

Streszczenie pracy doktorskiej

Zanieczyszczenie mikroplastikiem jest obecnie uznawane za stały czynnik presji na ekosystemy morskie, jednak jego wpływ na najmniejsze elementy pelagicznych sieci troficznych pozostaje niewystarczająco poznany. Podczas gdy wiele badań skupiało się na większych organizmach, najmniejsze cząstki mikroplastiku pokrywają się pod względem wielkości z bakteriami i inną zdobyczą mikrobową. Sprawia to, że są one szczególnie istotne dla pelagicznych mikrobowych sieci troficznych, w których bakterie i heterotroficzne nanoflagellaty (HNF) odgrywają kluczowe role w transferze węgla, recyklingu składników odżywczych oraz regulacji struktury zbiorowisk mikroorganizmów. W niniejszej pracy doktorskiej zbadano, w jaki sposób mikroplastik o wielkości bakterii wpływa na strukturę i funkcjonowanie pelagicznych mikrobowych sieci troficznych, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii, heterotroficznych nanoflagellatów oraz wyzwań metodologicznych związanych z wykrywaniem bardzo małych cząstek.

W pierwszej części pracy odniesiono się do kluczowego problemu analitycznego: niezawodnego wykrywania małych cząstek mikroplastiku. Ponieważ cząstki poniżej 5 mikrometrów są trudne do wykrycia przy użyciu standardowych podejść, opracowano zoptymalizowany protokół barwienia czerwienią Nilu dla mikroplastiku mniejszego niż 5 mikrometrów, ze szczególnym uwzględnieniem cząstek o wielkości 2 mikrometrów lub mniejszych. Protokół przetestowano przy użyciu cząstek polistyrenu i polietylenu, wraz z kontrolami nieorganicznymi. W zoptymalizowanych warunkach filtracji i barwienia, cząstki polistyrenu o wielkości 1 i 2 mikrometrów oraz cząstki polietylenu o wielkości 2 mikrometrów wykazywały silny i stały sygnał fluorescencji, podczas gdy cząstki szkła i materiał biologiczny nie ulegały zabarwieniu. Utrwalanie formaliną, powszechnie stosowane do konserwacji próbek mikroorganizmów, poprawiło jasność fluorescencji oraz stosunek sygnału do szumu bez

pogorszenia selektywności. Badanie to dostarczyło zatem prostej, opłacalnej i praktycznej metody wykrywania małego mikroplastiku w konserwowanych próbkach morskich, stanowiąc ważny fundament metodologiczny do badania jego skutków ekologicznych.

Druga część pracy przyniosła pierwszą eksperymentalną ocenę tego, jak cząstki polistyrenu o wielkości bakterii wpływają na naturalne mikrobowe sieci troficzne Morza Bałtyckiego. W pięciodniowym eksperymencie mikrokosmosowym przetestowano trzy stężenia cząstek polistyrenu o wielkości 1,1 mikrometra i porównano je z dopasowanymi pod względem wielkości cząstkami szkła, aby oddzielić efekty specyficzne dla polimeru od fizycznego wpływu zawieszonych cząstek. Na podstawie pomiarów liczebności bakterii i HNF, szacunków oddychania (respiracji) oraz sekwencjonowania amplikonów genów 16S i 18S rRNA w rozdziale tym wykazano, że wzrost HNF spadał w sposób zależny od stężenia, przy czym najsilniejsze efekty odnotowano w grupach o najwyższym stężeniu polistyrenu i szkła. Ponieważ podobne reakcje wystąpiły zarówno w grupach z plastikiem, jak i z cząstkami obojętnymi, wyniki wskazują, że to fizyczna obecność cząstek, a nie sama toksyczność polistyrenu, była głównym czynnikiem hamującym wzrost HNF. Liczebność bakterii i respiracja nie uległy istotnym zmianom, co sugeruje, że spadek HNF nie był spowodowany mniejszą dostępnością ofiar. Zamiast tego cząstki o wielkości bakterii mogły zakłócać żerowanie poprzez zmniejszenie efektywności napotykania ofiar, zwiększenie kosztów manipulacji pokarmem lub wypełnianie wakuoli pokarmowych bez dostarczania wartości odżywczych.

Analizy zbiorowisk w rozdziale 2 wykazały, że zbiorowiska eukariontów zmieniały się głównie w czasie, wykazując przesunięcie od początkowo dominujących grup fototroficznych lub miksotroficznych w kierunku taksonów heterotroficznych, w tym wiciowców bakteriożernych. Zbiorowiska bakteryjne były stosunkowo stabilne. Wyniki te wykazały, że wysokie stężenia

cząstek o wielkości bakterii mogą gwałtownie tłumić kluczowe mikrobowe drapieżniki i potencjalnie zmieniać transfer węgla w obrębie pętli mikrobowej. Ponieważ jednak rozdział ten opierał się głównie na sekwencjonowaniu amplikonów, opisywał on taksonomiczne przesunięcia w zbiorowiskach, lecz nie pozwalał na rozstrzygnięcie potencjału funkcjonalnego na poziomie genomu ani na zidentyfikowanie, które populacje bakterii mogą nieść geny związane z metabolizmem plastiku.

