

dr hab. Iwona Jasser

Zakład Ekologii Roślin i Ochrony Środowiska

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej pt. „The significance of cyanobacterial filament morphology in a defence against grazing by *Daphnia* spp.”

Autorstwa magistra Łukasza Wejnerowskiego wykonana pod opieką doktora Sławomira Cerebina na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska składa się z pięciu oryginalnych publikacji w języku angielskim, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wprowadzenia do publikacji w języku angielskim, będącego przedstawieniem założeń, hipotez, najważniejszych wyników badań i ich dyskusji. Wszystkie prace włączone do dysertacji doktorskiej są wieloautorskie, w czterech z nich Pan magister Łukasz Wejnerowski jest pierwszym autorem oraz autorem korespondującym, a jego udział w powstaniu prac jest znaczący i waha się między 40 a 80%. Prace te były opublikowane w latach 2013-2018 w czasopismach raportowanych w Journal Citation Reports i kolejno są to:

- 1) Sławek Cerbin, Łukasz Wejnerowski, Marcin Krzysztof Dziuba 2013. *Aphanizomenon gracile* increases in width in the presence of *Daphnia*. A defence mechanism against grazing? - Journal of Limnology, 72(3):505 DOI: 10.4081/jlimnol.2013.e41 (40%)
- 2) Łukasz Wejnerowski, Sławek Cerbin, Maria Wojciechowicz, Tomasz Jurczak, Małgorzata Glama, Jussi Meriluoto, Marcin Dziuba 2018 Effects of *Daphnia* exudates and sodium octyl sulphates on filament morphology and cell wall thickness of *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales) and *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales). European Journal of Phycology, DOI: 10.1080/09670262.2018.1442585 (L Wejnerowski autor korespondujący; 65%)

- 3) Łukasz Wejnerowski, Sławek Cerbin, Marcin Krzysztof Dziuba 2015. Thicker filaments of *Aphanizomenon gracile* are more harmful to *Daphnia* than thinner *Cylindrospermopsis raciborskii*. - Zoological Studies, 54:2. DOI: 10.1186/s40555-014-0084-5 (L Wejnerowski autor korespondujący; 50%)
- 4) Łukasz Wejnerowski, Sławek Cerbin, Maria K Wojciechowicz, Marcin K Dziuba. 2016. Differences in cell wall of thin and thick filaments of cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* SAG 31.79 and their implications for different resistance to *Daphnia* grazing. Journal of Limnology, 75(3): 634-643. DOI: 10.4081/jlimnol.2016.1383 (L Wejnerowski autor korespondujący; 70%)
- 5) Łukasz Wejnerowski, Sławek Cerbin, Marcin Krzysztof Dziuba. 2017. Setae thickening in *Daphnia magna* alleviates the food stress caused by the filamentous cyanobacteria. Aquatic Ecology, 51:485-498. DOI: 10.1007/s10452-017-9631-6 (L Wejnerowski autor korespondujący; 80%)

Naukowe znaczenie tematyki badawczej

Eutrofizacja jest jednym z najpoważniejszych współczesnych zagrożeń wód słodkich a towarzyszący jej wzrost biomasy fitoplanktonu i zakwity fitoplanktonowe należą do dobrze opisanych konsekwencji tejże, występujących w różnych strefach klimatycznych. Wzrostowi biomasy fitoplanktonu towarzyszy zwykle zmiana jego struktury i powszechny wzrost udziału sinic, aż po ich uciążliwą dominację w zespole fitoplanktonu (Dokulil i Teubner 2000). Sinice dominują w wodach eutroficznych dzięki licznym przystosowaniom, pomiędzy którymi jest ich odporność na wyżeranie przez konsumentów zooplanktonowych. Wynika ona z morfologii sinic tworzących trudne do pobrania przez zooplankton kolonie nitkowate, występujące w formie pojedynczych nici lub w wiązkach oraz, w przypadku sinic kokkalnych, kolonii złożonych z wielu komórek. Dodatkowo obecność śluzowych pochw i osłon utrudnia zarówno pobieranie jak i trawienie sinic (Gliwicz i Siedlar 1980; Kerfoot i in. 1988). Wiadomo jednak, że sinice charakteryzują się dużą zmiennością morfologiczną nawet w obrębie gatunku, co często jest przyczyną ich błędnej identyfikacji. Z tego powodu w identyfikacji sinic stosuje się obecnie podejście polifazowe, czyli analizę molekularną opartą na analizie sekwencji, morfologiczną, i ekologiczną (Komárek 2016). Istotnym pytaniem jest czy zmienność obserwowana w obrębie gatunku jest tylko odpowiedzią na różne warunki abiotyczne, czy może też być przejawem powszechnego w przyrodzie ciągłego „wyścigu zbrojeń” pomiędzy konsumentami a ich ofiarami, jakimi są w tym wypadku właśnie sinice – a więc indukowanym mechanizmem obronnym przed zjadaniem. Zmiany klimatu, w tym jego ocieplenie, ustępowanie lub skrócenie okresu obecności

