przyniosło istotnej poprawy WHC gleby. Dopiero trzy najwyższe dawki biowęglu ($60, 80$ i 100 Mg ha^{-1}) istotnie zwiększyły WHC gleby, a skuteczna poprawa WHC utrzymywała się w zakresie od 11,04% do 12,39% w odniesieniu do gleby kontrolnej (Tabela 3).

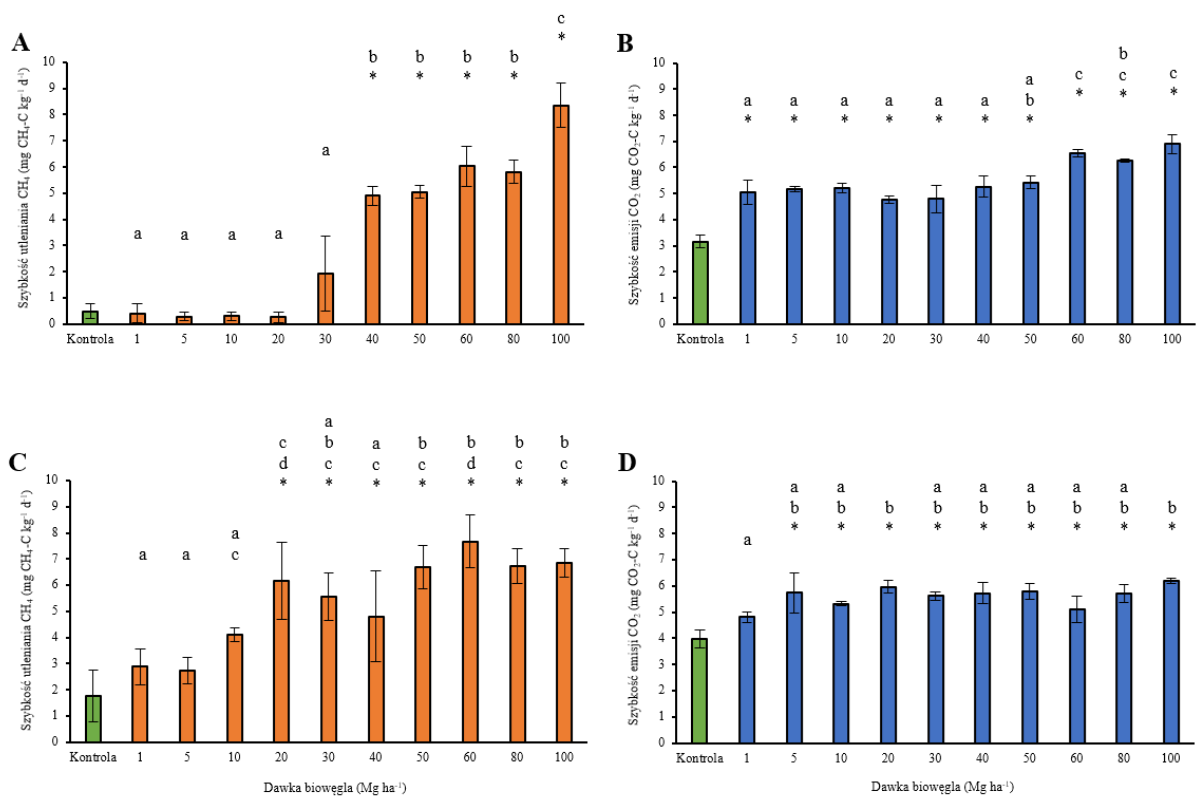
Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne (WHC, pH i N-NO₃) gleb (średnia ± odch. stand., n = 3). Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami zróżnicowanymi pod względem dawkowania biowęgla, natomiast gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie w odniesieniu do kontroli (Test Tukeya, p < 0,05).

Dawka biowęgla (Mg ha ⁻¹)	pH 60% WHC	N-NO ₃ (mg kg ⁻¹) 60% WHC	pH 100% WHC	WHC (g H ₂ O g ⁻¹)
Kontrola	5,04 ± 0,08	94,00 ± 0,89	5,79 ± 0,09	0,444 ± 0,009
1	5,13 ± 0,09 (ab)	89,53 ± 0,59 (a)	5,99 ± 0,11 (abd)	0,448 ± 0,009 (a)
5	5,28 ± 0,09 * (abd)	97,07 ± 0,61 (b)	6,34 ± 0,08 * (abcdefg)	0,436 ± 0,006 (ab)
10	5,52 ± 0,03 * (cdef)	115,00 ± 3,61 * (c)	6,49 ± 0,05 * (bcdefghi)	0,445 ± 0,011 (a)
20	5,38 ± 0,02 * (bcde)	115,00 ± 2,65 * (c)	6,29 ± 0,03 * (abcdefg)	0,462 ± 0,014 (a)
30	5,58 ± 0,01 * (cdef)	125,00 ± 1,00 * (d)	6,42 ± 0,05 * (bcdefgh)	0,467 ± 0,01 (ac)
40	5,61 ± 0,18 * (cef)	132,33 ± 1,15 * (e)	6,5 ± 0,05 * (bcdefghi)	0,461 ± 0,007 (a)
50	5,93 ± 0,02 * (g)	154,00 ± 2,65 * (f)	6,49 ± 0,12 * (bcdefghi)	0,464 ± 0,003 (a)
60	6,19 ± 0,07 * (h)	157,33 ± 3,06 * (f)	6,83 ± 0,05 * (cefg hij)	0,499 ± 0,015 * (d)
80	6,52 ± 0,04 * (i)	160,00 ± 1,73 * (f)	6,89 ± 0,06 * (cfghij)	0,495 ± 0,006 * (cd)
100	6,75 ± 0,03 * (j)	194,00 ± 2,65 * (g)	7,21 ± 0,42 * (hij)	0,493 0,011 * (cd)

3.4.3.2. Wymiana gazowa (CH₄, CO₂, O₂)

3.4.3.2.1. Utlenianie CH₄ i emisja CO₂ z gleby o wilgotności odpowiadającej 60% WHC

Pierwsze efekty wzbogacenia gleb biowęgłem z łusek słonecznika były widoczne (choć jeszcze nieistotne statystycznie) po aplikacji dawki równej 30 Mg ha⁻¹. Szybkość utleniania CH₄ dla gleby w tym wariacie wyniosła 1,92 ± 1,42 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹, czyli ok. czterokrotnie więcej, niż w glebie kontrolnej (0,48 ± 0,28 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹). Zastosowanie biowęgla w dawkach wyższych, niż 30 Mg ha⁻¹ przyniosło istotną poprawę szybkości utleniania metanu (Rysunek 6A). Dawki biowęgla rzędu 40-80 Mg ha⁻¹ wywołały co najmniej dziesięciokrotny, a nawet trzynastokrotny wzrost szybkości utleniania metanu w porównaniu z glebą kontrolną, przyjmując wartości wahające się w przedziale od 4,89 ± 0,37 do 6,03 ± 0,77 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹. Najwyższa dawka biowęgla (100 Mg ha⁻¹) wywołała zdecydowanie najsilniejszy wpływ na utlenianie metanu w *Haplic Luvisol*. Szybkość utleniania metanu w glebie o najwyższej zawartości biowęgla była blisko siedemnastokrotnie wyższa (8,36 ± 0,84 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹) w porównaniu z glebą bez biowęgla (kontrolną) (Rysunek 6A).



Rysunek 6. Szybkości utleniania CH₄ (A, C) i emisji CO₂ (B, D) w glebie kontrolnej (bez biowęgla) i glebach użyźnionych biowęgłem w dawkach: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 Mg ha⁻¹. Inkubacje prowadzono w temperaturze 25 °C, z 1% CH₄ (obj.), w dwóch wariantach wilgotności: 60% i 100% WHC (średnia ± odch. stand., n = 3). Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy wariantami o różnym dawkowaniu biowęgla. Gwiazdki oznaczają istotne różnice pomiędzy danym wariantem, a odpowiednią kontrolą (test Tukeya, p < 0,05).

Szybkości emisji CO₂ w glebach o wilgotności odpowiadającej 60% WHC były istotnie większe po zastosowaniu nawet najmniejszej dawki biowęgla, niż szybkość emisji CO₂ reprezentująca glebę kontrolną ($3,16 \pm 0,25$ mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹) (Rysunek 6B). Dawki biowęgla w przedziale od 1 do 50 Mg ha⁻¹ wykazywały podobny poziom oddziaływania na szybkości emisji CO₂ z *Haplic Luvisol*, których wartości wahały się w granicach od $4,77 \pm 0,14$ do $5,43 \pm 0,23$ mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹. Trzy najwyższe dawki biowęgla (60, 80 i 100 Mg ha⁻¹) wywołały najwyższy wzrost emisji CO₂ z gleby, których wartości mieściły się w przedziale od $6,26 \pm 0,07$ do $6,9 \pm 0,36$ mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹. Niemniej jednak, wprowadzenie biowęgla do gleby skutkowało co najwyżej dwukrotnym zwiększeniem szybkości emisji CO₂ (Rysunek 6B).

3.4.3.2.2. Zmiany w wymianie gazowej gleby o wilgotności odpowiadającej 100% WHC

Utlenianie metanu przebiegało na ogół szybciej w warunkach wyższej wilgotności gleby (100% WHC) (Rysunek 6C), niż w glebie o wilgotności odpowiadającej 60% WHC (Rysunek 6A). Różnice pomiędzy wariantami o różnej wilgotności były wyraźnie widoczne, zwłaszcza w glebie kontrolnej oraz po zastosowaniu mniejszych dawek biowęgla do 30 Mg ha⁻¹ (Rysunki 6A i 1C). W warunkach 100% WHC, dawki biowęgla rzędu 20 Mg ha⁻¹ i większe spowodowały istotny wzrost aktywności metanotroficznej *Haplic Luvisol*, wyrażony poprzez zwiększenie szybkości utleniania metanu (przyjmując wartości $\geq 6,17 \pm 1,46$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹). Wzbogacenie gleby biowęgłem w dawkach: 50, 60, 80 i 100 Mg ha⁻¹ spowodowało poprawę szybkości utleniania metanu z $6,7 \pm 0,82$ do $7,68 \pm 0,99$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹, a uzyskane wartości były ok. czterokrotnie wyższe w porównaniu z glebą kontrolną ($1,77 \pm 0,99$ mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹) (Rysunek 6C).

Gleby wzbogacone biowęgłem, inkubowane w dwóch warunkach wilgotności (60% i 100% WHC) charakteryzowały się zbliżonymi szybkościami emisji CO₂, jednak wartości rejestrowane w wariantach glebowych o większym nasyceniu wodą wykazywały mniejsze zróżnicowanie, wywołane szerokim zakresem dawek biowęgla (Rysunki 6B i 6D). W glebie o wilgotności odpowiadającej 100% WHC dodatek biowęgla w dawkach wyższych niż 1 Mg ha⁻¹ spowodował istotny wzrost szybkości emisji CO₂ z poziomu $3,99 \pm 0,34$ mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ dla gleby kontrolnej do maksymalnie $6,2 \pm 0,1$ mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ po zastosowaniu biowęgla w ilości 100 Mg ha⁻¹. Podsumowując, w glebie wzbogaconej biowęgłem szybkości emisji CO₂ były od 20 do 60% wyższe, niż w glebie kontrolnej (Rysunek 6D).

3.4.3.3. Struktura zbiorowisk mikrobiologicznych

Badana gleba (*Haplic Luvisol*) charakteryzowała się dużą bioróżnorodnością, o czym świadczyły wysokie wartości wskaźników różnorodności alfa. Wszystkie rozpatrywane dawki biowęgla wyraźnie zwiększyły różnorodność mikrobiologiczną badanej gleby. Ponadto, dodatek trzech najwyższych dawek biowęgla (60, 80 i 100 Mg ha⁻¹) w największym stopniu przyczyniły się do poprawy bioróżnorodności *Haplic Luvisol* (Tabela 4).

Sekwencje reprezentujące najliczniejsze taksony (> 5% udziału w zbiorowiskach mikrobiologicznych) stanowiły do 30% wszystkich odczytów. Poprawę bioróżnorodności, spowodowaną dodatkiem biowęgla widać m.in. w liczbie zidentyfikowanych mikroorganizmów. Glebę kontrolną reprezentowało 254 taksony, natomiast glebę wzbogaconą

biowęgłem w dawce 100 Mg ha⁻¹ aż 337, przy czym największe bogactwo taksonomiczne *Haplic Luvisol* (341 taksonów) występowało po aplikacji biowęgla rzędu 60 Mg ha⁻¹. Dodatek biowęgla spowodował również wzrost wskaźnika Shannona (H). W glebie bez biowęgla przyjmował on wartość 4,026, podczas gdy po wzbogaceniu gleby biowęgłem w dawce 80 Mg ha⁻¹ 4,485. Nie bez znaczenia jest również fakt, iż znaczny wzrost wartości wskaźnika Shannona (H) (z 4,026 do 4,417) nastąpił po zastosowaniu nawet niewielkiej dawki biowęgla, wynoszącej 10 Mg ha⁻¹. Wartości odwrotnego wskaźnika Simpsona wahały się od 0,969 w glebie kontrolnej do 0,980 w dawkach biowęgla rzędu 40 i 50 Mg ha⁻¹.

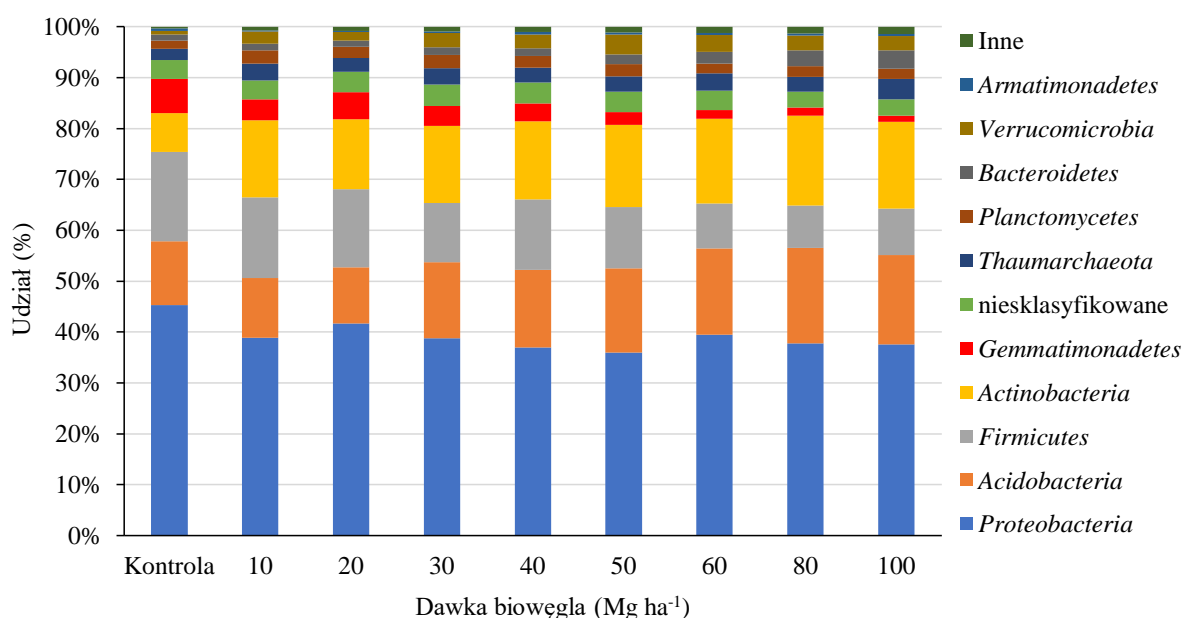
Tabela 4. Wskaźniki bioróżnorodności wyznaczone dla gleby wzbogaconej biowęgłem z łusek słonecznika.

Dawki biowęgla (Mg ha ⁻¹)	Wskaźniki bioróżnorodności					
	Liczba taksonów	Dominacja (D)	Odwrotny Simpsona	Shannona (H)	Równo- mierność	Fishera
Kontrola	254	0,031	0,969	4,026	0,221	18,72
10	308	0,021	0,979	4,417	0,269	22,93
20	280	0,022	0,978	4,365	0,281	20,8
30	284	0,021	0,979	4,418	0,292	20,97
40	305	0,02	0,98	4,454	0,282	22,59
50	298	0,02	0,98	4,468	0,293	22,02
60	341	0,024	0,976	4,413	0,242	25,43
80	334	0,021	0,979	4,485	0,266	24,91
100	337	0,023	0,977	4,461	0,257	25,23

W badanych próbkach gleby zidentyfikowano bakterie i archeony, należące łącznie do 26 typów. Zbiorowiska mikroorganizmów w glebie bez biowęgla (kontrolnej) i wzbogaconej biowęgłem zostały zdominowane przez *Proteobacteria*, których udział wahał się od 35,94 do 45,35%, *Acidobacteria* (od 11,06 do 18,81%), *Actinobacteria* (od 7,58 do 17,65%), *Firmicutes* (od 8,33 do 17,53%), *Gemmatimonadetes* (od 1,14 do 6,8%), *Thaumarchaeota* (od 2,19 do 4,01%), *Bacteroidetes* (od 1,19 do 3,57%), *Verrucomicrobia* (od 0,67% do 3,92%), *Planctomycetes* (od 1,63 do 2,6%), *Armatimonadetes* (od 0,18 do 0,5%). Mikroorganizmy niesklasyfikowane na poziomie typu stanowiły od 3,13 do 4,12% społeczności mikroorganizmów glebowych. Udział pozostałych typów nie przekraczał 1,4% (Rysunek 7).

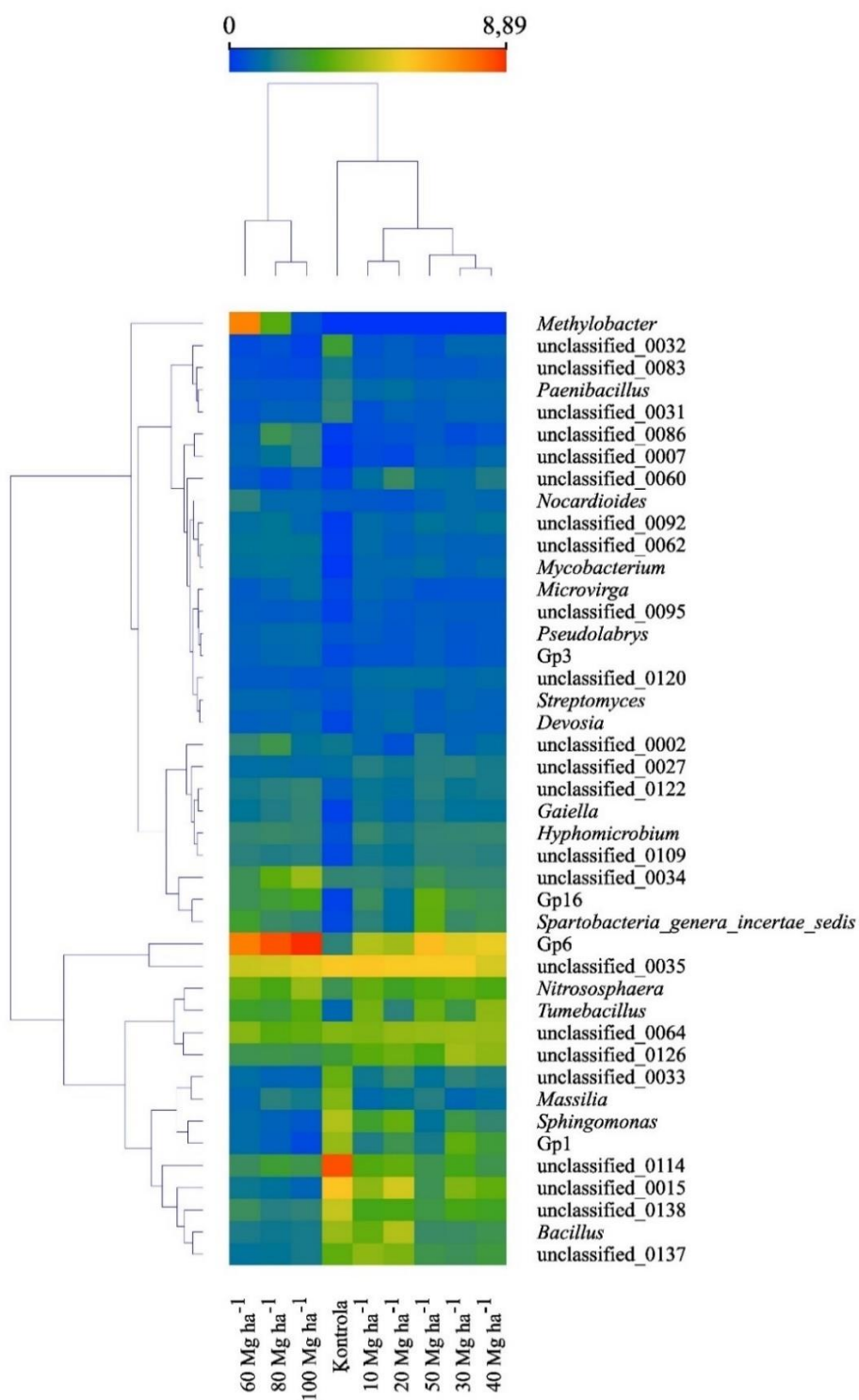
Analiza zbiorowisk mikroorganizmów występujących w glebie wzbogaconej różnymi dawkami biowęgla wskazuje na niewielki wpływ suplementacji na udział mikroorganizmów

reprezentujących najliczniejsze typy. Jedną z istotniejszych zmian w składzie mikrobioty glebowej, był niewielki wzrost udziału *Acidobacteria* w glebie wzbogaconej wyższymi dawkami biowęglu, z 12,52% w glebie kontrolnej do 14,91% przy dawce biowęglu wynoszącej 30 Mg ha⁻¹, a nawet 18,81% po aplikacji biowęglu w dawce 80 Mg ha⁻¹. Podobną tendencję zaobserwowano rozpatrując udział *Actinobacteria*, który również wzrastał wraz z dawką biowęglu, osiągając wartość 17,65% przy dawce 80 Mg ha⁻¹. Jednocześnie zmniejszył się udział mikroorganizmów reprezentujących typ *Firmicutes* z 15,84% po aplikacji biowęglu w dawce 10 Mg ha⁻¹ do 8,33% w glebie wzbogaconej biowęglem na poziomie 80 Mg ha⁻¹ oraz *Gemmatimonadetes* z 5,25% po użyciu dawki 20 Mg ha⁻¹ do 1,14% po zastosowaniu biowęglu w ilości 100 Mg ha⁻¹.



Rysunek 7. Zróżnicowanie zbiorowisk mikroorganizmów, przedstawione poprzez względną liczebność typów mikroorganizmów w wariantach po aplikacji szerokiego zakresu dawek biowęglu z łusek słonecznika w *Haplic Luvisol* (60% WHC).

Rozpatrując strukturę zbiorowisk mikroorganizmów glebowych na poziomie rodzaju wykazano, iż wzbogacenie gleby biowęglem zmniejszyło liczebność bakterii z rodzaju *Massilia* oraz zwiększyło udział przedstawicieli należących do *Nitrososphaera* (Rysunek 8). Ponadto najwyższe dawki biowęglu (60, 80 i 100 Mg ha⁻¹) ograniczyły liczebność bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Sphingomonas*. Potwierdzono również pozytywny wpływ dodatku biowęglu na udział bakterii metanotroficznych, w szczególności przedstawicieli z rodzaju *Methylobacter* (Rysunek 8).

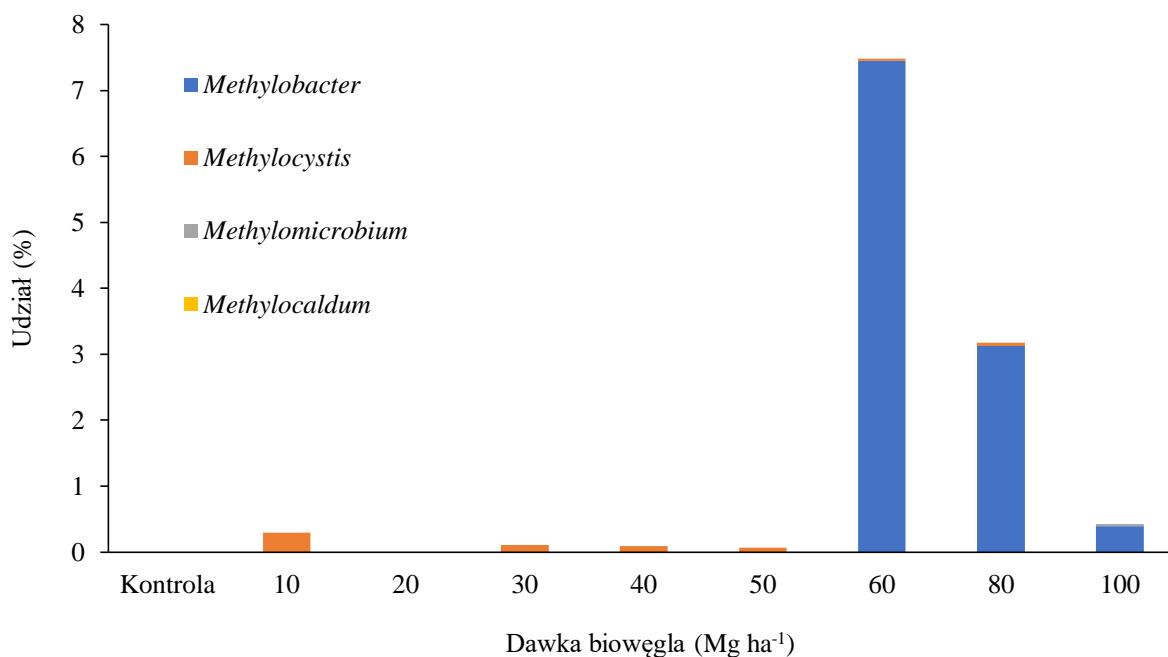


Rysunek 8. Hierarchicznie zgrupowana mapa cieplna najliczniej reprezentowanych (sumarycznie powyżej 5%) bakterii i archeonów, na poziomie rodzaju w glebie bez biowęglu (kontrola) i glebie użyźnionej biowęglem w dawkach: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 Mg ha⁻¹, inkubowanych w wilgotności odpowiadającej 60% WHC. Analiza skupień struktury społeczności mikroorganizmów została przeprowadzona w oparciu o odległości euklidesowe.

3.4.3.3.1. Wpływ biowęgla na bakterie metanotroficzne

Dodatek biowęgla z łusek słonecznika istotnie wpłynął na różnorodność i udział metanotrofów w zbiorowisku mikrobiologicznym *Haplic Luvisol* (Rysunek 9). Bakterie metanotroficzne były głównie reprezentowane przez przedstawicieli rodzajów: *Methylobacter*, *Methylocystis*, *Methylomicrobium* i *Methylocaldum*. Dominowały bakterie z rodzaju *Methylobacter*, których udział w zbiorowisku był kilkukrotnie większy, niż przedstawicieli pozostałych rodzajów bakterii metanotroficznych. Ponadto udział bakterii należących do rodzaju *Methylobacter* był ściśle związany z zastosowaną dawką biowęgla, ponieważ ich obecność potwierdzono jedynie w glebie wzbogaconej trzema najwyższymi dawkami (60, 80 i 100 Mg ha⁻¹). Udział *Methylobacter* osiągnęła maksimum (7,45%), po zastosowaniu biowęgla w dawce 60 Mg ha⁻¹, jednak co ciekawe, w glebach użyźnionych dwiema najwyższymi dawkami biowęgla (80 i 100 Mg ha⁻¹) odnotowano spadek udziału *Methylobacter* odpowiednio o 3,13% i 0,39% (Rysunki 8 i 9).

Bakterie z rodzaju *Methylocystis* były zdecydowanie słabiej reprezentowane (ich udział nie przekraczał 0,29%), jednak obecne w niemal każdym spośród testowanych wariantów suplementacji gleby. Metanotrofy należące do tego rodzaju reagowały na dodatek biowęgla w odmienny sposób, niż *Methylobacter* tj. największą ich obfitość stwierdzono w glebie z dawką biowęgla na poziomie 10 Mg ha⁻¹ i wraz ze wzrostem zawartości biowęgla udział metanotrofów z tego rodzaju systematycznie spadał, osiągając jedynie 0,03% w glebie wzbogaconej biowęgłem o 60 Mg ha⁻¹. Udział bakterii należących do rodzaju *Methylomicrobium* był dość niski (nie przekraczał 0,04%), a ponadto ich obecność potwierdzono jedynie w próbkach gleby wzbogaconej biowęgłem w dawkach 60 i 100 Mg ha⁻¹. Ostatni i najmniej liczny (jego udział oszacowano na poniżej 0,002%) rodzaj bakterii metanotroficznych to *Methylocaldum*. Przedstawicieli tego rodzaju zidentyfikowano jedynie w glebie po aplikacji biowęgla w dawce 60 Mg ha⁻¹. Warto zaznaczyć, że gleba wzbogacona biowęgłem w dawce 60 Mg ha⁻¹ była jedynym wariantem, w którym potwierdzono obecność przedstawicieli wszystkich wymienionych powyżej rodzajów bakterii metanotroficznych.



Rysunek 9. Porównanie składu zbiorowisk bakterii metanotroficznych (na poziomie rodzaju) w glebie kontrolnej oraz wzbogaconej biowęgłem z łusek słonecznika.

3.4.4. Dyskusja

3.4.4.1. Wpływ dodatku biowęgla z łusek słonecznika na właściwości fizykochemiczne gleby

Jednymi z najlepiej udokumentowanych dotychczas korzyści, wynikających ze wzbogacenia gleb biowęgłem są zmiany właściwości fizykochemicznych gleb, prowadzące do podwyższenia jakości gleby. Takie efekty zaobserwowano również w *Haplic Luvisol*, wzbogaconej biowęgłem z łusek słonecznika (Tabela 2). Istotne zwiększenie zawartości węgla organicznego w glebie (SOC) nastąpiło po zastosowaniu każdej spośród badanych dawek biowęgla. Ponadto wzbogacenie *Haplic Luvisol* trzema najwyższymi dawkami biowęgla poskutkowało nawet pięciokrotnie wyższą zawartością SOC w porównaniu z glebą kontrolną. W eksperymencie prowadzonym z udziałem biowęgla ze zrębków drzewnych, wzbogacenie gleby płowej dawką karbonizatu rzędu 10 Mg ha⁻¹ doprowadziło do podwyższenia zawartości całkowitego węgla organicznego o około 17% (Kubaczyński i in., 2022). Analogiczna dawka biowęgla z łusek słonecznika zwiększyła SOC gleby aż o 46%. W związku z powyższym, biowęgla z łusek słonecznika wykazywał wysoką skuteczność w poprawie zawartości SOC.

Zawartość rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) również wzrosła po wzbogaceniu gleby biowęgłem z łusek słonecznika. Badana gleba charakteryzowała się

zawartością DOC równą 232,6 mg kg⁻¹. Biowęgiel w dawkach ≥ 20 Mg ha⁻¹ zwiększył zasobność gleby w DOC do poziomów powyżej 250 mg kg⁻¹, co odpowiada zwiększeniu puli rozpuszczonego węgla organicznego o co najmniej 11%, a po zastosowaniu najwyższej dawki biowęgla nawet o 41,4% (Tabela 2). Warto przy tym zauważyć, iż badana gleba została wzbogacona biowęglem zaledwie pół roku przed pobraniem próbek i przeprowadzeniem omawianego doświadczenia. Starzenie biowęgla w warunkach naturalnych, spowodowane jego ekspozycją na substancje zawarte w glebie (m.in. kwasy humusowe, enzymy), jak również czynniki atmosferyczne (naturalne cykle nawilżania i suszenia oraz zamarzania i rozmrażania gleby) oraz kolonizację powierzchni biowęgla przez mikroorganizmy glebowe (Albalasmeh i Ghazzehei, 2013; Ameer i in., 2018; Li i in., 2019). Postępująca degradacja biowęgla może skutkować wzrostem zawartości DOC w glebie (Mukherjee i in., 2014). Dane literaturowe potwierdzają poprawę zawartości oraz długoterminową stabilizację poziomu DOC w glebie z biowęglem (Liu i in., 2016; Smebye i in., 2016; X. Yang i in., 2017). Rozpuszczony węgiel organiczny jest źródłem łatwo przyswajalnych form C, użytecznych dla roślin i mikrobioty glebowej (Hayes i in., 2019; L. Wang i in., 2020). W glebach intensywnie użytkowanych rolniczo, a taką na kontynencie europejskim jest bardzo często gleba płowa, dodatek biowęgla może być sposobem ochrony gleby przed degradacją (Hui, 2021). Użyty w eksperymencie polowym biowęgiel z łusek słonecznika charakteryzował się wysoką zawartością DOC wynoszącą 1065,7 mg kg⁻¹. Silna korelacja między wartościami SOC i DOC w glebie potwierdziła zależność zawartości DOC od zasobności gleby w SOC, która w przedstawionym eksperymencie została poprawiona przez dodatek biowęgla. Ponadto analiza korelacji rang Spearmana wykazała silną korelację pomiędzy zawartością SOC i DOC oraz wskaźnikiem emisji CO₂ (Tabela 5). Poprawa dostępności C, będącego jednym z pierwiastków biogennych, zwiększyła respirację gleby, będącą jednym z głównych wskaźników aktywności mikrobiologicznej i żyzności gleby (Klimek-Kopyra i in., 2021; Ouyang i in., 2014). Wobec powyższego można stwierdzić, iż dodatek biowęgla z łusek słonecznika do *Haplic Luvisol* jest zabiegiem poprawiającym zasobność gleby w węgiel, a co za tym idzie przeciwdziałającym degradacji gleby, zwiększającym aktywność mikrobiologiczną oraz bioróżnorodność ekosystemów.

Kwestia wpływu biowęgla na zasobność gleby w azot jest obecnie żywo rozwijanym zagadnieniem badawczym. Doniesienia literaturowe potwierdzają rolę biowęgla jako użytecznego źródła N. Jednym z możliwych efektów, odpowiedzialnych za wzbogacenia gleby w N jest powolne uwalnianie jonów azotanowych (NO₃⁻) na skutek starzenia się biowęgla w glebie (Hagemann i in., 2017). U podstaw kolejnego mechanizmu, zwiększającego zasobność

gleby w azotany również leży degradacja biowęgla. Wraz ze stopniowym utlenianiem biowęgla wzrasta ilość grup funkcyjnych, zlokalizowanych na jego powierzchni oraz mostków kationowych odpowiedzialnych w dużej mierze za sorpcję NO_3^- . Azotany ulegają następnie powolnej desorpcji, zmniejszając tym samym utratę azotu z gleby (Sanford i in., 2019). Biowęgiel z łusek słonecznika, zastosowany w dawkach 10 Mg ha^{-1} i wyższych zwiększył dostępną pulę N- NO_3 w *Haplic Luvisol* w zakresie od 22,34% (10 Mg ha^{-1}) do 106,38% (100 Mg ha^{-1}) (Tabela 3). Ponadto w przedstawianych badaniach zawartość N- NO_3 była najsilniej skorelowana z SOC (Tabela 5). Uzyskane rezultaty znajdują potwierdzenie w pracach innych badaczy. Ullah i in. (2020) potwierdzili zwiększoną dostępność N- NO_3 , spowodowaną wprowadzeniem biowęgla do gleby nawożonej mineralnie, natomiast Alam i in. (2019) wykazali silną, dodatnią korelację pomiędzy SOC, a zawartością i dostępnością azotu w glebie.

Tabela 5. Współczynniki korelacji rang Spearmana wyznaczone dla parametrów badanej gleby takich jak: utlenianie CH_4 , emisja CO_2 , właściwości fizykochemiczne gleby (pH, DOC, SOC, N- NO_3) oraz udział bakterii metanotroficznych. Analizę przeprowadzono dla danych uzyskanych z wariantów glebowych bez biowęgla (kontrola) i z biowęgłem w dawkach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 Mg ha^{-1} , inkubowanych w warunkach wilgotności odpowiadającym 60% WHC. Współczynniki istotne statystycznie dla wartości $> 0,4$ oznaczono kolorem czerwonym ($p < 0,05$).

	Utlenianie CH_4	Emisja CO_2	pH	DOC	SOC	N- NO_3	Udział metanotrofów
Utlenianie CH_4	1,00						
Emisja CO_2	0,84	1,00					
pH	0,90	0,87	1,00				
DOC	0,79	0,78	0,86	1,00			
SOC	0,92	0,87	0,95	0,91	1,00		
N- NO_3	0,92	0,89	0,95	0,87	0,98	1,00	
Udział metanotrofów	0,68	0,80	0,77	0,56	0,68	0,70	1,00

Ze względu na powszechność nadmiernego zakwaszenia gleb, kolejną, dobrze udokumentowaną korzyścią stosowania biowęgla jest wzrost odczynu (pH) gleb (Gul i in., 2015; Hui, 2021; Shah i in., 2017; Tomczyk i in., 2020). Przeważająca część biowęgla scharakteryzowanych w literaturze ma odczyn obojętny lub zasadowy, jest to spowodowane dużą zasobnością popiołu w tlenki i wodorotlenki metali alkalicznych (Gul i in., 2015; Kubaczyński i in., 2020; Mierzwa-Hersztek i in., 2018). Biowęgiel z łusek słonecznika

charakteryzuje się wysoką (kilkunastoprocentową) zawartością popiołu, co może w dużej mierze odpowiadać za jego zasadowy odczyn (Mikula i in., 2020). Ponadto Vassilev i in. (2014) wykazali, że popiół biowęgla z łusek słonecznika charakteryzował się wysoką zawartością K_2O (49,84%) i CaO (11,87%). Odczyn badanego biowęgla z łusek słonecznika był wysoki (pH 9,19) i w konsekwencji już niskie dawki tego biowęgla na poziomie 5 Mg ha^{-1} były w stanie istotnie podnieść pH *Haplic Luvisol* z 5,04 do 5,28 (60% WHC) (Tabela 3). Najwyższa dawka biowęgla (100 Mg ha^{-1}) zmieniła odczyn gleby z kwaśnego (pH 5,04) na obojętny (pH 6,75). Co istotne, podobne tendencje obserwowano przy obu badanych poziomach wilgotności gleby. Z tego powodu wzbogacenie gleb biowęgłem z łusek słonecznika może być metodą podwyższenia pH i tym samym przeciwdziałania zakwaszeniu gleby, stosowaną alternatywnie dla wapnowania.

