

Andrzej Mikulski
Zakład Hydrobiologii
Uniwersytetu Warszawskiego

Autoreferat
w języku polskim

Załącznik 3A do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

1. Imię i Nazwisko: Andrzej Mikulski**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

- **Studia biologiczne** na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w latach 1989-1996.
- **Praca magisterska** zatytułowana „Czy doświadczenie matki może wpływać na biografię potomstwa: *Daphnia magna* jako przykład” wykonana w Zakładzie Hydrobiologii UW pod kierunkiem dr Joanny Pijanowskiej (1996).
- **Praca doktorska** zatytułowana „Wpływ historii życia matki na fenotyp osobników potomnych – model *Daphnia magna*” wykonana pod kierunkiem dr hab. Joanny Pijanowskiej i obroniona wiosną 2002 roku.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- **1995-1996** – asystent-stażysta w Zakładzie Hydrobiologii UW
- **1997-2001** – asystent naukowy w Zakładzie Hydrobiologii UW (etat płatny ze środków grantu KBN kierowanego przez dr Joannę Pijanowską zatytułowanego „Zmiany w historiach życia wioślarek planktonowych wywołane obecnością drapieżcy i konsekwencje tych zmian w kolejnych pokoleniach osobników potomnych” – kierownik grantu: Joanna Pijanowska)
- **2002-2004** – asystent w Zakładzie Hydrobiologii UW
- **2004-2005** – adiunkt naukowy w Zakładzie Hydrobiologii UW (etat płatny ze środków grantu KBN 2PO4F 036 26 zatytułowanego: „Rola białek stresowych i metylacji DNA w ekspresji plastyczności fenotypowej - model *Daphnia*” - kierownik grantu: Joanna Pijanowska)
- **2005-2016** – adiunkt w Zakładzie Hydrobiologii UW
- **2016** – do chwili obecnej – asystent w Zakładzie Hydrobiologii UW.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Organizm zmiennocieplny w środowisku termicznie heterogennym – model *Daphnia*.

b) Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- Mikulski A., Grzesiuk, M., Kloc, M., Pijanowska J. 2009 – Heat shock proteins in *Daphnia* detected using commercial antibodies: description and responsiveness to thermal stress – *Chemoecology* 19: 69-72.
- Mikulski A., Bernatowicz, P., Grzesiuk, M., Kloc, M., Pijanowska, J. 2011 – Differential levels of stress proteins (hsps) in male and female *Daphnia magna* in response to thermal stress: A consequence of sex related behavioral differences? – *J. Chem. Ecol.* 37: 670-676.
- Mikulski A., Grzesiuk, M., Rakowska, A. Bernatowicz, P., Pijanowska, J. 2017 – Thermal shock in *Daphnia*: cost of diel vertical migrations or inhabiting thermally-unstable waterbodies? – *Fund. Appl. Limnol.* 190: 213-220.
- Pietrzak B, Grzesiuk M., Dorosz J., Mikulski A. (autor koresp.) 2018 – When males outlive females: Sex-specific effects of temperature on lifespan in a cyclic parthenogen – *Ecol. Evol.* 8: 9880-9888.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Jednym z najbardziej fundamentalnych pytań, jakie stawiają ekologodzy, to pytanie o wybór siedliska przez organizm. Już Karol Darwin podczas podróży na okręcie Beagle zauważył, że blisko spokrewnione gatunki wybierają do życia inną przestrzeń, często wyraźnie różniącą się oferowanymi warunkami (Darwin 1839). Myśl ta znalazła się kilkadziesiąt lat później w pracy Josepha Grinnella (1917), który badając rozmieszczenie subpopulacji przedrzeźniacza kalifornijskiego (*Toxostoma redivivum*) całokształt warunków środowiskowych charakterystycznych dla poszczególnych płatów siedliska określił nazwą niszy. Po kolejnych kilkadziesiąt lat, wybitny amerykański ekolog, Evelyn Hutchinson

(1957), sprecyzował to pojęcie definiując niszę ekologiczną, jako n-wymiarową przestrzeń wyznaczoną przez zakresy warunków środowiskowych możliwych do przeżycia (nisza potencjalna) lub doświadczanych przez organizm określonego gatunku (nisza realizowana). Organizm ma możliwość zmiany niszy, w jakiej przebywa (jakiej doświadcza), przemieszczając się w przestrzeni w gradientach wartości kluczowych dla siebie czynników środowiskowych. Wybór siedliska jest kluczowym dla dostosowania i bardzo złożonym wyzwaniem. Każde przemieszczenie się osobnika w przestrzeń wiąże się *de facto* z jego przemieszczeniem się w granicach niszy, a to z kolei oznacza zmianę niepoliczalnej ilości doświadczanych przez niego parametrów środowiska, które interferując, determinują osobnicze dostosowanie (*fitness*). W rzeczywistości da się wydzielić nieliczne, podstawowe elementy, których wpływ na indywidualny sukces jest kluczowy. Zazwyczaj podzielić je można na dwie antagonistyczne grupy. Pierwszą stanowią czynniki wpływające na przeżywalność (takie jak drapieżnictwo), drugą te, determinujące tempo reprodukcji (takie jak dostępność pokarmu, czy dostępność do partnera do rozrodu). Konieczność maksymalizacji tempa asymilacji energii (a więc w konsekwencji energii możliwej do zainwestowania w reprodukcję) przy jednoczesnym ograniczeniu ryzyka przedwczesnej śmierci determinuje pozycję osobnika w wielowymiarowej przestrzeni dostępnych w środowisku warunków (realizowaną niszę), a co za tym idzie, jego faktyczny wybór siedliska. Problem komplikuje konieczność dopasowywania przez organizm miejsca przebywania do dynamicznie zmieniających się warunków, co w przypadku zmian o charakterze cyklicznym może pociągać za sobą cykliczne migracje tych organizmów.

