



Dr hab. Wiktor Kotowski

Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Moniki Reczugi pt. „Wpływ gradientów środowiskowych oraz zaburzeń ekologicznych na mikroorganizmy torfowiskowe – różnorodność biologiczna oraz struktura zgrupowań”

1. Formalna strona pracy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska składa się z przedruków trzech artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach oraz poprzedzającego je angielskojęzycznego tekstu o charakterze autoreferatu, zawierającego abstrakt, polskie streszczenie i rozdziały *Introduction*, *Results* oraz *Summary and conclusions*. Poza wymienionymi częściami, na końcu liczącej 103 strony rozprawy zamieszczono deklaracje wkładu poszczególnych autorów, podziękowania i informacje o finansowaniu. Kandydatka, Pani mgr Monika Reczuga, jest pierwszą autorką i autorką korespondencyjną wszystkich trzech artykułów, a według informacji zawartych w deklaracjach jej rola we wszystkich przypadkach była wiodąca i polegała na zbiorze materiałów (z wyjątkiem pracy nr 1) i danych pomiarowych, analizie i opracowaniu danych, w tym wykonaniu analiz statystycznych, a także napisaniu i edycji manuskryptów (zakładam, że zgodnie z rolą autorki korespondencyjnej również dyskusji z recenzentami i rewizji artykułów przed publikacją). Z formalnego punktu widzenia rozprawa spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

2. Zarys treści i ocena spójności tematycznej rozprawy

Pierwsza praca, opublikowana w *European Journal of Protistology*, jest opisem nowego gatunku ameby skorupkowej *Arcella peruviana*, odkrytego w próbach ściółki z zalesionego torfowiska wysokiego położonego w basenie Amazonki. Jest to klasyczna praca o charakterze dokumentacyjnym i taksonomicznym, przy czym opis i określenie pozycji taksonomicznej oparte są na analizach morfometrycznych 17 skorupki wyizolowanych z biomasy pobranej z torfowiska. Druga praca, opublikowana w *Ecology and Evolution*, przedstawia wyniki opisowych i eksperymentalnych badań nad wpływem wilgotności na zespoły mikroorganizmów zamieszkujących warstwę mszystą budowaną przez torfowce na dwóch torfowiskach – francuskim Forbonnet i polskim Linje, ze szczególnym uwzględnieniem zmian stosunku biomasy drapieżników do ofiar w zespole mikroorganizmów. Trzecia praca, opublikowana w czasopiśmie *PeerJ*, opisuje wyniki badań eksperymentalnych nad wykonanych na torfowisku Linje (Polska, woj. kujawsko-pomorskie), których celem była dyskryminacja wpływu wzrostu temperatury i zmian wilgotności (w szczególności wysychania) w warstwie mszarnej torfowiska na zespoły mikroorganizmów.

Pierwsza praca różni się charakterem od dwóch pozostałych i wydaje się nie do końca pasować do nadanego całości rozprawy tytułu. Nie ma tu jednak zadeklarowanej w tytule analizy „wpływu gradientów



środowiskowych oraz zaburzeń ekologicznych na mikroorganizmy” – w odróżnieniu od dwóch kolejnych prac, które faktycznie ten temat podejmują. Choć artykuł nr 1 zawiera sekcję zatytułowaną *Ecology*, nie obejmuje ona w istocie opisu ekologii gatunku, a jedynie wymienia podstawowe parametry siedliskowe (pH i przewodnictwo elektrolityczne) oraz listę dominujących gatunków roślin. To zbyt mało, by uznać pracę za studium ekologiczne, co bynajmniej nie umniejsza jej wartościom. Zapewne większość adeptów studiów biologicznych marzyła o odkryciu i opisanu nowego gatunku, ale spełnienie tego marzenia dane jest niewielu z nas – tym bardziej imponujące jest osiągnięcie tego na etapie pracy doktorskiej. Pomimo początkowych wątpliwości, po głębszym zastanowieniu stwierdziłem, że włączenie pierwszej pracy w tak zatytułowany cykl jest jak najbardziej uprawnione i nadaje rozprawie walor wieloaspektowości, pokazując jednocześnie bogactwo doświadczeń i dojrzałość warsztatu naukowego Kandydatki. Zgłębienie procedur związanych z opisem nowego gatunku i kodem nomenklatury jest bez wątpienia bardzo cennym doświadczeniem w karierze biologa środowiskowego.