Poprawa odczynu gleby ma kluczowe znaczenie dla wydajności produkcji roślinnej oraz aktywności mikroorganizmów zasiedlających glebę. Główne składniki pokarmowe są najefektywniej przyswajane przez rośliny, gdy pH gleby mieści się w zakresie od lekko kwaśnego do obojętnego (pH od 5,6 do 7,0) (Grzebisz i in., 2005). Wspomniany zakres pH jest również określany jako optymalny dla rozwoju zbiorowisk bakterii metanotroficznych, odpowiedzialnych za biologiczne utlenianie metanu (Liu i in., 2019; Malyan i in., 2016). Silna korelacja wykazana pomiędzy pH gleby, a liczebnością metanotrofów i szybkością utleniania metanu potwierdziła wieloaspektowy, choć często pośredni wpływ biowęgla z łusek słonecznika na kształtowanie środowiska glebowego (Tabela 5).

Rosnąca liczba anomalii klimatycznych, w szczególności susz, prowadzi do pustynnienia kolejnych agroekosystemów (World Meteorological Organization, 2021) i stwarza poważne zagrożenie dla ciągłości wydajnej produkcji rolnej (Kroeger i in., 2021; Mouchi i in., 2019). Wilgotność gleby odpowiadająca połowej pojemności wodnej (PPW) zapewnia optymalny wzrost większości roślin uprawnych, a także warunkuje sprawny transport soli mineralnych, dyfuzję tlenu i innych gazów w glebie oraz wysoką aktywność mikrobioty glebowej (Fischer i in., 2019; Skopp i in., 1990; Yu i in., 2013). Zdolność zatrzymywania wody w glebie jest w dużej mierze determinowana zawartością glebowej materii organicznej oraz strukturą gleby (Huntington, 2007; Liao i Thomas, 2019). Dodatek biowęgla do gleby poprawia pulę SOC oraz chłonność i porowatość gleby, co ma pozytywny wpływ na zdolność zatrzymywania wody w glebie (Cao i in., 2017; Mao i in., 2019; Palansooriya i in., 2019). Wzbogacenie gleby płowej biowęgłem z łusek słonecznika poprawiło WHC gleby nawet o 12,4% (w porównaniu z kontrolą), przy czym istotną statystycznie poprawę zdolności

zatrzymywania wody w glebie odnotowano dopiero po zastosowaniu biowęglu w dawkach $\geq 60 \text{ Mg ha}^{-1}$ (Tabela 3).

3.4.4.2. Aktywność metanotroficzna i wymiana gazów cieplarnianych (CH_4 i CO_2) pomiędzy glebą z biowęglem a atmosferą

Rosnące zagrożenie gleb degradacją, wynikające z intensywnej gospodarki rolnej oraz nasilających się zmian klimatu, jak również potrzeba racjonalnego zagospodarowania biomasy odpadowej w postaci m.in. łusek słonecznika stały się powodem do przeprowadzenia niniejszych badań. Niewielki zasób doniesień literaturowych, opisujących zastosowanie biowęglu z łusek słonecznika jako dodatek do gleby, a co za tym idzie chęć uzupełnienia wiedzy na ten temat, stanowiły dodatkowe uzasadnienie przedstawionej pracy. Przeprowadzony eksperyment dowiódł skuteczności biowęglu z łusek słonecznika w poprawie właściwości fizykochemicznych (SOC, DOC, pH, N- NO_3 i WHC) *Haplic Luvisol* (Tabela 2 i 3). Przekształcenia środowiska glebowego, indukowane biowęglem obejmowały również zmiany w zbiorowiskach bakterii metanotroficznych. Wieloczynnikowa analiza wariancji potwierdziła istotny wpływ biowęglu na utlenianie CH_4 (Tabela 6), co pozostaje w zgodzie z dostępnymi danymi literaturowymi (Huang i in., 2019; Walkiewicz i in., 2020b; Z. Wu i in., 2019; Yu i in., 2013). Wzbogacenie gleby biowęglem sprzyja rozwojowi zbiorowisk bakterii metanotroficznych, co przekłada się na wzrost aktywności metanotroficznej (Reddy i in., 2014; Zhao i in., 2021). Powierzchnia biowęglu, z uwagi na swój hydrofobowy charakter, może być miejscem wydajnej sorpcji metanu, co przyczynia się do poprawy dostępności substratu w procesie biologicznego utleniania metanu (Kubaczyński i in., 2022; Sadasivam i Reddy, 2015).

Tabela 6. Wieloczynnikowa analiza wariancji zastosowana do porównania dwóch czynników: (A) dawki biowęgla i (B) wilgotności gleby na utlenianie CH₄ i emisję CO₂ w glebie płowej wzbogaconej biowęgłem z łusek słonecznika (n = 3).

	Utlenianie CH ₄	Emisja CO ₂
Główne czynniki		
A: dawka biowęgla (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 Mg ha ⁻¹)	F=48,50 p < 0,0001	F=28,1 p < 0,0001
B: wilgotność gleby (60% WHC wobec 100% WHC)	F=105,21 p < 0,0001	NS*
Interakcje		
A x B	F=9,52 p < 0,0001	F=7,84 p < 0,0001

* NS - nieistotne statystycznie

Część źródeł literaturowych sugeruje, iż poprawa aktywności metanotroficznej gleb wzbogaconych biowęgłem jest spowodowana zwiększoną dostępnością łatwo przyswajalnych związków, wniesionych do gleby wraz z biowęgłem i stanowiących źródło pierwiastków biogennych dla mikrobioty glebowej (Feng i in., 2012; Hale i in., 2012; Lentz i in., 2014; Z. Wu i in., 2019). Wu i in. (2019) łączą wzrost szybkości utleniania metanu ze wzbogaceniem gleby w azot (N) pochodzący z biowęgla (w dawce 40 Mg ha⁻¹). Biowęgłiel zastosowany przez Wu i in. (2019) charakteryzował się zawartością N na poziomie 5,6 g kg⁻¹. Biowęgłiel z łusek słonecznika użyty w przedstawionym eksperymencie odznaczał się jeszcze większą zawartością N na poziomie 9,8 g kg⁻¹, podczas gdy pula N, zawarta w badanej glebie płowej kształtowała się na poziomie zaledwie 0,75 g kg⁻¹. Dodatek biowęgla jest również rozpatrywany jako metoda zwiększenia dostępności N w glebie, sprzyjającej liczebności i bioróżnorodności bakterii metanotroficznych (Bodelier i in., 2000; Fang i in., 2014; Z. Wu i in., 2019). W związku z powyższym, użyty w eksperymencie biowęgłiel z łusek słonecznika poprzez zwiększenie ilości azotu w glebie płowej mógł przyczynić się do zwiększenia aktywności metanotroficznej *Haplic Luvisol*.

Zidentyfikowane zmiany w strukturze zbiorowisk metanotroficznych gleby użyźnionej biowęgłem z łusek słonecznika mogą także wynikać ze zwiększonej dostępności N. W przedstawionym badaniu zbiorowiska metanotroficzne, zasiedlające glebę wzbogaconą najwyższymi dawkami biowęgla (60, 80 i 100 Mg ha⁻¹) zostały zdominowane przez bakterie z rodzaju *Methylobacter* (Rysunki 8 i 9). Uzyskane wyniki kontrastują z poprzednimi rezultatami, w których dodatek biowęgla ze zrębków drzewnych również spowodował wzbogacenie zbiorowisk metanotroficznych gleby płowej, przy czym najliczniej

występującymi były bakterie należące do rodzaju *Methylocystis* (Kubaczyński i in., 2022). W obydwu przeprowadzonych eksperymentach szybkości utleniania metanu były wyraźnie wyższe po zastosowaniu biowęgla, jednak za wzrost aktywności metanotroficznej gleby płowej użyźnionej tymi dwoma różnymi biowęgłami odpowiadały metanotrofy, należące do dwóch różnych rodzajów. Ponadto w prezentowanym obecnie eksperymencie bakterie z rodzaju *Methylocystis* również zasiedlały badaną glebę, jednak nie były najliczniejszym taksonem, mało tego ich liczebność nie przekraczała 0,3% (Rysunek 9). Wyjaśnieniem tego zjawiska mogą być różnice w ekofizjologii taksonów metanotroficznych.

Bakterie z rodzaju *Methylocystis* należą do metanotrofów typu II oraz są zaliczane do klasy *Alphaproteobacteria* (Kubaczyński i in., 2022; La i in., 2018b; Pflugger i in., 2011). Bakterie należące do tego rodzaju są przystosowane do niskiej dostępności N w środowisku oraz posiadają zdolność asymilacji N₂ (Auman i in., 2001; Martínez-Pérez i in., 2017). Z kolei bakterie z rodzaju *Methylobacter* należą do *Gammaproteobacteria* i reprezentują metanotrofy typu I. Badania wykazały, że przedstawiciele rodzaju *Methylobacter* nie mają zdolności wiązania N₂ i dlatego częściej występują w środowiskach bogatych w N (Ho i in., 2012; Mohanty i in., 2006). Ponadto praca prowadzona przez Shiau i in. (2018) wskazuje na dodatnią korelację pomiędzy udziałem metanotrofów typu I, a stężeniem NO₃⁻. Podobną tendencję potwierdzono również w prezentowanych badaniach (Tabela 5), a bakterie należące do rodzaju *Methylobacter* zidentyfikowano w glebie wzbogaconej trzema najwyższymi dawkami biowęgla (60, 80, 100 Mg ha⁻¹), powodującymi blisko dwukrotny wzrost zawartości N-NO₃ w odniesieniu do gleby kontrolnej.

Zawartość N była podobna w obydwu testowanych biowęgłach (w biowęgłach ze zrębków drzewnych wynosiła 11,3 g kg⁻¹, natomiast w biowęgłach z łusek słonecznika 9,8 g kg⁻¹). Jednak dawki biowęgla z łusek słonecznika, po których zastosowaniu odnotowano wzbogacenie zbiorowisk metanotroficznych o bakterie z rodzaju *Methylobacter* (60-100 Mg ha⁻¹), były co najmniej dwu-, a nawet przeszło trzykrotnie wyższe, niż najwyższa dawka biowęgla ze zrębków drzewnych użyta w poprzednim doświadczeniu (30 Mg ha⁻¹). Wobec tego pula azotu wniesiona do gleby przez najwyższe dawki biowęgla z łusek słonecznika również była kilkukrotnie wyższa, skutecznie promując rozwój metanotrofów należących do *Methylobacter* i zwiększając bioróżnorodność mikrobioty glebowej. Według badań przeprowadzonych przez La i in. (2018a), poziom azotu w glebie jest kluczowym czynnikiem determinującym szybkość utleniania CH₄. Znalazło to swoje odzwierciedlenie również w niniejszej pracy, poprzez silną, dodatnią korelację pomiędzy szybkością utleniania CH₄, a zawartością N-NO₃ w badanej glebie (Tabela 5). Zarówno w przytoczonym jak i opisywanym eksperymencie, dodatek biowęgla

stymulował rozwój bakterii metanotroficznych, których najliczniejsi przedstawiciele należeli do rodzajów *Methylobacter* i *Methylomicrobium*. W przeprowadzonym badaniu, najwyższa dawka biowęgla z łusek słonecznika (100 Mg ha^{-1}) również doprowadziła do zdominowania zbiorowiska metanotroficznego przez bakterie należące do tych dwóch rodzajów.

Nasze badania wykazały również, że dodatek biowęgla z łusek słonecznika zwiększył aktywność metanotroficzną w obu testowanych wariantach wilgotności *Haplic Luvisol*, chociaż w wilgotności odpowiadającej 100% WHC szybkości utleniania CH_4 były na ogół wyższe, niż przy 60% WHC. Jednocześnie w warunkach pełnego nasycenia gleby wodą, znacząca poprawa aktywności metanotroficznej była widoczna już po zastosowaniu dawki 20 Mg ha^{-1} , podczas gdy przy 60% WHC pierwsze istotne efekty osiągnięto po dodaniu biowęgla w ilości 40 Mg ha^{-1} (Rysunek 6C). Te różnice mogą wynikać z faktu, iż wyższe nasycenie gleby wodą prowadzi do zmniejszenia zasobności w tlen, a według niektórych badań obniżona dostępność tlenu w glebie może być czynnikiem wspierającym bioróżnorodność (Xu i in., 2022). Umiarkowanie obniżona dostępność tlenu w atmosferze (do poziomu 5-10%) jest w stanie przyspieszyć utlenianie CH_4 w glebach (Walkiewicz i Brzezińska, 2019). Zdolności adaptacyjne bakterii metanotroficznych, należących m.in. do rodzaju *Methylobacter*, pozwalają metanotrofom na wzrost w warunkach mikroaerofilnych, charakterystycznych dla gleb w pełni wysyconych wodą (Danilova i in., 2016; Guerrero-Cruz i in., 2021; Kulkarni i in., 2019).

Aplikacja biowęgla z łusek słonecznika zwiększyła szybkość emisji CO_2 z gleby płowej, a uzyskane rezultaty są zbieżne z przeważającymi danymi literaturowymi (Tabela 6) (Almeida i in., 2019; Ippolito i in., 2014; Kubaczyński i in., 2022; Walkiewicz i in., 2020b; T. Yang i in., 2017). Jednocześnie w części prac nie wykazano zmożonej emisji CO_2 po wprowadzeniu biowęgla do gleby (Fidel i in., 2019; Lentz i in., 2014; Troy i in., 2013). Rozbieżności w raportowanych rezultatach mogą wynikać z faktu, iż biowęgle są częstym źródłem wolnych rodników o wysokiej trwałości w środowisku (ang. *environmentally persistent free radicals* - EPFRs), które indukują stres oksydacyjny, negatywnie oddziałujący na mikroorganizmy glebowe (Quan i in., 2020; Tomczyk i in., 2020). Wysoka temperatura sprzyja powstawaniu EPFRs, wobec czego warunki termiczne pirolizy determinują ich ilość, wnoszoną do środowiska przez dany biowęgiel (Odinga i in., 2020). Z uwagi na to, iż biowęgiel z łusek słonecznika powstał w procesie pirolizy, prowadzonej w umiarkowanej temperaturze ($450\text{-}550 \text{ }^\circ\text{C}$), pula powstałych EPFRs nie wywołała silnego stresu oksydacyjnego, hamującego aktywność mikrobiologiczną gleby. Potwierdzeniem tej tezy jest wysoka aktywność metanotroficzna gleby wzbogaconej biowęgłem.

Prezentowane badanie wykazało powszechny wzrost emisji CO₂, odnotowany w glebie o wilgotności odpowiadającej zarówno 60% WHC, jak i 100% WHC (Rysunki 6B i 6D). Po aplikacji biowęgla do gleby o wilgotności 60% WHC, szybkości emisji CO₂ były nawet dwukrotnie wyższe, niż w glebie kontrolnej (Rysunek 6B). W glebie o wyższej wilgotności (100% WHC), rozpatrywane dawki biowęgla wywołały podobny wzrost szybkości emisji CO₂. Niewielkie różnice pomiędzy szybkościami emisji CO₂ wynikają najpewniej z ograniczonej dyfuzji gazów w glebie wysyczonej wodą (Yu i in., 2013). Wzmożona emisja CO₂ w glebie z biowęglem wynika z kilku czynników. Biowęgiel poprawia m.in. napowietrzenie i zdolność zatrzymywania wody w glebie, stwarzając warunki sprzyjające kolonizacji przez mikroorganizmy glebowe. Respiracja gleby jest jednym z jej głównych wskaźników aktywności biologicznej (Joshi Gyawali i in., 2019; Shah i in., 2017). Ponadto silna korelacja między emisją CO₂, a utlenianiem CH₄ sugeruje, że wzrost aktywności metanotroficznej gleby przyczynia się do zwiększenia emisji CO₂.

Wzrost emisji CO₂ jest silnie zależny od puli rozpuszczonych związków organicznych, pochodzących z biowęgla (Yang i in., 2017), stanowiących łatwo przyswajalne substraty dla mikrobioty glebowej (Spokas i in., 2009; Yao i in., 2017). Odnotowany wzrost emisji CO₂ odpowiada umiarkowanym zmianom struktury zbiorowisk mikrobiologicznych *Haplic Luvisol* po zastosowaniu biowęgla z łusek słonecznika.

3.4.5. Podsumowanie

Przedstawiona praca uzasadnia rolę łusek słonecznika jako wartościowego materiału wsadowego, wykorzystywanego do produkcji biowęgla. Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ biowęgla z łusek słonecznika (rozpatrywanego w szerokim zakresie dawek) na właściwości fizykochemiczne gleby, przebieg wymiany gazów cieplarnianych pomiędzy glebą a atmosferą (wyrażony szybkościami utleniania CH₄ i emisji CO₂) oraz liczebność i strukturę mikrobioty zasiedlającej *Haplic Luvisol*. W glebie o wilgotności odpowiadającej 60% WHC, dawki biowęgla większe niż 40 Mg ha⁻¹ wywołały co najmniej 10-ciokrotny, a nawet 17-tokrotny wzrost szybkości utleniania metanu w porównaniu z glebą kontrolną. Zastosowanie biowęgla wyraźnie zwiększyło emisję CO₂, lecz co najwyżej dwukrotnie w stosunku do kontroli. Ponadto w glebie o wyższej wilgotności (100% WHC) dodatek biowęgla wywołał porównywalny wzrost emisji CO₂. W glebie o wyższej wilgotności (100% WHC), skuteczna poprawa szybkości utleniania metanu nastąpiła już po aplikacji dawki biowęgla rzędu 20 Mg ha⁻¹. Mając na uwadze wysoki potencjał cząsteczek metanu w tworzeniu efektu cieplarnianego (GWP), jak

również wyraźny wzrost efektywności usuwania CH₄, dodatek biowęglu do gleby sprzyja przyjęciu przez glebę roli wydajnego pochłaniacza metanu. Pozytywny wpływ biowęglu na *Haplic Luvisol* został potwierdzony wzrostem liczebności i różnorodności zbiorowisk metanotroficznych, zasiedlających daną glebę. Odpowiednio dobrana dawka biowęglu może poprawić właściwości fizykochemiczne gleby (takie jak: pH, WHC, a także zasobność w N-NO₃, SOC i DOC), prowadząc do zwiększenia liczebności oraz aktywności bakterii metanotroficznych, a tym samym zwiększyć efektywność gleby w pochłanianiu metanu. Dlatego też wzbogacenie gleby biowęglem z łusek słonecznika można uznać za obiecującą praktykę, zapobiegającą degradacji gleby pólowej, jak również jako narzędzie ograniczające emisję gazów cieplarnianych.

4. Podsumowanie i wnioski

Uzyskane wyniki badań, opublikowane oraz przygotowane do opublikowania na łamach specjalistycznych czasopism naukowych, prezentujących zagadnienia zbieżne z problematyką niniejszej rozprawy doktorskiej, potwierdzają hipotezy badawcze sformułowane na wstępie prowadzonej pracy badawczej. Wnioski z poszczególnych etapów prowadzonych badań zostały szczegółowo przedstawione w załączonych publikacjach oraz materiałach uzupełniających.

Rezultaty przeprowadzonych badań doświadczalnych pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków głównych:

1. Substrat wykorzystany do produkcji biowęgla silnie determinował jego parametry fizykochemiczne (P.1). Dokonana charakterystyka biowęgla ze zrębków drzewnych, z łusek słonecznika, z łądyg malin i łądyg ziemniaków (łącin) wykazała szereg wartościowych i użytecznych w rekultywacji właściwości fizykochemicznych m.in. odczyn zasadowy, znaczne zdolności zatrzymywania wody, wysoką zawartość całkowitego węgla organicznego i rozpuszczonego węgla organicznego.
2. Substrat wykorzystany do produkcji biowęgla silnie wpływał na jego potencjał łagodzenia zmian klimatu w zakresie ograniczania emisji gazów cieplarnianych lub zwiększania ich pochłaniania (P.1). Spośród badanych biowęgla, to właśnie karbonizaty powstałe z łądyg malin i ziemniaków wykazywały kilku-, a nawet kilkudziesięciokrotnie wyższą skuteczność w usuwaniu metanu z atmosfery (1% CH₄ obj.), niż biowęgla wytworzone ze zrębków drzewnych i łusek słonecznika. Ponadto wydajnemu pochłanianiu metanu, prowadzonemu przez nowe biowęgla z łądyg malin i ziemniaków towarzyszyła umiarkowana emisja ditlenku węgla.
3. Wilgotność silnie determinowała zdolność biowęgla do pochłaniania CH₄ (P.1). Metan był usuwany szybciej przez biowęgla inkubowane w wilgotności odpowiadającej 60% WHC. Biowęgiel z łądyg ziemniaków odznaczał się najwyższymi szybkościami pochłaniania metanu w obydwu testowanych wilgotnościach (60% WHC i 100% WHC), pełniąc tym samym rolę wydajnego sorbentu metanu (P.433435) i obniżając swój potencjał w tworzeniu efektu cieplarnianego (net GWP).
4. Dodatek biowęgla do gleby płowej korzystnie zmienił jej parametry (P.2 i P.3). Wzbogacenie *Haplic Luvisol* biowęgla ze zrębków drzewnych oraz biowęgla z łusek słonecznika wywołało szereg zmian właściwości fizykochemicznych gleby, obejmujących m.in. zwiększenie pH oraz poprawę zdolności zatrzymywania wody w glebie.

5. Praktyka dodawania biowęgla do gleb wykazała potencjał w zwiększaniu jej zdolności do pochłaniania CH₄, co było determinowane wilgotnością gleby i zastosowaną dawką biowęgla (P.2 i P.3). Jednym z efektów aplikacji biowęgla ze zrębków drzewnych był wzrost aktywności metanotroficznej gleby płowej o wilgotności odpowiadającej 60% WHC, przy czym wysokość dawki biowęgla miała istotny wpływ na trwałość poprawy szybkości utleniania metanu. Bezpośrednio po wprowadzeniu biowęgla do gleby, wszystkie zastosowane dawki (10, 20 i 30 Mg ha⁻¹) stymulowały utlenianie metanu, podczas gdy wpływ biowęgla pięć lat po jego zastosowaniu był wyraźnie słabszy i jedynie najwyższa dawka biowęgla (30 Mg ha⁻¹) nadal istotnie zwiększała aktywność metanotroficzną badanej gleby. Aplikacja biowęgla z łusek słonecznika również przyniosła poprawę aktywności metanotroficznej gleby płowej, niemniej jednak pierwsze efekty odnotowano po zastosowaniu biowęgla w dawkach odpowiadającym 40 Mg ha⁻¹ w glebie o wilgotności równej 60% WHC, i 20 Mg ha⁻¹ w glebie wysyczonej wodą (100% WHC).
6. Dodatek biowęgla do gleb wywołał krótkotrwale zwiększoną emisję CO₂ (P.2 i P.3). Wzrost emisji CO₂ odnotowano jedynie bezpośrednio po aplikacji biowęgla do gleby.
7. Wzbogacenie gleb biowęgłem silnie wpływało na społeczność zasiedlających ją bakterii metanotroficznych, co było zależne od substratu użytego do produkcji biowęgla i jego dawki (P.2 i P.3). Biowęgłe wprowadzone do gleby przyczyniły się do wzrostu liczebności i bioróżnorodności zbiorowisk bakterii metanotroficznych gleby płowej, przy czym biowęgłe wytworzone z dwóch różnych substratów roślinnych (zrębków drzewnych i łusek słonecznika) stymulowały rozwój metanotrofów o odmiennej przynależności rodzajowej. Biowęgłiel ze zrębków drzewnych wzbogacił zbiorowisko metanotroficzne o bakterie należące do rodzaju *Methylocystis*, natomiast wysokie dawki biowęgla z łusek słonecznika (60-100 Mg ha⁻¹) doprowadziły do znacznego wzrostu udziału bakterii metanotroficznych oraz dominacji metanotrofów z rodzaju *Methylobacter*.

Niniejsza rozprawa doktorska przedstawia wieloaspektowy, pozytywny wpływ badanych biowęgla na środowisko glebowe i ich potencjał łagodzenia udziału gleb w globalnym ociepleniu. Użyźnienie gleby płowej biowęgłem zwiększyło jej aktywność metanotroficzną, tym samym zmieniając bilans wymiany gazów cieplarnianych pomiędzy glebą i atmosferą. Prezentowana praca ukazuje również potencjał odpadowej biomasy roślinnej, która właściwie zagospodarowana może wesprzeć działania na rzecz ograniczenia emisji gazów cieplarnianych i ochrony klimatu, wpisując się jednocześnie w założenia gospodarki cyrkularnej.

5. Tekst publikacji P.1

Int. Agrophys., 2020, 34, 355-364
doi: 10.31545/intagr/126762

INTERNATIONAL
Agrophysics
www.international-agrophysics.org

New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars**

Adam Kubaczynski*, Anna Walkiewicz, Anna Pytlak, and Małgorzata Brzezińska

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290, Lublin, Poland

Received July 20, 2020; accepted August 25, 2020

Abstract. The reduction in greenhouse gas emissions from agriculture is of particular importance at present. In recent times, biochar addition to the soil was suggested as a means of mitigating greenhouse gases emissions from arable fields. More specifically, biochars with useful properties and those produced from easily available waste materials are still being sought. In the presented experiment, the CH₄ absorption potential of four biochars incubated at 60 and 100% water holding capacity with the addition of 1% CH₄ (v/v) was investigated for 28 days at 25°C. The potato stem and raspberry stem biochars showed much higher potentials for CH₄ uptake than wood offcuts biochar and sunflower husk biochar. Potato stem and raspberry stem biochars incubated at 60% water holding capacity were characterized by a methane uptake rate of 8.01 ± 0.47 and 5.78 ± 0.17 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹, respectively. The methane removal potentials of the other biochars were clearly lower. The advantage of the biochars from raspberry and potato stems over the wood offcuts biochar also results from their significantly lower production of carbon dioxide. Consequently, these materials have a high potential for agricultural use, in view of their impact on the greenhouse gas balance of the soil.

Keywords: biochar, methane, greenhouse gas removal, raspberry stems, potato stems

INTRODUCTION

Biochar may be defined as biomass that has been pyrolysed in a zero or low oxygen environment (Lehmann and Rondon, 2006). The application of biochar to soil is expected to enhance soil fertility, improve its water reten-

tion properties and increase carbon sequestration (Coomes and Miltner, 2017; Luo *et al.*, 2016). Biochar addition may also stimulate soil microbial activity and reduce the emission of greenhouse gases (GHGs) such as carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄) (Wu *et al.*, 2019) due to its specific properties, such as a large surface area and its high porosity value (Jeffery *et al.*, 2016; Kammann *et al.*, 2017; Sokolowska *et al.*, 2020). Oxygen in the soil environment is crucial for the functioning of microbiota and plant roots (Lehmann *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2017). A high degree of oxygen uptake by biochar may lead to the development of anoxic microhabitats in the soil (Ribas *et al.*, 2019). Under such conditions, methane is formed by anaerobic microbiota and released to the atmosphere rather than being removed from it (Chistoserdova and Kalyuzhnaya, 2018). Moisture levels modify the air-water conditions and a range of between 50 and 70% water holding capacity (WHC) is considered optimal for gas diffusion and soil microbiota (Walkiewicz *et al.*, 2020a). On the other hand, temporary flooding also occurs which results in a reduction in gas diffusion (Yu *et al.*, 2012). In order to mirror the variable conditions of the soil environment, we used 60 and 100% WHC. It has already been reported that the water held in the pores of the biochar may lead to a decrease in the amount of methane absorbed (Farzad *et al.*, 2007). For this reason, it is important to test biochars (especially those produced from new feedstocks) at different moisture levels.

*Corresponding author e-mail: a.kubaczynski@ipan.lublin.pl

**This work was partially conducted as a part of the project "Water in soil - satellite monitoring and improving the retention using biochar" no. BIOSTRATEG3/345940/7/NCBR/2017 which was financed by Polish National Centre for Research and Development within the framework of "Environment, agriculture and forestry" - BIOSTRATEG strategic R&D programme (2018-2020).



Biochar is increasingly used in environmental protection as a low-cost sorbent of heavy metals and hazardous gases (La *et al.*, 2018; Xiong *et al.*, 2019). Additionally, CH₄ can be removed through biochar filtration (Syed *et al.*, 2016). This gas is known for its explosive properties, which may pose a serious threat to safety in mines and landfills (Kammann *et al.*, 2017; Pytlak *et al.*, 2014), but mainly for its high infrared radiation absorption potential which results in a 28-fold higher global warming potential than CO₂ (IPCC, 2014). Nevertheless, there is an apparent deficit in studies describing the potential of biochar to remove higher than ambient CH₄ concentrations (Huang *et al.*, 2019; Syed *et al.*, 2016).

Due to the growing number of biochar applications, modifications of established products, as well as new materials for its production are being sought (Kammann *et al.*, 2017). New feedstocks could be a way to provide biochars with interesting and desirable properties (Thomazini *et al.*, 2015; Tomczyk, 2020). Another advantage of biochar is that it can be produced from waste biomass, which for various reasons is not suitable for other purposes such as feed, litter or fuel production (Qi *et al.*, 2020; Schwede *et al.*, 2017). In these circumstances, the production of biochar is economically, environmentally and ethically justifiable. For this reason, we decided to study agricultural waste from potato and raspberry stems as potential feedstock for biochar production. Potato stems are left in the fields after harvest and raspberry bushes are trimmed and discarded after each growing season. According to the FAO, in 2007 the global area used to grow potatoes amounted to around 19.3 million ha. In Europe, 7.5 million hectares were used for this purpose and the cultivation area is still increasing (Mackay, 2009). Raspberry crops are less prevalent but they have a local significance. In 2010-2012, the average global area used for raspberry production was 92,000 hectares but the amount of stem biomass harvested per hectare was considerable (Zaremba, 2014). The availability of both potato and raspberry biomass is thus high. It should be noted that the stems are often a habitat for pathogenic microorganisms and parasites and for this reason they often have to be disposed of properly (Guo *et al.*, 2019; Vincent *et al.*, 2003). Biochar production may be a beneficial way of making biohazardous plant debris safe. In this way, hazardous waste biomass may be neutralized through pyrolysis and returned safely to the environment thereby contributing to carbon sequestration and a reduction in GHG emissions.

The new aspects of our study are: i) the utilization of new agricultural waste feedstocks, ii) performing experiments on a single biochar (usually biochar with soil was under investigation), iii) comprehensive approach which included monitoring CH₄, CO₂ and O₂ exchange.

Since the ability of biochar to sequester CH₄ may depend on the feedstocks used, we hypothesize that biochars produced from raspberry and potato stems may be

used to remove CH₄ from the atmosphere and that the process is moisture-dependent since a high water content may impair gas diffusion.

The aim of the study was to determine the potential of CH₄ removal as well as the accompanying CO₂ production and O₂ uptake by new biochars prepared from plant waste materials (raspberry and potato stems) in comparison with widely available biochars made from wood offcuts and sunflower husks. In addition, we studied the differences between these materials based on their physicochemical properties.

MATERIALS AND METHODS

New biochars were produced in 2018 from raspberry (Br) and potato stems (Bp) (left after crop collection) by pyrolysis (at 600 °C, for half an hour, in an N₂ atmosphere), using an LAC L15/12 electric furnace with a Ht40 AL controller, and a working volume of 15 dm³. After pyrolysis, nitrogen flushing was maintained until the furnace cooled to room temperature. Common biochars made from wood offcuts (Bo) and sunflower husks (Bs) were produced by New Technology Trade Ltd. (Kobylany, Poland) at a temperature of 600 and 550 °C, respectively (Table 1).

All biochars were sieved with a 2 mm mesh sieve and stored in the dark at room temperature in hermetic containers. The content of the dissolved organic carbon (DOC), total carbon (TC) and nitrogen (TN), pH, oxidation-reduction potential (Eh) and bulk density were measured before incubation (Table 1). The DOC content was measured with a TOC-VCPH analyser (Shimadzu, Japan) (Yu *et al.*, 2018). The pH and Eh of the biochar were determined at a 1:5 biochar to water ratio, using a glass electrode and a redox electrode respectively (Sokołowska *et al.*, 2020; Yoo *et al.*, 2014) with a HQ40D Portable Multi Meter analyser (Hach Lange). The water holding capacity (WHC) of the tested biochars was determined according to Yoo *et al.* (2014) using the modified funnel method. The biochar C and N contents were determined using an elemental analyser (Perkin Elmer CHN 2400). The bulk density of the biochar was calculated based on its weight at 15°C, at a volume of 10 cm³ (Özçimen and Karaosmanoğlu, 2004).

The tested biochars (5 g of air-dried biochar per sample in three replications) were weighed into 120 cm³ glass bottles and adjusted to 60% or 100% WHC by the addition of distilled water. All samples were closed and subjected to three days of preincubation at 25°C. Next, after ventilation, the samples were closed with rubber stoppers and aluminum caps, and then the headspace was enriched with 1% CH₄ (v/v) to improve analytical precision. During the following 28 days of incubation (at 25°C, in darkness), the composition of the atmosphere (CH₄, CO₂ and O₂) above the biochar was analysed using a gas chromatograph. A GC-2014 (Shimadzu, Japan) gas chromatograph was used. It was fitted with a flame ionization detector (FID)

Table 1. Characteristics of four biochars: wood offcuts biochar (Bo), sunflower husk biochar (Bs), raspberry stem biochar (Br) and potato stem biochar (Bp)

Parameter	Biochar			
	Wood offcuts (Bo)	Sunflower husk (Bs)	Raspberry stem (Br)	Potato stem (Bp)
	Common – produced by the local company New Technology Trade Ltd., Kobylany, Poland		New – produced in the Institute of Agrophysics PAS, Lublin, Poland	
Pyrolysis temperature (°C)	600	550	600	600
C content (%)	86.13 ± 0.24	78.30 ± 0.01	74.21 ± 0.34	44.62 ± 0.02
N content (%)	0.35 ± 0.01	0.98 ± 0.03	0.90 ± 0.01	1.35 ± 0.00
C/N ratio	246.09	79.90	82.46	33.05
DOC mg dm ⁻³)	214.33 ± 0.22	106.57 ± 2.77	139.70 ± 1.19	100.04 ± 0.24
pH	6.99 ± 0.01	9.19 ± 0.02	9.17 ± 0.02	9.60 ± 0.05
Eh (mV)	105 ± 0.36	-16 ± 0.17	32 ± 0.44	25 ± 0.46
Bulk density (g cm ⁻³)	0.31 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01
WHC (g H ₂ O g biochar ⁻¹)	2.58 ± 0.26	2.58 ± 0.06	4.31 ± 0.16	4.45 ± 0.09

for CH₄ and CO₂ analysis and an electron capture detector (ECD) for O₂. Poraplot Q and Restek Q-bond columns (column flow – 5 cm³ min⁻¹, split ratio 5:1, oven temp. – 30°C, injection volume – 150 µL, purge flow 3 cm³ min⁻¹) with helium as a carrier was used to separate the gases. External standards (1% CH₄ in He; 20.9% O₂ in N₂, Air Products) were used for calibration (Walkiewicz *et al.*, 2020a, 2020b).

The methane and oxygen uptake rates were determined based on the difference between the initial and final gas concentrations on the last incubation day, and divided by the time of apparent CH₄ uptake (the lag phase for CH₄ was excluded) (Eq. (1)). The carbon dioxide production rate was calculated similarly, but in this case the difference in CO₂ concentration between the last and first incubation day was calculated due to the continuous emission of this gas (Eq. (2)) (Walkiewicz *et al.*, 2020a):

$$\text{CH}_4 \text{ uptake rate} = \frac{C_{\text{initial}} - C_{\text{final}}}{t}, \quad (1)$$

C_{initial} is the initial uptake CH₄ concentration in the headspace (mg CH₄-C kg⁻¹), C_{final} is the final CH₄ concentration in the headspace (mg CH₄-C kg⁻¹), t is the number of incubation days with CH₄ uptake.

$$\text{CO}_2 \text{ production rate} = \frac{C_{\text{final}} - C_{\text{initial}}}{t}, \quad (2)$$

C_{final} is the final CO₂ concentration in the headspace (mg CO₂-C kg⁻¹), C_{initial} is the initial CO₂ concentration in the headspace (mg CO₂-C kg⁻¹), t is the number of incubation days.