pokrywy lodowej na jeziorach, zmiany ilości i rozkładu opadów oraz długości okresu wegetacyjnego, a także stratyfikacji w głębokich jeziorach stwarzają warunki sprzyjające rozwojowi sinic. W konsekwencji tych zmian oczekuje się więc dalszego wzrostu dominacji sinic w jeziorach eutroficznych i hipertroficznych. Badania podjęte przez magistra Łukasza Wejnerowskiego, jego opiekuna i współpracowników mają na celu wyjaśnienie czy i w jaki sposób zmiany morfologii sinic nitkowatych mogą wpływać na najefektywniejszych konsumentów sinic, czyli *Daphnia*, oraz wyjaśnienie czy *Daphnia* mogą indukować takie zmiany u sinic. Magister Wejnerowski zwraca uwagę w swoich badaniach na znaczenie szerokości nici sinic dla wyżerania przez *Daphnia*, a więc tego aspektu morfologii sinic, który był pomijany w badaniach nad mechanizmami obronnymi cyjanobakterii przed wyżeraniem. Odpowiedź na te pytania jest bardzo istotna z punktu przewidywania zmian w planktonie i w całych ekosystemach jeziornych, szczególnie w dobie ocieplania klimatu.

Ocena merytoryczna prac składających się na rozprawę doktorską oraz ich wkład w rozwój tej dziedziny wiedzy

- 1) Pierwsza z ocenianych prac, opublikowana w *Journal of Limnology* dotyczy weryfikacji hipotezy, że zmiana szerokości i długości nici *Aphanizomenon gracile* obserwowana sezonowo w środowisku naturalnym jest mechanizmem obronnym przeciwko wyżeraniu przez *Daphnia*. Autorzy postanowili również sprawdzić czy powyższe zmiany morfologiczne mogą być wywoływane tylko bezpośrednio przez wyżeranie przez zooplankton, czy również przez samą obecność *Daphnia* i wydzielane przez nie substancje semiochemiczne (kairomony). Oba eksperymenty wykazały, że szerokość nici rosła w obecności *Daphnia* lub substancji wydzielanych przez nie, natomiast długość nici malała. Autorzy stwierdzili przy tym, że długość nici malała proporcjonalnie w ciągu 6 i 12 dni w obecności mechanicznego działania *Daphnia*, natomiast w przypadku braku mechanicznego wpływu *Daphnia* nici ulegały skróceniu w podobnym stopniu bez względu na czas działania czynników. Badacze uznali, że wzrost szerokości i zmniejszenie długości nici może być mechanizmem obronnym jednak zasugerowali także inną hipotezę tłumacząc zmiany morfologiczne, wg. której jest to odpowiedź sinic na zmianę w dostępności N i P w wyniku krążenia i regeneracji związków biogennych przez *Daphnia*. W publikacji tej nie widzę istotnych uchybień – metodyka badawcza jest poprawna, opis wyników i

tok rozumowania nie budzą zastrzeżeń. Do niewielkich uchybień należy pomyłka w opisie czasu dnia i nocy – czas naświetlania D16: L8 i drobne niezręczności językowe zaznaczone w tekście pracy i będące do wglądu dla Doktoranta.

- 2) W drugiej spośród prac przedstawionych w dysertacji, opublikowanej w 2018 roku w *European Journal of Phycology* mgr Wejnerowski i współautorzy, postawili sobie za cel zweryfikowanie wcześniej postawionej hipotezy, że zmiana morfologii sinic może wiązać się z regeneracją związków biogennych przez *Daphnia*. Drugim celem było stwierdzenie czy substancje semiochemiczne wydzielane przez *Daphnia* lub też siarczan oktylu, syntetyczny kairomon *Daphnia*, wpływają na różne gatunki sinic w podobny sposób jak opisane dla wcześniej dla szczepu *A. gracile* (SAG 31.79) oraz czy obserwowane zmiany morfologiczne są w jakiś sposób związane ze zdolnością cyjanobakterii do produkcji toksyn. Do badań wybrano cztery szczepy *A. gracile*, dwa *Cylindrospermopsis raciborskii* i dwa *Planktothrix agardhii*.