Idealne środowisko do badania wyboru siedliska (*habitat selection*) przez organizmy powinno oferować niewielkie lub cykliczne (przewidywalne, więc łatwe do uwzględnienia w analizie) zmiany warunków w czasie, oraz ostre i stabilne gradienty warunków w przestrzeni. Dzięki temu operując szczegółową analizą jedynie niewielkiej przestrzeni można obserwować zauważalne przemieszczanie się organizmów wzdłuż różnych wymiarów niszy towarzyszące niewielki ich ruchom w środowisku. Kryteria te znakomicie spełnia pelagial stratyfikowanych jezior klimatu umiarkowanego. Energia słoneczna docierająca do wody rozprasza się wraz z głębokością oświetlając i nagrzewając głównie wierzchnie jej warstwy. Woda cieplejsza (o temperaturze powyżej 4°C) jest jednocześnie mniej gęsta, a powstały gradient termiczny stabilizuje masy wody utrwalając inne pionowe gradienty fizyczne i chemiczne. W ich

konsekwencji powstają pionowe gradienty efektywności fotosyntezy (w przypadku organizmów autotroficznych) oraz – dla organizmów kolejnych pięter troficznych – gradienty ilości pokarmu i łatwości jego pobierania, a także gradienty zagrożenie ze strony organizmów z kolejnego poziomu troficznego. O ile większość gradientów chemicznych i fizycznych ma charakter w miarę trwały, to w rytmie dobowym zmienia się dostępność światła na poszczególnych głębokościach, co pociąga za sobą zmiany rozmieszczenia organizmów, u których warunkuje ono efektywne polowanie, lub zwiększa zagrożenie ze strony drapieżnika. Zarówno dobowe migracje w pelagialu jezior, jak i charakterystyczna dla pory dnia głębokość przebywania organizmów są od stu kilkudziesięciu lat obiektem ważnych z punktu widzenia poznania mechanizmów ewolucji, licznych badań (Ringelberg 2010).

Wiedza o tym, że zwierzęta planktonowe, takie jak wioślarki z rodzaju *Daphnia* migrują pionowo w rytmie dobowym, ugruntowana była już pod koniec XIX wieku (Marsh 1900). O ile zdawano sobie sprawę, że amplituda ich migracji zależy od temperatury i dostępności światła, to brak było konsensusu, co do czynników ultymatywnych, które spowodowały ewolucję takich zachowań. Przez kilkadziesiąt lat XX wieku testowano wiele hipotez z tym związanych. Jednak dopiero w latach 80-tych dowiedziono ostatecznie, że czynnikiem ultymatywnym dobowych migracji w zespole zooplanktonu jest na ogół drapieżnictwo (Ivasev 1982, Lampert 1989, Dodson 1990). Zwierzęta planktonowe przemieszczają się w dzień w głębsze warstwy wody uciekając przed zagrożeniem ze strony posługujących się wzrokiem ryb. Pytaniem otwartym pozostało, co jest podstawowym powodem odwodzącym zwierzęta od permanentnego przebywania w głębokich, bezpiecznych warstwach wody. Odpowiedź na to pytanie pojawiła się w pracach duetu autorów Dawidowicz i Loose (Dawidowicz i Loose 1992, Loose i Dawidowicz 1994). Głównym kosztem stowarzyszonym z przebywaniem *Daphnia* w głębokich warstwach pelagialu było spowodowane niską temperaturą ograniczenie ich tempa wzrostu, a co za tym idzie, tempa reprodukcji. Temperatura może pełnić więc w przypadku migracji zwierząt planktonowych funkcje zarówno regulacyjną, determinując amplitudę przemieszczania się, jak i funkcję ultymatywną, istotną z punktu widzenia ewolucji tego mechanizmu.

Istotnym elementem towarzyszącym przemieszczaniu się zwierząt w ostrych gradientach termicznych, oprócz doświadczania skrajnych dla tych gradientów temperatur, jest także ekspozycja na szybkie zmiany temperatury. Może wiązać się to z szokiem

termicznym i stanowić istotny, niebrany wcześniej pod uwagę koszt migracji. Z tematem tym próbowali zmierzyć się Orcutt i Porter (1983, 1984) i Reichwaldt ze współpracownikami (2005), jednak ich badania obciążone były metodologicznymi niedociągnięciami i dały niejednoznaczne wyniki. Istniała więc konieczność ostatecznego **zweryfikowania hipotezy, iż *Daphnia* pokonując gradient termiczny podczas migracji mogą doświadczać szoku termicznego, który stanowić może realny koszt tych migracji**. Był to punkt wyjścia do rozpoczęcia badań.