Based on the final CO₂ emission and O₂ consumption, the CO₂/O₂ ratio was calculated for each biochar separately for 60% and 100% WHC, as a measure of biochar stability.

Net GWP was calculated by making a comparison between the cumulative CH₄ and CO₂ fluxes in mg CO₂ equivalent per kg of biochar (Walkiewicz *et al.*, 2020b).

In these calculations, the GWP value for CH₄ and CO₂ was considered to be 28 and 1, respectively, over a 100-year time horizon (IPCC, 2014).

The results were statistically processed with Statistica 13 software (StatSoft Inc.). A one-way ANOVA (Tukey HSD post-hoc test) was used to test the significance of the differences in CH₄ uptake and CO₂ emission rates between the tested biochars (separately for 60 and 100% WHC).

RESULTS

For the group of four biochars incubated at 60% WHC, the added methane was completely taken up by the potato (Bp) and raspberry (Br) biochars (Fig. 1a). The most efficient in terms of CH₄ removal were samples containing Bp, where after a 13-day long lag phase, the CH₄ uptake rate reached 8.01 ± 0.47 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹, resulting in methane depletion within 25 days of incubation (Table 2). The incubation of Br showed a similar lag phase duration (15 days), and almost complete CH₄ removal occurred 13 days later. The methane uptake rate for the raspberry stem biochar achieved 5.78 ± 0.17 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ at 60% WHC. Methane wasn't completely absorbed by sunflower husk biochar (Bs) and only ca. 11% (10.23 ± 3.46 mg CH₄-C kg⁻¹) of the added CH₄ was absorbed by the end of incubation (till the 28th day) after a 24 ± 2 days lag phase. The wood offcuts biochar (Bo) did not show any apparent ability for CH₄ uptake at 60% WHC. Within the applied experimental timeframes, less than 1% of the added CH₄ (0.95 ± 0.25 mg CH₄-C kg⁻¹) was removed by the wood offcuts biochar.

The tested biochars differed in the CO₂ emissions that accompanied CH₄ uptake (Fig. 1b), but special attention needs to be paid to the wood offcuts biochar. During the experiment, Bo produced several times more CO₂ than the other biochars, with an average CO₂ production rate as high as 19.98 ± 1.22 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹. On the last day of incubation, CO₂ concentration in Bo was ca. 573 mg CO₂-C kg⁻¹,

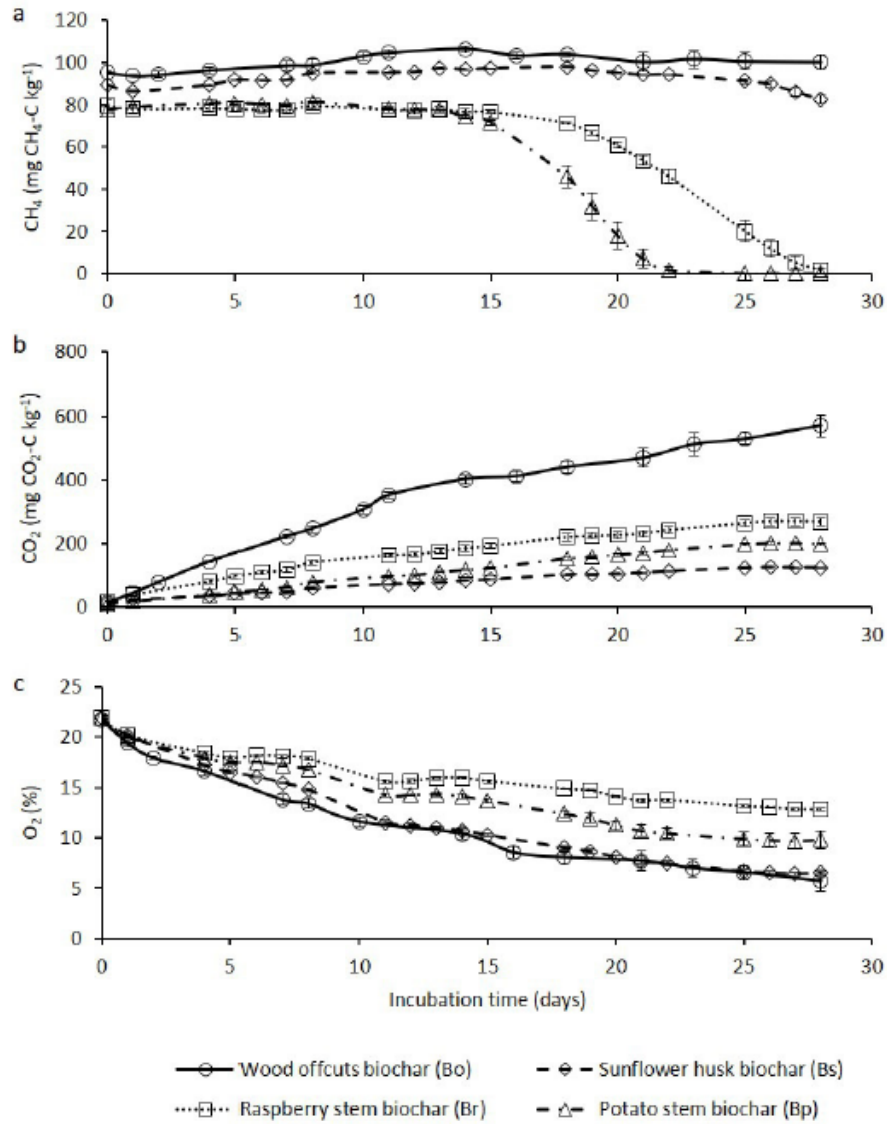


Fig. 1. Uptake of added CH₄ (1% v/v) (a), which accompanies CO₂ production (b) and O₂ uptake (c) by four biochars produced from: wood offcuts (Bo), sunflower husks (Bs), raspberry stems (Br) and potato stems (Bp) incubated at 60% WHC (avg. ± SD, n = 3).

Table 2. Methane uptake and accompanying carbon dioxide emission rate for the entire biochar incubation period with 1% CH₄ (v/v)

Biochar type	CH ₄ uptake rate (mg CH ₄ -C kg ⁻¹ d ⁻¹)		CO ₂ emission rate (mg CO ₂ -C kg ⁻¹ d ⁻¹)	
	60% WHC	100% WHC	60% WHC	100% WHC
Bo	0.17 ^a ± 0.06	0.33 ^A ± 0.18	19.98 ^c ± 1.22	21.62 ^C ± 1.32
Bs	2.74 ^b ± 0.57	1.51 ^A ± 0.55	3.88 ^a ± 0.08	2.44 ^A ± 0.33
Br	5.78 ^c ± 0.17	3.03 ^B ± 0.35	9.05 ^b ± 0.40	6.72 ^B ± 0.16
Bp	8.01 ^d ± 0.47	5.52 ^C ± 0.81	8.39 ^b ± 0.35	2.55 ^A ± 0.04

Different letters indicate significant differences between biochars, separately for 60% (small letters) and 100% WHC (capital letters), separately for CH₄ and CO₂, Tukey test, p < 0.05.

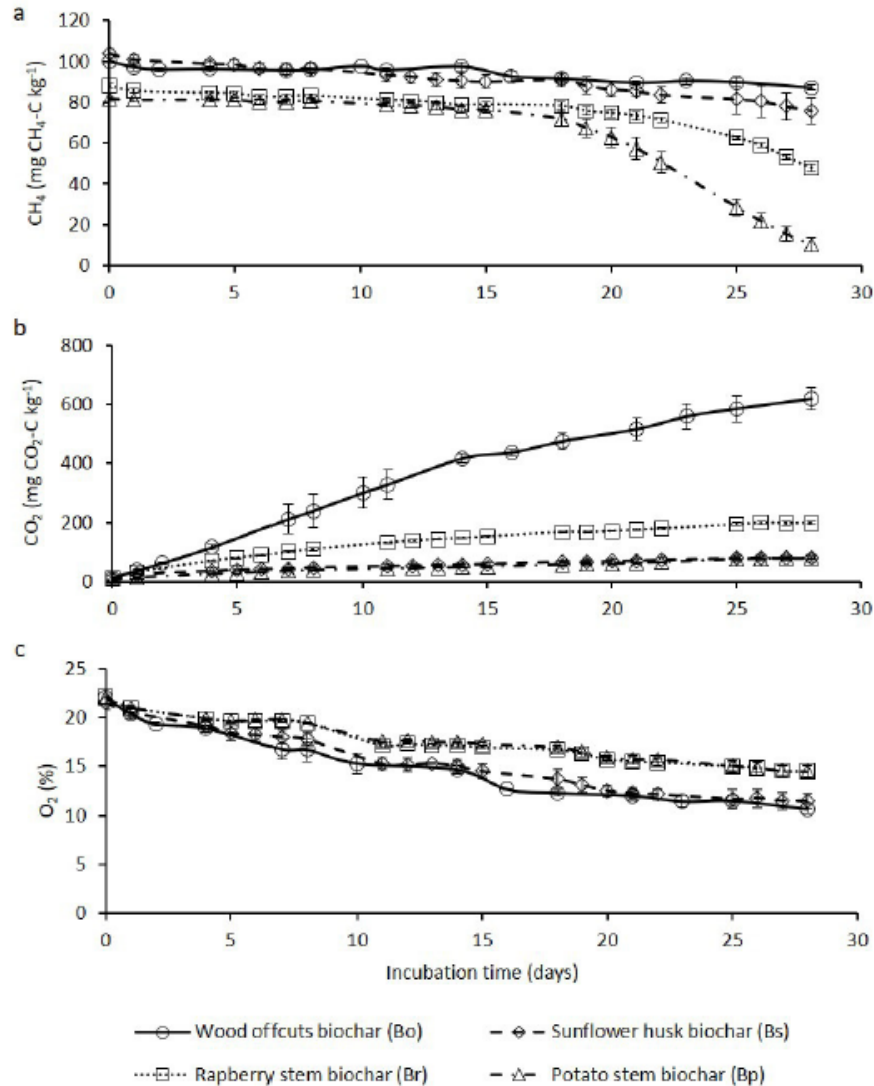


Fig. 2. Uptake of added CH₄ (1% v/v) (a), which accompanies CO₂ production (b) and O₂ uptake (c) by four biochars produced from: wood offcuts (Bo), sunflower husks (Bs), raspberry stems (Br) and potato stems (Bp) incubated at 100% WHC (avg. \pm SD, n = 3).

while the CO₂ concentration determined in the other tested biochars remained below 300 mg CO₂-C kg⁻¹. The Br and Bp biochars showed similar dynamics and CO₂ production rates (respectively: 9.05 ± 0.40 and 8.39 ± 0.35 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹). At 60% WHC moisture level, the production of CO₂ was definitely lowest in Bs (with a rate of 3.88 ± 0.08 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹) where the final concentration of this gas didn't exceed 130 mg CO₂-C kg⁻¹.

The highest CO₂ production by Bo corresponded to its highest O₂ uptake. At 60% WHC, the differences in the O₂ uptake of new biochar were clearly visible (Fig. 1c). During incubation, the oxygen level dropped to 12.8 and

9.8% in Br and Bp respectively while for the Bs and Bo variants, the final O₂ levels were as low as 6.5 and 5.7%, respectively (v/v).

Biochars incubated at higher moisture levels (100% WHC) showed different dynamics of CH₄ uptake. Within the applied timeframes, none of the tested biochars absorbed all of the added CH₄ (Fig. 2a). The lag phases were generally longer than at 60% WHC, and CH₄ absorption was slower. Methane uptake rates in potato (Bp) and raspberry (Br) stem biochar reached values of 5.52 ± 0.81 and 3.03 ± 0.35 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹, respectively (Table 2). The lag phases in the Bp and Br biochars lasted for about 16 and 18 days, respectively. The CH₄ uptake rate by Bp was highest and resulted in a reduction of 87% in the added CH₄.

Table 3. Global warming potential (GWP) contributions from CO₂ emission and CH₄ uptake by biochars (Bo, Bs, Br and Bp) incubated under 60 and 100% WHC (calculated based on GHGs data for the last incubation day)

Biochar type	Moisture WHC (%)	GWP-CO ₂	GWP-CH ₄	Net GWP
		(g CO _{2(eq)} kg ⁻¹)		
Bo	60	2.049 ^d ± 0.125	-0.035 ^a ± 0.009	2.014 ^c ± 0.120
	100	2.217 ^c ± 0.135	-0.096 ^a ± 0.043	2.122 ^b ± 0.100
Bs	60	0.398 ^a ± 0.008	-0.382 ^b ± 0.129	0.016 ^a ± 0.137
	100	0.250 ^a ± 0.034	-0.565 ^b ± 0.204	-0.315 ^a ± 0.217
Br	60	0.928 ^c ± 0.041	-2.805 ^c ± 0.082	-1.876 ^b ± 0.085
	100	0.690 ^b ± 0.016	-1.131 ^c ± 0.130	-0.441 ^a ± 0.115
Bp	60	0.696 ^b ± 0.012	-2.883 ^c ± 0.009	-2.187 ^d ± 0.021
	100	0.262 ^a ± 0.004	-2.440 ^d ± 0.088	-2.178 ^c ± 0.091

Different letters indicate significant differences between biochars, separately for 60% (small letters) and 100% WHC (capital letters), Tukey test, $p < 0.05$.

Despite a lower CH₄ uptake rate than Bp, Br was also able to remove a relatively large portion of the CH₄ added (*ca.* 39% of the initial level). Clearly, less CH₄ was taken up by Bs and Bo, as at 100% WHC those biochars absorbed just 15.14 ± 5.46 mg CH₄-C kg⁻¹ (*ca.* 17%) and 2.56 ± 1.14 mg CH₄-C kg⁻¹ (*ca.* 3%) respectively, after quite a long lag phase duration (18 days) (Fig. 2a).

The CO₂ emissions of the new Bp and Br biochars at 100% WHC were also lower than at 60% WHC (Fig. 2b). The rate of CO₂ emission by the wood offcuts biochar (Bo) was not significantly affected by the tested moisture conditions, it showed the highest production among the tested materials (Table 2). The Br biochar was characterized by a medium CO₂ production rate (6.72 ± 0.16 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹) (Table 2), but the final concentration didn't exceed 200 mg CO₂-C kg⁻¹. At 100% WHC, the tested Bp and Bs showed similarly low CO₂ production rates (Bp: 2.55 ± 0.04 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ and Bs: 2.44 ± 0.33 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹). For these variants, the final gas concentration was below 100 mg CO₂-C kg⁻¹. With regard to O₂ uptake, under given conditions, it was highest in the Bo and Bs incubations, with significantly lower values in Br and Bp (Fig. 2c).

The CO₂/O₂ ratio at 60% WHC had the following values: 0.65 (Bo), 0.23 (Br and Bp) and 0.19 (Bs). At 100% WHC, the CO₂/O₂ ratio was generally lower than at 60% WHC: 0.45 (Bo), 0.15 (Br), 0.07 (Bs) and 0.06 (Bp).

The values of net GWP which were calculated for each biochar under the tested moisture conditions are presented in Table 3.

DISCUSSION

Biochar is currently the focus of attention for scientists worldwide as a useful and beneficial soil additive. To date, however, most studies have been focused on gas exchange

and microbial activity in biochar mixed with soil (Han *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017; Lehmann *et al.*, 2011). Only a small group of studies have described the sole incubation of biochars. Moreover, those experiments were performed with the use of small portions of biochar (less than 1g) (Spokas and Reicosky, 2009; Thomazini *et al.*, 2015). In those studies, the uptake of CH₄ and CO₂ emissions brought about by the biochar, could usually be explained by abiotic processes (Jeffery *et al.*, 2016; Thomazini *et al.*, 2015). In our study, we presented newly developed biochars from common agricultural wastes. To the best of our knowledge, these materials had not been considered at the time of writing.

The new biochars from raspberry and potato stems were prepared under comparable temperature conditions as widely available materials produced from common feedstocks (wood offcuts and sunflower husks) (Sokolowska *et al.*, 2020; Zubkova *et al.*, 2019). Considering their potential application to soil we determined their basic physico-chemical properties (Table 1). It was found that the newly produced materials may improve the soil environment by increasing C and N content, the pH value (of acidic soils) and water storage ability (especially under drought conditions); this corresponds with current, global-scale problems. With respect to the aforementioned advantages, the newly developed biochars from raspberry (Br) and potato (Bp) stems seem to be even better than the well-known wood offcuts (Bo) and sunflower husk (Bs) biochars.

According to Thomazini *et al.* (2015), CH₄ uptake by wood chip biochar (produced at 550°C) wasn't observed, while CO₂ emissions from this material were 24 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ (in moisture conditions of 0.3 mL water per 1 g biochar). In our study, the wood offcuts biochar showed a similar CO₂ production rate (19.98 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ at 60% WHC and 21.62 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ at 100% WHC)

and CH₄ uptake was also not observed. In contrast to this result, the potato stem biochar showed a three-fold lower CO₂ production rate at 60% WHC (8.39 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹), while at 100% WHC this rate was nearly 10 times lower (2.55 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹) than that found in the Thomazini *et al.* (2015) study. At 60% WHC, the CO₂ production rate of raspberry stem biochar (9.05 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹) was at a similar level to Bp. Furthermore, potato stem and raspberry stem biochars also demonstrated a high level of CH₄ removal.

Spokas and Reicosky (2009) tested 16 different biochars in terms of CH₄ uptake and CO₂ production. Only three wet biochars (1 mL H₂O per 0.5 g biochar) from this group showed an ability for CH₄ uptake. Peanut hull biochar and corn stover biochar had an identical methane uptake rate (2.6 ± 0.6 ng CH₄ g⁻¹ d⁻¹). The biochar whose feedstock was Biosource™ showed the highest methane uptake rate of all (4.1 ± 0.9 ng CH₄ g⁻¹ d⁻¹). On the other hand, those biochars exhibited a high rate of CO₂ production: peanut hull biochar 168.5 ± 23.5 µg CO₂ g⁻¹ d⁻¹; corn stover biochar 162.4 ± 15.0 µg CO₂ g⁻¹ d⁻¹ and biochar with Biosource™ as a feedstock produced as much as 1 022.4 ± 109 µg CO₂ g⁻¹ d⁻¹ (Spokas and Reicosky, 2009). In our study, the methane uptake rate of the raspberry stem biochar at 60% WHC was 5.78 ± 0.17 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ (corresponding to 7 706.66 ± 226.66 ng CH₄ g⁻¹ d⁻¹). The potato stem biochar at a similar moisture level showed an even higher rate at 8.01 ± 0.47 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ (corresponding to 10 680 ± 626.66 ng CH₄ g⁻¹ d⁻¹). Therefore, the methane uptake rates of the biochars were several thousand times higher than any biochar tested by Spokas and Reicosky (2009). It is important to note that during efficient methane absorption by biochar from raspberry and potato stems, CO₂ emissions remained at a very low level. At 60% WHC, the average CO₂ production rate from the raspberry stem biochar was 9.05 ± 0.40 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ (corresponding to 33.15 ± 1.47 µg CO₂ g⁻¹ d⁻¹). The biochar that was the most effective at methane removal, the one made from potato stems, showed an even lower CO₂ production rate, 8.39 ± 0.35 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹ (corresponding to 30.73 ± 1.28 µg CO₂ g⁻¹ d⁻¹).

As yet, there are only a few studies describing the potential of biochars to remove CH₄ present at higher than ambient concentrations. However, this is particularly important when considering the use of biochar as a gas sorbent in ecosystems with increased CH₄ concentrations, such as those occurring in periodically waterlogged arable soils, paddy fields and landfills (Malyan *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2014; Walkiewicz *et al.*, 2020a). For this reason, we included a widely available biochar from common feedstock (Bo) in our experiment. However, Syed *et al.* (2016) conducted a long-term incubation of biochar from pine bark (prepared by pyrolysis at 450°C) at changing CH₄ concentrations. According to that study, non-inoculated biochar

was able to remove from 25% to over 80% of 10 000 ppm (1%) CH₄, but a higher effectiveness of methane removal was observed only after 100 days of incubation.

The mechanisms of effective removal of methane by raspberry and potato stem biochars haven't been elucidated yet. The pattern of CH₄ uptake in our experiment with a multi-day lag phase and a gradual decrease in CH₄ concentration may suggest biological oxidation, especially in the case of the newly produced biochars (Br and Bp). Further evidence for the microbial mechanism of the observed CH₄ oxidation may be deduced from the parallel CO₂ emission and O₂ consumption which were higher at 60% WHC (Fig. 1). These incubation conditions (including a temperature of 25°C) are widely accepted as optimal for methanotrophic bacteria (Malyan *et al.*, 2016; Skopp *et al.*, 1990; Walkiewicz *et al.*, 2020b). In fact, biochar may contribute to CO₂ emissions both biotically (*via* microbial degradation) and abiotically (*via* the release of inorganic C contained in the biochar (Gomez *et al.*, 2014; Gul *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2011)). In the case of the exclusively physical interaction of biochar with the tested gases, higher CO₂ emissions would be expected under full saturation conditions (100% WHC). Carbon dioxide binds to oxygen-containing functional groups via hydrogen bonds (Banik *et al.*, 2018). Thus, water molecules and CO₂ are likely to adsorb to similar functional groups. As such, the direct competition for active sites between water and CO₂ molecules may be observed resulting in higher desorption rates at 100% WHC (Pytlak *et al.*, 2020). The lower bulk density of the new biochars (Br and Bp) in comparison with the well-known materials (Bo and Bs) may result in a higher degree of aeration, gas availability and surface area available for microbial colonization (Table 1). In a field experiment described by Noyce *et al.* (2016) DNA was isolated from biochar which had a long-term (four year) contact with soil. That study showed that biochar was inhabited by similar groups of microorganisms as the adjacent soil. Also, the studies on biochar inoculated with methanogenic Archaea confirm that it may be inhabited by microbes, despite the poor habitat conditions (Schwede *et al.*, 2017).

Along with the advantageous environmental effects of biochar application to soil it is important to consider some economic aspects. Biochar production under anaerobic and high temperature pyrolysis is associated with considerable costs. High energy use leads to adverse environmental consequences as it generates GHGs, mainly CO₂ (Fungo *et al.*, 2014). It should be noted, however, that biochar has the ability to remove CH₄ which (mole for mole) has a Global Warming Potential several dozen times higher than the CO₂ emitted during energy production (Wu *et al.*, 2019). CO₂ was also emitted during the incubation time and that allowed for the determination two important biochar parameters. The first is the CO₂/O₂ ratio, which may be considered as a biochar stability parameter. A low

CO₂/O₂ ratio indicates higher biochar stability. Accordingly, it may be assumed that biochar from Bp and Bs (at 100% WHC) were the most stable, while the one originating from Bo showed the lowest stability under both moisture levels. Moreover, CO₂ production during biochar incubation were more variable than O₂ uptake, which was similar to the results observed by Almeida *et al.* (2019). The climate change mitigation potential of biochars, may be expressed as the changes in the global warming potential (GWP) of the gases which are either adsorbed or released during incubation. It was observed that the effect of biochars on CH₄ and CO₂ exchange depended on the feedstock type and moisture level. At 60% WHC, the change in net GWP in the headspace of potato (Bp) and raspberry (Br) biochar incubations was negative and amounted to -2.187 and -1.876 g CO₂(eq) kg⁻¹, respectively. These values resulted from the great potential of the new biochars to adsorb CH₄. For the sunflower husk biochar (Bs) incubations, net GWP was close to zero (0.016 g CO₂(eq) kg⁻¹) while for the wood offcuts biochar (Bo) it was positive (2.014 g CO₂(eq) kg⁻¹) which was a consequence of the highest CO₂ production and minimal CH₄ absorption. At 100% WHC, net GWP in incubations with Bp was characterized by similar negative values (-2.178 g CO₂(eq) kg⁻¹) as at lower moisture levels. That confirmed usefulness of Bp, especially for waterlogged ecosystems emitting CH₄ into the atmosphere. At higher moisture levels, in the Br and Bs headspaces, net GWP was still negative, yet lower, not exceeding -0.5. At both moisture levels studied, Bo incubations were characterized by a strongly positive net GWP (2.122 g CO₂(eq) kg⁻¹) value. The negative net GWP values (Table 3) and relatively high Br and Bp stability under both moisture levels could be the economic and environmental justification for the application of new biochars. Furthermore, the positive effects of soil enrichment with biochar are long-lasting and apply to many areas, *i.e.* fertility, hydrological and aeration conditions which result in increased crop productivity and a reduced necessity for agrotechnical practices. The trade-offs of economic profits and a reduction in GHG emissions should be included in the evaluations of the consequences of biochar application.

Therefore, it is important to continue research with biochars from new materials produced at lower temperatures in order to find optimal pyrolysis parameters to combine the lowest possible economical costs with maintained or even improved expected properties.

CONCLUSIONS

1. The methane uptake of four biochars was evaluated in a lab experiment. The results showed that two new biochars (from potato and raspberry stems) were able to efficiently remove added 1% CH₄, especially at 60% water holding capacity.

2. The high CH₄ consumption presented by the new biochars has great potential compared to common biochars from wood offcuts or sunflower husks and this could be a way of managing agricultural waste.

3. The advantage of new biochars from raspberry and potato stems over wood offcuts biochar is their significantly lower production of carbon dioxide, yet high methane absorption potential. At 60% water holding capacity, as well as at 100% water holding capacity, the potato stem biochar still showed the highest CH₄ uptake rates with relatively low CO₂ emission and O₂ uptake. Hence the potato stem biochar may be a good choice in ecosystems characterized by relatively high methane concentrations, such as periodically flooded and waterlogged areas, landfills or paddy fields.

4. Based on the CO₂/O₂ ratio, the biochars from sunflower husks and potato stems (at 100% water holding capacity) were the most stable, between the materials tested.

5. As a consequence, it is reasonable to carry out both short-term and long-term studies concerning the various sorptions and emissions of gases by these biochars. It should also be considered whether the observed greenhouse gas dynamics are dependent on physical or biological factors. Knowledge concerning the properties of biochars which enhance methane removal could be used to increase the filtration potential of these highly promising materials.

Conflict of interest: The authors do not declare conflict of interest.

REFERENCES

- Almeida R.F., Spokas K.A., Teixeira D.B., and La Scala Jr, N., 2019. Biochar insights from laboratory incubations monitoring O₂ consumption and CO₂ production. *Biochar*, <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00021-6>
- Banik C., Lawrinenko M., Bakshi S., and Laird D.A., 2018. Impact of pyrolysis temperature and feedstock on surface charge and functional group chemistry of biochars. *J. Environ. Qual.*, 47, 452-461. <https://doi.org/10.2134/jeq2017.11.0432>
- Chistoserdova L. and Kalyuzhnaya M.G., 2018. Current trends in myceliotrophy. *Trends Microbiol.*, 26, 703-714. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.011>
- Coomes O.T. and Miltner B.C., 2017. Indigenous charcoal and biochar production: potential for soil improvement under shifting cultivation systems. *L. Degrad. Dev.*, 28, 811-821. <https://doi.org/10.1002/ldr.2500>
- Farzad S., Taghikhani V., Aminshahidi B., and Lay E.N., 2007. Experimental and theoretical study of the effect of moisture on methane adsorption and desorption by activated carbon at 273.5 K. *J. Nat. Gas Chem.*, 16, 22-30. [https://doi.org/10.1016/s1003-9953\(07\)60021-8](https://doi.org/10.1016/s1003-9953(07)60021-8)
- Fungo B., Guereña D., Thiongo M., Lehmann J., Neufeldt H., and Kalbitz K., 2014. N₂O and CH₄ emission from soil amended with steam-activated biochar. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 177, 34-38. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300495>

- Gomez J.D., Deneff K., Stewart C.E., Zheng J., and Cotrufo M.F., 2014. Biochar addition rate influences soil microbial abundance and activity in temperate soils. *Eur. J. Soil Sci.*, 65, 28-39. <https://doi.org/10.1111/ejss.12097>
- Gul S., Whalen J.K., Thomas B.W., Sachdeva V., and Deng H., 2015. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 206, 46-59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.03.015>
- Guo W., Feng L., Wu D., Zhang C., and Tian X., 2019. Effectiveness of flame for preplant pest management in leaf vegetable fields. *Horttechnology*, 29, 788-794. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04341-19>
- Han X., Sun X., Wang C., Wu M., Dong D., Zhong T., Thies J.E., and Wu W., 2016. Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change. *Sci. Rep.*, 6, 1-10. <https://doi.org/10.1038/srep24731>
- He Y., Zhou X., Jiang L., Li M., Du Z., Zhou G., Shao J., Wang X., Xu Z., Hosseini Bai S., Wallace H., and Xu C., 2017. Effects of biochar application on soil greenhouse gas fluxes: a meta-analysis. *GCB Bioenergy*, 9, 743-755. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12376>
- Huang D., Yang L., Ko J.H., and Xu Q., 2019. Comparison of the methane-oxidizing capacity of landfill cover soil amended with biochar produced using different pyrolysis temperatures. *Sci. Total Environ.*, 693, 133594. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133594>
- IPCC, 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. <https://doi.org/10.1017/cbo9781107415416>
- Jeffery S., Verheijen F.G.A., Kammann C., and Abalos D., 2016. Soil Biology and biochemistry biochar effects on methane emissions from soils: A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 101, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.021>
- Jones D.L., Murphy D. V., Khalid M., Ahmad W., Edwards-Jones G., and DeLuca T.H., 2011. Short-term biochar-induced increase in soil CO₂ release is both biotically and abiotically mediated. *Soil Biol. Biochem.*, 43, 1723-1731. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.018>
- Kammann C., Ippolito J., Hagemann N., Borchard N., Cayuela M.L., Estavillo J.M., Fuertes-Mendizabal T., Jeffery S., Kern J., Novak J., Rasse D., Saarnio S., Schmidt H.P., Spokas K., and Wrage-Mönnig N., 2017. Biochar as a tool to reduce the agricultural greenhouse-gas burden-knowns, unknowns and future research needs. *J. Environ. Eng. Landsc. Manag.*, 25, 114-139. <https://doi.org/10.3846/16486897.2017.1319375>
- La H., Hettiaratchi J.P.A., Achari G., Verbeke T.J., and Dunfield P.F., 2018. Biofiltration of methane using hybrid mixtures of biochar, lava rock and compost. *Environ. Pollut.*, 241, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.039>
- Lehmann J., Rillig M.C., Thies J., Masiello C.A., Hockaday W.C., and Crowley D., 2011. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biol. Biochem.*, 43, 1812-1836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>
- Lehmann J. and Rondon M., 2006. Bio-char soil management on highly weathered soils in the humid tropics. *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*, 3, 517-530. <https://doi.org/10.1201/9781420017113.ch36>
- Luo Y., Yu Z., Zhang K., Xu J., and Brookes P.C., 2016. The properties and functions of biochars in forest ecosystems. *J. Soils Sediments*, 16, 2005-2020. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1483-5>
- Mackay G.R., 2009. *New light on a hidden treasure*. Rome: FAO, 136. *Exp. Agric.*, 45, 376-376. <https://doi.org/10.1017/s0014479709007686>
- Malyan S.K., Bhatia A., Kumar A., Gupta D.K., Singh R., Kumar S.S., Tomer R., Kumar O., and Jain N., 2016. Methane production, oxidation and mitigation: A mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *Sci. Total Environ.*, 572, 874-896. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.182>
- Noyce G.L., Winsborough C., Fulthorpe R., and Basiliko N., 2016. The microbiomes and metagenomes of forest biochars. *Sci. Rep.*, 6, 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep26425>
- Özçimen D. and Karaosmanoğlu F., 2004. Production and characterization of bio-oil and biochar from rapeseed cake. *Renew. Energy*, 29, 779-787. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2003.09.006>
- Pytlak A., Stepniowska Z., Kuźniar A., Szafranek-Nakoneczna A., Wolińska A., and Banach A., 2014. Potential for aerobic methane oxidation in carboniferous coal measures. *Geomicrobiol. J.*, 31, 737-747. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.889783>
- Pytlak A., Sujak A., Szafranek-Nakoneczna A., Grządziel J., Banach A., Goraj W., Gruszecki W.I., and Stepniowska Z., 2020. Water-induced molecular changes of hard coals and lignites. *Int. J. Coal Geol.*, 224, 103481. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2020.103481>
- Qi L., Pokharel P., Ni C., Gong X., Zhou P., Niu H., Wang Z., and Gao M., 2020. Biochar changes thermal activation of greenhouse gas emissions in a rice-lettuce rotation microcosm experiment. *J. Clean. Prod.*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119148>
- Reddy K.R., Yargicoglu E.N., Yue D., and Yaghoubi P., 2014. Enhanced microbial methane oxidation in landfill cover soil amended with biochar. *J. Geotech. Geoenvironmental Eng.*, 140, 1-11. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0001148](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0001148)
- Ribas A., Mattana S., Llorba R., Debouk H., Sebastià M.T., and Domene X., 2019. Biochar application and summer temperatures reduce N₂O and enhance CH₄ emissions in a Mediterranean agroecosystem: Role of biologically-induced anoxic microsites. *Sci. Total Environ.*, 685, 1075-1086. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.277>
- Schwede S., Bruchmann F., Thorin E., and Gerber M., 2017. Biological syngas methanation via immobilized methanogenic archaea on biochar. *Energy Procedia*, 105, 823-829. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.396>

- Skopp J., Jawson M.D., and Doran J.W., 1990. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 1619-1625. <https://doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400060018x>
- Sokolowska Z., Szewczuk-Karpisz K., Turski M., Tomczyk A., Cybulak M., and Skic K., 2020. Effect of wood waste and sunflower husk biochar on tensile strength and porosity of dystric cambisol artificial aggregates. *Agronomy*, 10. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020244>
- Spokas K.A. and Reicosky D.C., 2009. Impacts of sixteen different biochars on soil greenhouse gas production. *Ann. Environ. Sci.*, 3, 179-193.
- Syed R., Saggari S., Tate K., and Rehm B.H.A., 2016. Assessment of farm soil, biochar, compost and weathered pine mulch to mitigate methane emissions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 9365-9379. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7794-z>
- Thomazini A., Spokas K., Hall K., Ippolito J., Lentz R., and Novak J., 2015. GHG impacts of biochar: Predictability for the same biochar. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 207, 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.04.012>
- Tomczyk A., 2020. Biochar physicochemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.*, 19, 191-215. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09523-3>
- Vincent C., Hallman G., Panneton B., and Fleurat-Lessard F., 2003. Management of agricultural insects with physical control methods. *Annu. Rev. Entomol.*, 48, 261-281. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112639>
- Walkiewicz A., Brzezińska M., Wnuk E., and Jabłoński B., 2020a. Soil properties and not high CO₂ affect CH₄ production and uptake in periodically waterlogged arable soils. *J. Soils Sediments*, 20, 1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02525-x>
- Walkiewicz A., Kalinichenko K., Kubaczyński A., Brzezińska M., and Bieganski A., 2020b. Usage of biochar for mitigation of CO₂ emission and enhancement of CH₄ consumption in forest and orchard Haplic Luvisol (Siltic) soils. *Appl. Soil Ecol.*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103711>
- Wu Z., Song Y., Shen H., Jiang X., Li B., and Xiong Z., 2019. Biochar can mitigate methane emissions by improving methanotrophs for prolonged period in fertilized paddy soils. *Environ. Pollut.*, 253, 1038-1046. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.073>
- Xiong X., Liu X., Yu I.K.M., Wang L., Zhou J., Sun X., Rinklebe J., Shaheen S.M., Ok Y.S., Lin Z., and Tsang D.C.W., 2019. Potentially toxic elements in solid waste streams: Fate and management approaches. *Environ. Pollut.*, 253, 680-707. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.012>
- Yang T., Sun W., and Yue D., 2017. Characterizing the effects of biologically active covers on landfill methane emission flux and bio-oxidation. *J. Environ. Eng. (United States)*, 143, 1-9. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001251](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001251)
- Yoo G., Kim H., Chen J., and Kim Y., 2014. Effects of biochar addition on nitrogen leaching and soil structure following fertilizer application to rice paddy soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 78, 852-860. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.05.0160>
- Yu L., Tang J., Zhang R., Wu Q., and Gong M., 2012. Effects of biochar application on soil methane emission at different soil moisture levels. *Biol. Fertil. Soils*, 49. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0703-4>
- Yu Z., Chen L., Pan S., Li Y., Kuzyakov Y., Xu J., Brookes P.C., and Luo Y., 2018. Feedstock determines biochar-induced soil priming effects by stimulating the activity of specific microorganisms. *Eur. J. Soil Sci.*, 69, 521-534. <https://doi.org/10.1111/ejss.12542>
- Zaremba L., 2014. Polish and global market of raspberries and their preserves (in Polish). *Zesz. Nauk. Szk. Głównej Gospod. Wiej. w Warszawie Probl. Rol. Światowego*, 14(29), 148-156.
- Zubkova V., Strojwas A., Bielecki M., Kieush L., and Kovrya A., 2019. Comparative study of pyrolytic behavior of the biomass wastes originating in the Ukraine and potential application of such biomass. Part 1. Analysis of the course of pyrolysis process and the composition of formed products. *Fuel*, 254, 115688. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115688>

6. Tekst Publikacji P.2

Science of the Total Environment 806 (2022) 151259



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol



Adam Kubaczyński^{a,*}, Anna Walkiewicz^a, Anna Pytlak^a, Jarosław Grządziel^b, Anna Gałązka^b, Małgorzata Brzezińska^a

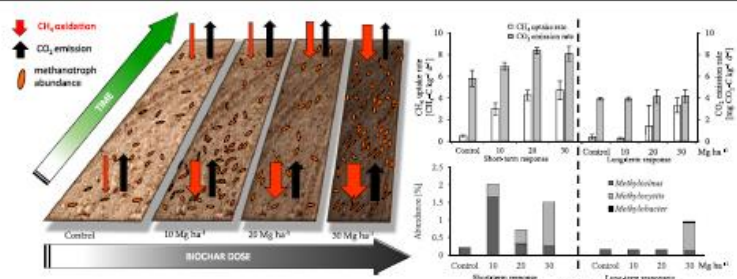
^a Department of Natural Environment Biogeochemistry, Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

^b Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation- State Research Institute (IUNG-PIB), Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland

HIGHLIGHTS

- Biochar addition stimulates methane oxidation in Haplic Luvisol.
- 30 Mg h⁻¹ of biochar maintains the stimulatory effect on methanotrophy for at least 5 years.
- Biochar addition increases the relative abundance of the methanotrophic bacteria.
- *Methylocystis* abundance in soil is promoted by biochar.
- In the short term, biochar addition increases CO₂ emission in Haplic Luvisol.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2021

Received in revised form 6 October 2021

Accepted 22 October 2021

Available online 27 October 2021

Editor: Baoliang Chen

Keywords:

Biochar

Soil

Greenhouse gases

Methanotroph abundance

Methylocystis

ABSTRACT

Biochar promotes C sequestration and improvement of soil properties. Nevertheless, the effects of biochar addition on soil condition are poorly understood, especially with respect to greenhouse gas (GHG) emissions. A large proportion of GHG emissions derive from agriculture and, thus, recognition of the effect of biochar addition to soil on GHG emissions from terrestrial ecosystems is an important issue. The purpose of our study was to evaluate the short- and long-term effects of biochar application on soil in aspects of: GHG exchange (CH₄ and CO₂), basic physicochemical soil properties and structure of microbial communities in *Haplic Luvisol*. Soil was collected from fallow fields enriched with three doses of wood offcuts biochar (10, 20 and 30 Mg ha⁻¹) and incubated at two moisture levels (60 and 100% WHC) with the addition of 1% CH₄. To evaluate the influence of biochar aging in soil, the samples were analysed directly (short-term response) and five years (long-term response) after amendment. Generally, biochar addition increased soil pH, redox potential (Eh), organic carbon (SOC) and dissolved organic carbon (DOC) contents. Under 60% WHC, direct biochar application to the soil resulted in a clear improvement in the CH₄ uptake rate. In contrast to that (at 100% WHC) methane uptake rates were twofold decreased. The positive effect was reduced due to biochar aging in the soil, but five years after application, at 60% WHC and the highest biochar dose (30 Mg ha⁻¹) still significantly enhanced CH₄ oxidation. From a short-term perspective, biochar application increased CO₂ emissions, but after five years this effect was not observed. Microbial tests confirmed that the improvement in CH₄ oxidation was correlated with methanotroph abundance in the soil. Moreover, an increase of *Methylocystis* abundance in the soil enriched with biochar along with enhanced CH₄ uptake rates confirm the positive biochar influence on methanotrophic communities.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail addresses: a.kubaczyński@ipan.lublin.pl (A. Kubaczyński), a.walkiewicz@ipan.lublin.pl (A. Walkiewicz), a.pytlak@ipan.lublin.pl (A. Pytlak), agalazka@iung.pulawy.pl (A. Gałązka), m.brzezinska@ipan.lublin.pl (M. Brzezińska).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

0048-9697/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Climate change is having an increasingly severe impact on the natural environment and human civilisation, making the development of countermeasures a great global challenge (Kammann et al., 2017; Serrano-Silva et al., 2014). One of the main problems to be solved is the sharp increase in greenhouse gas (GHG) emissions. In 2019, global atmospheric concentrations of carbon dioxide (CO₂) reached 410.5 ppm and methane (CH₄) 1877 ppb, which was 148% and 260% of the preindustrial level of CO₂ and CH₄, respectively (World Meteorological Organization, 2020). Particular attention should be paid to CH₄, which has 28 times higher global warming potential (GWP) than CO₂ and is highly dependent on anthropogenic sources (IPCC, 2014). One of the most important determinants shaping the global GHG balance are soil microbial processes which lead to both GHG production and elimination (Chen et al., 2010; Nannipieri et al., 2003; Walkiewicz et al., 2018). Soil respiration is one of the main sources of CO₂ (Wang et al., 2003) while anaerobic (e.g. flooded or compacted) soils are responsible for CH₄ emission into the atmosphere (Das and Adhya, 2012; Walkiewicz et al., 2020a). On the other hand, well aerated soil of sufficient moisture promote stable methanotrophic communities and constitute a sink for CH₄ (Fischer et al., 2009; Kvenvolden and Rogers, 2005; Malyan et al., 2016; Nosalewicz et al., 2013).