Spośród badanych sinic odpowiedź morfologiczną polegającą na wzroście szerokości nici stwierdzono u wszystkich badanych przedstawicieli Nostocales, natomiast w obydwóch szczepach *P. agardhii* albo nie stwierdzono istotnych zmian w szerokości albo wręcz jej zmniejszenie. Analizując długość nici zmiany zanotowano tylko w przypadku jednego ze szczepów *C. raciborskii* (SAG 1.97) i miały one odwrotny charakter niż poprzednio dla *A. gracile* – długość nici wzrosła zarówno w obecności związków wydzielanych przez *Daphnia* jak i syntetycznych kairomonów.

Weryfikację „hipotezy biogenowej” przeprowadzono na podstawie pomiarów stężenia związków biogennych w pożywkach w trakcie eksperymentu oraz, dla Nostocales, na podstawie liczby heterocytów w warunkach kontrolnych i eksperymentalnych. Wyniki tych analiz pozwoliły odrzucić hipotezę o regeneracji związków biogennych przez *Daphnia* jako tłumaczącą wzrost grubości nici *A. gracile* i *C. raciborskii* pomimo, że wykazały wzrost stężenia jonów amonowych w warunkach eksperymentalnych z żywymi *Daphnia*. W badaniach nie stwierdzono również wzrostu grubości ściany komórkowej pod wpływem *Daphnia*, dzięki czemu nici sinic mogłyby się stać bardziej sztywne i trudniejsze do złamania – grubość ścian komórkowych była proporcjonalna do grubości nici i nie zależała od obecności *Daphnia*.

Nie stwierdzono również aby wzrost grubości nici był związany z produkcją toksyn przez badane szczepy. Tylko w przypadku szczepu *P. agardhii* SAG 6.89 zidentyfikowano trzy kongenery mikrocytyn (MC-LR, RR i YR), a w żadnym ze szczepów nie stwierdzono obecności cylindropermopsyny. Interesujące jest jednak dlaczego nie badano obecności saksitoksyn? W szczepach *C. raciborskii* występujących w Europie jak dotychczas nie stwierdzono produkcji cylindropermopsyny ani saksitoksyny, wiadomo jednak, że *C. raciborskii* występujący w Brazylii jest silnym producentem saksitoksyn. A kolei szczepy *A. gracile* występujące w Europie znane są z produkcji zarówno saksitoksyn jak i cylindropermopsyny. Jeśli więc doktorant chciał wykluczyć ewentualną koincydencję kosztownych zmian morfologicznych oraz kosztownej toksyczności powinien sprawdzić również obecność saksitoksyn, które występują w niektórych szczepach badanych gatunków i mogą oddziaływać negatywnie na zooplankton.

Bardzo interesującym wynikiem opisanym w drugiej publikacji jest stwierdzenie, że *Planktothrix agardhii*, przedstawiciel Oscillatoriales, albo nie wykazywała żadnych zmian morfologicznych pod wpływem *Daphnia* albo jej nici były istotnie cieńsze. Opisane zmiany nie wiązały się również z obecnością toksyn. Brak widocznego mechanizmu obronnego w stosunku do *Daphnia* u *P. agardhii*, w postaci poszerzenia nici jest istotny i warty dalszego przetestowania z innymi szczepami tego gatunku, jako, że w przypadku tej sinicy zanotowano wyraźne sezonowe zmiany w morfologii w środowisku naturalnym. Ponadto *P. agardhii* jest jednym z gatunków tworzących w naszych jeziorach uciążliwe, nawet całoroczne, zakwity.

