

Warszawa 20.12.2021

Dr hab. Iwona Jasser, prof. UW  
Instytut Biologii Środowiskowej  
Wydział Biologii, Uniwersytetu Warszawskiego  
Ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr. Aleksandry Grażyny Jaskulskiej pt.

*„Cyjanofagi i ich rola w regulacji występowania sinicowych zakwitów wody”*

zrealizowanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Joanny Mankiewicz-Boczek w  
Katedrze UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej na Wydziale Biologii i  
Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego we współpracy z Europejskim

Centrum Ekohydrologii PAN

Wzrost częstości i intensywności zakwitów sinicowych notowany w ostatnich dekadach w wodach słodkich i słonawych spowodował zwiększenie zainteresowania naukowców samym zjawiskiem jak również czynnikami, które mogą regulować jego występowanie oraz ustępowanie. Jako najważniejsze przyczyny leżące u podstaw zakwitów sinicowych wymienia się eutrofizację oraz zmianę klimatu. Ta ostatnia objawia się między innymi wzrostem temperatury powietrza i wody, skróceniem okresu lub nawet brakiem pokrywy lodowej w przypadku wód słodkich, przedłużeniem okresu stratyfikacji letniej czy wreszcie zmianami w reżimie hydrologicznym. Poza czynnikami abiotycznymi ważną rolę w regulacji dynamiki i struktury fitoplanktonu oraz występowania zakwitów odgrywają zależności biotyczne. Wśród nich są bezpośrednie zależności między zooplanktonem a fitoplanktonem, wpływ ichtioeutrofizacji, czyli zwiększenia obsady ryb planktonożernych a szczególnie karpiowatych, a także wpływ wirusów. Wirusy są najliczniejszymi formami życia w środowisku wodnym. Cyjanofagi to bakteriovirusy, które specyficznie atakują cyjanobakterie i są odpowiedzialne za śmiertelność sinic, doprowadzając nawet do załamania zakwitów (Gons i in. 2002, Coello-Camba i in., 2020) lub wywołując zmiany sukcesyjne w obrębie zespołu sinic (Yoshida i in. 2008). Badania cyjanofagów, ich występowania, specyficzności prowadzone od lat 60tych oraz

relacji filogenetycznych i ewolucji cyjanofagów, prowadzone od końca XX wieku koncentrowały się w znacznym stopniu na środowisku morskim i cyjanofagach atakujących powszechnie w tych środowiskach występujących *Synechococcus* i *Prochlorococcus*. Badania cyjanofagów ze środowisk słodkowodnych, w których zakwitły sinicowe stanowią duży problem ekologiczny i ekonomiczny pozostały nieco w tyle dlatego zainteresowanie badaczy tą tematyką jest niezwykle cenne.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. Aleksandry Grażyny Jaskulskiej zatytułowana „Cyjanofagi i ich rola w regulacji występowania sinicowych zakwitów wody” należy właśnie do intensywnie ostatnio rozwijającego się kierunku badań występowania, charakterystyki, ekologii i ewolucji cyjanofagów w środowiskach słodkowodnych. Praca stanowi zbiór czterech publikacji opublikowanych w liczących się czasopismach międzynarodowych i prezentujących wyniki badań poświęconych występowaniu i specyficzności cyjanofagów w Zalewie Sulejowskim oraz w różnych zbiornikach Polski i Litwy a także ich wpływowi na współwystępujące zespoły sinic. Publikacje łączy tematyka oraz obiekt badawczy a Pani mgr Jaskulska jest pierwszym autorem w trzech z nich, ze znaczącym wkładem poświadczonym przez współautorów, natomiast w pierwszej chronologicznie pracy jest drugim autorem z 30% wkładem:

- Mankiewicz-Boczek J., Jaskulska A., Pawełczyk J. Gągała I., Serwecińska L., Dziadek J. 2016. Cyanophages Infection of Microcystis Bloom in Lowland Dam Reservoir of Sulejów, Poland. *Microbial Ecology* 71, 315-325, <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0677-5> (IF - 4,552; punktacja MNiSW – 100 – wkład 30%).
- Jaskulska A., Mankiewicz-Boczek J. Cyanophages specific to cyanobacteria from the genus *Microcystis*. 2020. *Ecohydrology Hydrobiology* (20) <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2019.06.001> (IF – 3,215; punktacja MNiSW – 70; wkład – 80%)
- Jaskulska A., Sulcius S., Kokociński M., Koreiviene J., Najera A.F. Mankiewicz-Boczek J. 2021a. Cyanophage Distribution Across European Lakes of the Temperate-Humid Continental Climate Zone Assessed Using PCR-Based Genetic Markers. *Microbial Ecology* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01783-y> (IF – 4,552; punktacja MNiSW – 100; wkład – 45%).
- Jaskulska A., Najera A.F., Czarny P., Serwecińska L., Mankiewicz-Boczek J. 2021b. Daily dynamic of transcripts abundance of Ma-LMM01-like cyanophages in two lowland European reservoirs. *Ecohydrology Hydrobiology* (21). <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2021.07.003> (IF – 3,215; punktacja MNiSW – 70; wkład – 55%)