It is estimated that soils are responsible for as much as 5–20% CO₂ and 10–30% global CH₄ emissions annually (Kammann et al., 2017; Wu et al., 2019a). It is therefore particularly important to reduce their negative impact on the global GHGs budget. Since the physicochemical properties of soil create habitats for microbial activity, and consequently determine the direction and intensity of biogeochemical processes (Chen et al., 2014; Wang et al., 2003). Several practices are currently considered to improve soil quality and reduce GHGs emission. One of the proposed means is soil enrichment with biochar, defined as organic (and usually waste) materials pyrolyzed in zero or low oxygen conditions (Han et al., 2016; Lehmann and Rondon, 2006).

There is an ongoing debate about the biochar impact on GHGs emission (Li et al., 2018; Zhao et al., 2021). Some data show that biochar amendment doesn't significantly affect emissions or even increase GHGs production in soil (Fungo et al., 2014; He et al., 2017; Ribas et al., 2019; Spokas and Reicosky, 2009; Zimmerman et al., 2011). However, there is growing evidence that biochar addition can also reduce emission of CH₄ and CO₂ into the atmosphere. A number of experiments have shown the effectiveness of biochar in decreasing GHG emissions from various types of soil (Lentz et al., 2014) including paddy soils (Feng et al., 2011) and silt loam (Karhu et al., 2011). Moreover, our previous study confirmed the positive influence of biochar amendment on CH₄ consumption, especially in saturated soil (Walkiewicz et al., 2020b).

Soil DNA analyses are widely used to obtain information on soil microbial diversity and help monitor soil processes related to GHG exchange (Szafranek-Nakonieczna et al., 2019; Wnuk et al., 2020). Research focused on the effect of biochar on methanotrophic communities has suggested that biochar amendment improves biodiversity and abundance of the methane oxidizing microbiota in paddy soils (Han et al., 2016; Huang et al., 2019b; Qin et al., 2016; Wu et al., 2019b). Han et al. (2016) reported that biochar amendment decreased CH₄ emissions from paddy soil due to the inhibition of methanogens and stimulation of methanotrophs. Qin et al. (2016) showed that biochar amendment may be linked to reduced CH₄ emissions, increased biodiversity and an abundance of methanotrophs in rice field soil. The same study indicated *Methylocystis* as a one of the most important genus of methanotrophic bacteria, which was stimulated by biochar addition (Qin et al., 2016). It is important as those bacteria are the one of the most common methanotrophs, responsible for both low and high affinity methane utilization in soil (Bani and Liesack, 2008) and even the minor participation of *Methylocystis* in the total bacterial

community may have a key role on CH₄ uptake (Knief et al., 2003; Szafranek-Nakonieczna et al., 2019). It has been suggested that methanotrophic bacteria are affected by the increased labile C and N contents, elevated pH and better aeration that provide favourable microhabitats for soil microbiota (Jeffery et al., 2016; Ouyang et al., 2014; Ribas et al., 2019). In contrast to the studies conducted on paddy soils, research efforts focused on mineral soils require recognition to confirm the correlation between the biochar-driven decrease in methane flux and changes in the structure of methanotrophic communities (Feng et al., 2011; Liu et al., 2011; Wang et al., 2012).

Wide biochar application appears to be a very promising method for improving soil quality and reducing GHG emissions (Hui, 2021). Nevertheless, given the great variety of soils and biochars, the topic requires further extensive research. One of the main questions involves the time aspect and the significance of biochar aging in soil, especially in relation to GHG mitigation. Previous studies related to the effects of biochar have mainly focused on the physical and chemical properties of the soil. It was found that it improves soil fertility, aeration, water retention and increases C sequestration (Coomes and Miltner, 2017; Luo et al., 2016). Those effects are considered to be long-lasting, e.g. a study on grassland soil reported improvement in water retention and soil organic carbon (SOC) mineralization with 3-year aged biochar (Paetsch et al., 2018). Nevertheless, there is a lack of long-term studies on how biochar influences GHG exchange between soil and the atmosphere. Additionally, the long-term effect of biochar application on methanotrophic communities remains largely unknown, although is very valuable to clarify the factors influencing for agricultural GHG emissions.

We hypothesise that biochar may enhance CH₄ oxidation and increase the abundance of methanotrophic bacteria in Haplic Luvisol by improving soil properties (e.g. pH, moisture, aeration) and thereby creating better conditions for methanotrophic activity. We also hypothesise, that the influence of biochar on CH₄ oxidation, accompanying CO₂ emissions and microbial community structure is correlated with time (negatively) and dose (positively) due to the variable amount of biochar in soils, which form crucial places for microbial adhesion and colonisation.

Taking into account the knowledge gaps, two experiments were performed to evaluate the short-term and the long-term responses of methanotrophic activity in soil to biochar application. The aims of this study on Haplic Luvisol were to determine: i) the time-dependent effectiveness of biochar (at doses of 10, 20, 30 Mg ha⁻¹) in CH₄ oxidation, ii) the accompanying CO₂ emissions and O₂ uptake, iii) changes in soil microbial communities directly after biochar application (as a short-term soil response) and five years after biochar application (as a long-term soil response). To ensure that our results have a broad meaning, the chosen soil (Haplic Luvisol) represents the type commonly found in the temperate zone and often utilised for agricultural purposes (Tóth et al., 2008), while the biochar used for soil amendment was produced from wood offcuts; it being a common waste material.

2. Materials and methods

2.1. Tested soils and biochar

The experimental fields are situated in south-eastern Poland (51°15'N, 22°35'E), as described by Usowicz et al. (2016). The field experiment started in spring 2013, when the biochar was applied to fallow in the amounts of 0 (control), 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹. Biochar was mixed with soil to a depth of 0–15 cm using a rototiller. During the experiment, the fields were maintained without plants.

The tested soil was collected in 2018 from the experimental fallow field (F) divided into four subplots (each of 20 m²), from a depth of 0–15 cm. In each sub-plot, soil was collected in three replications and mixed to prepare reference samples. According to the WRB classification, the soil was Haplic Luvisol derived from loess material (IUSS

Working Group WRB, 2006), characterised by 7.1 g kg^{-1} soil organic carbon (SOC), 23.3 mg dm^{-3} dissolved organic carbon (DOC), pH (H_2O) of 5.74 (Table S1) with sand, silt and clay contents of 66%, 23% and 11%, respectively (Usowicz et al., 2016). After collecting, the soil samples were air-dried, sieved through a 2 mm mesh sieve and stored in the dark at room temperature in hermetic containers.

The biochar used in this study was produced from wood offcuts by pyrolysis at 350–400 °C by a local company (Fluid SA, Sędziszów, Poland). Biochar characterization includes pH in H_2O (8.27), redox potential (Eh 142 mV), bulk density (235 kg m^{-3}), C content (664.6 g kg^{-1}), N content (11.3 g kg^{-1}), C/N ratio (59) and DOC content ($298.31 \text{ mg dm}^{-3}$).

The SOC and DOC contents were measured with a TOC- $V_{\text{C}_{\text{PH}}}$ analyser (Shimadzu, Japan) (Yu et al., 2018). Soil and biochar pH and Eh were determined potentiometrically in H_2O (Sokołowska et al., 2020; Yoo et al., 2014) with a HQ40D Portable Multi Meter analyser (Hach Lange). Biochar C and N contents were determined using an elemental analyser (Perkin Elmer CHN 2400). The bulk density of soil and biochar were calculated based on its weight at 15 °C, at a volume of 10 cm^3 (Özçimen and Karaosmanoğlu, 2004).

2.2. Laboratory experiment description

Two sampling procedures were used:

- 1) to study the short-term soil response, the samples were collected in three replications only from control plot of the field experiment to determine the direct effect of biochar on the processes under investigation. The soil was air-dried, sieved through a 2 mm mesh sieve, weighed into glass bottles, and then enriched with biochar in a laboratory and directly before incubation, in the amounts corresponding to the field doses of 0, 10, 20 and 30 Mg ha^{-1} ,
- 2) for the study of the long-term soil response, the samples were taken from all the field variants to determine the effect of five-year aging of the biochar in the soil.

All the samples were incubated in controlled laboratory conditions under 60% and 100% of soil water holding capacity (WHC). The 60% WHC has been considered optimal for aerobic soil microbiota, whereas the 100% WHC corresponded to soil saturation that may occur in anaerobic soil clods, large aggregates and hotspots, that may also be a source of methane when the soil is not flooded (Walkiewicz et al., 2020a). In fact, anoxic microsites can persist when bulk soil is aerated, thus supporting the activity of anaerobic microorganisms (Ebrahimi and Or, 2018; Horn et al., 1994; Sey et al., 2008). The WHC of soil and biochar was determined in separate tests using the modified method of Pramer and Schmidt (1964). In this regard, 50 g of air-dried soil sample (or 9 g of air-dry biochar sample) was placed on the filter fabric inside a brass ring. Next, the rings were placed on a shallow pan of water allowing for the samples to become wet. Once the samples were saturated, the rings were removed from the pan of water and placed in a chamber with high air humidity, until free gravity drainage finished. To determine WHC level, the difference in wet and dry (dried at 105 °C by 24 h) sample weight was used (Yoo et al., 2014).

The incubation procedure in the laboratory was as follows: 20 g of air-dried soil sample from each experimental treatment was weighted into 120 cm^3 glass bottles and adjusted to 60% or 100% WHC level by dripping on the sample surface the appropriate volumes of distilled water. The vessels were closed for the purpose of three-day preincubation at 25 °C. The main experiment was started after the glass bottles were ventilated and closing again with rubber stoppers and aluminium caps. Next, the headspace was enriched with 1% CH_4 (v/v).

The concentration of CH_4 , CO_2 and O_2 in the headspace was determined during 28 incubation days (at 25 °C, in darkness) (Chiu

and Huang, 2020; Walkiewicz et al., 2020b). The gas chromatograph (Shimadzu, Japan) used was fitted with a flame ionisation detector (FID) for CH_4 and CO_2 analysis and an electron capture detector (ECD) for O_2 . PoraPLOT Q and Restek Q-BOND columns were used (major parameters: column flow - $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, split ratio - 5:1, oven temperature - 30 °C, injection volume - 150 μL and purge flow - $3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) with helium as a carrier gas. For calibration, an external standard - 1% CH_4 in He and 20.9% O_2 in N_2 (Air Products) was used (Walkiewicz et al., 2020a). On the last incubation day, the glass bottles were opened and the soil pH was measured.

2.3. Microbiological analysis

Microbial genomic DNA was extracted from soil samples after 28 days of incubation, in duplicate, using a PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the supplementary instructions. The date of sampling also marked the end of incubation time. The V4 region of the 16S rRNA gene amplicons were sequenced (in pooled samples) according to 16S Illumina Amplicon Protocol EMP policy (Thompson et al., 2017) with MiSeq Illumina technology (Genomed Inc., Poland). The universal primers used for 16S rRNA (II) amplification were 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGTAA) and 806R (5'-GGACTACNVGGGTWCTAAT).

Demultiplexed fastq files which were processed using the DADA2 (1.14) package (Callahan et al., 2016) in R software (3.6.0) (R Core Team, 2016). Forward and reverse reads were trimmed to 250 bp and primer sequences were removed from all reads. Filtering parameters were as follows: $\text{maxN} = 0$, maxEE for both reads = 2, $\text{truncQ} = 2$. The error rates were estimated by *learnErrors* using one million reads and exact sequence variants were resolved using *dada*. Next, *removeBimeraDenovo* was used to remove chimeric sequences. After the filtration steps, 111,363–156,789 (mean = 135,458) of the reads were left for further analysis. Taxonomy was assigned against the latest version of the modified Silva SSU v r138 database (http://www2.decipher.codes/Classification/TrainingSets/SILVA_SSU_r138_2019.RData) using IDTAXA (Murali et al., 2018) on the sequences table resulting from the DADA2 workflow described above. The results were converted and imported into the *phyloSeq* (1.22.3) package (McMurdie and Holmes, 2013). Sequences belonging to the chloroplast or mitochondrial DNA were removed. Subsequently, for further analysis, the total number of reads for the individual taxa were converted to a percentage, assuming the sum of all taxa in the individual samples as 100%. On average, 62% of all reads, which were correctly classified to the genus level, were aggregated and their abundances were summed. Unclassified reads were clustered using *vsearch* (Rognes et al., 2016) implemented in seed software, version 2.1 (Větrovský et al., 2018) at a 97% similarity level. Each of 1175 clustered groups of unclassified reads were then named from Unclassified_0001 to Unclassified_1175 and merged with the previous table (containing reads classified to the genus level). This approach enabled the statistical processing of true alpha and beta diversity, regardless of whether a sequence exists in the reference database or not. In total, 1563 unique taxa (at the genus level plus unclassified cluster) were detected in all samples. Alpha diversity indices were calculated using the *phyloseq* package.

The 16S rRNA amplicon sequencing data generated in this study was deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject number PRJNA729906.

2.4. Calculation and statistical analysis

Water holding capacity ($\text{g H}_2\text{O g}^{-1}$) was calculated based on the difference between the masses of the wet (after gravity drainage) and dry soil samples (after drying) according to Walkiewicz et al., 2020b; Yu et al., 2018 from the Eq. (1):

$$WHC = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (1)$$

m_w is the mass of sample after gravity drainage (g)
 m_d is the mass of sample after drying at 105 °C (g)

The methane uptake rate ($\text{mg CH}_4\text{-C kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) was determined based on the difference between the initial (the lag phase for CH_4 was excluded) and final gas concentrations on the last incubation day, and divided by time of apparent CH_4 uptake (Eq. (2)) (Wnuk et al., 2017).

$$\text{CH}_4 \text{ uptake rate} = \frac{C_{\text{initial}} - C_{\text{final}}}{t} \quad (2)$$

C_{initial} is the initial uptake CH_4 concentration in headspace ($\text{mg CH}_4\text{-C kg}^{-1}$)
 C_{final} is the final CH_4 concentration in headspace ($\text{mg CH}_4\text{-C kg}^{-1}$)
 t is number of incubation days with CH_4 uptake

The carbon dioxide production rate ($\text{mg CO}_2\text{-C kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) was calculated similarly, but in this case the difference in CO_2 concentration between the last and first incubation day was calculated due to the continuous emission of this gas (Eq. (3)) (Walkiewicz et al., 2020a).

$$\text{CO}_2 \text{ production rate} = \frac{C_{\text{final}} - C_{\text{initial}}}{t} \quad (3)$$

C_{final} and C_{initial} is the final and initial, respectively, CO_2 concentration in the headspace ($\text{mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$)
 t is number of incubation days

The results were statistically processed with Statistica 13 software (TIBCO Software Inc.). A one-way ANOVA (Tukey HSD post-hoc test) was used to test the significance of the differences in CH_4 uptake and CO_2 emission rates between the soil treatments (separately for 60% and 100% WHC).

The Spearman rank-order correlation coefficient was used to measure the strength and direction of association between the greenhouse gas (GHG) release rate and environmental parameters. A graphical display of the correlation matrix was created using the "Heatmap illustrator" package in TTools software (Chen et al., 2020). The level of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

A multi-factor analysis of variance (MANOVA) was used to determine the significance of three factors: (A) biochar aging time in soil, (B) biochar dose, and (C) soil moisture on the CH_4 uptake and CO_2 emission in Haplic Luvisol (Table S2).

3. Results

3.1. Physical and chemical analyses

Soil parameters create different conditions for methanotrophic activity. Wood offcuts biochar applied to Haplic Luvisol had an eightfold

higher WHC than enriched soil and achieved $3.47 \pm 0.02 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$. Despite that, in the short-term response, biochar addition didn't significantly enhance soil WHC. However, after five years of natural biochar aging, all doses effectively improved the WHC of the soil by 5.5 to 15%, in comparison to the control (Table 1).

Under 60% WHC biochar addition significantly increased pH both in the short- and long-term response experiments. However, in the short-term response, the differences between the control soil and the highest biochar dose exceed 1 unit, while in the long-term those pH differences were close to 0.5 units (Table 1). Under 100% WHC, pH values measured after both incubations were generally higher than under 60% WHC. Directly after biochar application, all tested doses significantly enhanced pH, but five years after soil enrichment with biochar, only the two highest doses significantly increased pH. The highest value of pH (6.16) was achieved in the soil incubated under saturation and directly after addition of highest biochar dose.

3.2. Gases (CH_4 , CO_2 , O_2) exchange

3.2.1. Short-term and long-term soil response under 60% WHC

The experiments show that methane oxidation in Haplic Luvisol was positively affected by biochar addition and that the stimulatory effect lasted at least 5 years. Control soil samples (without biochar) incubated under 60% WHC showed the lowest CH_4 uptake, since only $4.04 \pm 3.6 \text{ mg CH}_4\text{-C kg}^{-1}$ (Fig. 1A) and $7.99 \pm 2.59 \text{ mg CH}_4\text{-C kg}^{-1}$ (Fig. 1B) of added methane was finally consumed in the short-term and long-term response experiment, respectively. The short-term soil response (determined directly after biochar addition) showed that, even the lowest biochar dose (corresponding to 10 Mg ha^{-1}) clearly improved CH_4 consumption (Fig. 1A). Methane uptake in this treatment started after a 15-day lag phase and circa 78.86% ± 36.4 of the added CH_4 was finally consumed within the experimental timeframes. However, the methane was completely oxidised in soil samples with higher biochar doses (corresponding to 20 and 30 Mg ha^{-1}) by the 25th day of incubation, after a shorter, eight-day lag phase. Assays performed five years after the soil was enriched with biochar (long-term soil response), revealed that the dose of 10 Mg ha^{-1} was no longer effective in CH_4 removal. (Fig. 1B). However, a significant improvement in methane oxidation was still found in the soil supplemented with 20 Mg ha^{-1} of biochar ($19.23\% \pm 9.55$ of CH_4 was consumed by the end of incubation). The long-term soil response test shows that the highest biochar dose (30 Mg ha^{-1}) strongly stimulated methane oxidation in the tested soil since CH_4 was depleted within ten days, after a 17-day lag phase.

The CH_4 uptake rates in soil enriched with biochar were from $2.67 \pm 0.49 \text{ mg CH}_4\text{-C kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ (in the case of dose of 10 Mg ha^{-1}) to $4.23 \pm 0.76 \text{ mg CH}_4\text{-C kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ (after addition of 30 Mg ha^{-1}), and those values were up six to even tenfold higher in comparison to the control. In assays performed five years after biochar application, only the highest dose of biochar (30 Mg ha^{-1}) was still found to significantly improve soil CH_4 uptake under 60% WHC. In this case, the methane uptake rate

Table 1

Water holding capacity (WHC) and pH of soils from fallow fields incubated without biochar (control) and with biochar in 10, 20 and 30 Mg ha^{-1} doses (avg \pm SD, $n = 3$). Different letters indicate significant differences between the short- and long-terms of biochar application in appropriate dose. Asterisks mean a significant difference to the adequate control (The Tukey test, $p < 0.05$).

Term of biochar application	Biochar dose [Mg ha^{-1}]	WHC [$\text{g H}_2\text{O g}^{-1}$]	pH under 60% WHC	pH under 100% WHC
Short-term response	Control	0.432 ± 0.002 (a)	4.51 ± 0.03 (a)	5.07 ± 0.02 (a)
	10	0.428 ± 0.007 (a)	$4.84 \pm 0.04^*$ (a)	$5.67 \pm 0.02^*$ (a)
	20	0.437 ± 0.004 (a)	$5.35 \pm 0.15^*$ (a)	$5.97 \pm 0.04^*$ (a)
	30	0.441 ± 0.004 (a)	$5.62 \pm 0.07^*$ (a)	$6.16 \pm 0.02^*$ (a)
Long-term response	Control	0.432 ± 0.002 (a)	4.82 ± 0.06 (b)	5.47 ± 0.06 (b)
	10	$0.456 \pm 0.009^*$ (b)	$5.04 \pm 0.04^*$ (b)	5.57 ± 0.06 (a)
	20	$0.486 \pm 0.009^*$ (b)	$5.04 \pm 0.03^*$ (b)	$5.68 \pm 0.05^*$ (b)
	30	$0.497 \pm 0.008^*$ (b)	$5.28 \pm 0.03^*$ (b)	$5.99 \pm 0.08^*$ (b)

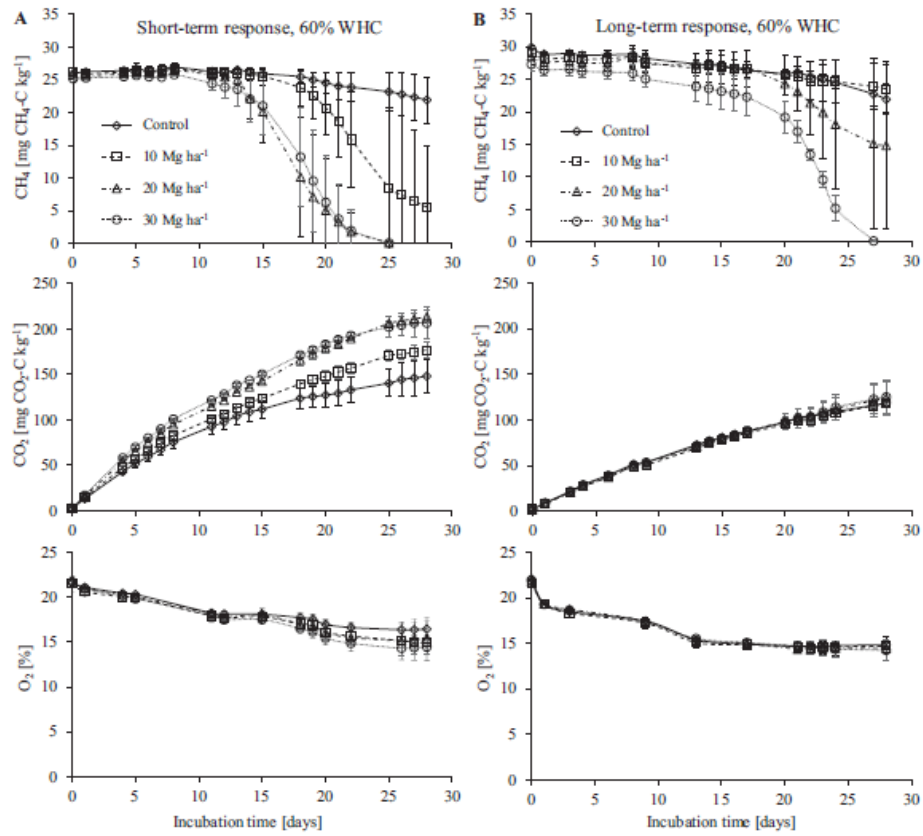


Fig. 1. Changes in CH₄, CO₂ and O₂ concentration over time during the methanotrophy study (with 1% CH₄ addition) in soil incubated under 60% WHC without biochar (control) and soil with biochar in 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹ doses directly after application (A: short-term response) and five years after application (B: long-term response) (avg. ± SD, n = 3).

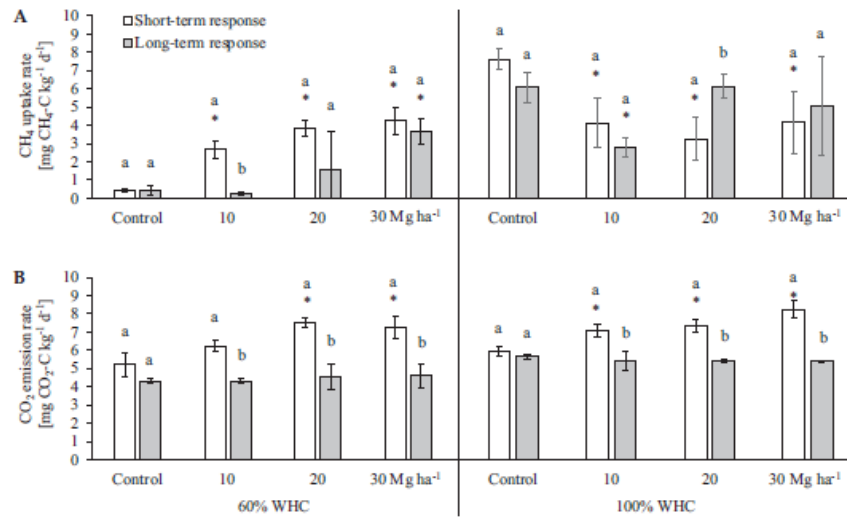


Fig. 2. Methane uptake rates (A) and carbon dioxide emission rates (B) in soil without biochar (control) and soil with biochar (corresponding to 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹) directly after application (short-term response) and five years after biochar application (long-term response) incubated with 1% CH₄ (v/v) under 60% and 100% WHC (avg. ± SD, n = 3). Different letters indicate significant differences between the short- and long-term responses for particular biochar doses. Asterisks mean a significant difference to the relevant control (The Tukey test, p < 0.05).

reached $3.66 \pm 0.74 \text{ mg CH}_4\text{-C kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, which was eight times higher in comparison to the control without biochar. Directly after biochar application, under 60% WHC, even the lowest dose (10 Mg ha^{-1}) significantly increased the methane uptake rate to level similar to that in higher doses of biochar. However, five years after biochar application, the effect of the lowest biochar dose was imperceptible and only 30 Mg ha^{-1} stimulated CH_4 uptake in comparison with the control (Fig. 2A).

Soil CO_2 emissions accompanying methane uptake were affected by the biochar, but only when tested directly after its application. The short-term response showed that soil samples with different biochar doses varied in their CO_2 emissions (Fig. 1A). During incubation, soil with the two highest biochar doses produced clearly more CO_2 than the control and the soil with the dose of 10 Mg ha^{-1} (Fig. 1A, middle panel). On the last day of incubation, CO_2 concentrations in the 20 and 30 Mg ha^{-1} treatments were $213.44 \pm 7.4 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$ and $206.35 \pm 17.41 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$, respectively. At the lowest biochar dose, CO_2 remained below $180 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$, while in the control soil it was $148.05 \pm 18.73 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$. The CO_2 emissions measured in the soil collected five years after biochar amendment (long-term response) was low and similar to that in the control (Fig. 1B, middle panel). Final, cumulative CO_2 concentrations ranged from $118.19 \pm 3.26 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$ to $125.05 \pm 17.64 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1}$.

Directly after biochar application, the CO_2 emission rate was significantly higher for 20 and 30 Mg ha^{-1} , reaching $7.52 \pm 0.26 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $7.26 \pm 0.62 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectively

(Fig. 2B). The long-term response of CO_2 emissions was similar to that in the control soil regardless of the used dose.

In the short-term soil response experiment, the O_2 level decreased from ambient to $16.47\% \pm 0.86 \text{ v/v}$ in the control, and to $14.47 \pm 0.89\% \text{ v/v}$ in soil with biochar dose of 30 Mg ha^{-1} (Fig. 1A, lower panel). In contrast, the long-term response experiment revealed that O_2 uptake did not differ among the treatments after five-year aging of biochar in the soil, and in all experimental sets the final O_2 concentration was between 14 and 15% v/v (Fig. 1B, lower panel). It should be noted that CO_2 and O_2 concentrations, in contrast to CH_4 , showed low variability among the replications, which resulted in small values of standard deviation.

3.2.2. Short-term and long-term soil response under 100% WHC

Soil samples enriched with biochar and incubated at higher moisture level (100% WHC) showed different dynamics for methane uptake than those incubated at the lower moisture level. The control soil (without biochar) completely and clearly more quickly depleted the added CH_4 (in 15 days in both the short- and long-term response tests) (Fig. 3A, B). In the short-term response, a prolongation of the lag phase was observed, from 8 days in the control up to 11–13 days in soil samples enriched with biochar (Fig. 3A). The time needed for CH_4 depletion was generally longer in the samples with biochar than in the control and lasted to the end of the 28-day incubation period (Fig. 3A). In the long-term experiment, similarly to the short-term study, CH_4 oxidation started earlier and was more rapid in the control than in the

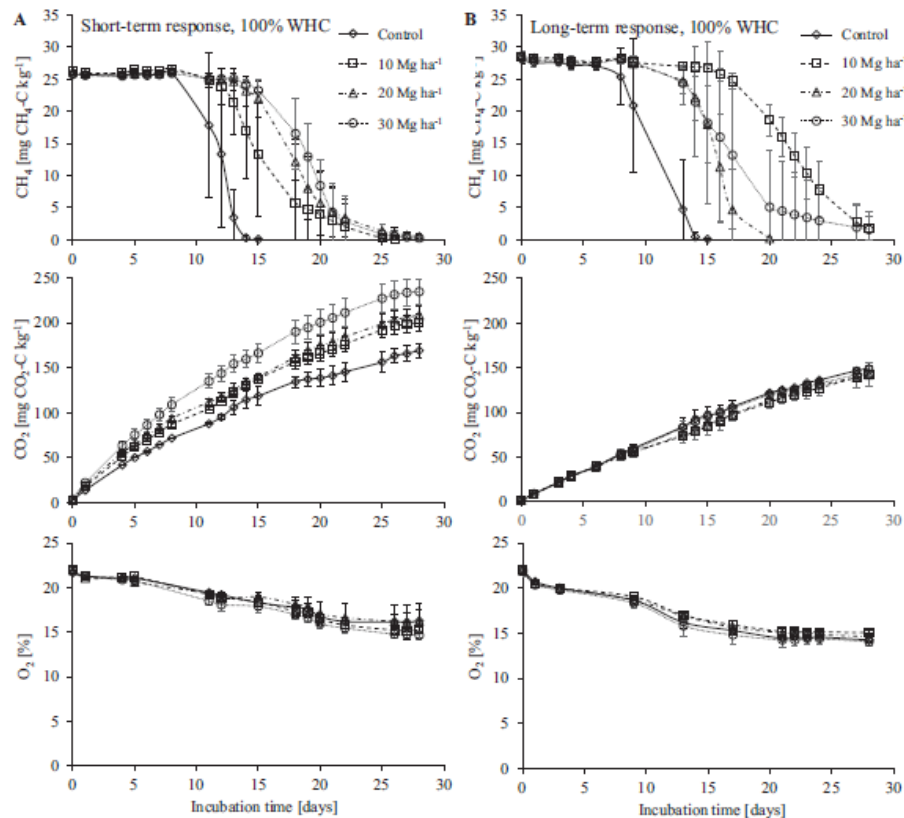


Fig. 3. Changes in CH_4 , CO_2 and O_2 concentration over time during the methanotrophy study (with 1% CH_4 addition) in soil incubated under 100% WHC without biochar (control) and soil with biochar in 10, 20 and 30 Mg ha^{-1} doses directly after application (A: short-term response) and five years after application (B: long-term response) (avg. \pm SD, $n = 3$).

biochar treatments. In the soil samples with the two highest biochar doses (20 and 30 Mg ha⁻¹) the lag phases were identical (9 days), but complete methane oxidation lasted ca. 20 days and 28 days, respectively. The soil with the 10 Mg ha⁻¹ dose of biochar was characterised by clearly the longest lag phase (14 days) and all the added methane was consumed by the end of incubation. In fact, in the 10 and 30 Mg ha⁻¹ treatments (under 100% WHC), low CH₄ concentrations were still present in the headspace at the end of incubation of the soils with five-year aged biochar.

Soil samples incubated under saturation (100% WHC) showed higher methane uptake rates than under 60% WHC. Differences between the two moisture levels were clearly visible, especially in the control soil (Fig. 2A). Directly after biochar application to the soil under 100% WHC, the methane uptake rates were: 4.13 ± 1.33 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹, 3.26 ± 1.2 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ and 4.15 ± 1.74 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹ in the variants with doses of 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹, respectively. Under soil saturation, all biochar doses caused ca. twofold decrease in methane uptake rates in comparison to the control soil (7.64 ± 0.58 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹). The methanotrophic activity of the soil samples under 100% WHC enriched with a biochar dose of 20 Mg ha⁻¹ was significantly higher five years after biochar application (6.17 ± 0.69 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹), than directly after amendment (3.26 ± 1.2 mg CH₄-C kg⁻¹ d⁻¹).

In the short-term response of the soil under 100% WHC, we observed increasing CO₂ concentration in the soil samples corresponding with increasing biochar dose (Fig. 3A, middle panel). Final, cumulative CO₂ emissions in the control were 169.25 ± 7.54 mg CO₂-C kg⁻¹, while after biochar addition it ranged from 200.72 ± 10.22 mg CO₂-C kg⁻¹ to 234.81 ± 14.21 mg CO₂-C kg⁻¹. In the long-term response, CO₂ emissions were similar in all treatments (about 140 mg CO₂-C kg⁻¹) (Fig. 3B, middle panel). Similarly to lower moisture level, under soil saturation, CO₂ emissions were significantly higher directly after biochar application (Fig. 3A, middle panel) than after five years of natural biochar aging in soil (Fig. 3B, middle panel).

