

Prof. dr hab. Hanna Mazur-Marzec
Zakład Biotechnologii Morskiej
Instytut Oceanografii WOiG
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 29-11-2021

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Grażyny Jaskulskiej pt.
"Cyjanofagi i ich rola w regulacji sinicowych zakwitów wody"
"Cyanophages and their role in the regulation of cyanobacterial blooms",

wykonanej w Katedrze UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Mankiewicz-Boczek.

W opiniowanej pracy Doktorantka zgłębiała problemem cyjanofagów, jako jednego z czynników biotycznych wpływających na dynamikę zakwitów cyjanobakterii. Ze względu na niewielkie rozpoznanie tego tematu, zwłaszcza w przypadku wód śródlądowych, oraz ze względu na istotne środowiskowe i zdrowotne znaczenie masowego rozwoju cyjanobakterii, podjęcie się badań w tym zakresie uważam za uzasadnione.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi cykl czterech artykułów naukowych, które zostały opublikowane w czasopiśmie *Microbial Ecology* (dwie prace) i *Ecohydrology and Hydrobiology* (dwie prace) o łącznej wartości IF 15,534. Jedna publikacja jest pracą przeglądową, napisaną we współautorstwie z Panią Promotor, prof. Mankiewicz-Boczek. Udział własny Doktorantki w powstawaniu tych prac został oceniony odpowiednio na 40, 80, 45 i 55%. Materiał do badań zbierano od 2009 r. Pochodził on ze zbiorników w Polsce Centralnej (głównie Zbiornik Sulejowski i Zbiornik Jeziorsko) oraz z jezior zlokalizowanych na Litwie. Badania prowadzono z zastosowaniem markerowych sekwencji wirusowych *g91*, *psbA* i *nbIA*, sekwencji genu 16S rRNA, oraz genu *mcyA* związanego z syntezą mikrocystyn. Analizie poddano też szereg parametrów fizyko-chemicznych zbiorników wodnych (pH, temperatura, przewodnictwo, TN i TP).

Przedstawiony do oceny cykl czterech publikacji stanowi spójną całość. Są one poprzedzone Występem, w którym w skrócie został przedstawiony negatywny wpływ masowo występujących cyjanobakterii na funkcjonowanie środowiska, klasyfikacja i znaczenie cyjanofagów oraz geny markerowe wykorzystywane w analizie cyjanofagów. Postawione przez Doktorantkę cele badawcze uważam za ambitne. Ich realizacja przebiegała z zastosowaniem metod molekularnych, pozwalających na jakościową i ilościową analizę wybranych sekwencji. Wątpliwości moje budzi zasadność hipotezy drugiej, według której „Zróżnicowanie rodzajowe sinic oraz parametry fizyko-

chemiczne wpływają na występowanie cyjanofagów”. Badania nad słusznością tej hipotezy, według mnie, prowadzą do oczywistego wniosku.

Pierwsza praca (*Cyanophages infection of Microcystis bloom in lowland dam reservoir of Sulejów, Poland*), opublikowana w 2016 roku była niejako wstępem do badań. Miała na celu stwierdzenie obecności oraz identyfikację cyjanofagów infekujących cyjanobakterie z rodzaju *Microcystis* (1); rozpoznania ewentualnego wpływu produkcji mikrocytyn przez te mikroorganizmy na ich oddziaływanie z cyjanofagami (2) oraz określenie kluczowych abiotycznych czynników środowiskowych wpływających na infekcje fagowe (3). Praca ta, wykonana na materiale ze Zbiornika Sulejowskiego, była w Polsce pionierska. Na podstawie analizy genu *g91* stwierdzono obecność fagów z rodziny *Myoviridae*, zdolnych do infekowania cyjanobakterii z rodzaju *Microcystis*, dominujących w Zbiorniku Sulejowskim. Nie stwierdzono natomiast związku między podatnością na infekcję, a występowaniem genów *mcyA* u *Microcystis*. Uzyskany wynik jest interesujący, choć Doktorantka nie wyjaśnia, dlaczego badała tę zależność. Dlaczego toksyczne (dla organizmów wyższych) mikrocytyny, miałyby wpływać na podatność cyjanobakterii na infekcje fagowe.

