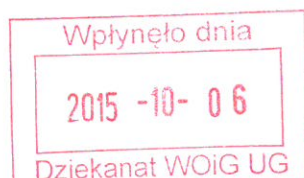




Warszawa, 01.10.2015

Dr hab. Iwona Jasser
Instytut Botaniki
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski



Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Sylwii Śliwińskiej pt. „Wpływ wybranych czynników środowiskowych na zjawisko allelopatii u bałtyckich sinic *Synechococcus* sp. i *Nodularia spumigena*”

Wzrost częstości i intensywności zakwitów sinicowych obserwowany w wodach słodkich i słonawych zwrócił uwagę naukowców na czynniki, które mogą leżeć u podstaw tego zjawiska. Jako najważniejsze przyczyny wymienia się eutrofizację oraz zmiany klimatu wiążące się ze wzrostem temperatury powietrza i wody, skróceniem okresu pokrywy lodowej w przypadku wód słodkich, przedłużenie okresu stratyfikacji latem czy wreszcie zmiany w reżimie hydrologicznym. Jednak poza czynnikami abiotycznymi ważną rolę w regulacji dynamiki i struktury fitoplanktonu przypisuje się również zależnościom biotycznym, a wśród nich zależnościom allelopatycznym. Stwierdzono bowiem, że produkowane przez pewne gatunki producentów pierwotnych związki allelopatyczne mogą modyfikować tempo wzrostu i procesy fizjologiczne innych wpływając w ten sposób na strukturę i sezonową sukcesję fitoplanktonu, promując dominację i tworzenie zakwitów przez określone taksony. Badania dotyczące allelopatii wskazują na potrzebę bliższego poznania mechanizmów działania związków allelopatycznych oraz weryfikację ich działania w ekologicznie wiarygodnych warunkach.

W pracy doktorskiej pani magister Sylwia Śliwińska stara się odpowiedzieć właśnie na pytania dotyczące mechanizmów oddziaływania związków allelopatycznych produkowanych przez dwa gatunki cyjanobakterii występujące w Morzu Bałtyckim tj. *Nodularia spumigena* i *Synechococcus* sp. na przykładowe gatunki fitoplanktonu oraz na siebie nawzajem. Ponadto, Autorka próbuje ocenić wpływ wybranych czynników abiotycznych oraz stanu fizjologicznego komórek na zdolność badanych cyjanobakterii do produkcji związków allelopatycznych. Tym jasno wyznaczonym celom odpowiada, przedstawiona w pracy, hipoteza badawcza mówiąca, że badane gatunki sinic wykazują oddziaływania allelopatyczne, modyfikowane przez czynniki biotyczne i abiotyczne. Tak postawiona hipoteza badawcza, jest bardzo szeroka i niespecyficzna, jednak wyznaczone cele badawcze są bardzo cenne poznawczo i odpowiadają na pytania nurtujące badaczy zależności allelopatycznych. Przedstawiona do oceny praca doktorska jest napisana zgodnie z tradycyjnym modelem tzn. jest to rozprawa prezentująca bezpośrednio wyniki badań w formie monografii. Układ pracy jest typowy, z podziałem na wstęp, metody, wyniki, dyskusję z podsumowaniem, wnioski i piśmiennictwo. Dodatkowo dysertacja zaopatrzona jest w aneks zawierający tabelaryczne zestawienie wyników analiz statystycznych. Praca jest bardzo obszerna, bo zawiera aż 226 stron. Wstęp jest rozbudowany i zajmuje 35 stron, rozdział opisujący materiał i metody badawcze dla odmiany jest bardzo skondensowany i mieści się na 14 stronach. Wydaje mi się, że przy tak dużej liczbie eksperymentów i ich wariantów jaka jest zaprezentowana w pracy rozdział ten jest nieco zbyt powierzchowny i powinien być, dla jasności, zakończony przynajmniej zestawieniem wszystkich typów i wariantów eksperymentalnych. Wyniki badań omówione są szeroko na 81 stronach, natomiast dyskusja zajmuje 54 strony. Autorka zacytowała w pracy aż 388 publikacji naukowych. Praca jest bogato zilustrowana; zawiera 9 schematów, kilka przykładowych zdjęć badanych mikroorganizmów oraz ponad 40 złożonych wykresów i blisko 40 tabel prezentujących wyniki.