A) Nowe wskaźniki szoku termicznego u *Daphnia*

PROBLEM BADAWCZY. Zazwyczaj miarą kosztów ponoszonych przez zwierzęta w związku z ekspozycją na niekorzystne warunki jest spadek osobniczego tempa wzrostu (G_j). W przypadku *Daphnia* niepoddanych ryzyku zwiększonej śmiertelności, parametr ten jest traktowany, jako bezpośredni wskaźnik dostosowania (Lampert i Trubetskova 1996). Towarzyszące szokowi termicznemu zmiany tempa wzrostu opisują jeden z istotnych, ale nie bezpośrednich oznak tego szoku. W żadnej z prac na temat kosztów towarzyszących szokowi termicznemu u *Daphnia* nie uwzględniono żadnego bardziej bezpośredniego wskaźnika stresu. Naturalnym wyborem wydawały się białka szoku cieplnego (HSP - *Heat shock proteins*). Zostały one wykryte jeszcze w latach 60-tych XX wieku u *Drosophila* właśnie w reakcji na stres termiczny (Ritossa 1962). Potem wykazano ich udział w reakcji organizmów na wiele innych rodzajów stresu zarówno biotycznego, jak i abiotycznego stąd potocznie nazywa się je białkami stresowymi. Uniwersalność HSP polega nie tylko na mnogości czynników inicjujących ich ekspresję, ale także na ogromnej konserwatywności kodujących je sekwencji i ich podobieństwie u organizmów z całego drzewa życia (przegląd np. Chen i in 2018). Pierwsza dekada XXI wieku przyniosła serię prac udowadniających zaangażowanie białek stresowych w reakcję *Daphnia* na stres biotyczny (Pijanowska i Kloc 2003, Pauwels i in. 2005 i 2007). Nadal jednak nie było dowodu na ekspresję białek stresowych u *Daphnia* w reakcji na szok termiczny. Dodatkowo, pomimo rosnącego zainteresowania ekologów planktonu tymi białkami, brak było informacji o tym, co w konkretnych publikacjach autorzy oznaczają jako białka z określonych rodzin HSP (obejmuje białka o podobnej wielkości; różne przeciwciała dedykowane rodzinom ujawniają kilka różnych białek). Pierwszym celem badań było więc dopracowanie metody (w tym wytypowanie skutecznych przeciwciał) wykrywania i

skatalogowanie białek stresowych u *Daphnia* oraz przetestowanie hipotezy, że ich koncentracja wzrasta pod wpływem szoku termicznego.

BADANIA: Spośród przeciwciał dostępnych na rynku wytypowaliśmy cztery sprawdzające się dobrze w analizie białek stresowych u *Daphnia*: dwa wykrywające HSP60, jedno - HSP70 i jedno - HSP90. Okazało się, że dwa przeciwciała anti-HSP60 wykrywały cztery całkiem różne białka, w tym jedno różniące się jedynie o 2 kDa od białka ludzkiego. Przeciwciało dla HSP70 wykrywało trzy różne białka (jedno o wielkości białka ludzkiego, dwa inne większe o odpowiednio 1 i 6 kDa. Przeciwciało dla HSP90 wykryło jedynie jeden produkt o 4 kDa mniejszy od referencyjnego białka ludzkiego. Koncentracja siedmiu spośród ośmiu białek wzrastała w reakcji na szybką zmianę temperatury z 20°C na 30°C, co potwierdziło stawianą hipotezę.

Opisane powyżej badania znalazły się w pracy:

- Mikulski A., Grzesiuk, M., Kloc, M., Pijanowska J. 2009 - Heat shock proteins in *Daphnia* detected using commercial antibodies: description and responsiveness to thermal stress – Chemoecology 19: 69-72.

B) Szok termiczny, jako koszt migracji *Daphnia*

PROBLEM BADAWCZY: Następnym krokiem było zweryfikowania hipotezy, że *Daphnia* pokonując gradient termiczny podczas migracji doświadczają szoku termicznego i stanowi to realny koszt ich migracji.

BADANIA: Ekspozowaliśmy *Daphnia* od urodzenia do osiągnięcia dojrzałości na (1) stałą temperaturę 12°C lub (2) stałą temperaturę 24°C lub (3) temperaturę zmienianą wolno (w 30 minut) 2 razy dziennie w rytmie i amplitudzie symulującej letnie migracje (z 12°C na 24°C i z 24°C na 12°C) lub (4) temperaturę zmienianą w tym samym rytmie i amplitudzie, ale szybko (w 10 sekund). Mierzyliśmy osobnicze tempo wzrostu i koncentracje białek z rodziny HSP70 zwierząt eksperymentalnych. Mierzone parametry w wariantach symulujących migrację odnosiliśmy do wartości referencyjnych obliczonych z modelu na podstawie pomiarów u zwierząt ekspozowanych na stałą temperaturę. Wartości te odpowiadały wartościom oczekiwanym dla zwierząt przebywających w średniej temperaturze doświadczanej przez

osobniki „migrujące”. Przebadaliśmy pięć klonów pochodzących ze zbiorników o różnej wielkości.