Druga część rozprawy doktorskiej (*Cyanophages specific to cyanobacteria from the genus Microcystis*) jest pracą przeglądową, opublikowaną w 2020. W tej publikacji Doktorantka udokumentowała swoją szeroką wiedzę z zakresu zagadnień związanych z realizowaną pracą. Przedstawiła dokładną charakterystykę cyjanofagów infekujących *Microcystis*, opisała najnowsze doniesienia dotyczące wpływu warunków środowiska na dynamikę fagów w wodzie i w komórkach gospodarza. Wskazała, że infekcje cyjanofagowe mogą zmieniać strukturę populacji, zwiększając udział genotypów opornych na te infekcje. W podsumowaniu pracy znalazła się bardzo ważna, opinia wyrażająca pogląd, że badania interakcji cyjanofagi-cyjanobakterie powinny uwzględniać analizę metagenomu.

Moim zdaniem, ta praca przeglądowa powinna stanowić pierwszą (lub ostatnią) część rozprawy, wskazującą w jakim miejscu badań nad fagami *Microcystis* lokuje się badania realizowane przez mgr A. Jaskulską. W ten sposób lepiej uwidoczniłyby się wkład Doktorantki w ten obszar nauki.

W trzeciej części rozprawy doktorskiej (*Cyanophage distribution accross European lakes of the temperate-humid continental climate zone assessed using PCR-based genetic markers*) mgr Aleksandra Jaskulska kontynuowała badania nad fagami cyjanobakterii. Tym razem Doktorantka analizowała materiał z 21 zbiorników położonych w Polsce i na Litwie. Uwzględniła też większą liczbę genów markerowych cyjanofagów. Były to geny *psbA* (specyficzne dla fagów *Prochlorococcus* i *Synechococcus*), *nblA* (konserwatywne, charakterystyczne dla fagów infekujących *Microcystis* i *Planktothrix*) i *g91* (charakterystyczne dla fagów litycznych infekujących *Microcystis*). Tak zaplanowane badania pozwoliły na porównanie cyjanofagów występujących w odległe względem siebie położonych zbiornikach wodnych, o zróżnicowanych warunkach i różnej strukturze cyjanobakterii. Jako istotny wynik, stwierdzono podobieństwo sekwencji genów markerowych z analizowanych jezior w zakresie 75-98% (*psbA*), powyżej 88% (*nblA*) i powyżej 90% (*g91*). Zatem

analiza z zastosowaniem *psbA* wykazała największe zróżnicowanie cyjanofagów. Wykazano także istotne zróżnicowanie zbiorników pod względem takich parametrów jak całkowite stężenie fosforanów i przewodnictwo, co przekłada się na strukturę cyjanobakterii, a pośrednio również na różnorodność cyjanofagów. Ponieważ różnorodność cyjanobakterii w badanych zbiornikach wodnych jest znaczna, wybrane sekwencje markerowe z pewnością nie pozwoliły na wykrycie wszystkich cyjanofagów tam występujących.

W moim odczuciu spora ilość analiz statystycznych nie jest zrównoważona dyskusją na temat mechanizmów oraz znaczenia biologicznego odnotowanych zależności.