Under 100% WHC, soil samples incubated directly after biochar enrichment showed significantly higher CO₂ emission rate (from 7.07 ± 0.36 to 8.26 ± 0.51 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹), than the control soil (5.95 ± 0.27 mg CO₂-C kg⁻¹ d⁻¹) (Fig. 2B). Similarly to soil samples incubated at lower moisture level, CO₂ emission rates in saturated soils were higher directly after biochar application (10, 20 and 30 Mg ha⁻¹), in comparison to the long-term experiment. Five years after enrichment of saturated soil with biochar, the CO₂ emission rates were at a similar level as in the control soil regardless of the used dose.

With regard to O₂ uptake, there were no apparent differences among the tested variants, regardless of the period of biochar aging in the soil, reaching between 14 and 15% (v/v), (Fig. 3, lower panel).

3.3. Microbial identification

3.3.1. Microbial community structure

The microbial community structure of the soil samples was analysed in treatments that were studied for short- and long-term effects of biochar addition. Treatments with 60% WHC were chosen as best reflecting field conditions. A total of 34 phyla (Archaea and Bacteria domains) were found in the tested soil samples. In the short-term response, bacterial communities were dominated by *Proteobacteria*, which ranged from 36.59 to 39.52%, *Actinobacteriota* (17.65 to 21.45%), *Acidobacteriota* (6.09 to 9.59%), *Firmicutes* (5.35 to 9.92%), *Gemmatimonadota* (4.10 to 6.24%), *Chloroflexi* (3.95 to 4.94%), *Planctomycetota* (3.54 to 4.04%), *Crenarchaeota* (2.95 to 4.08%) and *Mycococcota* (2.65 to 3.56%). Other phyla were represented by a relative abundance of less than 3%. The relative abundances of each phylum is shown in Fig. S1. Irrespective of biochar dose, two main phyla (*Proteobacteria* and *Actinobacteriota*) were at a similar level. The direct response of the microbial community to biochar addition was a reduction in *Firmicutes* abundance by about 28.13% for the dose of 10 Mg ha⁻¹ and about 46.07% after addition of

30 Mg ha⁻¹. Simultaneously, an increase in the number of sequences belonging to *Acidobacteriota* could be observed (from 16.78% at 10 Mg ha⁻¹ to 57.73% at the highest biochar dose).

Analysis of the long-term response showed more visible changes in the microbial communities. *Proteobacteria* were still the most abundant phylum (45.7% in control), but its abundance decreased substantially with biochar dose, reaching 28.74% at 30 Mg ha⁻¹. Simultaneously, the number of sequences belonging to the second largest group (*Actinobacteriota*) rose from 18.19% in control to 25.03% in the soil with the highest biochar dose. Similarly, increased abundance related with increasing biochar dose was observed for phyla: *Acidobacteriota*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* and *Verrucomicrobiota*.

Based on the comparison of microbial community structure changes over time (short-term and long-term response), it can be concluded that in the short-term perspective, biochar addition had little effect on the abundance of the main phyla. In the long-term perspective, at that level, the rebuilding of the microbial communities was noticeable only in the biochar doses of 20 and 30 Mg ha⁻¹.

Throughout the experimental timeframes, the most abundant genera in the studied soil were in the *Sphingomonas*, *Gaiella* and *Massilia*. These genera dominated in the control soil as well as in majority of the biochar-amended treatments. Only in the soil sampled 5 years after biochar application, at two highest doses (20 and 30 Mg ha⁻¹), did *Gaiella* become dominant.

The major differences between short- and long-term biochar application were an increase in the number of *Candidatus Koribacter* and *Candidatus Udaeobacter* and decrease in *Bacillus* taxa after five years. The heatmap below (Fig. 4) shows in detail the relative abundances of bacteria at the genus level in the studied soil treatments. A Bray-Curtis-based distance tree demonstrated clearly that although the communities were very similar, they could be clustered, with the sampling time being the main differentiating factor. The effect of biochar addition on reshaping of the microbial communities was visible at a dose of 20 Mg ha⁻¹ and higher.

3.3.2. The effect of biochar addition on α -diversity

Generally, the studied soil was characterised by high microbial diversity, which was reflected in the values of the calculated indices (Table 2). Simpson1-D index ranged from 0.983 to 0.985 in the short-term response to biochar application and from 0.977 to 0.987 for samples collected five years after biochar application. A similar trend was shown in the Shannon H index, which was in the range of 5.008 to 5.122 and 4.832 to 5.23, respectively (Table 2). There was no clear dominance pattern. The sequences representing the most abundant taxa (>4%) represented up to 22% of total reads.

Biochar addition was found to slightly improve soil microbial diversity, which consequently grew with biochar dose. The effect of time was also noticeable, the number of taxa in considered doses was clearly higher after five years of biochar presence in soil than in the beginning of the experiment (short-term response). The increase in the number of ASVs, stated after short-term biochar presence in the soil was from 4.06% to 11.49% (compared to unamended control). Five years after enrichment, the positive effect of supplementation was more visible, with an increase in the number of unique amplicon variant sequences (ASVs) by 17.22% in the soil with highest biochar dose (30 Mg ha⁻¹).

3.3.3. Methanotrophic bacteria

Methanotrophic community transformation on biochar addition to Haplic Luvisol is shown in Fig. 5. The most abundant genera were *Methylosinus* and *Methylocystis*, followed by *Methylobacter*. *Methylosinus* was the only genus represented in all tested variants. In the samples studied, to assess the short-time effect of biochar application, the relative abundance of this genus was in range of 0.21% to 1.67%, with the values noted in the control being several times lower than in the amended soils. Five years after biochar addition, *Methylosinus* abundance in the control soil was very similar to the initial

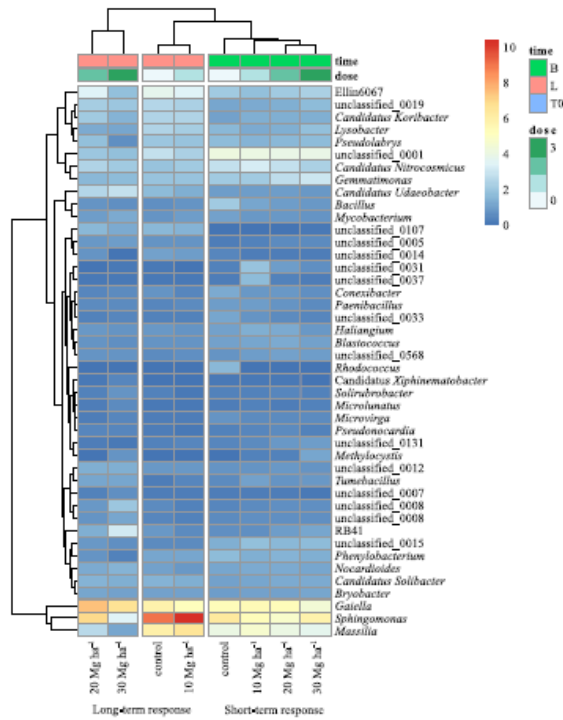


Fig. 4. Hierarchically clustered heatmap analysis of the highly represented bacterial and archaea taxa (at the genus and species levels) found in Haplic Luvisol without biochar (control) and soil with biochar (corresponding to 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹) directly after application (short-term response) and five years after biochar application (long term response) incubated with 1% CH₄ (v/v) under 60% WHC. The relative percentages of the bacterial genera are presented by different colour intensities, according to the legend situated at the top of the figure. Bacterial genus names are quoted on the right side of the heatmap. Dendrograms at the top and left side of the heatmap indicate the phylogenetic relation between the treatments and genus. The cluster analysis of bacterial community structure was generated based on Bray-Curtis distances between samples. The intensity of the cell colour corresponded to the abundance of the amplicons belonging to a given genus.

value. It is noteworthy that the stimulatory effect of biochar was not maintained and in the microbial communities representing the amended soils, sequences affiliated to *Methylosinus* showed little variation, with relative abundancies in the range of 0.14% to 0.16%.

The presence of the second most important genus of methanotrophic bacteria, *Methylocystis*, seemed to be tightly connected with the presence of biochar. In the short-term response, *Methylocystis* was found in each of the biochar-amended treatments. The relative abundance of the genus ranged from 0.36% to 1.24% and was correlated with increasing biochar doses. In the samples studied, to recognise the long-term response of the microbial community, the stimulatory effect

Table 2
Biodiversity indices of the experimental treatments.

Term of biochar application	Biochar dose [Mg ha ⁻¹]	Index					
		Number of taxa	DominanceD	Simpson1-D	ShannonH	Evenness	Fisher
Short-term response	Control	714	0.017	0.983	5.008	0.210	103.5
	10	743	0.016	0.984	5.031	0.206	109.3
	20	792	0.015	0.985	5.119	0.211	117.8
	30	796	0.015	0.985	5.122	0.211	116.7
Long-term response	Control	755	0.023	0.977	4.832	0.166	108.9
	10	765	0.025	0.975	4.822	0.162	110.4
	20	815	0.019	0.981	5.024	0.187	118.4
	30	885	0.014	0.987	5.23	0.211	131.2

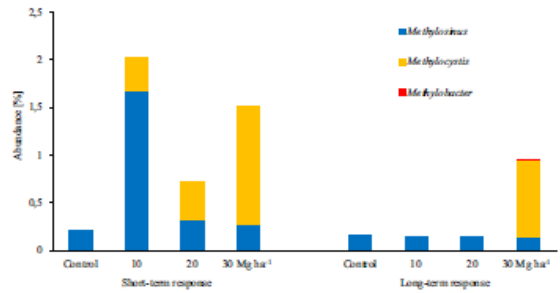


Fig. 5. Relative abundance of the methanotrophic microbial communities in Haplic Luvisol enriched with wood offcuts biochar (incubated under 60% WHC). Diversity was identified at the genus level, by 16S rRNA gene sequences. Each bar represents the relative abundance in respective treatments. Parts of the bar, indicated by different colour after biochar application are marked as "Short term" and samples collected five years after biochar addition to the soil as "Long term". Each part shows the treatments for control and soil with biochar doses: 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹.

of biochar remained visible only in the soil amended with a biochar dose of 30 Mg ha⁻¹, which was analogous to *Methylosinus*. These samples were also the only ones where the presence of *Methylobacter* was confirmed, thereby the highest biochar dose was able to improve diversity of methanotrophic bacteria even a few years after application.

4. Discussion

Luvisols are productive soils located all over Europe. They constitute the second largest reference soil group in the EU. The tested Haplic Luvisol comprise the largest soil unit belonging to European *Luvisols* and covers an area of 266,017 km² in Europe (Tóth et al., 2008). Haplic Luvisol are particularly important for agriculture in Europe due to their universality and high cultivation potential. Maintenance of the condition of Haplic Luvisol and control of GHG emissions are thus of great concern.

4.1. The influence of soil properties on GHG exchange

One of the basic improvements by biochar observed in the soil ecosystems was usually an increase in pH and C content, which determine many other soil properties and processes (Cybulak et al., 2019; Gul et al., 2015; Tomczyk et al., 2020). The negatively charged functional groups located on the biochar surface by association of H⁺ are mainly responsible for the increase in soil pH (Gul et al., 2015; Palansooriya et al., 2019). In our research, we noticed an increase in soil pH (under 60% WHC) from 4.51 to 4.84 after direct application of even the lowest dose of biochar (10 Mg ha⁻¹) (Table 1). The two highest doses of biochar (20 and 30 Mg ha⁻¹) increased the pH from 4.51 (control) to 5.35 and 5.62 respectively. The resulting improvement in soil pH has also been reported by other researchers. Shah et al. (2017) showed a

similar effect in pH (increase from 7.27 to 7.80) achieved by enriching silty clay loam soil with a biochar dose of 10 Mg ha⁻¹. On the other hand, the same studies also show a weakening of biochar impact already after the 50-day incubation period. A study on silty soil did not show any significant changes in pH after the direct application of 20 Mg ha⁻¹ of fir sawdust-biochar (Walkiewicz et al., 2020b). In our study, biochar clearly increased the soil pH, even 5 years after amendment. However, in the long-term response (under 60% WHC), soil pH value increased from 4.82 (control) to values in range of 5.04–5.28 for all tested biochar doses. Scientific reports have shown e.g. better efficiency of biochar addition in alkalisation of strongly acidic soils (Cybulak et al., 2019) due to the presence of ash which are a rich source of alkaline oxides and hydroxides (Mierzwa-Hersztek et al., 2018). This indicates the need for a precise selection of the biochar type for specific soils in order to permanently improve soil properties.

Our studies have shown a strong correlation between methane oxidation, soil pH, SOC and methanotroph abundance (Fig. 6, Table S3). The optimal pH for methanotrophic bacteria ranges from slightly acidic to neutral (Huang et al., 2019a; Malyan et al., 2016). Gamma-proteobacteria mainly occurs in soils with close to neutral pH (Knief et al., 2003). Biochar addition-driven pH improvement seems thus to promote CH₄ oxidation.

Soil water retention is particularly important given rising problems of drought. Soil moisture determines the condition of the entire soil environment and affect the availability of biogenic elements, microbiological activity, soil oxygenation and diffusion of other gases (Cook and Orchard, 2008; Mao et al., 2019; Yu et al., 2012). The high porosity and the large surface area of the biochar bring changes in the packing efficiency of soil particles (Ajayi et al., 2016; Lehmann et al., 2006; Mao et al., 2019). This may create new pore spaces in soil and ultimately improve hydraulic properties of the soil (Liao and Thomas, 2019). Changes of soil hydrophobicity and SOC caused by biochar amendment could also attribute to WHC improvement (Mao et al., 2019). In our research, a significant effect on soil WHC was confirmed only after 5 years of biochar aging in the soil. In the long-term response, all tested doses significantly improved those values by 5.6% (10 Mg ha⁻¹) to even 12.5% (20 Mg ha⁻¹) and 15.1% (30 Mg ha⁻¹) (Table 1). Yoo et al. (2014) observed an average increase in soil WHC due to rice chaff biochar amendment (pyrolysed at 500–600 °C) of 9%. Our previous study, in which we used fir sawdust biochar (pyrolysed at 650 °C) showed a direct and strong improvement in WHC values in Haplic Luvisol by 34 to 47% (Walkiewicz et al., 2020b). However, several other studies reported

little (short-term and long-term) effects of biochar amendment on soil retention properties (Karhu et al., 2011; Ventura et al., 2014). Moreover, most of the results from laboratory and pot studies which confirm the generally short-term effect of WHC improvement as a result of soil enrichment with biochar (Liu et al., 2016). The inconsistency in the results in soil WHC is mainly attributed to the differences in soil types, a wide range of biochar doses and biochar properties such as DOC content and hydrophilic level (Liu et al., 2016). Those biochar properties are determined by feedstock type and pyrolysis conditions (Xiao et al., 2018). The pyrolysis temperature of the biochar used in our experiment (350–400 °C) resulted in high DOC content (298.31 mg dm⁻³) and high hydrophobicity. These biochar parameters are considered to have an impact on microbial activity, and may be crucial for the long-term improvement of soil WHC observed in our study (Gul et al., 2015; Jeffery et al., 2016; Liu et al., 2019). It has been documented that soil microbiota has a particularly important role on gas exchange in soil and the optimum moisture level oscillated between 50 and 70% WHC (Muñoz et al., 2017; Skopp et al., 1990; Walkiewicz et al., 2020b). Our study showed some deviation of this value for methanotrophic processes, but on the other hand moisture didn't clearly alter CO₂ emissions.

Our study reported an improvement in different soil physicochemical parameters both in the long-term and short-term variants. Biochar addition increased SOC and DOC contents (Table S1). The characteristics of the soil samples showed an increase of the SOC content from 7.1 g kg⁻¹ (control) up to about 1.9% (after application of the 30 Mg ha⁻¹ dose) regardless of the time of biochar aging in soil. The DOC content was also higher in soil enriched with biochar. Moreover, the long-term effect of increased DOC content was stronger than directly after biochar application. A similar improvement in the content of both C forms has also been confirmed by other researchers (Liu et al., 2016; Wang et al., 2019; Yang et al., 2017). However, CO₂ emissions were weak correlated with the increased supply of SOC and DOC in the soil enriched with biochar (Fig. 6, Table S3).

The properties of biochar change over time. The changes relate to surface properties e.g. decrease in surface hydrophobicity and the formation of organic mineral complexes (Wang et al., 2020), and the availability of biochar-derived components (Wang et al., 2016) were observed even after three years. These parameters significantly alter biochar-microorganism interactions and enhance colonisation (Mukherjee et al., 2014). It may be assumed that soil ecosystems that contain aged biochar create a wider array of variable ecological niches than soil without biochar. It has also been suggested that part of the biochar is biologically available and can be slowly degraded by soil microorganisms.

4.2. Methanotrophic microbial community structure and methane oxidation in soil amended with biochar

Biochar dose and soil moisture level had a significant impact on CH₄ uptake (Table S2). Under 60% WHC, methanotrophic activity generally increased along with increasing biochar dose regardless of the biochar aging time in the soil. The short-term soil response test showed that, directly after application, all the biochar doses stimulated CH₄ uptake (Fig. 3).

One of the most important issues of the presented topic is the mechanism of interaction between biochar and methanotrophic bacteria. The properties of soils which have been modified by the addition of biochar, which, at the same time, changes the living conditions for methanotrophic bacteria (i.e.: porosity, moisture pH, nitrogen, metal oxides content), have been described in detail by Zhao et al. (2021).

Our study confirmed the improvement of CH₄ oxidation by biochar enrichment of soil. Directly after the application of wood offcuts biochar, all tested doses (10, 20, 30 Mg ha⁻¹, under 60% WHC) improved CH₄ uptake rate by several times. According to Walkiewicz et al. (2020b) study, a similar biochar addition (20 Mg ha⁻¹) to Haplic Luvisol under similar moisture (55% WHC) increased CH₄ uptake rate circa three times in orchard soil. However, in adjacent forest soil the

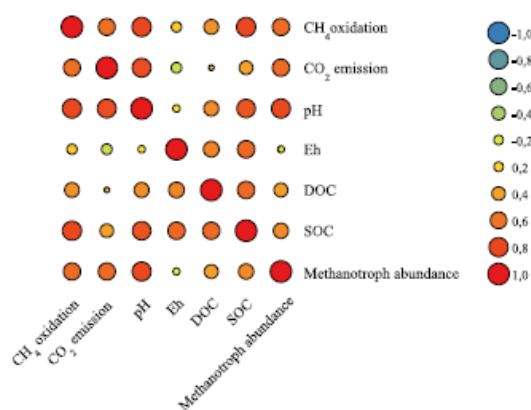


Fig. 6. Correlogram of Spearman's rank correlation coefficients of biochar properties, CH₄ oxidation and CO₂ emission and methanotroph abundance. The analyses were based on datasets limited to 60% WHC. Correlation coefficients were statistically significant ($p < 0.05$) at a value > 0.4 .

positive effect of biochar on methanotrophy was higher under saturated conditions (100% WHC). In our experiment, moisture level also significantly affected CH₄ oxidation in soil. Under 100% WHC, methane uptake was generally higher than at the lower moisture. Additionally, the highest rates of CH₄ oxidation were observed five years after soil enrichment in the two highest biochar doses (20 and 30 Mg ha⁻¹).

Our work emphasises the importance of time as a factor that governs the influence of biochar on methanotrophic bacteria. In the case of biochar produced from wood offcuts, a positive effect that included both the activity and the relative abundance, was visible even 5 years after soil supplementation with biochar, but in a greatly limited degree. This relationship may result from the changes that biochar undergoes in the soil. Initially, biochars are characterised by high hydrophobicity (Wang et al., 2016). Hydrophobic biochar surfaces are confirmed to have substantial methane sorption capacity (Sadasivam and Reddy, 2015). Methane sorption on the biochar surface might enable a more efficient utilization by the methanotrophic bacteria compared to free gas. Likewise, a positive effect in biological oxidation of low concentration methane was found in bioreactors where a non-aqueous, hydrophobic phase was applied to enhance mass transfer from the gas phase to the microorganisms (Cantera et al., 2016; Lebrero et al., 2015). The hydrophobic bioreactor phase was found to be occupied by methanotrophic bacteria affiliated to *Methylocystis* (Lebrero et al., 2015). As revealed by the current study, the abundance of *Methylocystis* was also tightly related with the soil biochar (Fig. 5).

The short-term soil response to biochar application included an increase in CO₂ emissions (Fig. 1A, middle panel). Other studies also confirmed a similar rise in CO₂ emissions as an early effect of biochar addition (Almeida et al., 2019; Ippolito et al., 2014; Yang et al., 2017). However, this effect wasn't permanent and five years after biochar application (at both of the moisture levels), CO₂ emission level reached a plateau and was independent of the biochar dose. A decrease of CO₂ emissions in a long-term study was also observed by Lentz et al., 2014 and Shen et al., 2017. Other studies have reported that biochar had no effect on CO₂ emissions (Fidel et al., 2019; Troy et al., 2013).

Soil respiration is a universal measure of soil biological activity and fertility (Haney et al., 2008; Joshi Gyawali et al., 2019). In the current experiment, the activity of microorganisms, tested directly after biochar addition, was higher than in the control (Fig. 4). Earlier reports have indicated that CO₂ emissions from soil supplemented with biochar can be both reduced (Spokas et al., 2010) and increased (Spokas and Reicosky, 2009). The limitation of activity was explained by the fact that fresh biochar contains persistent radicals and toxic chemical compounds that inhibit microbial activity (Gorovtsov et al., 2020). The presence of these inhibitors depends on the conditions of pyrolysis, with high temperature priming their formation (Tomczyk et al., 2020). The lack of inhibition of soil respiration indicates that wood offcuts subjected to pyrolysis at a temperature of 350–400 °C do not show toxicity toward soil microbiota.

The increased respiration that was observed directly after biochar addition (proportional to the biochar dose) must have partially result from enhanced methanotrophy (Fig. 6, Table S3). However, the quantity of CO₂ released also suggests the occurrence of biodegradation of biochar components by heterotrophic bacteria or the priming of native soil organic C pools (Ameloot et al., 2013). Biochars are composed of various compounds with the majority of them being scarcely available for microbiota. Some of the biochar compounds are labile and able to leach to the surrounding soil (Hale et al., 2012). Indeed, in the studied soil, the amount of DOC increased with the addition of biochar (Table S1). However, it is assumed that these were not easily-available growth substrates. According to the oligotrophic-copiotrophic theory that was proposed for ecological classification of soil bacteria, greater soil carbon availability promotes the growth of the copiotrophic taxa (Fierer et al., 2007). Their abundance is also linked with higher net C mineralization (respiration) (Yao et al., 2017). In our study, however, directly after biochar addition, there was no growth in abundance of copiotrophic bacteria (mostly *Proteobacteria* and *Firmicutes*). On the

contrary, biochar addition resulted in an increase in oligotrophic taxa (*Acidobacteriota*, *Gemmatimonadota*, *Chloroflexi*) (Ho et al., 2017; Liu et al., 2015; Yao et al., 2017 and references cited therein) (Table S4). The enhanced respiration should thus rather be linked with priming of native soil C pools. Such interpretation also persists in agreement with the results derived from the soil that was collected 5 years after supplementation. In this part of the experiment, respiration rates were similar in all treatments, despite the much higher DOC pools in biochar-amended soil samples. Also the changes that occurred in microbial communities point to a decrease in the proportion of copiotrophic taxa (34.68% of the cumulative relative abundance in dose of 30 Mg ha⁻¹ compared to 48.89% in control in long-term response) (Table S4).

5. Conclusions

Our study demonstrated the short-term and long-term influence of biochar application on GHGs (CH₄ uptake, CO₂ emissions) and microbial community diversity in Haplic Luvisol. Importantly, in the short-term, biochar increased CO₂ emissions (negative effect), while in the long-term it increased CH₄ uptake (positive effect). Five years after biochar addition, its influence was weaker than directly after application, but the highest dose of biochar (30 Mg ha⁻¹) significantly stimulated methanotrophic activity regardless of the time. Moreover, the positive biochar influence on methanotrophic communities was confirmed by the increase of *Methylocystis* abundance in the soil, which was observed directly and even five years after biochar amendment (dose of 30 Mg ha⁻¹). Soil pH, DOC and SOC contents, which were enhanced by biochar, also had a strong effect on methanotroph abundance and consequently on CH₄ oxidation processes. Considering the changes in CH₄ uptake and CO₂ emission balance, biochars could be a useful and beneficial soil amendment.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>.

Funding

This work was conducted as a part of the project "Water in soil - satellite monitoring and improving the retention using biochar" no. BIOSTRATEG3/345940/7/NCBR/2017 which was financed by Polish National Centre for Research and Development within the framework of "Environment, agriculture and forestry" - BIOSTRATEG strategic R&D programme (2018–2020).

CRedit authorship contribution statement

Adam Kubaczyński: Conceptualization, Data curation, Investigation, Formal analysis, Methodology, Resources, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Anna Walkiewicz:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. **Anna Pytlak:** Investigation, Visualization, Writing – review & editing. **Jarosław Grządziel:** Formal analysis, Methodology, Visualization. **Anna Gałązka:** Resources. **Małgorzata Brzezińska:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Ajayi, A.E., Holthusen, D., Horn, R., 2016. Changes in microstructural behaviour and hydraulic functions of biochar amended soils. *Soil Tillage Res.* 155, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.still.2015.08.007>.

- Almeida, R.F., Spokas, K.A., Teixeira, D.B., La Scala Jr., N., 2019. Biochar insights from laboratory incubations monitoring O₂ consumption and CO₂ production. *Biochar* 1, 249–258. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00021-6>.
- Ameloot, N., Graber, E.R., Verheijen, F.G.A., De Neve, S., 2013. Interactions between biochar stability and soil organisms: review and research needs. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 379–390. <https://doi.org/10.1111/ejss.12064>.
- Baani, M., Liesack, W., 2008. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. Strain SC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10203–10208.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Cantera, S., Estrada, J.M., Lebrero, R., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2016. Comparative performance evaluation of conventional and two-phase hydrophobic stirred tank reactors for methane abatement: mass transfer and biological considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1203–1212. <https://doi.org/10.1002/bit.25897>.
- Chen, Y., Huang, Xiang-dong, Han, Z., Huang, Xiao, Hu, B., Shi, D., 2010. Chemosphere effects of bamboo charcoal and bamboo vinegar on nitrogen conservation and heavy metals immobility during pig manure composting. *Chemosphere* 78, 1177–1181. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.029>.
- Chen, S., Zou, J., Hu, Z., Chen, H., Lu, Y., 2014. Global annual soil respiration in relation to climate, soil properties and vegetation characteristics: summary of available data. *Agric. For. Meteorol.* 198–199, 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2014.08.020>.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H.R., Frank, M.H., He, Y., Xia, R., 2020. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol. Plant* 13, 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>.
- Chiu, C.F., Huang, Z.D., 2020. Microbial methane oxidation and gas adsorption capacities of biochar-modified soils. *Int. J. Geosynth. Gr. Eng.* 6, 24. <https://doi.org/10.1007/s40891-020-00202-5>.
- Cook, F.J., Orchard, V.A., 2008. Relationships between soil respiration and soil moisture. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1013–1018. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.012>.
- Coomes, O.T., Miltner, B.C., 2017. Indigenous charcoal and biochar production: potential for soil improvement under shifting cultivation systems. *L. Degrad. Dev.* 28, 811–821. <https://doi.org/10.1002/ldr.2500>.
- Cybulak, M., Sokółowska, Z., Bogut, P., 2019. Impact of biochar on physicochemical properties of haplic luvisol soil under different land use: a plot experiment. *Agronomy* 9, 531.
- Das, S., Adhya, T.K., 2012. Dynamics of methanogenesis and methanotrophy in tropical paddy soils as influenced by elevated CO₂ and temperature interaction. *Soil Biol. Biochem.* 47, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.020>.
- Ebrahimi, A., Or, D., 2018. On upscaling of soil microbial processes and biogeochemical fluxes from aggregates to landscapes. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 123, 1526–1547. <https://doi.org/10.1029/2017JG004347>.
- Feng, Y., Xu, Y., Yu, Y., Xie, Z., Lin, X., 2011. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. *Soil Biol. Biochem.* 46, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.016>.
- Fidel, R.B., Laird, D.A., Parlán, T.B., 2019. Effect of biochar on soil greenhouse gas emissions at the laboratory and field scales. *Soil Syst.* 3, 1–18. <https://doi.org/10.3390/soilsystems3010008>.
- Fierer, N., Bradford, M.A., B. JR., 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364.
- Fischer, J.C., Von, Butters, G., Duchateau, P.C., Thelwell, R.J., Siller, R., 2009. In situ measures of methanotroph activity in upland soils: a reaction-diffusion model and field observation of water stress. *J. Geophys. Res.* 114, 1–12. <https://doi.org/10.1029/2008JG000731>.
- Fungo, B., Guarena, D., Thiongo, M., Lehmann, J., Neufeldt, H., Kalbi, 2014. N₂O and CH₄ emission from soil amended with steam-activated biochar. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 34–38. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300495>.
- Gorostov, A.V., Minkina, T.M., Mandzhieva, S.S., Perelomov, I.V., Soja, G., Zamulina, I.V., Rajput, V.D., Sushkova, S.N., Mohan, D., Yao, J., 2020. The mechanisms of biochar interactions with microorganisms in soil. *Environ. Geochem. Health* 42, 2495–2518. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00412-5>.
- Gul, S., Whalen, J.K., Thomas, B.W., Sachdeva, V., Deng, H., 2015. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: mechanisms and future directions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 206, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.03.015>.
- Hale, S.E., Lehmann, J., Rutherford, D., Zimmernan, A.R., Bachmann, R.T., Shitumbanuma, V., O'Toole, A., Sundqvist, K.L., Arp, H.P.H., Cornelissen, G., 2012. Quantifying the total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins in biochars. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2830–2838. <https://doi.org/10.1021/es203984k>.
- Han, X., Sun, X., Wang, C., Wu, M., Dong, D., Zhong, T., Thies, J.E., Wu, W., 2016. Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change. *Sci. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep24731>.
- Haney, R.L., Brinton, W.H., Evans, E., 2008. Estimating soil carbon, nitrogen, and phosphorus mineralization from short-term carbon dioxide respiration. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 39, 2706–2720. <https://doi.org/10.1080/00103620802358862>.
- He, Y., Zhou, X., Jiang, L., Li, M., Du, Z., Zhou, G., Shao, J., Wang, X., Xu, Z., Hossaini Bai, S., Wallace, H., Xu, C., 2017. Effects of biochar application on soil greenhouse gas fluxes: a meta-analysis. *CGB Bioenergy* 9, 743–755. <https://doi.org/10.1111/gcb.12376>.
- Ho, A., Lonardo, D.P.D., Bodeier, P.L.E., 2017. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix006>.
- Horn, R., Stepniowski, W., Włodarczyk, T., Walenzik, G., Eckhardt, F.E.W., 1994. Denitrification rate and microbial distribution within homogeneous model soil aggregates. *Int. Agrophys.* 8 (1), 65–74.
- Huang, D., Yang, L., Ko, J.H., Xu, Q., 2019. Comparison of the methane-oxidizing capacity of landfill cover soil amended with biochar produced using different pyrolysis temperatures. *Sci. Total Environ.* 693, 133594. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133594>.
- Huang, G., Luo, X., Li, D., Li, Z., Chen, Z., Zhu, M., 2019. A multidisciplinary investigation on bio-oxidation gold mine tailings from Dandong, China as a potential arsenic pollution source. *J. Geochem. Explor.* 196, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.11.003>.
- Hui, D., 2021. Effects of biochar application on soil properties, plant biomass production, and soil greenhouse gas emissions: a mini-review. *Agric. Sci.* 12, 213–236. <https://doi.org/10.4236/as.2021.123014>.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Ippolito, J.A., Stromberger, M.E., Lentz, R.D., Dungan, R.S., 2014. Hardwood biochar influences calcareous soil physicochemical and microbiological status. *J. Environ. Qual.* 43, 681–689. <https://doi.org/10.2134/jeq2013.08.0324>.
- IUSS Working Group WRB, 2006. World Reference Base For Soil Resources 2006: A Framework For International Classification, Correlation and Communication. 103. FAO, Rome.
- Jeffery, S., Verheijen, F.G.A., Kammann, C., Abalos, D., 2016. Biochar effects on methane emissions from soils: a meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* 101, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.021>.
- Joshi, G., G. Yawali, A., Lester, B.J., Stewart, R.D., 2019. Talking SMAAC: a new tool to measure soil respiration and microbial activity. *Front. Earth Sci.* 7, 138. <https://doi.org/10.3389/feart.2019.00138>.
- Kammann, C., Ippolito, J., Hagemann, N., Borchard, N., Cayuela, M.L., Estavillo, J.M., Fuentes-Mendizabal, T., Jeffery, S., Kern, J., Novak, J., Rasse, D., Saarnio, S., Schmidt, H.-P., Spokas, K., Wrage-Mönnig, N., 2017. Biochar as a tool to reduce the agricultural greenhouse-gas burden – knowns, unknowns and future research needs. *J. Environ. Eng. Landsc. Manag.* 25 (2), 114–139. <https://doi.org/10.3846/16486897.2017.1319375>.
- Karhu, K., Mattila, T., Bergström, I., Regina, K., 2011. Agriculture, ecosystems and environment biochar addition to agricultural soil increased CH₄ uptake and water holding capacity – results from a short-term pilot field study. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 309–313. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.12.005>.
- Knief, C., Lipski, A., Dunfield, P.F., 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (11), 6703–6714. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6703>.
- Kvenvolden, K.A., Rogers, B.W., 2005. Gaia's breath – global methane exhalations. *Mar. Pet. Geol.* 22, 579–590. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2004.08.004>.
- Lebrero, R., Hernández, L., Pérez, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., 2015. Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *J. Environ. Manag.* 151, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.016>.
- Lehmann, J., Rondon, M., 2006. Bio-char soil management on highly weathered soils in the humid Tropics 3, 517–529. <https://doi.org/10.1201/9781420017113.ch36>.
- Lehmann, J., Gaunt, J., Rondon, M., 2006. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – a review. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* 11, 403–427. <https://doi.org/10.1007/s11027-005-9006-5>.
- Lentz, R.D., Ippolito, J.A., Spokas, K.A., 2014. Biochar and manure effects on net nitrogen mineralization and greenhouse gas emissions from calcareous soil under com. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 1641–1655. <https://doi.org/10.2136/sssaj2014.05.0198>.
- Li, Yongfu, Hu, S., Chen, J., Müller, K., Li, Yongchun, Fu, W., Lin, Z., Wang, H., 2018. Effects of biochar application in forest ecosystems on soil properties and greenhouse gas emissions: a review. *J. Soils Sediments* 18, 546–563. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1906-y>.
- Liao, W., Thomas, S.C., 2019. Biochar particle size and post-pyrolysis mechanical processing affect soil pH, water retention capacity, and plant performance. *Soil Syst.* 2, 14. <https://doi.org/10.3390/soilsystems2010014>.
- Liu, Y., Yang, M., Wu, Y., Wang, H., Chen, Y., Wu, W., 2011. Reducing CH₄ and CO₂ emissions from waterlogged paddy soil with biochar. *J. Soils Sediments* 11, 930–939. <https://doi.org/10.1007/s11368-011-0376-x>.
- Liu, J., Fu, B., Yang, H., Zhao, M., He, B., Zhang, X., 2015. Phylogenetic shifts of bacterioplankton community composition along the pearl estuary: the potential impact of hypoxia and nutrients. *Front. Microbiol.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00064>.
- Liu, C., Wang, H., Tang, X., Guan, Z., Reid, B.J., Rajapaksha, A.U., Ok, Y.S., Sun, H., 2016. Biochar increased water holding capacity but accelerated organic carbon leaching from a sloping farmland soil in China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 995–1006. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4885-9>.
- Liu, Q., Chen, Y., Maltby, L., Zheng, Y., Ma, Q., 2019. Trace elements exposure of endangered crested ibis (*Nipponia nippon*) under in situ and ex situ conservations. *Environ. Pollut.* 253, 800–810. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.078>.
- Luo, Y., Yu, Z., Zhang, K., Xu, J., Brookes, P.C., 2016. The properties and functions of biochars in forest ecosystems. *J. Soils Sediments* 16, 2005–2020. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1483-5>.
- Malyan, S.K., Bhatia, A., Kumar, A., Gupta, D.K., Singh, R., Kumar, S.S., Tomer, R., Kumar, O., Jain, N., 2016. Methane production, oxidation and mitigation: a mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *Sci. Total Environ.* 572, 874–896. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.182>.
- Mao, J., Zhang, K., Chen, B., 2019. Linking hydrophobicity of biochar to the water repellency and water holding capacity of biochar-amended soil. *Environ. Pollut.* 253, 779–789. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.051>.
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. PhyloSeq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