3. Ocena merytoryczna pracy i pytania do Kandydatki

Rolę recenzenta rozprawy doktorskiej widzę nie tyle we wskazywaniu możliwych do wprowadzenia korekt i „ulepszeń” pracy (na to wszak jest i tak zbyt późno – zwłaszcza w sytuacji, gdy wszystkie rozdziały są opublikowane), ile w poddaniu sceptycznemu osądowi sposobu interpretacji wyników i wywołaniu tym samym ciekawej dyskusji w czasie publicznej obrony doktoratu. Dlatego pozwalam sobie poniżej wywieść takie problemowe pytania. Muszę jednocześnie zaznaczyć, że nie jestem mikrobiologiem lecz ekologiem roślinności i do dyskusji przedstawionych wyników podchodzę przede wszystkim z perspektywy osoby starającej się zrozumieć funkcjonowanie ekosystemu torfowiska, natomiast nie podejmuję się oceny aspektów związanych z metodyką analiz mikrobiologicznych, czy zagadnieniami taksonomicznym.

W związku z powyższym zastrzeżeniem niewiele mam uwag do **pierwszej pracy**, dotyczącej opisu *Arcella peruviana* sp. nov. Moje pewne wątpliwości budzi określenie sekcji dotyczącej opisu siedlisk nowego gatunku słowem „Ekologia” – bardziej adekwatne wydawałoby mi się „Warunki występowania” lub „siedlisko” (*habitat*). Mam też obiekcje, czy na podstawie 17 osobników znalezionych w pięciu próbach ściółki można wnioskować o bioindykacyjnych cechach gatunku. Wydaje mi się, że do takiego wnioskowania potrzebny jest liczniejszy materiał, a także inne podejście analityczne niż tylko opis warunków, w których gatunek wystąpił. Nie jest to poważne zastrzeżenie do samej pracy, w której owo bioindykacyjne znaczenie gatunku zostało tylko wspomniane – być może w charakterze hipotezy. Niemniej będę wdzięczny Kandydatce za ustosunkowanie się do moich wątpliwości i ewentualnie zapropozowanie protokołu badawczego pozwalającego na ustalenie rzeczywistych właściwości wskaźnikowych opisanego przez nią gatunku.

Druga publikacja wzbudziła moje duże zainteresowanie: gradienty wilgotnościowe należą do najważniejszych czynników kształtujących zmienność procesów ekologicznych na torfowiskach i podjęcie się zgłębienia ich roli w odniesieniu do wewnętrznej struktury zespołów mikroorganizmów jest niewątpliwie ważnym przedsięwzięciem. Autorzy wykazali, że zarówno głębokość w obrębie warstwy torfowców, jak i ich wilgotność mają znaczenie dla struktury funkcjonalnej zespołu mikroorganizmów, przy czym relatywne znaczenie tych czynników było inne na badanych opisowo powierzchniach na torfowisku we francuskiej Jurze i poddanych manipulacjom powierzchniach badawczych na torfowisku na polskim



nizu. Zastanowiło mnie na ile na te odmienne wyniki badań na dwóch torfowiskach mógł wpłynąć ich różny profil ekologiczny. W artykule przedstawiono je jako niemal bliźniacze obiekty – oba zdominowane przez *Sphagnum fallax* z niewielką domieszką roślin naczyniowych, podobno o jednakowym odczynie wody (niestety nie znalazłem danych na potwierdzenie tej informacji - tabela 1, do której odnosi się informacja o pH nie zawiera jej – to najwyraźniej przeoczony błąd). Ku mojemu zaskoczeniu w artykule nie podano informacji o klimacie badanych torfowisk, a ten okazuje się znacząco odmienny, zwłaszcza jeśli chodzi o dwukrotnie wyższą roczną sumę opadów w Forbonnet (1200 mm) niż na torfowisku Linje (500-550 mm). Francuskie torfowisko położone jest ponadto na wysokości 840 m n.p.m., w związku z czym na też niższą średnią temperaturę (a więc zapewne i ewapotranspirację) niż nizinne Linje (ok. 86 m n.p.m.). Spodziewam się, że konsekwencją różnic klimatycznych jest odmienność ekologicznych typów torfowisk: Linje to ubogie torfowisko niskie typu *poor fen* (kwaśny mszar minerotroficzny), natomiast Forbonnet składa się zarówno z części minerotroficznej typu *poor fen*, jak i z typowego torfowiska wysokiego (*raised bog*) (Jassey et al. 2011 Env. Microb), przy czym nie wiadomo z której części pochodziły próby. Moje pytanie do Kandydatki: czy wskazane przeze mnie odmienności klimatyczne i (być może) ekologiczne mogą tłumaczyć różnice w odpowiedzi zespołów mikroorganizmów na gradient wilgotności pomiędzy polskim i francuskim torfowiskiem - w szczególności znacznie mniejszą część wariacji wyjaśnianą przez zawartość wody w torfowcach na tym drugim obiekcie?