W związku z tym rozdział 3 rozszerzył rozdział 2 w dwóch ważnych aspektach. Po pierwsze, porównano w nim dwa istotne środowiskowo polimery – polistyren i polietylen – w tych samych warunkach eksperymentalnych i przy tym samym stosunku bakterii do cząstek, zachowując jednocześnie cząstki szkła jako kontrolę nieplastikową. Po drugie, włączono metagenomikę rozdzieloną genomowo (genome-resolved metagenomics), aby wyjść poza sam skład zbiorowiska i zbadać dynamikę populacji bakteryjnych, genomy zrekonstruowane z metagenomów (MAG) oraz domniemane geny związane ze szlakami przetwarzania plastiku. W ten sposób w rozdziale 3 przetestowano, czy ograniczone reakcje na poziomie zbiorowiska zaobserwowane w rozdziale 2 były specyficzne dla polistyrenu, czy też odzwierciedlały szerszą reakcję na cząstki o wielkości bakterii, pytając jednocześnie, czy efekty specyficzne dla polimeru można wykryć na bardziej szczegółowym poziomie genomycznym i funkcjonalnym.

W rozdziale 3 liczebność drobnoustrojów i skład zbiorowisk ponownie silnie zmieniały się w czasie. Liczebność HNF początkowo wzrosła, a później spadła w grupach z plastikiem, podczas gdy liczebność bakterii wykazywała zmienną, ale nie jednoznacznie specyficzną dla danej grupy dynamikę. Zarówno skład zbiorowisk bakteryjnych, jak i eukariotycznych był kształtowany głównie przez czas inkubacji, a nie przez rodzaj cząstek. Zbiorowiska eukariotyczne wykazały restrukturyzację czasową, w tym wzrost udziału Stramenopiles oraz rodzajów bakteriożernych, takich jak *Paraphysomonas* i *Spumella*. W zbiorowiskach

bakteryjnych dominowały Pseudomonadota, Bacteroidota i Actinobacteriota, z przesunięciami czasowymi wśród dominujących rodzin, ale bez wyraźnego rozdziału specyficznego dla polimeru.

Analizy rozdzielone genomowo przyniosły bardziej szczegółową interpretację. Odzyskano łącznie 118 genomów zrekonstruowanych z metagenomów (MAG) o średniej i wysokiej jakości, z których wielu nie można było przypisać do opisanych gatunków, co podkreśla niezbadaną różnorodność mikroorganizmów w bałtyckich wodach przybrzeżnych. Większość najliczniejszych MAG-ów nie wykazywała silnego wzbogacenia specyficznego dla danej grupy. Jednakże trzy mało liczne MAG-i należące do Spirosomaceae i Shewanellaceae były bogatsze w grupie z polietylenem i zawierały homologi genów związanych z przetwarzaniem syntetycznych polimerów lub pokrewnych związków. We wszystkich MAG-ach wykryto domniemane geny powiązane z przetwarzaniem polietylenu i polistyrenu, lecz na wzorce ich obfitości większy wpływ miał czas niż ekspozycja na dany polimer. Wyniki te sugerują, że krótkotrwała ekspozycja na cząstki PE i PS o wielkości bakterii nie spowodowała szerokich zaburzeń na poziomie zbiorowiska, ale PE może selektywnie sprzyjać wąskiej podgrupie bakterii o potencjalnych cechach metabolicznych związanych z polimerami.

Podsumowując, niniejsza praca doktorska pokazuje, że ekologiczne skutki mikroplastiku o wielkości bakterii dla pelagicznych mikrobowych sieci troficznych są subtelne, zależne od wielkości cząstek i silnie uwarunkowane interakcjami fizycznymi oraz naturalną sukcesją mikroorganizmów. Poprzez wcześniejsze ustanowienie solidnych podstaw metodologicznych do wykrywania najmniejszych cząstek mikroplastiku, praca ta w dalszej kolejności ujawnia, że cząstki polistyrenu o wielkości bakterii oraz cząstki obojętne mogą hamować wzrost heterotroficznych nanoflagellatów (HNF) poprzez fizyczny wpływ cząstek. Rozszerzając te ramy poprzez porównanie polistyrenu i polietylenu, w badaniach wykorzystano metagenomikę

do wykrywania subtelniejszych reakcji bakteryjnych i funkcjonalnych. Łącznie wyniki te pokazują, że choć krótkotrwała ekspozycja na mikroplastik o wielkości bakterii może nie przekształcać drastycznie całych zbiorowisk mikroorganizmów, to znacząco wpływa na kluczowe mikrobowe drapieżniki i ujawnia wąskie, powiązane z polimerami reakcje wśród specyficznych populacji bakterii. Ostatecznie niniejsza praca przyczynia się do bardziej mechanistycznego zrozumienia tego, jak mały mikroplastik wpływa na strukturę mikrobowych sieci troficznych, interakcje drapieżnik-ofiara oraz przepływ węgla u podstawy ekosystemów morskich.