- Mierzwa-Hersztel, M., Gondek, K., Klimkowicz-Pawlas, A., Kopeć, M., 2018. Effect of coapplication of poultry litter biochar and mineral fertilisers on soil quality and crop yield. *Zemdirb* 105, 203–210. <https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.026>.
- Mukherjee, A., Lal, R., Zimmerman, A.R., 2014. Science of the Total Environment effects of biochar and other amendments on the physical properties and greenhouse gas emissions of an artificially degraded soil. *Sci. Total Environ.* 487, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.141>.
- Muñoz, E., Curaqueo, G., Cea, M., Vera, L., Navia, R., 2017. Environmental hotspots in the life cycle of a biochar-soil system. *J. Clean. Prod.* 158, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.163>.
- Murali, A., Bhargava, A., Wright, E.S., 2018. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome* 6, 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 68, 12–26.
- Nosalewicz, M., Stepieniewska, Z., Nosalewicz, A., 2013. Effect of soil moisture and temperature on N₂O and CO₂ concentrations in soil irrigated with purified wastewater. *Int. Agrophys.* 27, 299–304. <https://doi.org/10.2478/v10247-012-0098-3>.
- Ouyang, L., Tang, Q., Yu, L., Zhang, R., 2014. Effects of amendment of different biochars on soil enzyme activities related to carbon mineralisation. *Soil Res.* 52, 706–716.
- Özçimen, D., Karasmanoğlu, F., 2004. Production and characterization of bio-oil and biochar from rapeseed cake. *Renew. Energy* 29, 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2003.09.006>.
- Paetsch, L., Mueller, C.W., Kögel-Knabner, I.L., Von, M., Girardin, C., Rumpel, C., 2018. Effect of in-situ aged and fresh biochar on soil hydraulic conditions and microbial C use under drought conditions. *Sci. Rep.* 8, 6852. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25039-x>.
- Palansooriya, K.N., Ok, Y.S., Awad, Y.M., Lee, S.S., Sung, J., Koutsospyros, A., Hyun, D., 2019. Impacts of biochar application on upland agriculture: a review. *J. Environ. Manag.* 234, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.085>.
- Pramer, D., Schmidt, E.L., 1964. *Experimental Soil Microbiology*. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN.
- Qin, X., Wang, H., Liu, C., Li, J., Wan, Y., Gao, Q., Fan, F., Liao, Y., 2016. Long-term effect of biochar application on yield-scaled greenhouse gas emissions in a rice paddy cropping system: a four-year case study in South China. *Sci. Total Environ.* 569–570, 1390–1401. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.222>.
- R Core Team, 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Ribas, A., Mattana, S., Ijumba, R., Debouk, H., Sebastia, M.T., Domene, X., 2019. Biochar application and summer temperatures reduce N₂O and enhance CH₄ emissions in a Mediterranean agroecosystem: role of biologically-induced anoxic microsites. *Sci. Total Environ.* 685, 1075–1086. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.277>.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
- Sadasivam, B.Y., Reddy, K.R., 2015. Adsorption and transport of methane in biochars derived from waste wood. *Waste Manag.* 43, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.04.025>.
- Serrano-Silva, N., Sarría-Guzmán, Y., Dendooven, L., Luna-Guido, M., 2014. Methanogenesis and methanotrophy in soil: a Review-1. *Pedosphere* 24, 291–307. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60016-3).
- Sey, B.K., Manceur, A.M., Whalen, J.K., Gregorich, E.G., Rochette, P., 2008. Small-scale heterogeneity in carbon dioxide, nitrous oxide and methane production from aggregates of a cultivated sandy-loam soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2468–2473. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.012>.
- Shah, T., Shah, S., Shah, Z., 2017. Soil respiration, pH and EC as influenced by biochar. *Laboratory analysis*. 36, 77–83. <https://doi.org/10.25252/SE/17/51184>.
- Shen, Y., Zhu, L., Cheng, H., Yue, S., Li, S., 2017. Effects of biochar application on CO₂ emissions from a cultivated soil under semiarid climate conditions in Northwest China. *Sustainability* 9, 1482. <https://doi.org/10.3390/su9081482>.
- Skopp, J., Jawson, M.D., Doran, J.W., 1990. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 1619–1625.
- Sokolowska, Z., Szewczuk-Karpisz, K., Turski, M., Tomczyk, A., Cybulak, M., Skic, K., 2020. Effect of wood waste and sunflower husk biochar on tensile strength and porosity of dystic cambisol artificial aggregates. *Agronomy* 10, 244. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020244>.
- Spokas, K.A., Reicosky, D.C., 2009. Impacts of sixteen different biochars on soil greenhouse gas production. *Ann. Environ. Sci.* 3, 179–193.
- Spokas, K.A., Baker, J.M., Reicosky, D.C., 2010. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. *Plant Soil* 333, 443–452. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0359-5>.
- Szafrańek-Naloniczna, A., Wolińska, A., Zielenkiewicz, U., Kowalczyk, A., Stepieniewska, Z., Błaszczak, M., 2019. Activity and identification of methanotrophic bacteria in arable and no-tillage soils from Lublin region (Poland). *Microb. Ecol.* 77, 701–712.
- Thompson, L., Sanders, J., McDonald, D., Al E., 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature24621>.
- Tomczyk, A., Sokolowska, Z., Boguta, P., 2020. Biochar physicochemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19, 191–215. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09523-3>.
- Tóth, G., Montanarella, L., Stolbovov, V., Máté, F., Bódis, K., Jones, A., Panagos, P., Van Liedekerke, M., 2008. Soils of the European Union. EUR 23439 EN. OPOCE, Luxemb.
- Troy, S.M., Lawlor, P.G., O'Flynn, C.J., Healy, M.G., 2013. Impact of biochar addition to soil on greenhouse gas emissions following pig manure application. *Soil Biol. Biochem.* 60, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.019>.
- Usovich, B., Lipiec, J., Lukowski, M., Marczewski, W., Usovich, J., 2016. The effect of biochar application on thermal properties and albedo of loess soil under grassland and fallow. *Soil Tillage Res.* 164, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.03.009>.
- Ventura, M., Zhang, C., Baldi, E., Fornasier, F., Sorrenti, G., Panzavachi, P., Toton, G., 2014. Effect of biochar addition on soil respiration partitioning and root dynamics in an apple orchard. *Eur. J. Soil Sci.* 65, 186–195. <https://doi.org/10.1111/ejss.12095>.
- Větrovský, T., Baktari, P., Morais, D., 2018. SEED2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics* 34, 2292–2294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty071>.
- Walkiewicz, A., Brzezińska, M., Bieganski, A., 2018. Methanotrophs are favored under hypoxia in ammonium-fertilized soils. *Biol. Fertil. Soils* 54, 861–870.
- Walkiewicz, A., Brzezińska, M., Wnuk, E., Jabłoński, B., 2020a. Soil properties and not high CO₂ affect CH₄ production and uptake in periodically waterlogged arable soils. *J. Soils Sediments* 20, 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02525-x>.
- Walkiewicz, A., Kalinichenko, K., Kubaczyński, A., Brzezińska, M., Bieganski, A., 2020b. Usage of biochar for mitigation of CO₂ emission and enhancement of CH₄ consumption in forest and orchard haplic luvisol (Siltic) soils. *Appl. Soil Ecol.* 156. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103711>.
- Wang, W.J., Dalal, R.C., Moody, P.W., Smith, C.J., 2003. Relationships of soil respiration to microbial biomass, substrate availability and clay content. *Soil Biol. Biochem.* 35, 273–284. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00274-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00274-2).
- Wang, J., Pan, X., Liu, Y., Zhang, X., Xiong, Z., 2012. Effects of biochar amendment in two soils on greenhouse gas emissions and crop production. *Plant Soil* 360, 287–298. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1250-3>.
- Wang, J., Xiong, Z., Kuzuyakov, Y., 2016. Biochar stability in soil: meta-analysis of decomposition and priming effects. *GCB Bioenergy* 8, 512–523. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12266>.
- Wang, D., Li, C., Parikh, S.J., Scow, K.M., 2019. Impact of biochar on water retention of two agricultural soils – a multi-scale analysis. *Geoderma* 340, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.01.012>.
- Wang, L., O'Connor, D., Rinklebe, J., Ok, Y.S., Tsang, D.C.W., Shen, Z., Hou, D., 2020. Biochar aging: mechanisms, physicochemical changes, assessment, and implications for field applications. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04033>.
- Wnuk, E., Walkiewicz, A., Bieganski, A., 2017. Methane oxidation in lead-contaminated mineral soils under different moisture levels. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 25346–25354. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0195-8>.
- Wnuk, E., Waśko, A., Walkiewicz, A., Bartmiński, P., Bejger, R., Mielnik, L., Bieganski, A., 2020. The effects of humic substances on DNA isolation from soils. *PeerJ* 8, e9378. <https://doi.org/10.7717/peerj.9378>.
- World Meteorological Organization, 2020. The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2019. *WMO Greenh. Gas Bull.* 1–9.
- Wu, X., Zang, S., Ma, D., Ren, J., Chen, Q., Dong, X., 2019. Emissions of CO₂, CH₄, and N₂O Fluxes from Forest soil in permafrost region of daxingan mountains, Northeast China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 2999.
- Wu, Z., Song, Y., Shen, H., Jiang, X., Li, B., Xiong, Z., 2019. Biochar can mitigate methane emissions by improving methanotrophs for prolonged period in fertilized paddy soils. *Environ. Pollut.* 253, 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.073>.
- Xiao, X., Chen, B., Chen, Z., Zhu, L., Schnoor, J.L., 2018. Insight into multiple and multi-level structures of biochars and their potential environmental applications: a critical review insight into multiple and multi-level structures of biochars and their potential environmental applications: a critical review. *Environ. Sci. Technol.* 52, 5027–5047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06487>.
- Yang, X., Meng, J., Lan, Y., Chen, W., Yang, T., Yuan, J., Liu, S., Han, J., 2017. Effects of maize Stover and its biochar on soil CO₂ emissions and labile organic carbon fractions in Northeast China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 240, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.001>.
- Yao, F., Yang, S., Wang, Z., Wang, Xue, Ye, J., Wang, Xugao, DeBruyn, J.M., Feng, X., Jiang, Y., Li, H., 2017. Microbial taxa distribution is associated with ecological trophic cascades along an elevation gradient. *Front. Microbiol.* 8, 2071. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02071>.
- Yoo, G., Kim, H., Chen, J., Kim, Y., 2014. Effects of biochar addition on nitrogen leaching and soil structure following fertilizer application to rice paddy soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 852–860. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.05.0160>.
- Yu, L., Tang, J., Zhang, R., Wu, Q., Gong, M., 2012. Effects of biochar application on soil methane emission at different soil moisture levels. *Biol. Fertil. Soils* 49. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0703-4>.
- Yu, Z., Chen, L., Pan, S., Li, Y., Kuzuyakov, Y., Xu, J., Brookes, P.C., Luo, Y., 2018. Feedstock determines biochar-induced soil priming effects by stimulating the activity of specific microorganisms. *Eur. J. Soil Sci.* 69, 521–534. <https://doi.org/10.1111/ejss.12542>.
- Zhao, Q., Wang, Y., Xu, Z., Yu, Z., 2021. How does biochar amendment affect soil methane oxidation? A review. 21, 1575–1586.
- Zimmerman, A.R., Gao, B., Ahn, M.-Y., 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.005>.

**Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic
Luvisol**

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1 Characteristics of soils collected from experimental fallow plots without (control) and with biochar in the dose of 10, 20, 30 Mg ha⁻¹ in a short-term and long-term response experiment.

Biochar aging	Biochar dose [Mg ha ⁻¹]	SOC [g kg ⁻¹]	DOC [mg dm ⁻³]	pH	Eh [mV]
Short-term response	0	7.1	23.3	5.74	206
	10	8.3	27.49	5.92	213
	20	13.2	24.87	6.12	217
	30	18.9	26.58	6.21	219
Long-term response	0	7.1	23.3	5.74	206
	10	7.7	20	5.61	251
	20	11.0	31.32	5.76	253
	30	19.4	30.72	5.92	322

Table S2 Results of multifactor analysis of variance used to compare three factors: (A) biochar aging time in soil, (B) biochar dose, and (C) soil moisture on CH₄ uptake and CO₂ emissions in Haplic Luvisol enriched with wood offcuts biochar (n = 3). Tukey's test was used to discriminate among the pairs of the means as an output of MANOVA.

	CH ₄ uptake	CO ₂ emission
Main effects		
A: biochar aging time in soil (short-term vs. long-term response)	n.s.	F=245.6 p < 0.0001
B: biochar dose (0, 10, 20 vs. 30 Mg ha ⁻¹)	F=5.2 p < 0.005	F=16.71 p < 0.0001
C: soil moisture (60% vs. 100% WHC)	F=70.24 p < 0.0001	F=45.86 p < 0.0001
Interactions		
A x B	n.s.	F=15.66 p < 0.0001
A x C	F=5.45 p < 0.03	n.s.
B x C	F=14.35 p < 0.0001	n.s.
A x B x C	F=4.32 p < 0.01	n.s.

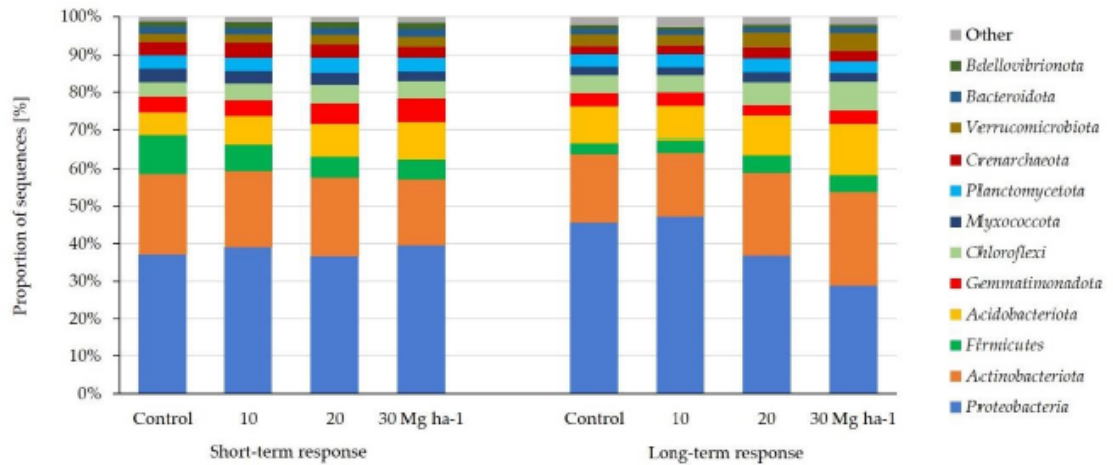


Fig. S1. Average distribution of the community composition in Haplic Luvisol enriched with wood offcuts biochar (incubated under 60% WHC) discriminated at the *phylum* level. Each bar represents the community composition for the relevant treatment. Parts of bar, indicated by different colours, represent particular *phylum* levels. Soil samples directly after biochar application marked as "Short-term response" and samples collected five years after biochar addition to the soil as "Long-term response". Each part shows the treatments for control and soil with biochar doses: 10, 20 and 30 Mg ha⁻¹.

Table S3 Correlogram of Spearman's rank correlation coefficients of the biochar properties, CH₄ oxidation and CO₂ emission and methanotrophy abundance. The analyses were based on datasets limited to 60% WHC. Correlation coefficients were statistically significant ($p < 0.05$) at value > 0.4 .

	CH ₄ oxidation	CO ₂ emission	pH	Eh	DOC	SOC	Methanotroph abundance
CH ₄ oxidation	1.00	0.62	0.80	0.23	0.48	0.80	0.64
CO ₂ emission	0.62	1.00	0.77	-0.25	0.07	0.40	0.64
pH	0.80	0.77	1.00	0.12	0.49	0.74	0.79
Eh	0.23	-0.25	0.12	1.00	0.54	0.66	-0.11
DOC	0.48	0.07	0.49	0.54	1.00	0.65	0.42
SOC	0.80	0.40	0.74	0.66	0.65	1.00	0.51
Methanotroph abundance	0.64	0.64	0.79	-0.11	0.42	0.51	1.00

Table S4 Copiotrophic- and oligotrophic-associated phyla in response to biochar amendments. Interpretation of life strategy was performed after Ho et al. (2017). Taxa for which there are large discrepancies in the life strategies presented in the literature were marked as "not assigned".

Phylum	Short-term response				Long-term response				
	Control	10	20	30 Mg ha ⁻¹	Control	10	20	30 Mg ha ⁻¹	
<i>Proteobacteria</i>	37.19	39.03	36.59	39.51	45.70	47.27	36.76	28.74	copiotrophic
<i>Actinobacteriota</i>	21.44	20.33	21.02	17.65	18.19	16.92	22.10	25.03	not assigned
<i>Firmicutes</i>	9.92	7.13	5.60	5.35	2.87	3.36	4.78	4.45	copiotrophic
<i>Acidobacteriota</i>	6.08	7.10	8.29	9.59	9.52	8.86	10.10	13.29	oligotrophic
<i>Gemmatimonadota</i>	4.10	4.24	5.60	6.24	3.53	3.47	2.84	3.54	oligotrophic
<i>Chloroflexi</i>	3.95	4.53	4.94	4.55	4.76	4.59	6.12	7.70	oligotrophic
<i>Myxococcota</i>	3.56	3.27	3.13	2.65	2.21	2.20	2.58	2.44	not assigned
<i>Planctomycetota</i>	3.54	3.55	4.04	3.64	3.44	3.52	3.77	3.01	oligotrophic
<i>Crenarchaeota</i>	3.52	4.08	3.56	2.95	2.10	2.22	2.78	2.80	oligotrophic
<i>Verrucomicrobiota</i>	2.25	2.26	2.49	2.64	3.16	2.80	4.10	4.69	oligotrophic
<i>Bacteroidota</i>	1.78	1.53	1.76	2.06	1.33	1.40	1.34	1.50	copiotrophic
<i>Bdellovibrionota</i>	1.30	1.51	1.51	1.50	0.80	0.73	0.54	0.64	not assigned
other (abundance <1%)	1.36	1.44	1.50	1.65	2.40	2.65	2.18	2.18	not assigned
Summary abundance:									
Copiotrophic	48.89	47.69	43.94	46.93	49.90	52.04	42.87	34.68	
Oligotrophic	23.45	25.76	28.90	29.62	26.51	25.47	29.72	35.03	
Not assigned	27.67	26.56	27.16	23.45	23.59	22.49	27.41	30.29	

References (S):

Ho, A., Lonardo, D.P. Di, Bodelier, P.L.E., 2017. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix006>

7. Tekst osiągnięcia patentowego P.433435

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237796**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **433435**

(22) Data zgłoszenia: **02.04.2020**

(51) Int.Cl.

C01B 32/05 (2017.01)

C01B 32/324 (2017.01)

C01B 32/312 (2017.01)

C09K 17/40 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu
oraz jego zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
30.11.2020 BUP 25/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2021 WUP 11/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Lublin, PL**

(72) Twórcą(y) wynalazku:

**ADAM KUBACZYŃSKI, Żakowola Radzyńska, PL
ANNA WALKIEWICZ, Świdnik, PL
MAŁGORZATA BRZEZIŃSKA, Lublin, PL
CEZARY POLAKOWSKI, Lublin, PL
ANNA PYTLAK, Lublin, PL
ANDRZEJ BIEGANOWSKI,
Abramowice Prywatne, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Tarała

PL 237796 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biowęgla z biomasy, posiadającego dobrą zdolność pochłaniania metanu z atmosfery, a także jego zastosowanie do pochłaniania metanu z atmosfery.

Biowęgiel jest to produkt powstały w wyniku poddania biomasy procesowi pirolizy, tj. procesowi degradacji pod wpływem wysokiej temperatury, prowadzonego bez dostępu tlenu i opcjonalnie innych celowo dodawanych reagentów. Znajduje obecnie coraz szersze zastosowanie m.in. w rolnictwie, leśnictwie i ochronie środowiska jako dodatek do gleby. Ze względu na dużą powierzchnię właściwą i dobre właściwości sorpcyjne biowęgiel poprawia właściwości fizykochemiczne gleby oraz zwiększa sekwestrację węgla. Ponadto jest źródłem trwałej materii organicznej, ogranicza wypłukiwanie odżywczych soli mineralnych w głąb profilu glebowego oraz spowolnia migrację wody w profilu glebowym. Z tego powodu biowęgiel może pozytywnie wpływać na stabilność agregatów glebowych (strukturę) i porowatość, poprawiając tym samym stosunki wodno-powietrzne gleby. Jest to istotne nie tylko ze względu na podejmowane próby ograniczenia nawożenia, ale również wobec nasilających się zjawisk suszy.

Postępująca degradacja środowiska oraz nasilające się zmiany klimatyczne sprawiają, że coraz intensywniej poszukuje się rozwiązań prowadzących do zatrzymania lub opóźnienia tych niekorzystnych zjawisk. Szczególnie istotne jest ograniczenie emisji gazów cieplarnianych z rolnictwa, które m.in. odpowiada za około 50% globalnej emisji metanu (CH_4). Mimo, iż atmosferyczne stężenie CH_4 jest stonkowo niewielkie (1,8 ppm), to jego potencjał cieplarniany jest około 34 razy większy, niż dwutlenku węgla (CO_2) (Wu et al., 2019). Dodatkowo niepokoi fakt, że poziom CH_4 w atmosferze systematycznie rośnie, a w przeciągu ostatnich ok. 200 lat jego stężenie zwiększyło się około 2,5 razy (Kammann et al., 2017). Wzbogacanie gleb biowęgłem może okazać się skutecznym sposobem na ograniczenie emisji gazów cieplarnianych. Istnieją doniesienia literaturowe świadczące o tym, że dodatek biowęgla do gleby ogranicza emisję gazów cieplarnianych, takich jak dwutlenek węgla, podtlenek azotu (N_2O), czy metan (Dong et al., 2020; Jeffery et al., 2016; Kammann et al., 2017; Lentz et al., 2014). Z drugiej strony jednak, nie brakuje danych wykazujących, że biowęgiel nie ma istotnego wpływu na pochłanianie CH_4 w glebie, a wręcz może przyczyniać się do zwiększonej emisji CH_4 i CO_2 (Fungo et al., 2014; He et al., 2017; Ribas et al., 2019; Zimmerman et al., 2011). Zestawienie wielu badań na ten temat pokazuje, że wpływ biowęgla na emisyjność gleb nie jest jednoznaczny i wymaga dalszego poznania (Li et al., 2018).

Pojawiły się również prace naukowe, skupiające się na wpływie biowęgla na mikrobiom glebowy. Doniesienia literaturowe wykazują pozytywne aspekty w tym zakresie. Zwiększona porowatość gleby spowodowana dodatkiem biowęgla sprawia, że w glebie jest więcej miejsc, w których mogą bytować mikroorganizmy (tzw. mikrohabitatów). W połączeniu z poprawą stosunków wodno-powietrznych, sprzyja to namnażaniu bakterii tlenowych, co z kolei przekłada się na rosnącą ilość tzw. hotspotów w glebie, czyli miejsc o zwiększonym nagromadzeniu mikroorganizmów glebowych. Mikroorganizmy te w znacznym stopniu odpowiadają za procesy emisji i pochłaniania gazów w glebie (Muñoz et al., 2017). W ten sposób zmiana właściwości fizykochemicznych spowodowanych wzbogaceniem gleb biowęgłem pośrednio przekłada się na ich emisyjność w zakresie gazów cieplarnianych.

Badania dotyczące wymiany gazowej przeprowadzone na glebach mineralnych *Mollic Gleysol*, *Haplic Podzol*, *Eutric Cambisol*, wskazują na ich wysoki potencjał metanotroficzny, tzn. do pochłaniania metanu (Walkiewicz et al., 2012). Generalnie gleby uważa się za jedne z najważniejszych biologicznych pochłaniaczy metanu, co może być jeszcze wzmocnione dodatkiem biowęgla. Wpływ biowęgla tłumaczony jest zazwyczaj zmianami fizykochemicznymi, jakie zachodzą w glebie po aplikacji biowęgla.

Dotychczas bardzo niewielu autorów podejmowało badania dotyczące emisji/pochłaniania metanu przez same biowęgłe. Spokas i Reicosky (2009) przebadali 16 różnych biowęgla pod kątem redukcji stężenia metanu w powietrzu. W trzech przypadkach potwierdzili to zjawisko. Biowęgiel z łusek orzechów ziemnych i biowęgiel z pędów kukurydzy charakteryzowały się identyczną dobową szybkością utleniania metanu na poziomie $2,6 \pm 0,6 \text{ ng CH}_4 \text{ g}_{\text{biowęgla}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Biowęgiel, którego materiał wsadowy stanowił Biosource™ wykazywał zdolność utleniania metanu rzędu $4,1 \pm 0,9 \text{ ng CH}_4 \text{ g}_{\text{char}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Spokas and Reicosky, 2009).

W publikacji opisu patentowego US8926932B2 opisano adsorbent w postaci węgla aktywowanego zawierającego więcej niż 50% wagowych węgla pochodzącego z biomasy. Adsorbent ma całkowitą objętość porów od $1,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ do $2,37 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, pole powierzchni właściwej od $2700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ do $3421 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, wielkość cząstek wynoszącą co najmniej 149 mikronów, objętość porów od $1,5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ do

2,00 cm³ g⁻¹ dla porów o średnicach mniejszych niż 50 Å oraz objętość porów od 0,8 cm³ g⁻¹ do 1,13 cm³ g⁻¹ dla porów o średnicach od 20 Å do 50 Å. Adsorbent charakteryzuje ponadto grawimetryczna pojemność magazynowa metanu większa niż 200 g kg⁻¹ w temperaturze 20°C i pod ciśnieniem 500 psi (ok. 34500 hPa, czyli pod ciśnieniem ponad 34 razy wyższym od atmosferycznego). Opis przedstawia ponadto proces wytwarzania adsorbentu, który obejmuje zwęglanie surowca biomasy zawierającego więcej niż 40% wagowych węgla w temperaturze od 350°C do 850°C, z wytworzeniem węgla o powierzchni właściwej większej niż 900 m² g⁻¹ oraz objętości porów większej niż 1,0 cm³ g⁻¹ dla porów, których średnice wynoszą od 10 Å do 50 Å. Uzyskany węgiel aktywuje się w obecności substancji alkalicznej o wartości pH większej niż 9 w temperaturze od 600°C do 100°C, z wytworzeniem węgla aktywnego o powierzchni właściwej większej niż 1700 m² g⁻¹, łącznej objętości porów większej niż 1,1 cm³ g⁻¹ i takim rozkładem porów, że co najmniej 20% objętości porów zawiera pory o średnicy w zakresie od 20 Å do 50 Å. Rozwiązanie nie pozwala jednak każdorazowo uzyskać biowęgla posiadającego bardzo dobrą zdolność do pochłaniania metanu.

Z chińskiego zgłoszenia patentowego CN109089809 znany jest sposób wytwarzania biowęgla, w którym jako surowiec stosuje się sadzonki ziemniaków (sadzeniaki), a po naturalnym ich suszeniu prowadzi się pirolizę w beztlenowej spalarni w temperaturze 400–500°C, następnie chłodzi się wytworzony produkt i otrzymuje biowęgiel. Rozwiązanie przewiduje zastosowanie węgla z sadzeniaków do łagodzenia stresu związanego z toksycznością glinu w kwaśnej glebie, jako materiału sprzyjającemu wzrostowi, tworzeniu się brodawek i wchłanianiu składników odżywczych przez fasolę bambusową.

Natomiast z chińskiego zgłoszenia patentowego CN106747906 znany jest nawóz organiczny, zawierający m.in. biowęgiel, który został wytworzony w następujących etapach: suszenie sadzonek ziemniaków (sadzeniaków) na słońcu, do otrzymania zawartości wody poniżej 20%, a następnie cięcie lub rozbijanie, umieszczanie ich w piecu do karbonizacji i zwęglanie przez 2,5 do 3,5 godzin w temperaturze 420 do 480°C; po zakończeniu karbonizacji, filtrowanie za pomocą wody, chłodzenie do temperatury pokojowej i suszenie.

Nie jest znane natomiast zastosowanie biowęgla otrzymanego z sadzeniaków według ww. CN109089809 oraz CN106747906 jako materiału do usuwania metanu z atmosfery.

Łęciny (łęty, łodygi, stolony) stanowią materiał odpadowy po produkcji ziemniaków. Ze względu na fakt, że zawierają substancje trujące (zawierają solaninę i inne toksyczne glikoalkaloidy) nie nadają się, tak jak sadzeniaki, nie tylko do spożycia przez ludzi ale także do skarmiania zwierząt. Jedyne dwa sposoby zagospodarowania łęcin to spalanie lub pozostawienie na polu i zaoranie. Wykorzystanie ich jako surowca do produkcji biowęgla nie było do tej pory stosowane. Publikacje CN 109089809A i CN106747906A opisują produkcję biowęgla z bulw ziemniaka, ale biorąc pod uwagę, że: skład chemiczny bulw ziemniaczanych oraz łętów są zupełnie inne, bulwy mają zastosowanie spożywcze albo do produkcji pasz, oraz że nie wykazano zdolności pochłaniania metanu przez biowęgiel powstały z bulw ziemniaków, bulwy i łęty należy uznać za inny materiał.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie wydajnego sposobu otrzymywania biowęgla posiadającego bardzo dobrą zdolność do samodzielnego pochłaniania metanu z atmosfery, w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Celem wynalazku jest ponadto zaproponowanie zastosowania tego biowęgla do usuwania metanu. Cel ten jest realizowany poprzez otrzymywanie biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu, w którym biomase suszy się, następnie ogrzewa i poddaje schłodzeniu, a którego istotą jest to, że biomase roślinną stanowią odpadowe łęciny po uprawie ziemniaków.

Korzystnie, suszenie biomasy jest prowadzone w temperaturze od 20°C do 80°C przez 2 do 24 godzin, ewentualnie po uprzednim rozdrobieniu materiału.

Korzystnie, ogrzewanie prowadzi się w temperaturze od 180°C do 1000°C przez okres 15 do 360 min, przy szybkości narastania temperatury od 3 do 25°C min⁻¹.

Korzystnie, proces ogrzewania i schładzania prowadzony jest w atmosferze gazu obojętnego.

Istotą wynalazku jest również zastosowanie biowęgla otrzymanego ww. sposobem do usuwania metanu z atmosfery, przy czym otrzymany biowęgiel poddaje się uwilgotnieniu do wilgotności w zakresie od 50 do 70% pojemności wodnej (WHC). 100% pojemności wodnej – ang. Water Holding Capacity – WHC – odpowiada ilości wody, która została zatrzymana w ośrodku porowatym, tu w biowęglu, po odpłynięciu tzw. wody grawitacyjnej, tj. tej ilości wody, która nie jest utrzymywana siłami kapilarnymi (Yoo et al., 2014).

Z przeprowadzonych badań wynika, że po uwilgotnieniu do poziomu 60% WHC prób biowęgla z łęcin ziemniaków, jego dobowy szybkość konsumpcji metanu wyniosła ok. 10 500 ng CH₄ g_{biowęgla}⁻¹ d⁻¹. Uzyskane wyniki szybkości pochłaniania metanu dla biowęgla wyprodukowanego z łęcin ziemniaków

są zatem nawet kilka tysięcy razy wyższe, niż biowęgla, o których informacje można było do tej pory spotkać.

Ważnym atutem biowęgla powstałych z łęcin ziemniaków jest również to, że biomasa potrzebna do ich wytworzenia jest uznawana za odpad w produkcji rolniczej, który przerabiając na biowęgiel można wartościowo spożytkować.

Wynalazek został szczegółowo przedstawiony w poniższym przykładzie realizacji. Jako porównanie zastosowano tu dwa inne biowęgla: z malin oraz ze słonecznika.

Biomasy pozostałe po uprawie ziemniaków (w postaci łęcin) oraz po uprawie malin (w postaci ściętych całych roślin) powietrznie wysuszono, dosuszono w temperaturze 25°C przez 6 godzin i wytworzono biowęgiel w procesie pirolizy, przy temperaturze 600°C, w czasie 30 min, przy szybkości narastania temperatury około 10°C min⁻¹ w atmosferze azotu. Po czasie przeznaczonym na pirolizę wyłączono grzanie, a nadmuch azotem prowadzony był do momentu ostygnięcia pieca i znajdującego się w nim biowęgla. Kolejnym etapem prowadzonych prac było wykonanie szeregu analiz fizykochemicznych takich jak: zawartość rozpuszczalnego węgla organicznego (DOC), stosunek C/N, gęstość nasypowa, pojemność wodna (WHC), pH i potencjał oksydoredukcyjny (Eh), prowadzących do opracowania charakterystyki nowo wyprodukowanych biowęgla.

Biowęgiel z łusek słonecznika powstał w procesie pirolizy prowadzonym na specjalnie do tego celu przeznaczonej linii produkcyjnej, w temperaturze 650°C, w czasie 60 min.

Podstawowe charakterystyki biowęgla przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Podstawowe charakterystyki badanych biowęgla.

	Gęstość [g cm ⁻³]	pH	Eh [mV]	C [% _{dw}]	N [% _{dw}]	C/N	DOC [mg dm ⁻³]	Wilgotność Światy Świeżego biowęgla ⁻¹ odpowiadająca WHC	
								100%	60%
Łęciny ziemniaków	0,19	9,6	25,1	44,62	1,35	33,05	100,0	4,45	2,67
Maliny	0,21	9,2	32,3	74,21	0,90	82,46	139,7	4,31	2,59
Słonecznik	0,35	9,2	-16,1	78,3	0,98	79,9	106,6	2,58	1,55

Wszystkie biowęgla rozdrobiono, przesiano przez sito o średnicy oczek równej 2 mm, naważono w ilości po 5 g do oddzielnych szklanych naczyń inkubacyjnych o pojemności 120 ml, następnie próby uwilgotniono do dwóch wilgotności, odpowiadających 60% i 100% WHC. Następnie szczelnie zamknięto gumowym korkiem z kapslem. Do tak przygotowanych prób dodano po 1% CH₄ (v/v) i inkubowano je w ciemności w temperaturze 25°C przez 36 dni. W tym czasie prowadzono regularne pomiary składu atmosfery gazowej w przygotowanych próbach za pomocą chromatografu gazowego.

Całkowity ubytek metanu w próbkach biowęgla z łęcin ziemniaków odnotowano już 25 dnia. Natomiast, przy uwilgotnieniu wynoszącym 100% WHC, całkowita konsumpcja metanu nastąpiła po 34 dniach.

Biowęgiel z łusek malin całkowicie pochłonął dodany metan dopiero 32 dnia eksperymentu, natomiast przy uwilgotnieniu wynoszącym 100% WHC, po 36 dniach eksperymentu ubyło tylko 83,44%.

Biowęgiel otrzymany z łusek słonecznika przy wilgotności 60% WHC po 36 dniach eksperymentu zaabsorbował jedynie 23,3% obecnego metanu. Przy uwilgotnieniu wynoszącym 100% WHC po 36 dniach eksperymentu pochłonął mniej niż połowę obecnego metanu.

Przeprowadzony eksperyment wskazuje na wysokie powinowactwo wytworzonego z łęcin ziemniaków biowęgla do jednego z głównych gazów cieplarnianych, jakim jest metan.

Cytowany stan techniki:

Dong, W., Walkiewicz, A., Bieganowski, A., Oenema, O., 2020. Geoderma Biochar promotes the reduction of N₂O to N₂ and concurrently suppresses the production of N₂O in calcareous soil. *Geoderma* 362, 114091. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114091>

Fungo, B., Guarena, D., Thiongo, M., Lehmann, J., Neufeldt, H., Kalbi, 2014. N₂O and CH₄ emission from soil amended with steam-activated biochar. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 34–38. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300495>

He, Y., Zhou, X., Jiang, L., Li, M., Du, Z., Zhou, G., Shao, J., Wang, X., Xu, Z., Hosseini Bai, S., Wallace, H., Xu, C., 2017. Effects of biochar application on soil greenhouse gas fluxes: a metaanalysis. *GCB Bioenergy* 9, 743–755. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12376>

Jeffery, S., Verheijen, F.G.A., Kammann, C., Abalos, D., 2016. Soil Biology & Biochemistry Biochar effects on methane emissions from soils: A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* 101, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.021>

Kammann, C., Ippolito, J., Hagemann, N., Borchard, N., Cayuela, M.L., Estavillo, J.M., Fuertes-Mendizabal, T., Jeffery, S., Kern, J., Novak, J., Rasse, D., Saamio, S., Schmidt, H.P., Spokas, K., Wrage-Mönnig, N., 2017. Biochar as a tool to reduce the agricultural greenhouse-gas burden-knowns, unknowns and future research needs. *J. Environ. Eng. Landsc. Manag.* 25, 114–139. <https://doi.org/10.3846/16486897.2017.1319375>

Lentz, R.D., Ippolito, J.A., Spokas, K.A., 2014. Biochar and Manure Effects on Net Nitrogen Mineralization and Greenhouse Gas Emissions from Calcareous Soil under Com. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 1641–1655. <https://doi.org/10.2136/sssaj2014.05.0198>

Li, Yongfu, Hu, S., Chen, J., Müller, K., Li, Yongchun, Fu, W., Lin, Z., Wang, H., 2018. Effects of biochar application in forest ecosystems on soil properties and greenhouse gas emissions: a review. *J. Soils Sediments* 18, 546–563. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1906-y>

Muñoz, E., Curaqueo, G., Cea, M., Vera, L., Navia, R., 2017. Environmental hotspots in the life cycle of a biochar-soil system. *J. Clean. Prod.* 158, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.163>

Ribas, A., Mattana, S., Llurba, R., Debouk, H., Sebastià, M.T., Domene, X., 2019. Biochar application and summer temperatures reduce N₂O and enhance CH₄ emissions in a Mediterranean agroecosystem: Role of biologically-induced anoxic microsites. *Sci. Total Environ.* 685, 1075–1086. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.277>

Spokas, K.A., Reicosky, D.C., 2009. Impacts of Sixteen Different Biochars on Soil Greenhouse Gas Production. *Ann. Environ. Sci.* 3, 179–193.