Od strony merytorycznej Autorka bardzo pieczołowicie zaplanowała eksperymenty i konsekwentnie je przeprowadziła. Przede wszystkim zastosowała typ eksperymentów polegający na wykorzystaniu przesączu z hodowli badanych sinic. Z założenia przesącz taki nie zawiera żywych komórek (cell-free filtrate) lub produktów ich rozpadu tak aby poza potencjalnym wpływem związków allelopatycznych nie występował żaden inny efekt jak np. efekt konkurencji o zasoby ze strony żywych komórek producentów

związków allelopatycznych, efekt użyczenia z ewentualnie zniszczonych komórek czy efekt działania toksyn uwalnianych do środowiska po rozpadzie komórek. Wszystkie eksperymenty przeprowadzane były według tego samego schematu: tzn. badano wpływ przesączu na liczebność wybranych gatunków fitoplanktonu na podstawie pomiarów OD oraz na wybrane parametry fizjologiczne. Należały do nich fluorescencja chlorofilu *a* badana metodą pulsacyjnej modulacji amplitudy (PAM) i tempo wymiany gazowej mierzone metodą elektrody tlenowej Clarka, na podstawie której wykreślano krzywe fotosyntezy oraz wyliczano zmianę parametrów charakteryzujących intensywność fotosyntezy jak α – czyli kąt nachylenia krzywej fotosyntezy oraz P_m – czyli maksymalne tempo fotosyntezy. Dodatkowo, Autorka badała wpływ wybranych abiotycznych czynników środowiskowych na efekt oddziaływań allelopatycznych, tj. wpływ dostępności/limitacji związków biogenych, intensywności światła oraz temperatury. Autorka sprawdzała także czy intensywność oddziaływania allelopatycznego zależy od stanu fizjologicznego komórek i fazy wzrostu badanych hodowli. W ten sposób Autorka badała wpływ dwóch gatunków sinic *N. spumigena* i *Synechococcus* sp. wzajemnie na siebie oraz na 4 gatunki mikroglonów: *Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina*, *Skeletonema marinoi* i *Bacillaria paxillifer*.

Autorka szeroko i systematycznie omówiła wyniki eksperymentów wg stałego klucza również w dyskusji podążając konsekwentnie za zastosowanym schematem eksperymentów. Wyniki badań magister Sylwii Śliwińskiej świadczą o tym, że cyjanobakterie mogą produkować związki allelopatyczne, które wpływają - zwykle negatywnie – na niektóre gatunki fitoplanktonu. Siła ich oddziaływania zależy od czynników abiotycznych, które modyfikują produkcję związków allelopatycznych a oddziaływania te są najsilniejsze w przypadku stosowania przesączu z aktywnie rosnących hodowli. Oddziaływanie to zmieniało się również w zależności od gatunków glonów poddanych temu działaniu. Tak więc Autorka wykazała, że związki pochodzące zarówno od *N. spumigena* jak i *Synechococcus* sp. ograniczają liczebność *C. vulgaris* i *S. marinoi* a także wpływają negatywnie na fluorescencję i krzywą fotosyntezy szczególnie u *S. marinoi*. Co więcej działanie to jest najsilniejsze gdy sinice hodowane są w optymalnych warunkach tzn. dużej intensywności światła, w wysokiej temperaturze (25°C) oraz w przy nadmiarze związków biogenych. Autorka wykazała także, że małe gatunki fitoplanktonu są bardziej wrażliwe na działanie związków allelopatycznych niż

duże gatunki. Pani magister Śliwińska sugeruje również, że to czy glony eukariotyczne współwystępują z badanymi sinicami w środowisku czy mijają się z nimi w czasie ma znaczenie dla wykształcenia przez nie mechanizmów osłabiających działanie związków allelopatycznych. Dotyczące powyższych zagadnień wyniki badań pani magister Sylwii Śliwińskiej są bardzo ważne dla zrozumienia zależności pomiędzy gatunkami glonów i cyjanobakterii oraz dynamiki fitoplanktonu w Morzu Bałtyckim.