Rozprawę doktorską rozpoczyna wstęp przedstawiający problematykę związaną z występowaniem w środowisku cyjanobakterii i cyjanofagów, markerów molekularnych stosowanych w badaniach tych zespołów oraz znaczenie podjętych badań. Następnie Autorka przedstawiła hipotezy badawcze oraz cele badawcze pracy, które mają umożliwić zweryfikowanie postawionych hipotez. Oto one:

- 1) Cyjanofagi z rodziny *Myoviridae* wpływają na dynamikę występowania sinic w monitorowanych zbiornikach retencyjnych Polski Centralnej
- 2) Na występowanie cyjanofagów wpływają zarówno sinice występujące w środowisku jak i warunki fizyczno-chemiczne zbiorników
- 3) Cykl dobowy – dzień/noc wpływa na proces transkrypcji cyjanofagów

Oraz cele badawcze:

- 1) Sprawdzenie występowania i dynamiki cyjanofagów oraz sinic z uwzględnieniem genotypów toksygenicznymi odpowiedzialnych za syntezę mikrocystin w zbiorniku Sulejowskim i Zbiorniku Jeziorsko na tle warunków fizyczno-chemicznych i hydrologicznych
- 2) Przeanalizowania występowania cyjanofagów na tle parametrów biotycznych i abiotycznych w zbiornikach polskich i litewskich
- 3) Analiza transkrypcji cyjanofagów specyficznie atakujących *Microcystis* z wykorzystaniem genów markerowych charakterystycznych dla wirusów i sinic

W części rozprawy poświęconej metodyce i terenom badawczym Autorka zamieściła mapy z lokalizacją badanych zbiorników (rycina 3) oraz bardzo pomocne zestawienie metodyki badań (rycina 4). Na tym etapie zabrakło jednak informacji o statusie troficznym oraz charakterze badanych zbiorników, choć oczywiście pojawia się ona w załączonych publikacjach. Pani magister Jaskulska prowadziła badania w Zbiorniku Sulejowskim i Zbiorniku Jeziorsko w Centralnej Polsce, oraz w 14 dodatkowych zbiornikach w Polsce i 7 na Litwie. Stan troficzny badanych zbiorników wahał się od meso-eutroficznego do hypertroficznego z eutroficznymi zbiornikami w Polsce i dominacją hypertroficznych zbiorników na Litwie. W ten sposób autorka uzyskała w badaniach zarówno gradient trofii jak i gradient geograficzny. Badane zbiorniki charakteryzowały się dużą i bardzo dużą biomasą sinic oraz występowaniem gatunków potencjalnie toksygenicznymi. Podczas gdy część badanych wód była zdominowana przez jeden gatunek cyjanobakterii *Planktothrix* (Lubosińskie, Bytyńskie i Zbąszyńskie) lub *Microcystis* (Sulejowski, Jeziorsko) w innych jeziorach (8 Polskich i wszystkich litewskich) zespoły sinic były bardziej zróżnicowane z kilkoma potencjalnie toksygenicznymi gatunkami występującymi w różnych proporcjach. W dalszej części rozprawy Autorka przedstawiła najważniejsze wyniki badań wraz z odniesieniem ich do istotnych danych literaturowych oraz zamieściła podsumowanie z weryfikacją postawionych hipotez.