Alternatywnym wyjaśnieniem wyżej wspomnianych różnic w reakcji zespołu mikroorganizmów na wilgotność jest fakt, że w Forbonnet badano ustabilizowany gradient środowiskowy, natomiast na torfowisku Linje – efekt manipulacji warunkami wilgotnościowymi za pomocą usuwania lub dodawania warstwy torfu. Wreszcie przyczyną tych odmiennych wyników może być fakt, że badano różną długość gradientu wilgotności: w Forbonnet różnica w wysokości lustra wody w „lawns” i hummocks” wyniosła tylko 3 cm, podczas gdy między wariantami polskiego eksperymentu wystąpiły znacznie większe różnice poziomu wody (obniżenie lub podwyższenie o 10 cm w stosunku do kontroli). Fakt różnic klimatycznych i w ogóle zlokalizowanie tych badań w dwóch lokalizacjach nie pozwalają niestety oddzielić efektu manipulacji od wpływu lokalnych czynników - aż chciałoby się „skompletować” protokół badawczy poprzez dołożenie badań niezaburzonych kęp i dolinek na Linjach oraz eksperymentu manipulacyjnego w Forbonnet. Wobec braku takiej możliwości uzupełnienia badań chciałbym jednak poprosić Doktorantkę o spekulację: czy zbadanie tych samych dwóch obiektów torfowiskowych obydwoma metodami zniósłoby Jej zdaniem wykryte różnice we względnym wpływie wilgotności i głębokości na zespoły mikroorganizmów? A jeśli różnica by się utrzymała (tzn. przy obu metodach wpływ wilgotności byłby większy w Polsce), to jak należałoby ją tłumaczyć?

Z metodycznej ciekawości będę też wdzięczny za wyjaśnienie w jaki sposób zapewniono, że pobierane pędy mchów nie utraciły części otaczającej je wody zanim zważono ich świeżą masę (tzn., że woda nie została z nich odcisnięta lub nie odciekła przy pobieraniu). Chcę też zapytać o słuszność zakwalifikowania wszystkich napotkanych nicieni jako „drapieżników” – wszak wśród nich mogły występować również nicienie roślinożerne, których liczebność nie ma bezpośredniego wpływu na zespoły bakterii czy grzybów.



Moje kolejne wątpliwości wzbudziło łączne przeanalizowanie danych z torfowiska Forbonnet i Linje (figura 3) - czy Kandydatka może obronić łączne potraktowanie tych danych w świetle przedstawionych przeze mnie powyżej argumentów o odmienności klimatycznej tych obiektów i różnych metodach?

Na koniec chciałbym zaproponować alternatywne wyjaśnienie wyników wskazujących na spadek stosunku drapieżników do ofiar wskutek obniżenia wilgotności i poprosić Doktorantkę o komentarz do niego. Otóż Autorzy artykułu interpretują ten wynik poprzez efekt top-down: zmniejszenie uwodnienia torfowców ogranicza przestrzeń życiową i możliwości żerowania drapieżników, wywołując spadek ich liczebności, co przekłada się na wzrost liczebności bakterii. Czy jednak nie może być tak, że wzrost liczebności bakterii (aerobowych) wynikał wprost ze wzrostu dostępności tlenu w warstwie mszystej? Co więcej, w efekcie natlenienia mógł nastąpić szybki wzrost liczebności bakterii napędzany dodatnim sprzężeniem zwrotnym związanym z rosnącą dostępnością częściowo rozłożonej materii organicznej pochodzącej z obumierających wskutek przesychnienia mszaków. Spadek liczebności drapieżników mógł się nałożyć na wspomniany efekt, ale być może nie był czynnikiem decydującym o zmianach ilościowych w strukturze troficznej zespołu. Będę wdzięczny za ustosunkowanie się do tej spekulacji.

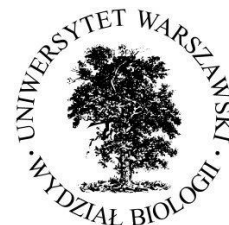
W **pracy numer trzy** badano reakcję zespołów mikroorganizmów eukariotycznych na zmianę klimatu poprzez dwuczynnikowy eksperyment manipulacyjny, w którym modyfikowano temperaturę otoczenia za pomocą techniki *open top chambers* oraz wilgotność warstwy mszystej za pomocą, stosowanej też w pracy nr 2, techniki usuwania lub dodawania, podściełającej mchy, warstwy torfu. To ciekawe i wartościowe założenie badawcze, zważywszy na to, że bez badań eksperymentalnych trudno oddzielić od siebie rolę tych dwóch składowych wpływu zmian klimatu na torfowiska.