- 3) W trzeciej z zaprezentowanych prac, opublikowanej w 2015 roku w Zoological Studies porównany jest wpływ *A. gracile* i *C. raciborskii* na historię życia *Daphnia*. W publikacji tej Pan magister Wejnerowski i współpracownicy wykazali, że *A. gracile* o niciach istotnie szerszych niż *C. raciborskii* wywiera bardziej negatywny wpływ na *Daphnia* niż *C. raciborskii*. Objawiało się to tym, że *Daphnia* przystępująca do rozrodu była mniejsza i miała mniej liczne potomstwo niż w przypadku wpływu *Cylindropermopsis* o węższych niciach. Interesujące jest, że rodzaj pokarmu nie wpłynął na wielkość osobników potomnych, co sugerowało, że w złych warunkach pokarmowych *Daphnia* inwestują w silne potomstwo.

Wyniki opisane w tej publikacji są istotne dla zrozumienia dynamiki populacji *Daphnia* w środowisku zdominowanym przez różne gatunki sinic nitkowatych, niemniej wywołały kilka pytań i wątpliwości. Po pierwsze dlaczego Doktorant i współautorzy wybrali do eksperymentu dwa gatunki sinic? Różnice w reakcji *Daphnia* na inny pokarm, tzn. badane gatunki sinic, mogły wynikać nie tylko z samych szerokości nici czy ich sztywności i łamliwości ale także z różnych wartości odżywczych czy obecności różnych metabolitów wtórnych. Jak sami Autorzy zauważyli w dyskusji, w kolejnych eksperymentach powinno się dobierać różne morfologicznie szczepy tego samego gatunku. Co ciekawe Doktorant dysponował szczepem *A. gracile* (SAG 31.79) o dwóch morfotypach, a jak wykazał w kolejnej pracy, możliwe jest rozdzielenie tych morfotypów przynajmniej na jakiś. Wydaje się, że zapoczątkowanie eksperymentów nad wpływem grubości nici sinic na *Daphnia* od użycia tego samego gatunku czy nawet szczepu i zweryfikowanie wyników na innych gatunkach byłoby lepszym podejściem metodycznym.

Drugie pytanie wiąże się właśnie z faktem istnienia w hodowli *A. gracile* morfotypów o cienkich i grubych niciach. Czy więc w pierwszym eksperymencie, w którym obserwowano zmianę morfologii tego samego szczepu *A. gracile* (SAG 31.79), zmiana ta nie wynikała częściowo z wyjadania przez *Daphnia* cieńszych nici i w konsekwencji zmiany struktury zespołu, a nie ze zmiany morfologicznej poszczególnych nici, i jak autorzy sugerowali, inwestowania przez *A. gracile* w budowę grubszych nici. Choć podobne zmiany morfologiczne obserwowano w obecności samych związków wydzielanych przez *Daphnia* (bez jej mechanicznego wpływu), jednak były one mniejsze, możliwe jest więc nakładanie się tych dwóch mechanizmów. Brak tego aspektu w pierwszej z publikacji, zaczynającej cały cykl badań nie jest niepokojący, szkoda jednak, że Doktorant nie ustosunkował się do tego we wprowadzeniu do dysertacji.

Kolejna wątpliwość, jaką mam w związku z omawianą pracą dotyczy sposobu przedstawienia metod. Układ i długość trwania eksperymentów oraz sposób pobierania i łączenia prób opisane są w dosyć zawiły sposób. Być może tabela lub schemat graficzny ułatwiłyby czytelnikowi zrozumienie tego, czego nie udało się przedstawić jasno w tekście? Dodatkowo, rodzi się pytanie dlaczego mierzono grubość tylko 30 nici, a długość 150 nici skoro to właśnie grubość nici jest motywem przewodnim prezentowanych badań? Wątpliwości budzi sposób przedstawienia wyników dotyczących zmiany grubości nici *A. gracile*. W streszczeniu i w dyskusji Autorzy piszą o zmianie proporcji pomiędzy liczbą cienkich i grubych nici wynikającą z wyjadania

cienkich nici przez *Daphnia*, natomiast w innych miejscach o wzroście liczby grubych nici. Nie wiadomo więc czy opisywane zmiany wynikają tylko ze spadku liczby cienkich nici i w konsekwencji zmiany proporcji pomiędzy grubymi i cienkimi nićmi, czy wiążą się z rzeczywistym wzrostem liczby grubych nici np. w wyniku ich pogrubiania w obecności *Daphnia*.