Pierwszy z artykułów włączonych do rozprawy doktorskiej „Cyanophages Infection of *Microcystis* Bloom in Lowland Dam Reservoir of Sulejów, Poland” oraz drugi zatytułowany „Cyanophages specific to cyanobacteria from the genus *Microcystis*” poświęcone są problemowi występowania i zmienności sezonowej cyjanofagów infekujących *Microcystis* w jeziorach zdominowanych przez ten rodzaj sinic. W badaniach tych Autorka stwierdziła współwystępowanie cyjanofagów i sinic oraz ich toksygenicznymi genotypów przez cały okres badań. Pani mgr. Jaskulska nie zanotowała jednak powtarzających się zmian w dynamice cyjanofagów i sinic w Zbiornikach Sulejowskim i Jeziorsko, oraz tylko okazjonalnie antagonistyczne zależności wraz z załamaniem liczebności sinic przy gwałtownym wzroście liczby kopii genów cyjanofagów, świadczące o możliwym regulującym wpływie cyjanofagów na liczebność *Microcystis*. Autorka wysnuła więc wniosek, że choć cyjanofagi nie były jednym z czynników regulujących występowanie sinic, to mogły okresowo kontrolować ich liczebność.

Regularne zmiany liczebności dwóch populacji z przesunięciem czasowym, których nie zanotowała Autorka, zgodne z modelem Lotki-Volterra (1926) dla zespołu drapieżcy i ofiary były też obserwowane w innych układach, np. pomiędzy pasożytami a gospodarzami czy komórkami rakowymi (wirusami) a systemem immunologicznym. Model Lotki-Volterra zakłada jednak, że w danym środowisku występują tylko dwa gatunki powiązane wzajemnymi zależnościami. W przypadku badań cyjanofagów i cyjanobakterii w środowisku naturalnym przy użyciu metod molekularnych, stosowanych w ramach pracy, możliwe jest niezauważenie subtelnych różnic w genotypach wirusów i cyjanobakterii przez co badanych jest więcej niż tylko dwie populacje. Tym bardziej, że jak Autorka stwierdziła, długość amplifikowanego fragmentu genu *g91* (132 pz) i identyczność nukleotydów tylko w 17% pozycji, mogła być przyczyną nierozróżnienia genotypów fagowych i stąd brak ścisłych zależności z liczebnością sinic. Z drugiej strony można się spodziewać, że poszczególne szczepy *Microcystis* mogą być w różny sposób podatne na infekcje wirusowe, co zaobserwowali też inni badacze, i w konsekwencji cyjanofagi mogłyby wpływać na sukcesję szczepów w ramach zespołu *Microcystis*, co nie musiałyby być odzwierciedlone w całkowitej liczebności komórek tego gatunku. Taka interpretacja opisanych wyników pojawia się w drugiej publikacji, gdy Autorka odnosi się do badań swoich i innych autorów.

Intersującym spostrzeżeniem Autorki jest stwierdzenie braku zależności między liczbą kopii cyjanofagów i toksygenicznymi genotypów *Microcystis* co Autorka tłumaczy jako niewrażliwość badanych cyjanofagów na geny z klastra *mcy* i mikrocytyny i potwierdza wcześniejsze doniesienia (Kimura i in. 2013). Wynik ten moim zdaniem wskazuje również, na brak kierunkowych różnic w podatności toksycznych i nietoksycznych szczepów *Microcystis* występujących w badanym zbiorniku na analizowane cyjanofagi. Jest to jednak inny rezultat niż uzyskali np. Yoshida i in. (2008), którzy zaobserwowali drastyczny spadek udziału genotypów toksycznych *Microcystis* w trakcie wzrostu liczebności cyjanofagów. Wyniki przedstawione w powyższych dwóch publikacjach poszerzają wiedzę na temat zależności

między cyjanofagami specyficznymi dla *Microcystis* i samym *Microcystis* w naszej strefie geograficznej, ukazując jednocześnie konieczność dalszych badań na tym polu, z poszerzeniem metodyki o badania metagenomowe – co słusznie zauważała Autorka.

Trzecia publikacja mgr A. Jaskulskiej pod tytułem „Cyanophage Distribution Across European Lakes of the Temperate-Humid Continental Climate Zone Assessed Using PCR-Based Genetic Markers” dotyczy występowania oraz różnorodności cyjanofagów w jeziorach polskich i litewskich. Autorka przepadała pod tym kątem 14 jezior w Polsce; 13 w Zachodniej i Centralnej części kraju, jedno jezioro w Południowo-Wschodniej części oraz 7 jezior na Litwie. Jest to pierwsza praca obejmująca tak rozległy obszar, ponieważ dystans blisko 1000 km i 20000 km<sup>2</sup> i 21 jezior jednocześnie, podczas gdy inne publikacje zwykle dotyczyły wybranych pojedynczych zbiorników. Tym razem Autorka wykorzystała trzy geny markerowe: gen *psbA* (gen odpowiedzialny syntezę białka D1 w PSII), gen *nblA* (odpowiedzialny za degradację fikobylisomów) i gen *g91* (kodujący białka osłonki ogona) na tle fragmentu genu 16S rRNA charakteryzującego obecność sinic.