Klony różniły się zasadniczo reakcją na zmianę temperatury. Te pochodzące z małych, astatycznych zbiorników nie reagowały na zmiany temperatury ani zmianą tempa wzrostu, ani zmianą koncentracji HSP70. W dwóch klonach w zaobserwowaliśmy istotne obniżenie tempa wzrostu spowodowane zmianą temperatury, w dwóch - osobniki eksponowane na szybką zmianę temperatury rosły istotnie wolniej niż te konfrontujące się z jej powolną zmianą. Potwierdziło to stawiane hipotezy jedynie w odniesieniu do części klonów. Sugeruje to, iż nie wszystkie genotypy reagują szokiem termicznym na zmianę temperatury towarzyszącej migracjom, ale u niektórych taka reakcja może wystąpić. U części klonów koszty szoku cieplnego mogą zostać ograniczone poprzez spowolnienie migracji.

Opisane powyżej badania znalazły się w pracy:

- Mikulski A., Grzesiuk, M., Rakowska, A. Bernatowicz, P., Pijanowska, J. 2017 – Thermal shock in *Daphnia*: cost of diel vertical migrations or inhabiting thermally-unstable waterbodies? – Fund. Appl. Limnol. 190: 213-220.

C) Międzyplciowe różnice w wyborze siedliska u *Daphnia*

PROBLEM BADAWCZY: Niezależnie od prac związanych z badaniem szoku termicznego spojrzeliśmy na problem kosztów migracji od nieco innej strony. Punktem wyjścia był prezentowany już schemat kompromisowego rozwiązania, polegającego z jednej strony na maksymalizacji tempa wzrostu i reprodukcji, z drugiej - skutecznej ochrony przed presją drapieżnika. Zależna od kontekstu przewaga jednej lub drugiej potrzeby determinuje decyzję o głębokości, na jakiej osobnik przebywa, zatem każda zmiana jego priorytetów (przeżycie versus reprodukcja) powinna spowodować korektę w wyborze siedliska. Przyglądając się strategiom życiowym *Daphnia*, łatwo zauważyć, że płeć może istotnie wpływać na istotność potrzeby zapewnienia sobie bezpieczeństwa i tempa asymilacji zasobów. O ile sukces samic ściśle wiąże się z maksymalizacją tempa asymilacji, wzrostu i reprodukcji, co wymusza na nich przebywanie w wysokiej temperaturze, o tyle dostosowanie dorosłych samców nie zależy od tempa wzrostu i gromadzenia zasobów, a jedynie od liczby napotkanych w środowisku receptywnych samic, które pojawiają się kilka razy w sezonie. Sprzyja temu

długie życie, a to wymaga przede wszystkim unikania zagrożeń. Naturalnym wydaje się więc postawienie hipotezy, że samce przebywać będą w epilimnionie głębiej niż samice, w miejscu bezpieczniejszym choć spowolniającym tempo wzrostu (dorosłe samce mogą być i w rzeczywistości są znacznie mniejsze od samic). Jeżeli by tak rzeczywiście było, to przebywające stale w niskiej temperaturze samce byłyby w mniejszym stopniu niż samice narażone na wahania temperatury, więc nie potrzebowałyby utrzymywanie rozbudowanych (zapewne również kosztownych) mechanizmów, umożliwiających im radzenie sobie z szokiem termicznym. Pozwala to na postawienie hipotezy, że u samców koncentracja białek szoku cieplnego będzie istotnie niższa niż u samic.

BADANIA: Przeprowadziliśmy eksperyment, w którym samce i samice *Daphnia* eksponowaliśmy na różne kombinacje biotycznych i abiotycznych czynników stresowych (kairomon ryby planktonożerne, sinice i dwa kongenery polichlorowanych bifenyli PCB). Badaliśmy głębokość, na jakiej przebywają zwierzęta. Wyniki potwierdziły pierwszą z hipotez. Samce stale przebywały na podobnej, znacznej głębokości bez względu na warunki, samice zaś zmieniały głębokość przebywania w zależności od czynników występujących w środowisku. Nigdy nie były obserwowane głębiej niż samce, w kilku przypadkach przebywały istotnie płycej (w wyższej temperaturze).

W drugim eksperymencie badaliśmy koncentracje sześciu białek stresowych u samców i samic *Daphnia* eksponowanych na stres termiczny. Zgodnie z hipotezą, ilość wszystkich badanych białek, poza jednym, u samców była znacząco niższa niż u samic (często HSP występowały u nich w śladowych koncentracjach), a w przypadku białka 79 kDa, a więc tego, którego koncentracja u samic nie zmieniała się w odpowiedzi na stres termiczny (patrz wyżej: Mikulski i in., 2009) była znacząco wyższa niż u samic. Sugeruje to, iż pełni ono u *Daphnia* inną funkcję niż wspieranie organizmu podczas szoku termicznego. Wątek ten niewątpliwie wart jest dalszego zbadania.

Opisane powyżej badania znalazły się w pracy:

Mikulski A., Bernatowicz, P., Grzesiuk, M., Kloc, M., Pijanowska, J. 2011 – Differential levels of stress proteins (hsps) in male and female *Daphnia magna* in response to thermal stress: A consequence of sex related behavioral differences? – J. Chem. Ecol. 37: 670-676.

D) wybór siedliska (temperatury), jako sposób na adaptatywną regulację długości życia.