Walkiewicz, A., Bulak, P., Brzezińska, M., Włodarczyk, T., Polakowski, C., 2012. Kinetics of methane oxidation in selected mineral soils. *Int. Agrophysics* 26, 401–406. <https://doi.org/10.2478/v10247-012-0056-0>

Wu, Z., Song, Y., Shen, H., Jiang, X., Li, B., Xiong, Z., 2019. Biochar can mitigate methane emissions by improving methanotrophs for prolonged period in fertilized paddy soils. *Environ. Pollut.* 253, 1038–1046. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.073>

Yoo, G., Kim, H., Chen, J., Kim, Y., 2014. Effects of biochar addition on nitrogen leaching and soil structure following fertilizer application to rice paddy soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 852–860. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.05.0160>

Zimmerman, A.R., Gao, B., Ahn, M., 2011. Soil Biology & Biochemistry Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.005>

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu, w którym biomasę suszy się, następnie ogrzewa i poddaje schłodzeniu, znamienny tym, że biomasę roślinną stanowią odpadowe łęciny po uprawie ziemniaków.
2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że suszenie biomasy jest prowadzone w temperaturze od 20°C do 80°C przez 2 do 24 godzin, ewentualnie po uprzednim rozdrobieniu materiału.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, znamienny tym, że ogrzewanie prowadzi się w temperaturze od 180°C do 1000°C przez okres 15 do 360 min, przy szybkości narastania temperatury od 3 do 25°C/min.
4. Sposób według któregokolwiek z poprzednich zastrz., znamienny tym, że proces ogrzewania i schładzania prowadzony jest w atmosferze gazu obojętnego.
5. Zastosowanie biowęgla otrzymanego sposobem określonym w zastrz. 1 do 4, do usuwania metanu z atmosfery, przy czym otrzymany biowęgiel poddaje się uwilgotnieniu do wilgotności w zakresie od 50 do 70% pojemności wodnej (WHC).

8. Bibliografia

1. Abernethy, S., Connor, F.M.O., Jones, C.D., Jackson, R.B., 2021. Methane removal and the proportional reductions in surface temperature and ozone. *Phil.Trans.R.Soc.A* 379, 20210104.
2. Acha, V., Alba, J., Thalasso, F., 2002. The absolute requirement for carbon dioxide for aerobic methane oxidation by a methanotrophic-heterotrophic soil community of bacteria. *Biotechnol. Lett.* 675, 675-679.
3. Ahmad, Z., Mosa, A., Zhan, L., Gao, B., 2021. Biochar modulates mineral nitrogen dynamics in soil and terrestrial ecosystems: A critical review. *Chemosphere* 278, 130378.
4. Al-Wabel, M.I., Hussain, Q., Usman, A.R.A., Ahmad, M., Abduljabbar, A., Sallam, A.S., Ok, S.Y., 2018. Impact of biochar properties on soil conditions and agricultural sustainability: A review. *L. Degrad. Dev.* 29, 2124–2161.
5. Alam, M.A., Rahman, M.M., Biswas, J.C., Akhter, S., Maniruzzaman, M., Choudhury, A.K., Jahan, M.A.H.S., Miah, M.M.U., Sen, R., Kamal, M.Z.U., Mannan, M.A., Shiragi, H.K., Kabir, W., Kalra, N., 2019. Nitrogen transformation and carbon sequestration in wetland paddy field of Bangladesh. *Paddy Water Environ.* 17, 677-688.
6. Albalasmeh, A., Ghazzehei, T., 2013. Soil aggregate formation: The role of wetting-drying cycles in the genesis of interparticle bonding. *Geophys. Res. Abstr.* 15, EGU2013-5969.
7. Almeida, R.F., Spokas, K.A., Teixeira, D.B., La Scala Jr, N., 2019. Biochar insights from laboratory incubations monitoring O₂ consumption and CO₂ production. *Biochar* 1, 249-258.
8. Amaral, J.A., Ren, T.I.E., Knowles, R., 1998. Atmospheric Methane Consumption by Forest Soils and Extracted Bacteria at Different pH Values. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2397-2402.
9. Ameer, D., Zehetner, F., Johnen, S., Jöchlinger, L., Pardeller, G., Wimmer, B., Rosner, F., Faber, F., Dersch, G., Zechmeister-Boltenstern, S., Mentler, A., Soja, G., Keiblinger, K.M., 2018. Activated biochar alters activities of carbon and nitrogen acquiring soil enzymes. *Pedobiologia - J. Soil Ecol.* 69, 1-10.
10. Auman, A.J., Speake, C.C., Lidstrom, M.E., 2001. nifH Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4009-4016.
11. Ballabio, C., Lugato, E., Fernández-Ugalde, O., Orgiazzi, A., Jones, A., Borrelli, P., Montanarella, L., Panagos, P., 2019. Mapping LUCAS topsoil chemical properties at European scale using Gaussian process regression. *Geoderma* 355, 113912.
12. Bédard, C., Knowles, R., 1989. Physiology, Biochemistry, and Specific Inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53, 68-84.
13. Bednarek, R., Dziadowiec, H., Pokojska, U., Prusinkiewicz, Z., 2011. *Badania ekologiczno-gleboznawcze*, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
14. Beusch, C., 2021. Biochar as a Soil Ameliorant: How Biochar Properties Benefit Soil Fertility—A Review. *J. Geosci. Environ. Prot.* 9, 28-46.
15. Blomqvist, L., Yates, L., Brook, B.W., 2020. Drivers of increasing global crop production: A decomposition analysis. *Environ. Res. Lett.* 15, 0940b6.
16. Blume, H.-P., Brümmer, G.W., Fleige, H., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., Kretschmar, R., Stahr, K., Wilke, B.-M., 2016. *Soil Organisms and Their Habitat*, in: Scheffer/Schachtschabel Soil Science. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 87-122.
17. Bodelier, P.L.E., Roslev, P., Henckel, T., Frenzel, P., 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* 403, 421-424.
18. Bowman, J.P., 2015. *Methylocystis*, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, pp. 1-7.

19. Bowman, J.P., Sly, Nichols, Hayward, 2015. *Methylosinus*, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley and Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, Hoboken, USA, pp. 62-67.
20. Bridgwater, A. V, 2012. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and Bioenergy* 38, 68-94.
21. Brtnicky, M., Datta, R., Holatko, J., Bielska, L., Gusiatin, Z.M., Kucerik, J., Kintl, A., Sudoma, M., Ahmed, N., Pecina, V., 2021. A critical review of the possible adverse effects of biochar in the soil environment. *Sci. Total Environ.* 796, 148756.
22. Brunelle, T., Dumas, P., Souty, F., Dorin, B., Nadaud, F., 2015. Evaluating the impact of rising fertilizer prices on crop yields. *Agric. Econ.* 46, 653-666.
23. Burrell, A.L., Evans, J.P., Kauwe, M.G. De, 2020. Anthropogenic climate change has driven over 5 million km² of drylands towards desertification. *Nat. Commun.* 11, 3853.
24. Cao, T., Chen, W., Yang, T., He, T., Liu, Z., Meng, J., 2017. Surface Characterization of Aged Biochar Incubated in Different Types of Soil 12, 6366-6377.
25. Cassia, R., Nocioni, M., Correa-Aragunde, N., Lamattina, L., 2018. Climate Change and the Impact of Greenhouse Gasses: CO₂ and NO, Friends and Foes of Plant Oxidative Stress. *Front. Plant Sci.* 9, 1-11.
26. Chandra, S., Bhattacharya, J., 2019. Influence of temperature and duration of pyrolysis on the property heterogeneity of rice straw biochar and optimization of pyrolysis conditions for its application in soils. *J. Clean. Prod.* 215, 1123-1139.
27. Chatterjee, R., Sajjadi, B., Chen, W., Mattern, D.L., Hammer, N., Raman, V., Dorris, A., 2020. Effect of Pyrolysis Temperature on PhysicoChemical Properties and Acoustic-Based Amination of Biochar for Efficient CO₂ Adsorption. *Front. Energy Res.* 8, 1-18.
28. Chen, L., Sun, S., Yao, B., Peng, Y., Gao, C., Qin, T., Zhou, Y., Sun, C., Quan, W., 2022. Effects of straw return and straw biochar on soil properties and crop growth: A review. *Front. Plant Sci.* 13, 1-12.
29. Chistoserdova, L., 2018. Methanotrophy: An Evolving Field, in: Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H. (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer International Publishing AG part of Springer Nature, Cham, Switzerland, pp. 1-15.
30. Chiu, C.F., Huang, Z.D., 2020. Microbial Methane Oxidation and Gas Adsorption Capacities of Biochar-Modified Soils. *Int. J. Geosynth. Gr. Eng.* 6:24, 1-14.
31. Chowdhury, T.R., Dick, R.P., 2021. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Appl. Soil Ecol.* 65, 8-22.
32. Ciais, P., Sabine, G., Bala, L., Bopp, V., Brovkin, J., Canadell, A., Chhabra, R., DeFries, J., Galloway, M., Heimann, C., Jones, C., Le Quéré, R.B., Myneni, S., Piao and P. Thornton, 2013: Carbon and Other Biogeochemical Cycles. in: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA, 465-570.
33. Collins, D.A., Akberdin, I., Kalyuzhnaya, M.G., 2017. *Methylobacter*, in: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., De Vos, P. et al. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, Hoboken, NJ, pp. 1-9.
34. Conrad, R., 1996. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* 60, 609-640.
35. Coomes, O.T., Miltner, B.C., 2017. Indigenous Charcoal and Biochar Production: Potential for Soil Improvement under Shifting Cultivation Systems. *L. Degrad. Dev.* 28, 811-821.

36. Cui, X., Yang, J., Shi, X., Lei, W., Huang, T., Bai, C., 2019. Pelletization of Sunflower Seed Husks: Evaluating and Optimizing Energy Consumption and Physical Properties by Response Surface Methodology (RSM). *Processes* 7,1-20.
37. Curaqueo, G., Cea, M., Vera, L., 2017. Environmental hotspots in the life cycle of a biochar-soil system 158, 1-7.
38. Danilova, O. V, Suzina, N.E., Kamp, J. Van De, Svenning, M.M., Bodrossy, L., Dedysh, S.N., 2016. A new cell morphotype among methane oxidizers : a spiral-shaped obligately microaerophilic methanotroph from northern low-oxygen environments. *ISME J.* 10, 2734-2743.
39. Daszczyńska, A., Matlakowska, R., 2021. Łupek miedzionośny a metabolizm metanu - znaczenie mikroorganizmów metanogennych i metanotroficznych w kopalniach monokliny przedsudeckiej, in: Ratajczak, T. (Ed.), *Łupek Miedzionośny V*. WGGG PWi, Wrocław, pp. 20-35.
40. Debaeke, P., Bedoussac, L., Bonnet, C., Emmannelle, M., Seassau, C., Gavaland, A., Raffailac, D., Tribouillois, H., Vericel, G., Justes, E., 2017. Sunflower crop: environmental-friendly and agroecological. *OCL Oilseeds fats Crop. lipids* 23, 1-12.
41. Dedysh, S.N., Knief, C., 2018. Diversity and Phylogeny of Described Aerobic Methanotrophs, in: Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H. (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer International Publishing AG part of Springer Nature, Cham, Switzerland, pp. 17-42.
42. Demirbas, A., Arin, G., 2002. An Overview of Biomass Pyrolysis. *Energy Sources* 24, 471-482.
43. Deng, J., Qu, J., Wang, Q.-H., Xiao, Y., Cheng, Y.-C., Shu, C.-M., 2019. Experimental data revealing explosion characteristics of methane, air, and coal mixtures. *RSC Adv.* 9,
44. Ding, W., Dong, X., Ime Mandu, I., Gao, B., Ma, L.Q., 2014. Pyrolytic temperatures impact lead sorption mechanisms by bagasse biochars. *Chemosphere* 105, 68-74.
45. Donohoe, A., Armour, K.C., Pendergrass, A.G., Battisti, D.S., 2014. Shortwave and longwave radiative contributions to global warming under increasing CO₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16700-16705.
46. Duke, S.O., 2020. Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Sci.* 68, 201-207.
47. Dunfield, P.F., Liesack, W., Henckel, T., Knowles, R., Conrad, R., 1999. High-Affinity Methane Oxidation by a Soil Enrichment Culture Containing a Type II Methanotroph. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1009-1014.
48. Fang, H., Cheng, S., Yu, G., Cooch, J., Wang, Y., Xu, M., Li, L., Dang, X., Li, Y., 2014. Low-level nitrogen deposition significantly inhibits methane uptake from an alpine meadow soil on the Qinghai - Tibetan Plateau. *Geoderma* 213, 444-452.
49. Felice, M.L., Schmidt, R., Peng, J., Sieyes, N.R. de, Scow, K.M., Mackay, D.M., 2018. Methane-Oxidizing Bacteria Communities Shift to Attenuate a Controlled Vadose Zone Methane Release. *Vadose Zo. J.* 17, 180089.
50. Feng, J., Li, F., Zhou, X., Xu, C., Ji, L., Chen, Z., Fang, F., 2018. Impact of agronomy practices on the effects of reduced tillage systems on CH₄ and N₂O emissions from agricultural fields: A global meta-analysis. *PLoS One* 13, 1-17.
51. Feng, Y., Xu, Y., Yu, Y., Xie, Z., Lin, X., 2012. Mechanisms of biochar decreasing methane emission from Chinese paddy soils. *Soil Biol. Biochem.* 46, 80-88.
52. Fischer, B.M.C., Manzoni, S., Morillas, L., Garcia, M., Johnson, M.S., Lyon, S.W., 2019. Improving agricultural water use efficiency with biochar - A synthesis of biochar effects on water storage and fluxes across scales. *Sci. Total Environ.* 657, 853-862.
53. Furtak, K., 2017. Metanotrofy - niesamowite mikroorganizmy, in: Leśny, J., Chojnicki, B.H., Panfil, M., Nyckowiak, J. (Eds.), *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce*. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy, pp. 38-43.

54. GEF Secretariat, 2022. Combating Land Degradation. Global Environment Facility 1-8. <https://www.thegef.org/newsroom/publications/combating-land-degradation>. Dostęp: 09 Stycznia 2023.
55. Główny Urząd Statystyczny, 2022. Produkcja upraw rolnych i ogrodnich w 2021 roku. Warszawa.
56. Główny Urząd Statystyczny, 2005. Produkcja upraw rolnych i ogrodnich w 2004 r. Warszawa.
57. Gluba, Ł., Rafalska-Przysucha, A., Szewczak, K., Łukowski, M., Szlązak, R., Vitková, J., Kobyłecki, R., Bis, Z., Wichliński, M., Zarzycki, R., Kacprzak, A., Usowicz, B., 2021. Effect of fine size-fractionated sunflower husk biochar on water retention properties of arable sandy soil. *Materials (Basel)*. 14, 1335.
58. Gradziuk, P., Gradziuk, B., Trocewicz, A., Jendrzewski, B., 2020. Potential of Straw for Energy Purposes in Poland - Forecasts Based on Trend and Causal Models. *Energies* 13, 1-22.
59. Grzebisz, W., Szczepaniak, W., Diatta, J.B., 2005. ABC Wapnowania Gleb Uprawnych. Produkt. Poznań, pp. 1-36.
60. Guerrero-Cruz, S., Vaksmaa, A., Horn, M.A., Niemann, H., Pijuan, M., Ho, A., 2021. Methanotrophs: Discoveries, Environmental Relevance, and a Perspective on Current and Future Applications. *Front. Microbiol.* 12, 678057.
61. Gul, S., Whalen, J.K., Thomas, B.W., Sachdeva, V., Deng, H., 2015. Physico-chemical properties and microbial responses in biochar-amended soils: Mechanisms and future directions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 206, 46-59.
62. Guo, W., Feng, L., Wu, D., Zhang, C., Tian, X., 2019. Effectiveness of flame for preplant pest management in leaf vegetable fields. *Horttechnology* 29, 788-794.
63. Hagemann, N., Kammann, C.I., Schmidt, H.-P., Kappler, A., Behrens, S., 2017. Nitrate capture and slow release in biochar amended compost and soil. *PLoS One* 12, 1-16.
64. Hale, S.E., Lehmann, J., Rutherford, D., Zimmerman, A.R., Bachmann, R.T., Shitumbanuma, V., O'Toole, A., Sundqvist, K.L., Arp, H.P.H., Cornelissen, G., 2012. Quantifying the total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins in biochars. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2830-2838.
65. Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1-9.
66. Hamza, M.A., Anderson, W.K., 2005. Soil compaction in cropping systems A review of the nature, causes and possible solutions. *Soil Tillage Res.* 82, 121-145.
67. Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439-471.
68. Hayes, F., Lloyd, B., Mills, G., Jones, L., Dore, A.J., Carnell, E., Vieno, M., Dise, N., Fenner, N., 2019. Impact of long-term nitrogen deposition on the response of dune grassland ecosystems to elevated summer ozone. *Environ. Pollut.* 253, 821-830.
69. He, J., Zhou, W., Guo, S., Deng, X., Song, J., Xu, D., 2022. Effect of land transfer on farmers' willingness to pay for straw return in Southwest China. *J. Clean. Prod.* 369, 133397.
70. He, Y., Zhou, X., Jiang, L., Li, M., Du, Z., Zhou, G., Shao, J., Wang, X., Xu, Z., Hosseini Bai, S., Wallace, H., Xu, C., 2017. Effects of biochar application on soil greenhouse gas fluxes: a meta-analysis. *GCB Bioenergy* 9, 743-755.
71. Ho, A., Kerckhof, F.-M., Luke, C., Reim, A., Krause, S., Boon, N., Bodelier, P.L.E., 2012. Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 1-11.
72. Huang, D., Yang, L., Ko, J.H., Xu, Q., 2019. Comparison of the methane-oxidizing capacity of landfill cover soil amended with biochar produced using different pyrolysis

- temperatures. *Sci. Total Environ.* 693, 133594.
73. Hui, D., 2021. Effects of Biochar Application on Soil Properties , Plant Biomass Production , and Soil Greenhouse Gas Emissions: A Mini-Review. *Agric. Sci.* 12, 213-236.
 74. Huntington, T.G., 2007. Available Water Capacity and Soil Organic Matter. In *Encyclopedia of Soil Science, Second Edition*. Taylor and Francis: New York, Published online: 12 Dec 2007; 139-143.
 75. IPCC, 2022: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. Cambridge University Press. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, pp. 3056.
 76. IPCC, 2007: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA, pp. 996.
 77. IPCC, 2001: *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Houghton, J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA, pp. 881.
 78. Ippolito, J.A., Stromberger, M.E., Lentz, R.D., Dungan, R.S., 2014. Hardwood Biochar Influences Calcareous Soil Physicochemical and Microbiological Status. *J. Environ. Qual.* 43, 681-689.
 79. IUSS Working Group WRB, 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015 International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. *World Soil Resources Reports No. 106*. FAO, Rome.
 80. Janusz, P., 2010. Zasoby gazu ziemnego w Polsce jako czynnik poprawiający bezpieczeństwo energetyczne, na tle wybranych państw UE. *Polityka Energ.* 13, 1429-6675.
 81. Jastrzębska, M., Kostrzevska, M., Saeid, A., 2022. Chapter 2 - Sustainable agriculture: A challenge for the future, in: Chojnacka, K., Saeid, A. (Eds.), *Smart Agrochemicals for Sustainable Agriculture*. Smart Agrochemicals for Sustainable Agriculture, Academic Press, pp. 29-56.
 82. Jeffery, S., Verheijen, F.G.A., Kammann, C., Abalos, D., 2016. Biochar effects on methane emissions from soils: A meta-analysis. *Soil Biol. Biochem.* 101, 251-258.
 83. Joshi Gyawali, A., Lester, B.J., Stewart, R.D., 2019. Talking SMAAC: A New Tool to Measure Soil Respiration and Microbial Activity. *Front. Earth Sci.* 7, 138.
 84. Kalyuzhnaya, M.G., 2016. *Methylobacterium*, in: Whitman, W.B. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, Hoboken, NJ, pp. 1-10.
 85. Karbin, S., Guillet, C., Kammann, C.I., Niklaus, P.A., 2015. Effects of Long-Term CO₂ Enrichment on Soil- Atmosphere CH₄ Fluxes and the Spatial Micro-Distribution of Methanotrophic Bacteria. *PLoS One* 10, 1-14.
 86. Karhu, K., Mattila, T., Bergström, I., Regina, K., 2011. Biochar addition to agricultural soil increased CH₄ uptake and water holding capacity - Results from a short-term pilot field study. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 309-313.
 87. Kavitha, B., Venkata, P., Reddy, L., Kim, B., Soo, S., Kumar, S., Kim, K., 2018. Benefits

- and limitations of biochar amendment in agricultural soils: A review. *J. Environ. Manage.* 227, 146-154.
88. Kaya, Y., Jovic, S., Miladinovic, D., 2012. Sunflower. In: Gupta S. (eds) *Technological Innovations in Major World Oil Crops*, Volume 1. Springer, New York, NY.
 89. Klimek-Kopyra, A., Sadowska, U., Kuboń, M., Gliniak, M., Sikora, J., 2021. Sunflower Husk Biochar as a Key Agrotechnical Factor Enhancing Sustainable Soybean Production. *Agriculture* 11, 1-14.
 90. Komisja Europejska, 2022. Europejski Zielony Ład: Aspirowanie do miana pierwszego kontynentu neutralnego dla klimatu. https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_pl. Dostęp: 12 Grudnia 2022.
 91. Kroeger, J.E., Masiello, C.A., Medlock, K.B., 2021. Water cost savings from soil biochar amendment: A spatial analysis. *GCB Bioenergy* 13, 133-142.
 92. Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *Int. Agrophysics* 34, 355-364.
 93. Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Sci. Total Environ.* 806, 151259.
 94. Kulkarni, S., Dhakar, K., Amaraja, J., 2019. Chapter 15 - Alkaliphiles: Diversity and Bioprospection, in: Editor(s): Surajit Das, Hirak Ranjan Dash, *Microbial Diversity in the Genomic Era*, Academic Press, pp. 239-263.
 95. Kurowska, A., 2016. Struktura podaży odpadów drzewnych w Polsce. *SYLWAN* 160, 187-196.
 96. Kuś, J., 2015. Glebowa materia organiczna - znaczenie, zawartość i bilansowanie, in: *Kształtowanie Żyzności Gleby. Studia i Raporty IUNG-PIB*, Puławy, pp. 27-53.
 97. Kuzyakov, Y., 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biol. Biochem.* 38, 425-448.
 98. La, H., Hettiaratchi, J.P.A., Achari, G., Kim, J.-J., Dunfield, P.F., 2018a. Investigation of Biologically Stable Biofilter Medium for Methane Mitigation by Methanotrophic Bacteria. *J. Hazard. Toxic Radioact. Waste* 22, 04018013.
 99. La, H., Hettiaratchi, J.P.A., Achari, G., Verbeke, T.J., Dunfield, P.F., 2018b. Biofiltration of methane using hybrid mixtures of biochar, lava rock and compost. *Environ. Pollut.* 241, 45-54.
 100. Ledakowicz, S., Krzystek, L., 2005. Wykorzystanie fermentacji metanowej w utylizacji odpadów przemysłu rolno-spożywczego. *Biotechnologia* 3, 165-183.
 101. Lehmann, J., 2009. Terra Preta Nova - Where to from Here? *Amaz. Dark Earths Wim Sombroek's Vis.* 473-486.
 102. Lehmann, J., 2007. Bio-energy in the black. *Front Ecol Env.* 5, 381-387.
 103. Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1812-1836.
 104. Lehmann, J., Rondon, M., 2006. Bio-Char Soil Management on Highly Weathered Soils in the Humid Tropics 3, 517-529.
 105. Lentz, R.D., Ippolito, J.A., Spokas, K.A., 2014. Biochar and Manure Effects on Net Nitrogen Mineralization and Greenhouse Gas Emissions from Calcareous Soil under Corn. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 1641-1655.
 106. Li, H., Lu, X., Xu, Y., Liu, H., 2019. How close is artificial biochar aging to natural biochar aging in fields? A meta-analysis. *Geoderma* 352, 96-103.
 107. Li, Yongfu, Hu, S., Chen, J., Müller, K., Li, Yongchun, Fu, W., Lin, Z., Wang, H., 2018. Effects of biochar application in forest ecosystems on soil properties and greenhouse gas emissions: a review. *J. Soils Sediments* 18, 546-563.

108. Liao, S., Pan, B., Li, H., Zhang, D., Xing, B., 2014. Detecting Free Radicals in Biochars and Determining Their Ability to Inhibit the Germination and Growth of Corn, Wheat and Rice Seedlings. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8581-8587.
109. Liao, W., Thomas, S.C., 2019. Biochar Particle Size and Post-Pyrolysis Mechanical Processing Affect Soil pH, Water Retention Capacity, and Plant Performance. *Soil Syst.* 2, 14.
110. Lin, Y., Cho, J., Tompsett, G.A., Westmoreland, P.R., Huber, G.W., 2009. Kinetics and Mechanism of Cellulose Pyrolysis. *J. Phys. Chem. C* 113, 20097-20107.
111. Liu, C., Wang, H., Tang, X., Guan, Z., Reid, B.J., Rajapaksha, A.U., Ok, Y.S., Sun, H., 2016. Biochar increased water holding capacity but accelerated organic carbon leaching from a sloping farmland soil in China. *Env. Sci Pollut Res* 23, 995-1006.
112. Liu, Y., Tang, H., Muhammad, A., Huang, G., 2019. Emission mechanism and reduction countermeasures of agricultural greenhouse gases - a review. *Res. Cent. Ecol. Sci.* 174, 160-174.
113. Liu, Y., Yang, M., Wu, Y., Wang, H., Chen, Y., Wu, W., 2011. Reducing CH₄ and CO₂ emissions from waterlogged paddy soil with biochar. *J Soils Sediments* 11, 930-939.
114. Liu, Z., Deng, Z., Davis, S.J., Giron, C., Ciasis, P., 2022. Monitoring global carbon emissions in 2021. *Nat. Rev. Earth Environ.* 3, 217-219.
115. López-Valdez, F., Fernández-Luqueño, F., Luna-Suárez, S., Dendooven, L., 2011. Greenhouse gas emissions and plant characteristics from soil cultivated with sunflower (*Helianthus annuus* L.) and amended with organic or inorganic fertilizers. *Sci. Total Environ.* 412-413, 257-264.
116. Lu, X., Yin, Yan, Li, S., Ma, H., Gao, R., Yin, Yunfeng, 2021. Effects of Biochar Feedstock and Pyrolysis Temperature on Soil Organic Matter Mineralization and Microbial Community Structures of Forest Soils. *Front. Environ. Sci.* 9, 1-9.
117. Ludwig, J., Meixner, F.X., Vogel, B., Förstner, J., 2001. Soil-air exchange of nitric oxide: An overview of processes, environmental factors, and modeling studies. *Biogeochemistry* 52, 225-257.
118. Luo, Y., Yu, Z., Zhang, K., Xu, J., Brookes, P.C., 2016. The properties and functions of biochars in forest ecosystems. *J. Soils Sediments* 16, 2005-2020.
119. Ma, Y., Shen, Y., Liu, Y., 2020. State of the art of straw treatment technology: challenges and solutions forward. *Bioresour. Technol.* 313, 123656.
120. Malorgio, G., Marangon, F., 2021. Agricultural business economics: the challenge of sustainability. *Malorgio Marangon Agric. Food Econ.* 9, 4-7.
121. Malyan, S.K., Bhatia, A., Kumar, A., Gupta, D.K., Singh, R., Kumar, S.S., Tomer, R., Kumar, O., Jain, N., 2016. Methane production, oxidation and mitigation: A mechanistic understanding and comprehensive evaluation of influencing factors. *Sci. Total Environ.* 572, 874-896.
122. Mao, J., Zhang, K., Chen, B., 2019. Linking hydrophobicity of biochar to the water repellency and water holding capacity of biochar-amended soil. *Environ. Pollut.* 253, 779-789.
123. Martínez-Pérez, C., Mohr, W., Schwedt, A., Dürschlag, J., Callbeck, C.M., Schunck, H., Dekaezemaker, J., Buckner, C.R.T., Lavik, G., Fuchs, B.M., Kuypers, M.M.M., 2017. Metabolic versatility of a novel N₂-fixing Alphaproteobacterium isolated from a marine oxygen minimum zone. *Environ. Microbiol.* 20, 755-768.
124. Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., Klimkowicz-Pawlas, A., Kopeć, M., 2018. Effect of coapplication of poultry litter biochar and mineral fertilisers on soil quality and crop yield. *Zemdirbyste-Agriculture* 105, 203-210.
125. Mikula, K., Soja, G., Segura, C., Berg, A., Pfeifer, C., 2020. Carbon Sequestration in Support of the “4 per 1000” Initiative Using Compost and Stable Biochar from Hazelnut

- Shells and Sunflower Husks. *Processes* 8, 1-13.
126. Mohanty, S.R., Bodelier, P.L.E., Floris, V., Conrad, R., 2006. Differential Effects of Nitrogenous Fertilizers on Methane-Consuming Microbes in Rice Field and Forest Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1346.
 127. Mouchi, V., Chapron, L., Peru, E., Pruski, A.M., Meistertzheim, A.L., Vétion, G., Galand, P.E., Lartaud, F., 2019. Long-term aquaria study suggests species-specific responses of two cold-water corals to macro-and microplastics exposure. *Environ. Pollut.* 253, 322-329.
 128. Mukherjee, A., Lal, R., Zimmerman, A.R., 2014. Effects of biochar and other amendments on the physical properties and greenhouse gas emissions of an artificially degraded soil. *Sci. Total Environ.* 487, 26-36.
 129. Murali, A., Bhargava, A., Wright, E.S., 2018. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome* 6, 140.
 130. Nair, V.D., Mukherjee, A., 2022. The use of biochar for reducing carbon footprints in land-use systems: prospects and problems. *Carbon Footprints* 1, 1-17.
 131. Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 68, 12-26.
 132. National Center for Biotechnology Information, 2005. PubChem Compound Summary for CID 280, Carbon Dioxide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbon-Dioxide>. Dostęp: 18 Grudnia 2022.
 133. Nieder, R., Benbi, D.K., 2008. Carbon and Nitrogen Pools in Terrestrial Ecosystems, in: *Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment*. Springer Science, pp. 5–44.
 134. Niu, H., Kang, S., Gao, W., Wang, Y., Paudyal, R., 2019. Vertical distribution of the Asian tropopause aerosols detected by CALIPSO. *Environ. Pollut.* 253, 207-220.
 135. Noyce, G.L., Winsborough, C., Fulthorpe, R., Basiliko, N., 2016. The microbiomes and metagenomes of forest biochars. *Sci. Rep.* 6, 1-12.
 136. Odinga, E.S., Waigi, M.G., Gudda, F.O., Wang, J., Yang, B., Hu, X., Li, S., Gao, Y., 2020. Occurrence, formation, environmental fate and risks of environmentally persistent free radicals in biochars. *Environ. Int.* 134, 105172.
 137. Oertel, C., Matschullat, J., Zurba, K., Zimmermann, F., Erasmi, S., 2016. Greenhouse gas emissions from soils — A review. *Chemie der Erde - Geochemistry* 76, 327-352.
 138. Oshkin, I.Y., Miroshnikov, K.K., Grouzdev, D.S., Dedysh, S.N., 2020. Pan-Genome-Based Analysis as a Framework for Demarcating Two Closely Related Methanotroph Genera *Methylocystis* and *Methylosinus*. *Microorganisms* 8, 1-18.
 139. Ouyang, L., Tang, Q., Yu, L., Zhang, R., 2014. Effects of amendment of different biochars on soil enzyme activities related to carbon mineralisation. *Soil Res.* 52, 706-716.
 140. Özçimen, D., Karaosmanoğlu, F., 2004. Production and characterization of bio-oil and biochar from rapeseed cake. *Renew. Energy* 29, 779-787.
 141. Palansooriya, K.N., Ok, Y.S., Awad, Y.M., Lee, S.S., Sung, J., Koutsospyros, A., Hyun, D., 2019. Impacts of biochar application on upland agriculture: A review. *J. Environ. Manage.* 234, 52-64.
 142. Palmieri, N., Forleo, M.B., Giannoccaro, G., Suardi, A., 2017. Environmental impact of cereal straw management: An on-farm assessment. *J. Clean. Prod.* 142, 2950-2964.
 143. Paluszek, J., 2010. Ocena jakości stanu fizycznego gleb pływych i czarnych ziem wytworzonych z utworów pyłowych. *Rocz. Glebozn.* 61, 186-193.
 144. Pfister, M., Saha, S., 2017. Effects of biochar and fertilizer management on sunflower (*Helianthus annuus* L.) feedstock and soil properties. *Arch. Agron. Soil Sci.* 63, 651-662.
 145. Pfluger, A.R., Wu, W., Pieja, A.J., Wan, J., Rostkowski, K.H., Criddle, C.S., 2011. Selection of Type I and Type II methanotrophic proteobacteria in a fluidized bed reactor under non-sterile conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 9919-9926.

146. Philips, R.L., Whalena, S.C., Schlesinger, W.H., 2001. Influence of atmospheric CO₂ enrichment on methane consumption in a temperate forest soil. *Glob. Chang. Biol.* 7, 557-563.
147. Pilorgé, E., 2020. Sunflower in the global vegetable oil system: situation, specificities and perspectives. *OCL Oilseeds fats Crop. Lipids* 27, 34.
148. Popkiewicz, M., Kardaś, A., Malinowski, S., 2021. Nauka o klimacie. Nieoczywiste, pp. 75-87.
149. Pramer, D., Schmidt, E.L., 1964. *Experimental soil microbiology*. Burgess Publ. Company, Minneapolis, MN.
150. Pytlak, A., Kuźniar, A., Stepniewska, Z., 2012. pmoA based detection of methanotrophic bacteria in coal-bed rocks of the Lublin coal basin. *Acta Agrophysica* 19, 403-413.
151. Pytlak, A., Stepniewska, Z., Kuźniar, A., Szafranek-Nakonieczna, A., Wolińska, A., Banach, A., 2014. Potential for Aerobic Methane Oxidation in Carboniferous Coal Measures. *Geomicrobiol. J.* 31, 737-747.
152. Qiu, L., Zhang, Q., Zhu, H., Reich, P.B., Banerjee, S., van der Heijden, M.G.A., Sadowsky, M.J., Ishii, S., Jia, X., Shao, M., Liu, B., Jiao, H., Li, H., Wei, X., 2021. Erosion reduces soil microbial diversity, network complexity and multifunctionality. *ISME J.* 15, 2474-2489.
153. Quan, G., Fan, Q., Zimmerman, A.R., Sun, J., Cui, L., Wang, H., Gao, B., Yan, J., 2020. Effects of laboratory biotic aging on the characteristics of biochar and its water-soluble organic products. *J. Hazard. Mater.* 382, 121071.
154. Rafalska-Przysucha, A., Szlązak, R., Vitková, J., Gluba, Ł., 2020. How do grain size and dose of sunflower husk biochar influence the water retention of sandy soil?, in: *EGU General Assembly 2020*. p. 345940.
155. Rajkai, K., Vég, K.R., Várallyay, G., Farkas, C.S., 1997. Impacts of soil structure on crop growth. *Int. Agrophysics* 11, 97-109.
156. Ray, R.L., Griffin, R.W., Fares, A., Elhassan, A., Awal, R., Woldesenbet, S., Risch, E., 2020. Soil CO₂ emission in response to organic amendments, temperature, and rainfall. *Sci. Rep.* 10, 5849.
157. Reddy, K.R., Rai, R.K., Green, S.J., Chetri, J.K., 2020. Effect of pH on Methane Oxidation and Community Composition in Landfill Cover Soil. *J. Environ. Eng.* 146, 1-10.
158. Reddy, K.R., Yargicoglu, E.N., Yue, D., Yaghoubi, P., 2014. Enhanced microbial methane oxidation in landfill cover soil amended with biochar. *J. Geotech. Geoenvironmental Eng.* 140, 1-11.
159. Redlin, M., Gries, T., 2021. Anthropogenic climate change: the impact of the global carbon budget. *Theor. Appl. Climatol.* 146, 713-721.
160. Reim, A., Luke, C., Krause, S., Pratscher, J., Frenzel, P., 2012. One millimetre makes the difference: high-resolution analysis of methane-oxidizing bacteria and their specific activity at the oxic-anoxic interface in a flooded paddy soil. *Int. Soc. Microb. Ecol.* 6, 2128-2139.
161. Ribas, A., Mattana, S., Llurba, R., Debouk, H., Sebastià, M.T., Domene, X., 2019. Biochar application and summer temperatures reduce N₂O and enhance CH₄ emissions in a Mediterranean agroecosystem: Role of biologically-induced anoxic microsites. *Sci. Total Environ.* 685, 1075-1086.
162. Rigby, M., Montzka, S.A., Prinn, R.G., White, J.W.C., Young, D., O'Doherty, S., Lunt, M.F., Ganesan, A.L., Manning, A.J., Simmonds, P.G., Salameh, P.K., Harth, C.M., Muhle, J., Weiss, R.F., Fraser, P.J., Steele, L.P., Krummel, P.B., Mcculloch, A., Park, S., 2017. Role of atmospheric oxidation in recent methane growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 5373-5377.