Autorka stwierdziła, że geny cyjanofagów występowały w 16 z 21 jezior i zinterpretowała brak cyjanofagów w 5 jeziorach jako efekt liczebności cząstek fagowych w tych jeziorach poniżej limitu detekcji lub też obecności inhibitorów, które uniemożliwiły amplifikację badanych genów. Zależności filogenetyczne zostały bliżej przeanalizowane dla genu *psbA* z sześciu jezior pokazując podobieństwo na poziomie 75 do 98% do cyjanofagów *Synechococcus* i *Prochlorococcus* przy czym w większości tych jezior (Lubosińskim, Pniewskim, Buszewskim, Pakoskim oraz Gineitiskes) było ono powyżej 90% i tylko w jednym, jeziorze Ilno, wynosiło ono zaledwie w 75%, wykazując najbliższe pokrewieństwo z sekwencją wirusa morskiego *Synechococcus* (S-CAM22). To bardzo interesujący wynik, choć nie odosobniony w literaturze i wskazujący, że marker *psbA* umożliwia analizowanie zarówno słodkowodnych jak i morskich środowisk pod kątem cyjanofagów, a co więcej, że cyjanofagi blisko spokrewnione z morskimi występują także w ekosystemach słodkowodnych. Czy można więc wysnuć wniosek, że cyjanofagi przy generalnie dużej specyficzności w stosunku do gatunków sinic mogą w pewnych przypadkach infekować daleko spokrewnione gatunki np. morskie i słodkowodne? Chciałabym, aby Pani magister odniosła się do tej uwagi. Pozostałe geny Autorka stwierdziła w około 50% badanych jezior, w których zanotowano markery sinicowe. Co więcej podobieństwo w ramach genu *nblA* było większe z sekwencjami nieznanymi szczepów z rodziny *Myoviridae* oraz szczepu MaMV-DC zdeponowanymi w GenBank-u (powyżej 90%) niż między nimi samymi (powyżej 88%). Jest to ciekawy wynik wskazujący na dużą różnorodność genotypów fagowych zaobserwowanych w tych środowiskach. Z kolei analiza genu strukturalnego osłonki ogona (*g91*) cyjanofaga zdolnego do lizy *Microcystis* wskazała duże podobieństwo (powyżej 90%) cyjanofagów z 6 jezior polskich i 3 litewskich oraz podobieństwo do wirusów z *Myoviridae* m.in. wspomniany wyżej MaMV-DC. Szkoda tylko że

Autorka nie przeanalizowała bliżej tych zależności filogenetycznych i nie zamieściła drzewa filogenetycznego lub chociaż przyrównania dla genów *nbIA* i *g91*.

Pani magister Jaskulska stwierdziła również istnienie zależności pomiędzy liczbą zanotowanych markerów cyjanofagów (dwa lub trzy) a całkowitą biomasą sinic, składem gatunkowym sinic oraz produktywnością badanych zbiorników wyrażoną jako fosfor całkowity a także przewodnością elektrolityczną. Na podstawie analizy PCA Autorka podzieliła badane jeziora na trzy grupy; pierwsza grupa – jezior litewskich z dominującymi *Microcystis viridis* i *M. wesenbergii* oraz *Planktolyngbya limnetica* oraz dwoma lub trzema markerami cyjanofagowymi, druga grupa zbierająca jeziora polskie również z dwoma lub trzema genami cyjanofagów oraz wysokim TP i przewodnością elektrolityczną i dominacją *Planktothrix agardhii*. Trzecią grupę stanowiły jeziora polskie i litewskie z brakiem lub pojedynczymi genami cyjanofagów. Co ciekawe w grupie tej były trzy z litewskich jezior, które były określone jako hipertroficzne. Jeziora te charakteryzowały się jednak niezbyt dużą biomasą cyjanobakterii co wskazuje, że prawdopodobnie całkowita biomasa cyjanobakterii bardziej niż produktywność jezior determinuje występowanie cyjanofagów. Autorka wykazała również, że hydrologia zbiorników zaporowych, zwiększony czas retencji, podobnie jak w przypadku promowania zakwitów cyjanobakteryjnych, również może istotnie wpływać na wzrost infekcji fagowych. Pomimo moich drobnych uwag dotyczących analiz filogenetycznych uważam, że omawiana publikacja dostarczyła niezwykle ważnych wyników dotyczących występowania, różnorodności i czynników determinujących występowanie genów cyjanofagów w naszej strefie klimatycznej.