Omawiana rozprawa doktorska nie jest jednak wolna od potknięć i niedociągnięć, które należy wytknąć. Moje zastrzeżenia dotyczą jednak głównie kwestii metodycznych. Tak więc, brakuje mi scharakteryzowania podstawowego obiektu badawczego czyli *Synechococcus* sp. i *N. spumigena*. Szczególnie w przypadku *Synechococcus* sp. czuję tu niedosyt, ponieważ pikocyjanobakterie są stosunkowo nowym tematem badawczym, i jak sama Autorka zaznaczyła po raz pierwszy badanymi pod kątem zależności allelopatycznych. Ponadto pikocyjanobakterie, wbrew ogólnie uznawanym prawidłowościom, mówiącym że dominują one w środowiskach mało żyznych a w żyznych mają znacznie mniejsze znaczenie, odgrywają w Morzu Bałtyckim bardzo dużą rolę, dominując okresowo w biomacie sinic. Zabrakło więc informacji takich jak to czy badane szczepy i ten konkretny, wybrany do dalszych badań są bogate w fikocytrynę czy w fikocyjaninę, jaką mają średnią wielkość, choć jakąś wskazówką może być rycina ze zdjęciami przedstawicieli tych trzech szczepów spod mikroskopu skaningowego, ani jaki ma typ podziału czy tempo wzrostu. O tempie wzrostu badanych szczepów dowiadujemy się dopiero w dyskusji. Myślę, że przy tak rozbudowanej pracy doktorskiej informacje te powinny znaleźć się w rozdziale „Materiał i metody”.

Moje wątpliwości budzi metoda liczenia pikocyjanobakterii w komorze Bürkera służącej do liczenia krwinek, w świetle przechodzącym i przy powiększeniu ok. 600 razy. Odbiega to od powszechnie przyjętych metod stosowanych w badaniach pikocyjanobakterii, tzn. liczenia komórek osadzonych na filtrze poliwęglanowym o średnicy porów 0,2 μm w mikroskopie fluorescencyjnym w zielonym lub niebieskim świetle wzbudzającym. Takie wymagania w stosunku do identyfikacji i liczenia pikocyjanobakterii wynikają z ich bardzo małych rozmiarów. Zgodnie z definicją, średnica komórek pikocyjanobakterii mieści w przedziale od 0,2 do 2,0 μm a w praktyce od 0,6 do 2,0 μm . Z badań prowadzonych w Morzu Bałtyckim wynika, że pikocyjanobakterie tam występujące tworzą 3 wyraźne klasy wielkości: 0,6-0,7 \times 1,1 μm ;

0,8-0,9×1,5 μm i 1,0-1,2×1,7 μm. Pomimo, iż w hodowli komórki mogą przyjmować nieco większe rozmiary wydaje się, że w komorze o głębokości 0,1 mm trudno jest tak nastawić ostrość aby bezbłędnie policzyć tak małe komórki – co jest szczególnie ważne przy wyliczaniu ich tempa wzrostu na podstawie zmian liczebności, czy wykreślanu krzywych kalibracyjnych dla pomiarów OD. Jest to też o tyle istotne, że Autorka nie zauważyła istotnych zmian w liczebności *Synechococcus* sp. pod wpływem przesączu z *N. spumigena*, podczas gdy zanotowała zmiany w przebiegu krzywych fotosyntezy. Może się więc rodzić pytanie czy tych zmian rzeczywiście nie było czy metoda nie była wystarczająco czuła.