Interesującym elementem rozprawy doktorskiej jest czwarta publikacja (*Daily dynamic of transcripts abundance of Ma-LMM01-like cyanophages in two lowland European reservoirs*). Opisuje ona dobową zmienność cyjanofagów infekujących cyjanobakterie z rodzaju *Microcystis*, porównując ją jednocześnie z dynamiką występowania cyjanobakterii należących do tego rodzaju. Obszarem badań był Zbiornik Jeziersko oraz Zbiornik Sulejowski. Zmienność cyjanobakterii określano na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA, a markerem zmienności cyjanofaga były geny *g91* oraz jego transkrypty. Dodatkowym narzędziem w ocenie różnorodności sinic była analiza sekwencji genu *rpoB*. Szkoda, że ten gen nie był brany pod uwagę w pozostałych pracach. W odróżnieniu od genu 16S rRNA, występuje on u cyjanobakterii w jednej kopii, a więc byłby bardziej odpowiedni jako marker charakteryzujący ilość cyjanobakterii. Jest też mniej konserwatywny. Niektórzy autorzy, w podobnych pracach, zalecają analizę sekwencji obu genów (t.j. 16S rRNA oraz *rpoB*).

Stosując wymienione narzędzia, Doktorantka wykazała różnice w strukturze cyjanobakterii w badanych zbiornikach oraz stwierdziła różnicę w dobowej dynamice *Microcystis* i infekujących ją fagów. Co ciekawe, mimo tych różnic liczba transkryptów genu *g91* była w obu zbiornikach podobna. Zwiększona aktywność cyjanofagów w czasie dnia była podstawą do wyciągnięcia wniosku o zależności replikacji cyjanofaga od przebiegu procesu fotosyntezy w komórkach gospodarza. Zastanawiać może niewspółmiernie duży (w porównaniu z łagodnymi zmianami liczby kopii genów 16S rRNA oraz *g91*) wzrost liczby transkryptów *g91* w Zbiorniku Sulejowskim odnotowany o godz. 12.00 w południe.

Co Doktorantka miała na myśli tłumacząc różnicę w dobowych zmianach liczby kopii 16S rRNA *Microcystis* dominacją cyjanobakterii różnego rodzaju. W Zbiorniku Sulejowskim dominowały tylko cyjanobakterie z rodzaju *Microcystis*, natomiast w Zbiorniku Jeziersko cyjanobakterie z rodzaju *Microcystis* współdominowały z *Aphanizomenon*. W jaki sposób *Aphanizomenon* mógł wpłynąć na cykl dobowy *Microcystis*?

W publikacji czwartej nie podano dnia pobierania próbek; wspomniano tylko, że było to w sierpniu 2016 r. Można się domyślać, że badania w Zbiorniku Sulejów i Zbiorniku Jeziersko prowadzono w różnych dniach. W związku z tym powstaje pytanie, czy różne warunki atmosferyczne w trakcie zbierania materiału mogły wpłynąć na obserwowane procesy. Skoro wzrost liczby kopii 16S rRNA oraz *g91* w godzinach popołudniowych w Zbiorniku Sulejowskim tłumaczona jest kumulacją *Microcystis* przy powierzchni, dlaczego takie zjawisko nie było obserwowane w Zbiorniku Jeziersko.

Wyniki tej interesującej pracy prowokują szereg pytań. Z pewnością wykonanie podobnych badań w więcej niż jednym cyklu dobowym; stosując dodatkowe markery, o większej rozdzielczości, pozwoliłoby znaleźć odpowiedź przynajmniej na niektóre z nich.

Szkoda, że w badaniach prowadzonych w ramach przedstawionej mi do oceny rozprawy prowadzono analizę sekwencji genu 16S rRNA, które nie sprawdzają się w badaniach różnic międzygatunkowych. Nie umniejsza to wartości pracy, ale ze względu na selektywność wirusów w doborze gospodarza, to podejście mogło w istotny sposób wpłynąć na wyniki badań i ich interpretację. W środowisku mamy do czynienia z wieloma różnymi układami cyjanofag-*Microcystis*. W pracy Yoshida i wsp. (2006), wyizolowany cyjanofag Ma-LMM01 infekował tylko jeden (NIES298) z szesnastu badanych szczepów *Microcystis aeruginosa*. Znaczna część fagów identyfikowana przez Doktorantkę na podstawie analizy sekwencji genu *g91* wykazywała duże podobieństwo właśnie do faga Ma-LMM01. Można więc oczekiwać, że również wykrywane cyjanofagi były zdolne do infekcji niektórych tylko gatunków lub raczej genotypów *Microcystis*. Doktorantka jest świadoma tej niedoskonałości i wspomina o niej w swojej rozprawie. W związku z tym powstają jednak wątpliwości, czy przy zastosowaniu narzędzi, jakie wybrała Doktorantka do realizacji pracy, była ona w stanie rzetelnie odpowiedzieć na pytanie o rolę cyjanofagów w regulacji sinicowych zakwitów. Na podstawie tytułu rozprawy można wnioskować, że poszukiwanie odpowiedzi na to pytanie było jej głównym celem.