W kolejnej, czwartek publikacji pt. "Daily dynamic of transcripts abundance of Ma-LMM01-like cyanophages in two lowland European reservoirs" Pani mgr. Jaskulska postanowiła zbadać bliżej zależności pomiędzy cyjanofagami i *Microcystis*, aby stwierdzić czy cykl dobowy związany z produktywnością sinic wpływa na liczebność i tempo namnażania się wirusów. Analizując próbki pobrane w cyklu dobowym z dwóch zbiorników (Jeziorsko i Sulejowskiego) pod kątem markera sinicowego, genu 16S rRNA Autorka wykazała inny cykl dobowy sinic w tych dwóch zbiornikach z pikiem w godzinach porannych (6.00-10.00) i nad ranem (2.00-4.00) w zbiorniku Jeziorsko i dwóch pików w godzinach rannych (6.00) i wczesnopołudniowych (14.00-16.00) w Zbiorniku Sulejowskim. Dopiero analiza genu *rpoB* (RNA zależnej polimerazy) wykazała inną strukturę gatunkową sinic i dominację *Microcystis* i *Aphanizomenon* w Zbiorniku Jeziorsko oraz *Microcystis* w Sulejowskim, co może tłumaczyć różnice w cyklu dobowym. Podobnie jak dynamika cyjanobakterii dynamika cyjanofagów nie była taka sama w obu zbiornikach. Natomiast, co istotne, dynamika względnej liczby transkryptów była podobna w obu zbiornikach wskazując na zależność transkrypcji cyjanofagów od światła i procesów fotosyntezy sinic-gospodarzy. Praca ta dostarczyła nowych wyników dotyczących zależności pomiędzy cyjanofagami infekującymi *Microcystis* i

*Microcystis* oraz zweryfikowała opublikowane wcześniej przez Kimura i in (2012) postulaty, że transkrypcja fagów może zależeć od cyklu dobowego sinic.

Na podstawie przedstawionych wyników Autorka zweryfikowała pozytywnie przedstawione przez siebie hipotezy o współwystępowaniu cyjanofagów rodziny *Myoviridae* i sinic oraz możliwym kontrolowaniu przez fagi liczebności i dynamiki cyjanobakterii, a także hipotezę, że zróżnicowanie rodzajowe i czynniki fizyczno-chemiczne zbiorników wpływają na występowanie i różnorodność cyjanofagów. Ostatnia, trzecia hipoteza, dotycząca zależności transkrypcji cyjanofagów od cyklu dobowego została również pozytywnie zweryfikowana. Do drobnych potknięć już w samej rozprawie mogę zaliczyć drobne błędy językowe, niestety dosyć powszechnie występujące, jak np. używanie określenia „ilość” w stosunku do policzalnych czynników np. „ilość kopii genu” czy „ilość kopii transkryptu”. Wspomniany wyżej brak informacji o statusie troficznym i rodzajach zbiorników wodnych analizowanych w pracy nr 3, oraz drobne literówki w pisaniu łacińskich nazw. Są to jednak nieistotne niedociągnięcia przy ogromie wyników i informacji o mało zbadanych formach życia jak słodkowodne cyjanofagi i ich zależnościach z infekowanymi przez nie sinicami i warunkami środowiskowymi.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana przeze mnie praca doktorska spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami). Oceniam pracę magister Aleksandry Jaskulskiej bardzo pozytywnie. Uważam, że praca jest nowatorska, obszerna i wykonana z wykorzystaniem szerokiego wachlarza metod badawczych. Autorka wykazała się doskonałą znajomością problematyki dotyczącej cyjanofagów opierając się na aktualnej literaturze.

Cele pracy zostały osiągnięte, a hipotezy badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane, co zostało udokumentowane w pracach opublikowanych w znaczących, międzynarodowych czasopismach naukowych oraz podsumowane w rozprawie doktorskiej. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr. Aleksandry Jaskulskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na niezwykle ważną wagę badań dotyczących cyjanofagów mogących regulować występowanie zakwitów sinicowych w wodach słodkich, a szczególnie w Europie Centralnej, na zaawansowane metody wykorzystane w badaniach (molekularne i bioinformatyczne), a także na szeroki zakres badań zarówno pod względem merytorycznym, geograficznym jak i czasowym wnioskuję o nagrodzenie recenzowanej pracy stosownym wyróżnieniem.