Następną wątpliwość metodyczną budzi używanie filtrów GF/C do uzyskiwania przesączu hodowli badanych sinic. Podczas gdy w przypadku *N. spumigena* użycie filtrów GF/C a więc o średnicy porów 1,2 μm jest zasadne, to użyty do eksperymentów szczep *Synechococcus* BA-124 ma prawdopodobnie średnicę komórek podobną (a może nawet mniejszą) niż nominalna średnica porów filtra GF/C. W konsekwencji przesącz z hodowli *Synechococcus* sp. mógł zawierać także żywe komórki tych cyjanobakterii. Autorka, jak rozumiem, nie sprawdzała w mikroskopie fluorescencyjnym przesączu, mogła więc sobie nawet nie zdawać sprawy z obecności żywych komórek *Synechococcus* sp. w kolbach eksperymentalnych. W konsekwencji, w eksperymentach mogły zaistnieć nie tylko czyste oddziaływania allelopatyczne, które zapewnia typ wybranych eksperymentów, ale możliwe że dochodziło również do konkurencji o zasoby pokarmowe pomiędzy badanymi organizmami. Dlatego bezpieczniej byłoby wybrać do uzyskiwania przesączu filtry o średnicy porów zdecydowanie mniejszej niż średnica odfiltrowywanych komórek czyli przynajmniej o średnicy porów 0,7 μm (GF/F) lub 0,45 μm.

Kolejnym niewielkim mankamentem pracy jest brak podsumowania wyników. Jak zaznaczyłam wyżej praca jest bardzo obszerna i prezentuje wyniki wielu eksperymentów i ich wariantów i choć w kolejnych eksperymentach powtarzany jest układ z poprzednich, to liczba wyników jest bardzo duża. Wprawdzie Autorka zamieściła pod koniec rozdziału „Dyskusja“ podsumowanie, jednak jest ono umieszczone pod koniec pracy, ma charakter opisowy i zawiera elementy dyskusji. Myślę, że tabela zestawiająca typy eksperymentów i ich warianty oraz podstawowy efekt osiągnięty w danym wariantcie umieszczona na końcu rozdziału „Wyniki“ bardzo ułatwiłaby przyswojenie sobie tego niezaprzeczalnie bardzo obszerne materiału.

Od strony formalnej praca jest bardzo dobrze przygotowana, co jest dużym osiągnięciem przy tak obszernym tekście. Napisana jest ładną polszczyzną i bardzo starannie zredagowana. Zawiera tylko nieliczne potknięcia redakcyjne takie jak drobne błędy gramatyczne (np. „pora” zamiast „por”) czy literówki, choć niektóre znajdują się w nazwach łacińskich glonów eukariotycznych i cyjanobakterii. Z pewnym zdziwieniem zauważyłam jednak, że Autorka cytuje w tekście wyniki liczbowe w sposób niezgodny z ogólnie przyjętymi zasadami matematyki, tzn. bez względu na cyfrę po przecinku (przykładowo dwa czy dziewięć) zaokrągla zawsze wyniki w dół.

Autorka wykazała natomiast dużą dbałość o stronę graficzną pracy; schematy, wykresy i tabele są w estetyczne i większości przypadków łatwe do odczytania (może z wyjątkiem kilku wykresów prezentujących wyniki zmian przebiegu krzywej fotosyntezy str. 74, 82, 93). Autorka zadbała o konsekwentne przedstawianie wyników na wykresach z zachowaniem kolorystyki i kolejności wariantów, które ułatwia czytanie i zrozumienie tego bardzo obszernego materiału.