PROBLEM BADAWCZY: Tak jak już wyżej wspomniałem, jedną z możliwych strategii samców *Daphnia* jest trwanie w czasie i próba wykorzystania do przekazania własnych genów kilku okresów pojawiania się receptywnych samic. Być może więc zyskiem z przebywania w głębszych warstwach wody, poza zapewnieniem sobie bezpieczeństwa, jest dla samców wykorzystanie niskiej temperatury do obniżenia tempa metabolizmu i wydłużenia życia (por. np. Keil i in. 2015). Bardzo trudno udowodnić, że działanie doboru promującego wykorzystanie przez samce termicznej heterogenności środowiska do regulacji długości życia mogło istotnie odegrać rolę w utrwaleniu wyboru przez nie siedliska (wyboru niższej temperatury). Jeżeli tak rzeczywiście było i samce wykorzystują możliwość wyboru temperatury do regulacji długości swojego życia, **można by się spodziewać, iż obniżenie temperatury, w jakiej przebywają samce spowoduje większe wydłużenie ich życia, niż ma to miejsce u samic.**

BADANIA: Podczas eksperymentów laboratoryjnych obserwowaliśmy długość życia samców i samic *Daphnia* eksponowanych na 16°C i 20°C, a więc średnie temperatury doświadczane przez samce i samice w eksperymencie opisanym we wspomnianej powyżej pracy (Mikulski i in. 2011). Przetestowaliśmy zwierzęta pochodzące z trzech klonów.

Okazało się, że w przypadku jednego z klonów udało się potwierdzić postawioną wcześniej hipotezę: wykazaliśmy istotną interakcję pomiędzy efektem temperatury i płci. Długość życia samców ulegała wyraźnemu wydłużeniu w reakcji na spadek temperatury. U samic taka reakcja nie była obserwowana. W kolejnym z klonów istotne okazały się efekty płci i temperatury. Samce i samice jednakowo reagowały na temperaturę wydłużeniem życia wraz z jej spadkiem, natomiast samce żyły wyraźnie krócej niż samice, bez względu na temperaturę. W ostatnim analizowanym klonie istotny okazał się jedynie efekt płci. Samce bez względu na temperaturę żyły dłużej niż samice. Otrzymane wyniki, choć niejednoznaczne, uwiarygodniły hipotezę o działaniu doboru w kwestii wykorzystania przez samce wyboru temperatury do regulacji długości życia, choć cechy stanowiące konsekwencje tego nie są udziałem wszystkich genotypów. Wyniki wskazują na dywergencję możliwych strategii życiowych samców *Daphnia* – ukierunkowanie ich na długowieczność, a więc próbę wykorzystania kilku okresów pojawiania się receptywnych samic, bądź krótkie życie, odpowiadające jednemu okresowi, w którym możliwa jest kopulacja. Oznaki takiego

zróznicowania strategii pojawiły się w wynikach naszych prac terenowych prowadzonych w zbiornikach miejskich (manuskrypt jest poprawiany po recenzjach).

Opisane powyżej badania znalazły się w pracy:

Pietrzak B, Grzesiuk M., Dorosz J., Mikulski A. 2018 - When males outlive females: Sex-specific effects of temperature on lifespan in a cyclic parthenogen – *Ecol. Evol* 8: 9880-9888.

Jestem jej ostatnim i korespondującym autorem.

PODSUMOWUJĄC, w wyniku badań składających się na „osiągnięcie”:

- Dopracowaliśmy metodę (w tym wytypowaliśmy skuteczne przeciwciała) analizy koncentracji białek szoku cieplnego (HSP) u *Daphnia*.

W efekcie powstała praca metodyczna, która pomaga innym badaczom rozpocząć pracę z wykorzystaniem białek stresowych na popularnym i użytecznym organizmie modelowym, jakim jest Daphnia.

- Skatalogowaliśmy białka stresowe ujawnione u *Daphnia* przez dostępne przeciwciała.

*Ułatwia to analizę wyników innym badaczom, dając możliwość łatwego definiowania, jakiego białka analiza taka dotyczy. Podanie wielkości białek stresowych wykrywanych u *Daphnia* i reakcji każdego z nich na stres termiczny ułatwia molekularne badania dotyczące zaangażowania HSP w procesy zachodzące u tego organizmu.*

- Wykazaliśmy zwiększenie koncentracji 7 białek stresowych w reakcji na szok termiczny u *Daphnia*.

*Poprzez udowodnienie modyfikacji koncentracji HSP wywołanej temperaturą, potwierdziliśmy uniwersalność HSP, jako molekularnego wskaźnika stresu u *Daphnia*. Nie bez znaczenia jest fakt, iż badania nasze wykazały modyfikację HSP w reakcji na szok termiczny u organizmów z kolejnej grupy, co ma znaczenia dla badań nad ewolucją tych białek.*

- Wykazaliśmy międzyklonalne różnice w osobniczym tempie wzrostu i koncentracji HSP u *Daphnia* w reakcji na zmiany temperatury odpowiadające tym doświadczanym przez migrujące w pelagialu zwierzęta.