Po zapoznaniu się z całością rozprawy doktorskiej, można odnieść wrażenie, że jest ona bardziej na temat wpływu cyjanobakterii na dynamikę cyjanofagów niż na temat roli cyjanofagów w regulacji występowania sinicowych zakwitów (jak to ujęto w tytule).

Kolejne pytanie dotyczy motywacji, jakimi kierowała się Doktorantka wybierając gen *mcyA*, jako markerowy dla cyjanobakterii produkujących mikrocyстыny. Jak wiadomo, gen ten jest związany z syntezą białka katalizującego przyłączenie *N*-metylo-dehydroalaniny (w pozycji 7) i alaniny (pozycji 1). W podobnych badaniach uwzględnia się głównie geny *mcyE*, związane z syntezą fragmentu Adda⁵-Glu⁶, który jest znacznie bardziej konserwatywny i ponad to kluczowy dla toksyczności związku. Ciekawa jestem zdania Doktorantki na temat wyników zaprezentowanych przez Beversdorf i wsp. (2015; 10.1371/journal.pone.0125353), którzy wykazali, że geny *mcyA* i *mcyE* nie są dobrymi markerami w ocenie występowania toksycznych mikrocyстыn oraz ich roli środowiskowej. Jeżeli Doktorantka zgadza się z opinią autorów, czy nie byłoby korzystniejsze zastosowanie analizy produktów (t.j. mikrocyстыn), zamiast genów? Uwzględniając również fakt, iż nie zawsze geny *mcy* ulegają ekspresji.

W załączonych dokumentach przedstawione zostały również inne osiągnięcia naukowe Doktorantki. Poza publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, jest ona pierwszym autorem lub współautorem pięciu innych prac (IF 0.69-4.04). Była też pierwszym autorem lub współautorem 17 wystąpień konferencyjnych, w tym jednego wystąpienia referatowego w ramach

10 International Conference on Toxic Cyanobacteria, która odbyła się w Chinach (2016 r.). Istotnym elementem dorobku Doktorantki jest zaangażowanie, jako wykonawca, w projektach naukowych realizowane przez Europejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii. Pani mgr Aleksandra Jaskulska uczestniczyła też w czterech kursach o zróżnicowanej tematyce, co wskazuje na tendencję do zdobywania różnorodnych doświadczeń, istotnych w realizacji badań naukowych.

Reasumując, opisane w rozprawie doktorskiej badania mają charakter pionierski i wnoszą wiele elementów nowości do istniejącej wiedzy na temat różnorodności i dynamiki cyjanofagów w wodach polskich i litewskich. Doktorantka zamieściła cztery publikacje w kolejności ich ukazywania się. Pozwala to na odnotowanie wyraźnego rozwoju naukowy mgr Jaskulskiej. Uwagi zamieszczone w recenzji, nawet gdy są krytyczne, stanowią element dyskusji naukowej zainspirowanej przedstawioną do oceny pracą. Nie wpływają w istotny sposób na moją pozytywną ocenę rozprawy, którą czytałam z dużym zainteresowaniem.

Jednocześnie wyrażam opinię, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Jaskulskiej spełnia wymogi merytoryczne i formalne Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Komisji Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Jaskulskiej do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