Moim zdaniem, przed podjęciem się oceny uzyskanych wyników i ich interpretacji, warto poświęcić trochę czasu dyskusji założeń przyjętych przez Autorów co do roli, jaką mikroorganizmy eukariotyczne pełnią w ekosystemach torfowisk. Podstawową funkcją dla trwania torfowiska jako ekosystemu bagiennego jest utrzymująca się sekwestracja węgla w postaci akumulacji materii organicznej, a więc, jak zauważono we wstępie do omawianego artykułu – przewaga procesu fotosyntezy nad (autotroficzną i heterotroficzną) respiracją. Jak zaznaczają Autorzy, wpływ żyjących w briosferze („sfagnosferze”) mikroorganizmów eutroficznych na ten bilans może być wieloraki i kaskadowy: zwrócono uwagę zarówno na ich znaczenie jako konsumentów (w szczególności drapieżników), przyspieszających rozkład biomasy, jak i producentów zwiększających akumulację węgla (mikro-glony, protisty miksotroficzne oraz cyjanobakterie). Na poparcie znaczenia tego drugiego mechanizmu cytowana jest praca Jasseya i in. (2015) wskazująca m.in., że dwutygodniowa inkubacja pobranych z torfowiska monolitów sfagnowych w ciemności, poprzez znaczącą redukcję liczebności miksotroficznych ameb skorupkowych, doprowadziła do spadku całkowitej efektywności fotosyntetycznej briosfery i ograniczenia poboru węgla. Nawet jeśli założyć, że ta redukcja rzeczywiście wynikała ze zmniejszenia biomasy ameb skorupkowych i ich endosymbiotycznych producentów, a nie ekofizjologicznej reakcji mchów, to, moim zdaniem, wciąż nie wiadomo jak przełożyłoby się to na sekwestrację węgla w torfowisku. Ta bowiem zależy przecież nie tylko od chwilowego bilansu między fotosyntezą i respiracją w powierzchniowej warstwie torfowiska (briosferze), ale od całościowego bilansu tych procesów w długim cyklu przekształceń materii organicznej w ekosystemie bagiennym. Istotne pytania brzmią zatem: na ile trwałe jest wiązanie węgla przez



miksotroficzne i autotroficzne mikroorganizmy, w szczególności jaka frakcja wiążanego przez nie węgla ulega długotrwałej immobilizacji w złożu torfu? Czy nie jest tak, że wysoka aktywność fotosyntetyczna protistów (a także cyjanobakterii) przekłada się raczej na szybszy turnover węgla na powierzchni torfowiska nie zwiększając zasadniczo sekwestracji? I wreszcie – sprawa nie poruszona ani w omawianym artykule, ani u Jasseya i in. (2015) – w jakim stopniu dochodzi między mikroorganizmami fotosyntetyzującymi i mszakami do konkurencji o światło i jaki jest efekt netto takich interakcji na pełen bilans węglowy ekosystemu torfowiska? Osobnym aspektem, nieporuszonym w przedmiotowym artykule, jest znaczenie wiązania przez cyjanobakterie azotu atmosferycznego dla zmiany dostępności tego pierwiastka dla mchów, a w efekcie – ich wzrostu. Te wszystkie mechanizmy pokazują wieloaspektowość możliwego wpływu fototroficznych i miksotroficznych mikroorganizmów na funkcjonowanie torfowiska, przy czym, niezależnie od tego który z tych mechanizmów przeważa, najważniejszy jest aspekt ilościowy, tzn. na ile znaczący jest wkład tych mechanizmów w całkowity bilans węglowy torfowiska w porównaniu z rolą producentów roślinnych z jednej strony i destruentów bakteryjnych i grzybowych z drugiej.