Pokazaliśmy dzięki temu, że spodziewane różnice w reakcjach Daphnia na zmiany temperatury, a więc międzyklonalne różnice w radzeniu sobie w heterogennym środowisku sięgają poziomu molekularnego. Wykazaliśmy ponadto, iż na silne wahania temperatury odporniejsze są zwierzęta zasiedlające płytkie zbiorniki astatyczne, a nie te żyjące w jeziorach, w których migracje pionowe są możliwe. Rzuca to nowe światło na nasze postrzeganie dominujących sił doboru naturalnego działające na zwierzęta w różnych typach ekosystemów wodnych.

- Wykazaliśmy, iż *Daphnia* z niektórych klonów mogą ponosić koszty migracji pionowych wynikające z szoku termicznego i że koszty te mogą ulec zmniejszeniu przez zmniejszenie tempa pokonywania gradientów temperatury.

Nasze wyniki umożliwiają korektę modeli optymalizujących wzór migracji pionowych zwierząt planktonowych ukazując ich nieuwzględniane dotychczas możliwe koszty. Wyniki stawiają też w nowym świetle obserwowane zwalnianie tempa migracji u zwierząt docierających do warstwy skoku termicznego, nadając nowy kierunek przyszłym badaniom.

- Wykazaliśmy, że w wyniku międzypłciowych różnic w strategii życiowej, samce *Daphnia* przebywają głębiej (w chłodniejszej wodzie) niż samice.

Bardziej precyzyjne określenie czynników determinujących rozmieszczenie Daphnia w toni wodnej (a więc miejsc ich odżywiania się) ma też kluczowe znaczenie z uwagi na ogromny wpływ tych organizmów na przepływ materii i energii od producentów pierwotnych ku wyższym poziomom troficznym i co za tym idzie, na występowanie zakwitów fitoplanktonu. Ponadto, poprzez pokazanie różnicy w wyborze siedliska przez samce i samice Daphnia spowodowanej różnymi strategiami życiowymi wskazaliśmy na ciekawy przykład działania doboru naturalnego.

- Wykazaliśmy, że różnice między płciami w sposobie wyboru siedliska przekładają się na różną u samców i samic koncentrację białek stresowych i inną zmianę ich koncentracji w reakcji na stres termiczny.

Nasze wyniki zwracają uwagę na konieczność określania płci Daphnia w badaniach z wykorzystaniem HSP. Dają też podstawę do rozpoczęcia ciekawych badań dotyczących

mechanizmów molekularnej odpowiedzi na stres termiczny u samców i samic i zaangażowania w ten proces HSP.

- Wykazaliśmy różnorodność strategii życiowych samców *Daphnia* – wyniki sugerują istnienie samców krótko- i długowiecznych.

*Sugestia istnienia dywergencji w strategiach życiowych samców *Daphnia*, potwierdzona wynikami badań terenowych, wzbogaca naszą wiedzę i otwiera nowe przestrzenie badań związanych z ewolucją cyklicznej partenogenezy.*

- Uzyskaliśmy wyniki uprawdopodobniające hipotezę, że samce mogą wykorzystywać wybór chłodniejszego siedliska do wydłużania czasu trwania życia.

*O ile sytuacje, w których zamieszkiwanie chłodnych siedlisk może skutkować długowiecznością *Daphnia* są znane od dawna (MacArthur i Baillie 1929), o tyle możliwość adaptatywnej modyfikacji długości życia tych zwierząt poprzez aktywny wybór siedliska jest całkiem nowym pomysłem i poza istotnym znaczeniem dla zrozumienia czynników regulujących plastyczne elementy fenotypu, może stanowić inspirację do otwarcie nowych obszarów badań.*

Ogólnie rzecz ujmując, badania pokazały zarówno koszty jak i możliwości związane z życiem organizmów w heterogennym termicznie środowisku.

Niedyskutowanym, choć istotnym czynnikiem czyniącym prezentowane badania istotnymi, jest postępujące ocieplenie klimatu. Do niedawna letnia temperatura epilimnionu dużych polskich jezior oscylowała wokół 19-24°C (Skowron 2015). Obecnie coraz częściej okresowo sięga 30°C (dane własne). Oznacza to zarówno niebezpieczne zbliżenie się występujących w środowisku temperatur do granic tolerancji ekologicznej organizmów planktonowych zasiedlających polskie jeziora, jak i prawie dwukrotne zwiększenie gradientów temperatury pomiędzy hypolimnionem i epilimnionem, co wiąże się ze zwiększeniem prawdopodobieństwa wystąpienia szoku termicznego u migrujących organizmów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

A) Moja naukowa „kariera” rozpoczęła się oficjalnie w 1994 roku na Zjeździe Hydrobiologów Polskich we Wrocławiu, gdzie jako magistrant Zakładu Hydrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego zaprezentowałem plakat próbujący udowodnić, iż wyniki otrzymywane

podczas połowu zooplanktonu siatką planktonową mogą być obarczone błędem całkowicie zmieniającym ich wymowę. Następne lata poświęciłem pracy pod kierunkiem Prof. Joanny Pijanowskiej we współpracy z jej licznymi dyplomantami i oddałem się wnikliwej analizie wpływu różnych czynników środowiskowych (doświadczanych przez osobniki lub ich matki) na morfologię, historię życia i zachowanie *Daphnia*. Część prac została sfinansowana z grantu KBN "Zmiany w historiach życia wioślarek planktonowych wywołane obecnością drapieżców i ich konsekwencje w kolejnych pokoleniach osobników potomnych", kierowanego przez Prof. Joannę Pijanowską. Byłem w nim zatrudniony, jako główny wykonawca, a wcześniej uczestniczyłem aktywnie w jego pisaniu. Część wyników znalazła się w mojej pracy magisterskiej (1996) i doktorskiej (2002). Ten wątek badań jest po części kontynuowany przeze mnie do dzisiaj i przyniósł kilka prac oryginalnych:

– pracę, w której staram się podważyć uniwersalność tezy, iż *Daphnia* w reakcji na zagrożenie ze strony drapieżnika posługującego się wzrokiem powinny zawsze dojrzewać przy mniejszych rozmiarach ciała niż te nieeksponowane na ten czynnik:

- Mikulski A. 2000 – Does *Daphnia* really minimize its size at first reproduction in the presence of fish? – Verh. Internat. Verein. Limnol. 27: 2888-2891.

- pracę, w której udowadniam istnienie nieznanego dotychczas, adaptatywnego anty-drapieżniczego mechanizmu u *Daphnia*, polegającego na skróceniu czasu niebezpiecznej dla niej aktywności, jaką jest uwalnianie potomstwa z komory lęgowej:

- Mikulski A. 2001 – The presence of fish induces the quick release of offspring by *Daphnia* – Hydrobiologia 442: 195-198.

- trzy prace, w których pokazujemy ontogenetyczne zróżnicowanie wrażliwości *Daphnia* na sygnały chemiczne informujące je o obecności drapieżnika, czas, jaki potrzebny jest od momentu odbioru sygnału (przez osobnika lub jego matkę) do adaptatywnej odpowiedzi organizmu i czas, jaki musi upłynąć od wygaszenia sygnału o zagrożeniu do cofnięcia kosztownych, służących ochronie przed drapieżnikiem zmian fenotypu. Poza wartością poznawczą wspierającą wydatnie naszą wiedzę o indukcji mechanizmów obronnych, prace te miały też aspekt praktyczny, ułatwiają planowanie i upraszczając eksperymenty polegające na indukcji takich mechanizmów:

- Mikulski A., Lipowska D., Pijanowska J. 2004 – Ontogenetic changes in *Daphnia* responsiveness to fish kairomone – Hydrobiologia 526: 219-224.

- **Mikulski A.**, Czernik M., Pijanowska J. 2005 – Induction time and reversibility of changes in *Daphnia* life history caused by the presence of fish – J. Plankt. Res. 27: 757-762.
- **Mikulski A.**, Pijanowska J. 2010 – When and how can *Daphnia* prepare their offspring for the threat of predation? Hydrobiologia 643: 21-26.

- pracę, w której analizując modyfikacje wielu cech fenotypowych *Daphnia* próbujemy wesprzeć hipotezę, że wpływ matki na fenotyp potomstwa jest silny w sytuacji, gdy działają mechanizmy, które wymagają długiego czasu od momentu zainicjowania zmian fenotypu do momentu, kiedy zmiany te staną się adaptatywne. Niezaprzeczalną wartością tej pracy jest też zwrócenie uwagi na to, że większość cech fenotypowych osobnika jest pod znaczącym wpływem warunków, w jakich żyła jego matka. Większość obserwowanych zależności pomiędzy środowiskiem życia matki i fenotypem jej potomstwa wiąże się ze zwiększeniem jego dostosowania – obserwowany efekt matczyny jest adaptacyjny:

- **Mikulski A.**, Pijanowska, J. 2017 – The contribution of individual and maternal experience in shaping *Daphnia* life history – Hydrobiologia 788: 55-63.

- pracę, w której pokazujemy jako pierwszy zaangażowanie efektu matczynego w kluczowe dla dostosowania przestawienie się samic *Daphnia* z rozrodu partenogenetycznego na rozród płciowy:

- **Mikulski A.**, Pijanowska J. 2009 – Maternal experience can enhance production of resting eggs in *Daphnia* exposed to the risk of fish predation – Fund. Appl. Limnol. 174: 301-305.

Z okresu tego pozostał uporządkowany materiał na kolejne 3 publikacje. Jedna jest w trakcie przygotowywania.

Ten etap mojej pracy przyniósł również trzy prace koncepcyjno-przeglądowe:

- **Mikulski A.** 1999 – Efekt matczyny u zwierząt wodnych: odpowiedź na wyzwania środowiska – Kosmos 48: 485-490.
- **Mikulski A.** 2000 – Chemical cues from predators can induce anti-predator defense in freshwater algae and invertebrates – Biological Bulletin of Poznań 1:37.
- **Mikulski A.** 2003 – Ekologiczne znaczenie efektu matczynego – Wiad. Ekol. 49: 97-113

B) Kolejny etap mojej pracy realizowany był w ramach stypendium Max Planck Society w Ploen pod kierunkiem Prof. Winfrieda Lamperta. Zajmowałem się w tym okresie indukowanymi adaptacjami *Daphnia* do życia w środowisku ubogim w pokarm i wpływem

doświadczeń z początkowej fazy ontogenezy na decyzje podejmowane w późniejszym życiu.

Do tej pory powstała jedna praca:

- Mikulski A. 2006 – Can crowding stimulate *Daphnia* to produce neonates more resistant to starvation? – Verh. Internat. Verein. Limnol. 29: 1119-1121.