163. Ritchie, G., Dolling, P., 1985. The Role of Organic Matter in Soil Acidification. *Aust. J. Soil Res.* 23, 569-76.
164. Saari, A., Rinnan, R., Martikainen, P.J., 2004. Methane oxidation in boreal forest soils: kinetics and sensitivity to pH and ammonium. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1037-1046.
165. Sadasivam, B.Y., Reddy, K.R., 2015. Adsorption and transport of methane in biochars derived from waste wood. *Waste Manag.* 43, 218-229.
166. Sadigov, R., 2022. Rapid Growth of the World Population and Its Socioeconomic Results. *Sci. World J.* 2022, 8110229.
167. Saletnik, B., Zagula, G., Bajcar, M., Tarapatsky, M., Bobula, G., Puchalski, C., 2019. Biochar as a Multifunctional Component of the Environment—A Review. *Appl. Sci.* 9, 1139.
168. Sanford, J.R., Larson, R.A., Runge, T., 2019. Nitrate sorption to biochar following chemical oxidation. *Sci. Total Environ.* 669, 938-947.
169. Schmidt, H.P., Kammann, C., Hagemann, N., Leifeld, J., Bucheli, T.D., Sánchez Monedero, M.A., Cayuela, M.L., 2021. Biochar in agriculture - A systematic review of 26 global meta-analyses. *GCB Bioenergy* 13, 1708-1730.
170. Schulze, E.D., Luyssaert, S., Ciais, P., Freibauer, A., Janssens, I.A., 2009. Importance of methane and nitrous oxide for Europe's terrestrial greenhouse-gas balance. *Nat. Geosci.* 2, 842-850.
171. Searchinger, T., Herrero, M., Yan, X., Wang, J., Dumas, P., Beauchemin, K., Kebreab, E., 2021. Opportunities to Reduce Methane Emissions from Global Agriculture, pp. 1-40.
172. Seghers, D., Siciliano, S.D., Top, E.M., Verstraete, W., 2005. Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community. *Soil Biol. Biochem.* 37, 187-193.
173. Sengupta, A., Dick, W.A., 2017. Methanotrophic bacterial diversity in two diverse soils under varying land-use practices as determined by high-throughput sequencing of the *pmoA* gene. *Appl. Soil Ecol.* 119, 35-45.
174. Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L., Luna-Guido, M., 2014. Methanogenesis and Methanotrophy in Soil : A Review*1. *Pedosphere* 24, 291-307.
175. Shah, T., Shah, S., Shah, Z., 2017. Soil respiration, pH and EC as influenced by biochar. *Soil Environ.* 36, 77-83.
176. Shaukat, R.A., Saqib, Q.M., Khan, M.U., Chougale, M.Y., Bae, J., 2021. Bio-waste sunflower husks powder based recycled triboelectric nanogenerator for energy harvesting. *Energy Reports* 7, 724-731.
177. Shaw, R., Williams, A.P., Miller, A., Jones, D.L., 2013. Assessing the Potential for Ion Selective Electrodes and Dual Wavelength UV Spectroscopy as a Rapid on-Farm Measurement of Soil Nitrate Concentration. *Agriculture* 3, 327-341.
178. Shiau, Y.-J., Cai, Y., Jia, Z., Chen, C.-L., Chiu, C.-Y., 2018. Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan. *Soil Biol. Biochem.* 124, 59-69.
179. Siczek, A., Kalembasa, S., Kalembasa, D., Becher, M., Symanowicz, B., 2020. Influence of Nod factors on the quantity and distribution in faba bean of symbiotically fixed nitrogen as determined by the ¹⁵N isotope dilution method. *Crop Sci.* 60, 2720-2731.
180. Šimanský, V., Kováčik, P., Jonczak, J., 2017. The Effect of Different Doses of N Fertilization on the Parameters of Soil Organic Matter and Soil Sorption Complex. *J. Ecol. Eng.* 18, 104-111.
181. Skopp, J., Jawson, M.D., Doran, J.W., 1990. Steady-State Aerobic Microbial Activity as a Function of Soil Water Content. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 1619-1625.
182. Smebye, A., Alling, V., Vogt, R.D., Gadmar, T.C., Mulder, J., Cornelissen, G., Hale,

- S.E., 2016. Biochar amendment to soil changes dissolved organic matter content and composition. *Chemosphere* 142, 100-105.
183. Sohi, S.P., Krull, E., Lopez-Capel, E., Bol, R., 2010. A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. *Adv. Agron.* 105, 47-82.
 184. Sokołowska, Z., Szewczuk-Karpisz, K., Turski, M., Tomczyk, A., Cybulak, M., Skic, K., 2020. Effect of Wood Waste and Sunflower Husk Biochar on Tensile Strength and Porosity of Dystric Cambisol Artificial Aggregates. *Agronomy* 10, 244.
 185. Spokas, K.A., Koskinen, W.C., Baker, J.M., Reicosky, D.C., 2009. Impacts of woodchip biochar additions on greenhouse gas production and sorption/degradation of two herbicides in a Minnesota soil. *Chemosphere* 77, 574-581.
 186. Spokas, K.A., Reicosky, D.C., 2009. Impacts of Sixteen Different Biochars on Soil Greenhouse Gas Production. *Ann. Environ. Sci.* 3, 179-193.
 187. Stein, L.Y., 2018. Proteobacterial Methanotrophs, Methylophs, and Nitrogen, in: Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.-H. (Eds.), *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer International Publishing AG part of Springer Nature, Cham, Switzerland, pp. 57-66.
 188. Stępniewska, Z., Goraj, W., Kuźniar, A., 2014. Przemiany metanu w środowiskach torfowych. *Leśne Pr. Badaw.* 75, 101-110.
 189. Strong, P.J., Xie, S., Clarke, W.P., 2015. Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4001-4018.
 190. Systematyka gleb Polski, 2019. Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Komisja Genezy Klasyfikacji i Kartografii Gleb. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Wrocław-Warszawa, pp. 132-133.
 191. Szafranek-Nakonieczna, A., Wolińska, A., Zielenkiewicz, U., Kowalczyk, A., Stępniewska, Z., Błaszczuk, M., 2019. Activity and Identification of Methanotrophic Bacteria in Arable and No-Tillage Soils from Lublin Region (Poland). *Microb. Ecol.* 77, 701-712.
 192. Szewczak, K., Jednoróg, S., Wołoszczuk, K., Gluba, Ł., Rafalska-Przysucha, A., Łukowski, M., 2021. Radon emission fluctuation as a result of biochar application into the soil. *Sci. Rep.* 11, 1-11.
 193. Szymański, W., Nikorych, V.A., 2012. Gleby płowe (Luvisols) Pogórza i Przedgórze Karpackiego z obszaru Polski i Ukrainy. *Rocz. Bieszczadzkie* 20, 268-280.
 194. Tabari, H., 2020. Climate change impact on flood and extreme precipitation increases with water availability. *Sci. Rep.* 10, 13768.
 195. Takeuchi, M., 2016. *Methylocaldum*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, Hoboken, NJ, pp. 1-5.
 196. Tarasov, D., Leitch, M., Fatehi, P., 2018. Lignin-carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: a review. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1-28.
 197. Team, C.W., Pachauri, R.K., Meyer, L.A., 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva, Switzerland.
 198. Thomazini, A., Spokas, K., Hall, K., Ippolito, J., Lentz, R., Novak, J., 2015. GHG impacts of biochar: Predictability for the same biochar. *Agric. Ecosyst. Environ.* 207, 183-191.
 199. Thompson, L., Sanders, J., McDonald, D., Al., E., 2017. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457-463.
 200. Tkaczyk, P., Bednarek, W., Dresler, S., Krzyszczak, J., Baranowski, P., Sławiński, C.,

2017. Relationship between assimilable-nutrient content and physicochemical properties of topsoil. *Int. Agrophysics* 31, 551-562.
201. Tomczyk, A., Sokołowska, Z., Boguta, P., 2020. Biochar physicochemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 19, 191-215.
202. Topp, E., 1993. Effects of selected agrochemicals on methane oxidation by an organic agricultural soil. *Can. J. Soil Sci.* 73, 287-291.
203. Tóth, G., Montanarella, L., Stolbovoy, V., Máté, F., Bódis, K., Jones, A., Panagos, P., Van Liedekerke, M., 2008. Soils of the European union. JRC Scientific and Technical Reports, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp.40-41.
204. Trimble, W.H., 1851. On charring wood. *Plough, Loom Anvil* 3, 513-516.
205. Ullah, S., Liang, H., Ali, I., Zhao, Q., Iqbal, A., Wei, S., Shah, T., Yan, B., Jiang, L., 2020. Biochar coupled with contrasting nitrogen sources mediated changes in carbon and nitrogen pools, microbial and enzymatic activity in paddy soil. *J. Saudi Chem. Soc.* 24, 835-849.
206. USDA Foreign Agricultural Service, 2022. World Agricultural Production. *Circ. Ser. WAP 4-22*, 1-37.
207. Usowicz, B., Lipiec, J., Łukowski, M., Marczewski, W., Usowicz, J., 2016. The effect of biochar application on thermal properties and albedo of loess soil under grassland and fallow. *Soil Tillage Res.* 164, 45-51.
208. Van Bavel, J., 2013. The world population explosion: causes, backgrounds and projections for the future. *Facts Views Vis Obgyn.* 5, 281-291.
209. Vassilev, S. V, Vassileva, C.G., Baxter, D., 2014. Trace element concentrations and associations in some biomass ashes. *Fuel* 129, 292-313.
210. Veni, D.K., Kannan, P., Edison, T.N.J.I., Senthilkumar, A., 2017. Biochar from green waste for phosphate removal with subsequent disposal. *Waste Manag.* 68, 752-759.
211. Vincent, C., Hallman, G., Panneton, B., Fleurat-Lessard, F., 2003. Management of Agricultural Insects with Physical Control Methods. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 261-281.
212. Walkiewicz, A., Brzezińska, M., 2019. Interactive effects of nitrate and oxygen on methane oxidation in three different soils. *Soil Biol. Biochem.* 133, 116-118.
213. Walkiewicz, A., Brzezińska, M., Bieganski, A., 2018. Methanotrophs are favored under hypoxia in ammonium-fertilized soils. *Biol. Fertil. Soils* 54, 861-870.
214. Walkiewicz, A., Brzezińska, M., Wnuk, E., Jabłoński, B., 2020a. Soil properties and not high CO₂ affect CH₄ production and uptake in periodically waterlogged arable soils. *J. Soils Sediments* 20, 1231-1240.
215. Walkiewicz, A., Bulak, P., Brzezińska, M., Włodarczyk, T., Polakowski, C., 2012. Kinetics of methane oxidation in selected mineral soils. *Int. Agrophysics* 26, 401-406.
216. Walkiewicz, A., Kalinichenko, K., Kubaczyński, A., Brzezińska, M., Bieganski, A., 2020b. Usage of biochar for mitigation of CO₂ emission and enhancement of CH₄ consumption in forest and orchard Haplic Luvisol (Siltic) soils. *Appl. Soil Ecol.* 156, 103711.
217. Wang, D., Li, C., Parikh, S.J., Scow, K.M., 2019. Impact of biochar on water retention of two agricultural soils - A multi-scale analysis. *Geoderma* 340, 185-191.
218. Wang, H., Yi, H., Zhang, X., Su, W., Li, X., Zhang, Y., Gao, X., 2020. Biochar mitigates greenhouse gas emissions from an acidic tea soil. *Polish J. Environ. Stud.* 29, 323-330.
219. Wang, J., Pan, X., Liu, Y., Zhang, X., Xiong, Z., 2012. Effects of biochar amendment in two soils on greenhouse gas emissions and crop production. *Plant Soil* 360, 287-298.
220. Wang, L., O'Connor, D., Rinklebe, J., Ok, Y.S., Tsang, D.C.W., Shen, Z., Hou, D., 2020. Biochar Aging: Mechanisms, Physicochemical Changes, Assessment, And Implications

- for Field Applications. *Environ. Sci. Technol.* 54, 14797-14814.
221. Watson, A.J., Schuster, U., Shutler, J.D., Holding, T., Ashton, I.G.C., Landschützer, P., Woolf, D.K., Goddijn-Murphy, L., 2020. Revised estimates of ocean-atmosphere CO₂ flux are consistent with ocean carbon inventory. *Nat. Commun.* 11, 1-6.
 222. West, J.B., 2014. Joseph Black, carbon dioxide, latent heat, and the beginnings of the discovery of the respiratory gases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306, L1057-L1063.
 223. Winkler, K., Fuchs, R., Rounsevell, M., Herold, M., 2021. Global land use changes are four times greater than previously estimated. *Nat. Commun.* 12, 2501.
 224. World Meteorological Organization, 2021. State of the Global Climate 2021 WMO Provisional report. https://library.wmo.int/doc_num.php?explnum_id=10859. Dostęp: 25 Grudnia 2022.
 225. Wu, X., Zang, S., Ma, D., Ren, J., Chen, Q., Dong, X., 2019. Emissions of CO₂, CH₄, and N₂O Fluxes from Forest Soil in Permafrost Region of Daxing' an Mountains, Northeast China. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 2999.
 226. Wu, Z., Song, Y., Shen, H., Jiang, X., Li, B., Xiong, Z., 2019. Biochar can mitigate methane emissions by improving methanotrophs for prolonged period in fertilized paddy soils. *Environ. Pollut.* 253, 1038-1046.
 227. Xiao, X., Chen, B., Chen, Z., Zhu, L., Schnoor, J.L., 2018. Insight into Multiple and Multi-level Structures of Biochars and Their Potential Environmental Applications : A Critical Review Insight into Multiple and Multilevel Structures of Biochars and Their Potential Environmental Applications : A Critical Review. *Environ. Sci. Technol.* 52, 5027-5047.
 228. Xu, X., Qin, Y., Li, X., Ma, Z., Weixiang, W., 2022. Heterogeneity of CH₄-derived carbon induced by O₂:CH₄ mediates the bacterial community assembly processes. *Sci. Total Environ.* 829, 154442.
 229. Yaashikaa, P.R., Kumar, P.S., Varjani, S., Saravanan, A., 2020. A critical review on the biochar production techniques, characterization, stability and applications for circular bioeconomy. *Biotechnol. Reports* 28, e00570.
 230. Yang, T., Sun, W., Yue, D., 2017. Characterizing the Effects of Biologically Active Covers on Landfill Methane Emission Flux and Bio-Oxidation. *J. Environ. Eng. (United States)* 143, 1-9.
 231. Yang, X., Meng, J., Lan, Y., Chen, W., Yang, T., Yuan, J., Liu, S., Han, J., 2017. Effects of maize stover and its biochar on soil CO₂ emissions and labile organic carbon fractions in Northeast China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 240, 24-31.
 232. Yao, F., Yang, S., Wang, Z., Wang, Xue, Ye, J., Wang, Xugao, DeBruyn, J.M., Feng, X., Jiang, Y., Li, H., 2017. Microbial taxa distribution is associated with ecological trophic cascades along an elevation gradient. *Front. Microbiol.* 8, 2071.
 233. Yoo, G., Kim, H., Chen, J., Kim, Y., 2014. Effects of biochar addition on nitrogen leaching and soil structure following fertilizer application to rice paddy soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 852-860.
 234. Yu, L., Tang, J., Zhang, R., Wu, Q., Gong, M., 2013. Effects of biochar application on soil methane emission at different soil moisture levels. *Biol Fertil Soils* 49, 119-128.
 235. Zhang, C., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Chen, M., Cheng, M., Tang, W., Tang, L., Dong, H., Huang, B., Tan, X., Wang, R., 2019. Biochar for environmental management: Mitigating greenhouse gas emissions, contaminant treatment, and potential negative impacts. *Chem. Eng. J.* 373, 902-922.
 236. Zhang, S., Ying, X.J., Chen, L.L., Wang, Y., 2011. Biosynthesis of Poly-β-Hydroxybutyrate as New Material of Food Packing by Various Strains of Methanotrophs from Methane. *Adv. Mater. Res.* 183-185, 924-928.

237. Zhang, X., Guo, J., David, R., Mulder, J., Wang, Y., Qian, C., Wang, J., Zhang, Xiaoshan, 2020. Soil acidification as an additional driver to organic carbon accumulation in major Chinese croplands. *Geoderma* 366, 114234.
238. Zhang, Y., Jacob, D.J., Lu, X., Maasackers, J.D., Scarpelli, T.R., Sheng, J.-X., Shen, L., Qu, Z., Sulprizio, M.P., Chang, J., Bloom, A.A., Ma, S., Worden, J., Parker, R.J., Boesch, H., 2021. Attribution of the accelerating increase in atmospheric methane during 2010-2018 by inverse analysis of GOSAT observations. *Atmos. Chem. Phys.* 21, 3643-3666.
239. Zhang, Y., Xin, J., Chen, L., Xia, C., 2009. The Methane Monooxygenase Intrinsic Activity of Kinds of Methanotrophs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 431-441.
240. Zhao, Q., Wang, Y., Xu, Z., Yu, Z., 2021. How does biochar amendment affect soil methane oxidation? A review. *J. Soils Sediments* 21, 1575-1586.
241. Zheng, Y., Zhang, L.-M., Zheng, Y.-M., Di, H., He, J.-Z., 2008. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *J Soils Sediments* 8, 406-414.
242. Zhu, Y., Koo, C.W., Cassidy, C.K., Spink, M.C., Ni, T., Zanetti-domingues, L.C., Bateman, B., Martin-fernandez, M.L., Shen, J., Sheng, Y., Song, Y., Yang, Z., Rosenzweig, A.C., Zhang, P., 2022. Structure and activity of particulate methane monooxygenase arrays in methanotrophs. *Nat. Commun.* 13, 1-10.
243. Zimmerman, A.R., Gao, B., Ahn, M.-Y., 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1169-1179.

9. Oświadczenia



Lublin, 10.02.2023 r.

mgr Adam Kubaczyński
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym.

P.1: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364. <https://doi.org/10.31545/intagr/126762>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- wyborze i zebraniu biomasy oraz produkcji części spośród badanych biowęgli,
- oznaczeniu parametrów fizykochemicznych biowęgli,
- inkubacji próbek i pomiarach chromatograficznych,
- analizie uzyskanych wyników,
- statystycznym i graficznym opracowaniu wyników,
- współprzygotowaniu manuskryptu.

Adam Kubaczyński

Lublin, 10.02.2023 r.

dr inż. Anna Walkiewicz
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

P.1: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364. <https://doi.org/10.31545/intagr/126762>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu problematyki i zakresu pracy,
- analizie i interpretacji wyników badań,
- nadzorowaniu kolejnych etapów badań,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

Anna Walkiewicz

Lublin, 10.02.2023 r.

dr hab. Anna Pytlak
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego .

P.1: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364. <https://doi.org/10.31545/intagr/126762>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu problematyki i zakresu pracy,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

prof. dr hab. Małgorzata Brzezińska
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego .

P.1: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364. <https://doi.org/10.31545/intagr/126762>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu koncepcji, problematyki i zakresu pracy,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

M. Brzezińska

Lublin, 10.02.2023 r.

mgr Adam Kubaczyński
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym.

P.2: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- pobraniu próbek gleby z poletek doświadczalnych,
- oznaczeniu parametrów fizykochemicznych próbek gleby wzbogaconych biowęgłem ze zrębków drzewnych,
- zaprojektowaniu i przeprowadzeniu doświadczenia laboratoryjnego,
- inkubacji próbek i pomiarach chromatograficznych,
- wyizolowaniu DNA glebowego,
- analizie uzyskanych wyników,
- statystycznym i graficznym opracowaniem wyników,
- współprzygotowaniu manuskryptu.

Adam Kubaczyński

Lublin, 10.02.2023 r.

dr inż. Anna Walkiewicz
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

P.2: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałazka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu problematyki i zakresu pracy,
- analizie i interpretacji wyników badań,
- nadzorowaniu kolejnych etapów badań,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

Anna Walkiewicz

Lublin, 10.02.2023 r.

dr hab. Anna Pytlak
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

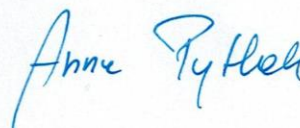
Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego .

P.2: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- koordynacji analiz z wykorzystaniem technik biologii molekularnej,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

dr Jarosław Grządziel
Zakład Mikrobiologii Rolniczej (NMR)
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Oświadczenie

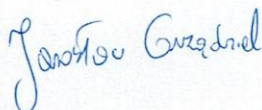
Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego .

P.2: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Jarosław Grządziel

Lublin, 10.02.2023 r.

dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB
Zakład Mikrobiologii Rolniczej (NMR)
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego .

P.2: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- koordynacji analiz bioinformatycznych,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

Anna Gałązka

Lublin, 10.02.2023 r.

prof. dr hab. Małgorzata Brzezińska
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego .

P.2: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259>

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu koncepcji, problematyki i zakresu pracy,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

M. Brzezińska

Lublin, 10.02.2023 r.

mgr Adam Kubaczyński
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższym osiągnięciu patentowym inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym.

Osiągnięcie patentowe P.433435: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie patentowe polegał na:

- opracowaniu biowęgla z łodyg ziemniaków (łętów),
- oznaczeniu właściwości fizykochemicznych biowęgla,
- inkubacji próbek i pomiarze chromatograficznym umożliwiającym określenie potencjału biowęgla do pochłaniania metanu,
- analizie uzyskanych wyników,
- współprzygotowaniu wniosku patentowego.

Adam Kubaczyński

Lublin, 10.02.2023 r.

dr inż. Anna Walkiewicz
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższym osiągnięciu patentowym inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Osiągnięcie patentowe P.433435: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie patentowe polegał na:

- określeniu koncepcji i zakresu pracy,
- edycji i recenzji wniosku patentowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

Anna Walkiewicz

Lublin, 10.02.2023 r.

dr inż. Cezary Polakowski
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

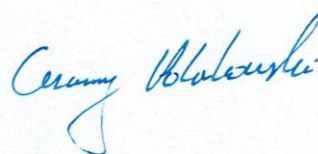
Niniejszym oświadczam, że w poniższym osiągnięciu patentowym inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Osiągnięcie patentowe P.433435: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganowski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie patentowe polegał na:

- określeniu koncepcji i zakresu pracy,
- współprzygotowaniu wniosku patentowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

dr hab. Anna Pytlak
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

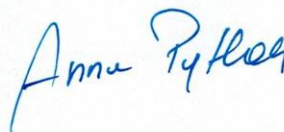
Niniejszym oświadczam, że w poniższym osiągnięciu patentowym inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Osiągnięcie patentowe P.433435: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganowski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie patentowe polegał na:

- określeniu koncepcji i zakresu pracy,
- edycji i recenzji wniosku patentowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

prof. dr hab. Małgorzata Brzezińska

Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższym osiągnięciu patentowym inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Osiągnięcie patentowe P.433435: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganowski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu koncepcji i zakresu pracy,
- edycji i recenzji wniosku patentowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

prof. dr hab. Andrzej Bieganski
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

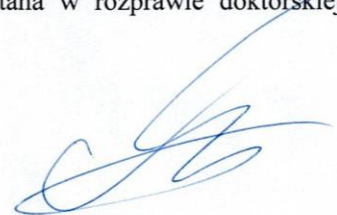
Niniejszym oświadczam, że w poniższym osiągnięciu patentowym inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Osiągnięcie patentowe P.433435: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie patentowe polegał na:

- określeniu koncepcji i zakresu pracy,
- współprzygotowaniu wniosku patentowego.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

mgr Adam Kubaczyński
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest moim wkładem intelektualnym.

Badania uzupełniające P.3: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.
Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- pobraniu próbek gleby z poletek doświadczalnych,
- oznaczeniu właściwości fizykochemicznych gleby wzbogaconej szerokim zakresem dawek biowęgla z łusek słonecznika,
- inkubacji próbek i pomiarach chromatograficznych,
- wyizolowaniu DNA glebowego,
- analizie uzyskanych wyników,
- statystycznym i graficznym opracowanie wyników,
- współprzygotowaniu manuskryptu.

Adam Kubaczyński

Lublin, 10.02.2023 r.

dr inż. Anna Walkiewicz
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Badania uzupełniające P.3: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.
Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- określeniu problematyki i zakresu pracy,
- analizie i interpretacji wyników badań,
- nadzorowaniu kolejnych etapów badań,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

Anna Walkiewicz

Lublin, 10.02.2023 r.

dr hab. Anna Pytlak
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Badania uzupełniające P.3: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.

Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- koordynacji analiz z wykorzystaniem technik biologii molekularnej,
- edycji i recenzji manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

dr Jarosław Grządziel
Zakład Mikrobiologii Rolniczej (NMR)
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Oświadczenie

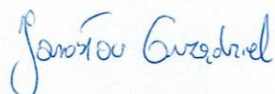
Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Badania uzupełniające P.3: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.
Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.



Lublin, 10.02.2023 r.

dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB
Zakład Mikrobiologii Rolniczej (NMR)
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
– Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Badania uzupełniające P.3: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.
Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Mój wkład w powyższą pracę polegał na:

- koordynacji analiz bioinformatycznych,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

Anna Gałązka

Lublin, 10.02.2023 r.

prof. dr hab. Małgorzata Brzezińska
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w poniższej pracy inicjatywa podjętych badań jest wkładem intelektualnym mgra Adama Kubaczyńskiego.

Badania uzupełniające P.3: Kubaczyński, A., Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M.. Zastosowanie bogatego w azot biowęgla z łusek słonecznika sprzyja utlenianiu metanu i zwiększa liczebność *Methylobacter* w glebie ubogiej w azot.
Angielskojęzyczny (oryginalny) tytuł manuskryptu: Application of nitrogen-rich sunflower husks biochar promotes methane oxidation and increases abundance of *Methylobacter* in nitrogen-poor soil.

Mój wkład w powyższe osiągnięcie patentowe polegał na:

- określeniu koncepcji, problematyki i zakresu pracy,
- edycji i recenzji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby praca została wykorzystana w rozprawie doktorskiej mgra Adama Kubaczyńskiego.

M. Brzezińska

10. Aneks - życiorys naukowy

DANE PERSONALNE:

Imię i nazwisko: **Adam Kubaczyński**

WYKSZTAŁCENIE:

09.2008 - 04.2011 I Liceum Ogólnokształcące w Radzynie Podlaskim
wykształcenie: **średnie**

09.2011 - 06.2013 Zespół Szkół Rolniczych w Woli Osowińskiej
wykształcenie: **technik rolnik**

10.2011 - 06.2014 Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
wykształcenie: **licencjat ochrony środowiska**

Tytuł pracy licencjackiej: **Wpływ nachylenia stoku na aktywność metaboliczną wybranej gleby organicznej**

10.2014 - 06.2016 Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
wykształcenie: **magister biotechnologii**

Tytuł pracy magisterskiej: **Akumulacja PHB w konsorcjach bakterii metanotroficznych wyizolowanych z otoczenia pokładów węgla i soli**

10.2017 - 30.09.2022 Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
studia doktoranckie z dziedziny nauk rolniczych, dyscyplina rolnictwo i ogrodnictwo

10.2020 - 06.2021 Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
studia podyplomowe na kierunku Diagnostyka molekularna

DOROBEK NAUKOWY:

- **9 publikacji naukowych,**
- **2 rozdziały w monografii,**
- **1 (uzyskany) patent**
- **37 komunikatów zjazdowych na konferencjach ogólnopolskich (21 komunikatów) i międzynarodowych (16 komunikatów)**

Publikacje naukowe:

1. Szafranek-Nakonieczna A., Zheng Y., Słowakiewicz M., Pytlak A., Polakowski C., **Kubaczyński A.**, Bieganowski A., Banach A., Wolińska A., Stępniewska Z., 2018. Methanogenic potential of lignites in Poland. *International Journal of Coal Geology* 196, 201-210. **Punktacja MNiSW: 40 pkt.; IF 5,33.**
2. **Kubaczyński A.**, Pytlak A., Stępniewska Z. 2019. Poly-3-hydroxybutyrate as an example of a biopolymer produced by methanotrophic bacteria. *Postępy Mikrobiologii* 58(3), 329-338. **Punktacja MNiSW: 20 pkt.; IF 0,263.**
3. Szafranek-Nakonieczna A., Pytlak A., Grządziel J., **Kubaczyński A.**, Banach A., Górski A., Goraj W., Kuźniar A., Gałązka A., Stępniewska Z. 2019. Changes in the Substrate Source Reveal Novel Interactions in the Sediment-Derived Methanogenic Microbial Community. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 4415. **Punktacja MNiSW: 140 pkt.; IF 4,556.**
4. Pytlak A., Kasprzycka A., Szafranek-Nakonieczna A., Grządziel J., **Kubaczyński A.**, Proc K., Onopiuk P., Walkiewicz A., Polakowski C., Gałązka A., Lalak-Kańczugowska J., Stępniewska Z., Bieganowski A. 2020. Biochar addition reinforces microbial interspecies cooperation in methanation of sugar beet waste (pulp). *Science of the Total Environment* 730, 138921. **Punktacja MNiSW: 200 pkt.; IF 7,963.**
5. Walkiewicz A., Kalinichenko K., **Kubaczyński A.**, Brzezińska M., Bieganowski A. 2020. Usage of biochar for mitigation of CO₂ emission and enhancement of CH₄ consumption in forest and orchard Haplic Luvisol (Siltic) soils. *Applied Soil Ecology* 156, 103711. **Punktacja MNiSW: 140 pkt.; IF 4,046.**
6. Pytlak A., Szafranek-Nakonieczna A., Sujak A., Grządziel J., Polakowski C., Kuźniar A., Proc K., **Kubaczyński A.**, Goraj W., Gałązka A., Gruszecki W., Bieganowski A., Stępniewska Z. 2020. Stimulation of methanogenesis in bituminous coal from the upper Silesian coal basin. *International Journal of Coal Geology* 231, 103609. **Punktacja MNiSW: 140 pkt.; IF 6,806.**
7. **Kubaczyński A.**, Walkiewicz, A., Pytlak, A., Brzezińska, M., 2020. New biochars from raspberry and potato stems absorb more methane than wood offcuts and sunflower husk biochars. *International Agrophysics* 34(3), 355-364. **Punktacja MNiSW: 70 pkt.; IF 2,317.**

8. **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Pytlak, A., Grządziel, J., Gałązka, A., Brzezińska, M., 2022. Biochar dose determines methane uptake and methanotroph abundance in Haplic Luvisol. *Science of the Total Environment* 806, 151259. **Punktacja MEiN: 200 pkt.; IF 7,963.**
9. Tomczyk A., **Kubaczyński A.**, Szewczuk-Karpisz K. 2023. Assessment of agricultural waste biochars for remediation of degraded water-soil environment: Dissolved organic carbon release and immobilization of impurities in one- or two-adsorbate systems. *Waste Management* 155, 87-98. **Punktacja MEiN: 200 pkt.; IF 8,816.**

Rozdziały w monografii:

1. **Kubaczyński A.**, Walkiewicz A., Brzezińska M. 2020. Określenie wpływu dodatku biowęgla na respirację gleby płowej z zastosowaniem chromatografii gazowej. Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie. D. Kołodyńska (red.). Wydawnictwo UMCS. Lublin 2020. ISBN 978-83-227-9370-1. **Punktacja MNiSW: 20 pkt; IF -.**
2. Tomczyk A., Szewczuk-Karpisz Katarzyna, **Kubaczyński A.**, Kondracki B. 2022. Biowęgiel z łętów ziemniaka jako wysoce efektywny adsorbent tetracykliny i karboksyny w ich mieszanym układzie. Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości. Z. Hubicki (red.). Wydawnictwo UMCS Lublin 2022. ISBN 978-83-227-9602-3, str. 395-398. **Punktacja MEiN: 20 pkt; IF -.**

Osiągnięcie patentowe:

1. P.433435: **Kubaczyński, A.**, Walkiewicz, A., Polakowski, C., Pytlak, A., Brzezińska, M., Bieganowski, A. Sposób otrzymywania biowęgla z biomasy do pochłaniania metanu oraz jego zastosowanie. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk. Lublin, Polska. Zgłoszenie patentowe numer P.433435 z 02.04.2020. Numer i data uzyskania prawa wyłącznego: Pat.237796 / 2021-02-12.

Wyróżnione doniesienia konferencyjne:

1. **Kubaczyński A.**, Walkiewicz A., Pytlak A., Grządziel J., Gałązka A., Brzezińska M.: Wpływ biowęgla na utlenianie metanu i strukturę społeczności bakterii metanotroficznych w glebie. 54. Konferencja Mikrobiologiczna „Mikroorganizmy Różnych Środowisk”. Lublin 20-21.09.2021.

UDZIAŁ W REALIZACJI PROJEKTÓW BADAWCZYCH:

1. **12.2016 - 03.2018:** Projekt OPUS „Naturalna i stymulowana aktywność metanogeniczna polskich węgla kopalnych”, sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2015/17/B/NZ9/01662. Kierownik projektu: prof. dr hab. Zofia Stępniewska.
2. **03.2018 - 10.2021:** Projekt BIOSTRATEG „Woda w glebie - monitoring satelitarny w poprawie retencji wodnej przy użyciu biowęgla” (BIOSTRATEG3/345940/7/NCBR/2017) o akronimie SoilAqChar, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach strategicznego programu badawczo-rozwojowego "Środowisko, rolnictwo i leśnictwo". Kierownik projektu: prof. dr hab. Bogusław Usowicz.
3. **04.2022 - obecnie:** Projekt ERA-NET 2021, Joint Call on Circularity „Powrót do przyszłości: Reintegracja gruntów i hodowli zwierząt dla ograniczenia emisji gazów cieplarnianych i cyrkularności” (ReLive), finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Kierownik projektu: dr inż. Anna Walkiewicz.

STYPENDIA

1. **2018/2019; 2019/2020** - Wyróżnienie w postaci stypendium dla najlepszych doktorantów IA PAN
2. **2019/2020; 2021/2022** - Laureat stypendium Prezydenta Miasta Lublin w ramach Miejskiego programu stypendialnego dla studentów i doktorantów

DZIAŁANIA NA RZECZ POPULARYZACJI NAUKI

- **Festiwale i Pikniki naukowe - 10**
- **Wolontariat - 1**

Festiwale i Pikniki naukowe:

1. Wnuk E., Piotr B., **Kubaczyński A.** Prezentacja pt. Nie wszystko złoto co się świeci. XV Lubelski Festiwal Nauki. Lublin 20.09.2018.
2. **Kubaczyński A.**, Krekora M. Przygotowanie projektu pt. Znikający atrament - dyfuzja w ośrodkach o różnej temperaturze ukazana za pomocą barwników atramentowych. XXII Festiwal Nauki w Jabłonie. Jabłonna 22.09.2018.

3. **Kubaczyński A.**, Rumińska W. Krekora M. Realizacja projektu pt. Wyścig barwników - chromatograficzny rozdział mieszanin. XVI Lubelski Festiwal Nauki. Lublin 14-20.09.2019.
4. Rumińska W. Krekora M., **Kubaczyński A.**, Współorganizacja projektu pt. Czy wszystkie płyny dobrze się ze sobą mieszają? Właściwości barwników spożywczych. XXIII Festiwal Nauki w Jabłonce. Jabłonna, 21.09.2019.
5. **Kubaczyński A.**, Krekora M., Proc K., Łukowski M. Przygotowanie prezentacji pt. Śledząc oddech gleby. 24. Piknik Naukowy Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik „Klimat i my”. Warszawa 08-15.05.2021.
6. **Kubaczyński A.**, Krekora M., Berus W., Kłosok K. Przygotowanie projektu pt. Świat pełen barw - reakcje barwne i chromatograficzny rozdział mieszanin. XVII Lubelski Festiwal Nauki. Lublin, 18-24.09.2021.
7. **Kubaczyński A.**, Krekora M. Współorganizacja pokazu naukowego pt. W świecie pełnym barw - chromatograficzny rozdział mieszanin i reakcje barwne. Festiwal Nauki w Jabłonce „Nauka z pałacem w tle”. Jabłonna, 25.09.2021.
8. **Kubaczyński A.**, Krekora M., Kłosok K., Berus W., Polakowski C. Realizacja pokazu pt. Dwa oblicza wody w glebie - kiedy życiodajna substancja zmienia się w niszczycielską siłę? 25 Piknik Naukowy Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik „Woda”. Warszawa 21.05.2022.
9. **Kubaczyński A.**, Berus W., Kurzylewska M., Walkiewicz A. Prezentacja pt. Oblicza wody w glebie - kiedy woda przestaje być wybawieniem, a staje się zagrożeniem?”. XVIII Lubelski Festiwal Nauki „Ogrody Nauki”. Lublin 10-16.09.2022.
10. **Kubaczyński A.**, Krekora M. Pokaz naukowy pt. Co możemy wyczytać z barw gleby - badanie właściwości gleby i procesów w niej zachodzących. Festiwal Nauki w Jabłonce „Nauka z pałacem w tle”. Jabłonna 24.09.2022.

Wolontariat:

1. **2019-2021** - Pełnienie roli Ambasadora Fundacji Tygiel, związane z pomocą w realizacji wydarzeń naukowych.