Istotnym osiągnięciem pani magister Sylwii Śliwińskiej jest wykazanie, że pikocyjanobakterie są zdolne do produkcji związków allelopatycznych i że mogą w ten sposób wpływać na inne gatunki fitoplanktonu występujące w wodach ograniczając ich liczebność i wydajność procesów fizjologicznych. Zważywszy, że pikocyjanobakterie występują powszechnie w wodach słodkich, słonawych i morskich wskazuje to na ich potencjał w regulowaniu funkcjonowania zespołów fitoplanktonu w tych akwenach. Jest to o tyle ciekawe, że choć uważa się, iż pikocyjanobakterie są to organizmy nie tworzące zakwitów, to istnieją doniesienia świadczące, że mogą one tworzyć długotrwałe zakwity. Takie długotrwałe zakwity obserwowano w lagunie Comacchio przy północno-zachodnim wybrzeżu Adriatyku (Sorokin i Zakuskina 2010). Tym samym badania Autorki mogą rzucić nowe światło na przyczyny występowania i trwania takich zakwitów.

Autorka wykazała, że oprócz wpływu na zielenice i okrzemki *Synechococcus* sp. wywiera też wyraźnie negatywny wpływ na *N. spumigena*, toksyczną sinicę współwystępującą z badanymi pikocyjanobakteriami w Morzu Bałtyckim. To bardzo ciekawy wynik, w kontekście kłopotliwych zakwitów tworzonych przez *N. spumigena* w Morzu Bałtyckim. Niestety Autorka w dyskusji nie próbowała odnosić się do wyników badań środowiskowych dotyczących dynamiki biomasy i zależności pomiędzy

N. spumigena i *Synechococcus* sp., choć istnieją już przynajmniej dwie publikacje zwracające uwagę na antagonistyczny charakter tych zależności w Morzu Bałtyckim. To, co inni Autorzy opisywali na podstawie analiz środowiskowych być może mogłoby być tłumaczone zależnościami allelopatycznymi wykazanymi przez Autorkę na drodze eksperymentów laboratoryjnych. Co dziwniejsze, Autorka zacytowała w swojej dysertacji obydwie publikacje, lecz najwyraźniej nie doceniła wagi informacji w nich zawartych dla wyników swoich własnych badań. Mówię tu o pracy Stal i in. z 2003 oraz Mazur-Marzec i in. z 2013. W obu tych pracach zwracano uwagę, że prawdopodobnie pikocyjanobakterie „trzymają w szachu” swoich większych konkurentów, choć brakowało przekonujących danych tłumaczących przyczyny tego zjawiska. Tak jak napisałam wyżej, wyniki badań Autorki rzucają nowe światło na możliwy mechanizm postulowanego „trzymania w szachu” *N. spumigena* przez *Synechococcus* sp. i aż prosiłoby się aby Autorka wykorzystwała to w dyskusji. Nie jest to poważny zarzut, raczej rodzaj zawodu, że Autorka nie skorzystała aby wyniki swoich niezaprzeczalnie niezwykle interesujących badań odnieść do środowiska naturalnego. Mam nadzieję, że wyniki przytoczonych prac staną się dla Autorki inspiracją do dalszych badań.

Podsumowując stwierdzam, że na podstawie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, bardzo wysoko oceniam kwalifikacje naukowe pani magister Sylwii Śliwińskiej. Uważam, że zarówno przygotowanie teoretyczne jak i zaprojektowane eksperymenty świadczą o dojrzałości Autorki. Pomijając drobne niedociągnięcia metodyczne, które jednak nie dyskwalifikują przeprowadzonych badań eksperymentalnych, czy jeszcze mniej istotne redakcyjne, stwierdzam że praca jest bardzo dobrze przemyślana i od strony merytorycznej nie budzi wątpliwości. Wyniki eksperymentów są przekonujące i potwierdzone różnymi metodami. Dają odpowiedź na pytanie jaki jest mechanizm działania związków allelopatycznych oraz w jaki sposób abiotyczne czynniki środowiskowe oraz stan fizjologiczny komórek wpływają na oddziaływania allelopatyczne. Na szczególne podkreślenie zasługuje konsekwencja z jaką badania te zostały przeprowadzone oraz jasno zaprezentowane. Uważam, że praca spełnia wszystkie wymogi stawiane tego typu rozprawom i że zasługuje na wyróżnienie. Niniejszym wnoszę więc o dopuszczenie pani magister Sylwii Śliwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o nagrodzenie stosowną nagrodą.