Powyższe pytania nasunęły mi się w trakcie czytania wstępu do omawianego artykułu i pozostały ze mną po lekturze wyników i dyskusji. W wynikach zaskoczył mnie brak wykazania ilościowego wpływu manipulacji temperaturą na mikroorganizmy. Podano tylko informacje o istotności wpływu jakościowego GDD (*growing degree day*) na zespoły mikroorganizmów w analizie RDA zilustrowanej wykresami (przesunięcie wzdłuż drugiej osi wykresu ordynacji). Czy brak wyników ilościowych oznacza, że czynnik temperaturowy nie odegrał znaczącej roli? Porównania ilościowe zamieszczono natomiast dla wpływu czynnika wilgotnościowego (fig. 4). Wpływ manipulacji mających na celu zwiększenie wilgotności (wariant WET) był zasadniczo nieistotny lub mało znaczący, co mogło to być spowodowane zbyt małym efektem ilościowym (w wynikach wykazano w zasadzie brak różnicy w głębokości zwierciadła wody pomiędzy wariantem kontrolnym i mokrym – proszę o komentarz z czego to wynikało i czy nie podważa to skuteczności założeń eksperymentalnych). Wykazano natomiast istotny i wyraźny wpływ spadku wilgotności (wariant DRY): m.in. jako spadek liczebności protistów miksotroficznych i wzrost liczebności protistów autotroficznych. Wynik ten był dla mnie dość zaskakujący - spodziewałem się raczej spadku liczebności autotrofów, kojarzonych przeze mnie ze środowiskiem wodnym. Rezultat ten może mieć ciekawe implikacje dla wyjaśnienia szybkiego wzrostu tempa rozkładu materii organicznej na odwadnianym torfowisku. Jest ono tradycyjnie tłumaczone przede wszystkim wzrostem dostępności tlenu dla grzybów i bakterii, a praca pani Reczugi i in. wskazuje na dodatkowe możliwe znaczenie zmniejszonej kontroli top-down w wyniku redukcji liczebności ameb skorupkowych. Z drugiej strony, informacja o wzroście liczebności autotrofów ponownie przywołała moje, przedstawione powyżej, pytania o możliwe konsekwencje mikro-eukariontycznych producentów dla procesów torfotwórczych. Autorzy powstrzymują się od spekulacji na ten temat, zwracając uwagę, że „*identifying which micro-eucaryotes form close associations with Sphagnum mosses and what influence they have on their host and on the functioning of the ecosystem, remains open question*”. Rozumiejąc (i poniekąd doceniając) tę naukową powściągliwość, chciałbym jednak namówić Doktorantkę na chwilę dyskusji na ten temat w trakcie obrony. W szczególności chciałbym poprosić o sformułowanie roboczej hipotezy lub hipotez i sposobów ich weryfikacji, które pomogłyby w częściowej przynajmniej odpowiedzi na to otwarte pytanie na temat roli eukariontycznych mikroorganizmów w funkcjonowaniu torfowiska. Jest to zresztą zagadnienie ważne



dla interpretacji ekologicznej wyników całej ocenianej rozprawy doktorskiej, a przynajmniej części 2 i 3. Innymi słowy, moje ostatnie pytanie brzmi: jakie wyzwania stoją przed torfowiskową protistologią w kontekście lepszego zrozumienia funkcjonowania tych ekosystemów i wpływu zmian globalnych?

4. Ocena ogólna i konkluzja

Moje powyższe uwagi mają charakter dyskusji naukowej i nie podważają mojej wysokiej oceny merytorycznej pracy. Wszystkie trzy artykuły odznaczają się wysokim poziomem naukowym i znakomitym warsztatem pisarskim. Jestem też pełen podziwu dla bogactwa cytowań i uwidaczniającej się w tekście biegłości metodologicznej i terminologicznej. Za szczególną wartość pracy uważam zastosowanie eksperymentów terenowych do badań zespołów mikroorganizmów torfowiskowych – to ważny nowy nurt prac w literaturze międzynarodowej i całkowita innowacja w polskich badaniach. Pozostaje mi pewien niedosyt w obszarze interpretacji ekologicznej wyników: nie zostałem przekonany, że zmiany w stosunkach ilościowych poszczególnych grup funkcjonalnych mikroorganizmów (w szczególności miksotrofów, autotrofów i drapieżników) rzeczywiście wpływają znacząco na tempo rozkładu materii organicznej na torfowiskach, a przez to na obieg węgla, ale też założone badania nie mogły takiej tezy w pełni zweryfikować. Jestem przekonany więc, że badania zaprezentowane w ocenianej pracy rozpoczynają nurt, który zdecydowanie powinien być kontynuowany i mam nadzieję, że będzie – być może przy udziale Doktorantki i / lub innych osób z zespołu badawczego, w którym pracowała.

Podsumowując, przedstawioną mi do oceny pracę uznaję za spełniającą warunki stawiane rozprawom doktorskim, w związku z czym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie pani mgr Moniki Reczugi do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z wysokim poziomem naukowym rozprawy, a także faktem opublikowania wszystkich trzech części w renomowanych czasopismach naukowych wnoszę o wyróżnienie Kandydatki stosowną nagrodą.

Warszawa, 21.03.2021 r.