- 4) Czwarta z kolei publikacja przedstawiona w ramach rozprawy opisuje różnice w budowie ścian komórkowych badanego już wcześniej szczepu *A. gracile* (SAG 31.79) i ich implikacje dla mechanizmu odporności na wyżeranie. Autorzy stwierdzili, że cieńsze nici *A. gracile* charakteryzowały się również cieńszą ścianą komórkową oraz, że grubość ściany komórkowej korelowała z grubością nici. W ten sposób szersze nici były też pewnie sztywniejsze i bardziej odporne na złamanie, co tłumaczyłoby ich odporność na wyjadanie przez *Daphnia*. Doktorant stwierdził również, że mniejszej grubości nici (szczególnie tych najwęższych) towarzyszyła zwiększona wakuolizacja i zniekształcenie komórek co było najprawdopodobniej przejawem gorszego stanu fizjologicznego nici czy wręcz ich obumierania i mogło tłumaczyć ewentualną większą podatność na wyżeranie. Większa podatność na wyżeranie populacji sinic w złym stanie fizjologicznym była już opisywana wcześniej (Gliwicz 1990). Interesujące jest jednak czy w trakcie zamierania i autolizy elementów protoplastu, grubość ściany komórkowej nie powinna być proporcjonalnie większa niż w zdrowych komórkach w dobrym stanie fizjologicznym?
- 5) W piątej i ostatniej z prezentowanych prac, opublikowanej w 2017 w *Aquatic Ecology*, Doktorant i współautorzy stwierdzili zmiany w budowie aparatu filtracyjnego *Daphnia* w obecności sinic nitkowatych o różnej grubości nici. Generalnie polegały one na zgrubieniu szczecin filtracyjnych i zmniejszeniu wielkości oczek w aparacie filtracyjnym. Aby wyeliminować efekt zmiany wielkości samych *Daphnia* w obecności sinic nitkowatych przedstawiono względne zmiany grubości szczecin i stwierdzono, że zwiększały się one u każdego z badanych klonów *Daphnia*. Podobnie jak większości prezentowanych w rozprawie doktorskiej badań wpływ *A. gracile* był silniejszy i bardziej negatywny niż wpływ *C. raciborskii*. Ten i wcześniej prezentowane wyniki sugerują więc, że *C. raciborskii*, inwazyjny w Europie gatunek sinicy, wydaje się być mniej odporny na wyżeranie przez *Daphnia*, niż rodzimy gatunek *A. gracile*. Pomimo tego jednak w ostatnich dekadach, wraz z ocieplaniem klimatu obserwujemy stałe przesuwanie się jego zasięgu na północ. Interesujące jest więc jak wyglądają zależności pomiędzy *C. raciborskii* i filtratorami w warunkach naturalnych w naszych jeziorach.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska jest zbiorem bardzo wartościowych publikacji rozwiązujących problem naukowy jakim jest mechanizm odporności sinic nitkowatych na wyżeranie przez *Daphnia* oraz mechanizm negatywnego wpływu nietoksycznych szczepów sinic nitkowatych na *Daphnia*. Zaprezentowane publikacje stanowią spójny ciąg logiczny z prawidłowo postawionymi hipotezami badawczymi, które są weryfikowane w danej publikacji lub w kolejnych. Zastosowane metody badawcze oraz metody statystyczne są prawidłowe i zgodne ze standardami nowoczesnych badań, podobnie jak wyciągane wnioski. Wszystkie publikacje zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o współczynniku wpływu między 0,885 a 2,412. Zaznaczone w recenzji wątpliwości i pytania, nie umniejszają wartości publikacji. Wynikają one z głębokiego zainteresowania hipotezami badawczymi i przedstawionymi wynikami i powinny być traktowane jako przyczynek do dyskusji i dalszego rozwoju.

Przedstawiona dysertacja spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (tekst jednolity, Dz. U. 2014 poz. 1852). Moja ostateczna ocena rozprawy doktorskiej magistra Łukasza Wejnerowskiego jest bardzo wysoka i przedkładam Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto w związku z podjęciem bardzo interesującego i pomijanego dotąd aspektu zależności pomiędzy *Daphnia* i nitkowatymi sinicami, kompleksowego podejścia do problemu badawczego oraz odkrycia ważnych zależności, które mogą przyczynić się do zrozumienia i prognozowania zmian planktonu w jeziorach zdominowanych przez sinice nitkowate wnoszę o rozważenie przez Wysoką Radę Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu przyznania wyróżnienia recenzowanej pracy.

Z wyrazami szacunku
Iwona Jonek