Kolejny manuskrypt jest od dłuższego czasu udoskonalany. Do części opracowanego materiału dorobiłem część molekularną i zamierzam manuskrypt ten niebawem wystać do redakcji.

C) Po powrocie ze stypendium podoktorskiego uzyskałem grant KBN na badania „Tolerancja na zasolenie - model *Daphnia*”. W jego wyniku przeprowadziłem szeroką analizę wpływu zasolenia na cechy fenotypu *Daphnia* włączając w to zagadnienie efektu matczynego, a także analizę skażenia zbiorników w Warszawie chlorkami.

Dotychczas ukazała się jedynie praca, która stanowi przegląd wzbogacony o wyniki własne:

- Grzesiuk, M., Mikulski A. 2006 – The effect of salinity on freshwater crustaceans – Pol. J. Ecol. 54: 669-674.

Kolejna praca dotycząca wpływu ekspozycji matki na zasolenie na tolerancję na zasolenie jej potomstwa jest poprawiana po recenzjach. Praca dotycząca wpływu zasolenia na historię życia i koncentrację białek stresowych u *Daphnia* jest w fazie kolejnej tury poprawek.

D) Równolegle z realizacją własnego projektu uczestniczyłem, jako główny wykonawca, w realizacji grantów KBN Prof. Joanny Pijanowskiej „Rola białek stresowych i metylacji DNA w ekspresji plastyczności fenotypowej - model *Daphnia*”, a następnie „Ewolucja płci - model *Daphnia*”. Brałem wcześniej aktywny udział w pisaniu obu tych projektów. W wyniku badań prowadzonych w ich ramach, powstały prace, które składają się na „osiągnięcie”.

Pod koniec realizacji grantu dotyczącego ewolucji płci otrzymałem finansowanie grantu KBN „Plankton drobnych zbiorników miejskich – studium dyspersji w czasie i przestrzeni”. Główna publikacja z tego projektu jest aktualnie poprawiana po recenzjach. Zgodnie z sugestiami recenzentów wydzieliśmy z pierwotnego, bardzo obszernego manuskryptu, materiał mogący posłużyć do napisania kolejnych dwóch prac. Po opublikowaniu pierwotnej pracy zamierzamy się tym zająć.

E) W 2013 roku przejąłem wydziałową dydaktykę dotyczącą ochrony i rekultywacji środowisk wodnych, co pociągnęło za sobą konieczność dogłębnego przestudiowania problemów z tym

związanych i zatrzymało prawie całkowicie na kilka lat moje badania z dziedziny ekologii ewolucyjnej. W efekcie działań związanych z nowym nurtem zainteresowań uczestniczyłem w realizacji lub kierowałem kilkoma projektami dotyczącymi funkcjonowania zaburzonych ekosystemów jeziornych, zlecanymi przez jednostki samorządu terytorialnego lub firmy. W ich wyniku powstało kilka ekspertyz, z których każda stanowi efekt całorocznych badań po części wspartych eksperymentami laboratoryjnymi:

- Górski D, **Mikulski A.**, Bańkowska A. 2012 - Wnioski i wytyczne do opracowania przyrodniczego na podstawie wyników rejestracji elektronicznych zapisów pomiarów deszczy i poziomu zwierciadła wody w Jeziorku z okresu lat hydrologicznych 2011 i 2012 (01.XI.2010 ÷ 31.X.2012) – zleceniodawca: Miasto Stołeczne Warszawa – Urząd Dzielnicy Warszawa-Mokotów.
- Bańkowska A., Gruchała P., **Mikulski A.**, Pełechata A., Wasilewicz M. 2016 – Analizy w ramach projektu powstrzymania degradacji zbiornika Jeziorko Czerniakowskie – zleceniodawca: PGNIG Termika S.A.
- Wasilewicz M., Koperski P., **Mikulski A.**, Oglęcki P., Sikorska D., Sikorski P. 2016 – Analiza aktualnego składu fauny oraz roślinności wodnej i nabrzeżnej zbiornika Jeziorko Czerniakowskie – zleceniodawca: Urząd Dzielnicy Warszawa-Mokotów.
- **Mikulski A.**, Pełechata A., Parysek M. 2017 – Opracowanie struktury ilościowej i jakościowej fitoplanktonu i zooplanktonu oraz określenie produkcji pierwotnej fitoplanktonu Jeziora Zdwojskiego – zleceniodawca: Wojewódzki Zarząd Melioracji i Urządzeń Wodnych w Warszawie, Oddział w Płocku.

Zgodnie z umową ze zleceniodawcami uzyskany w ich efekcie bardzo bogaty i ciekawy materiał może zostać opublikowany.

Plonem tych badań są też wystąpienia konferencyjne, a także publikacje:

- Pełechata A., Bańkowska A., **Mikulski A.**, Wasilewicz M. 2017 – Composition and dynamics of cyanobacteria assemblage in a shallow lake under anthropogenic and climatic pressure. In: Pawlik-Skowrońska B., Pęczuła W. (eds.) Mass development of algae: biodiversity, ecology and management prospects – Proceedings of the 36th International Conference of the Polish Phycological Society, Lublin-Kazimierz Dolny, 24-27 May 2017: 66.
- **Mikulski A.**, Bańkowska-Sobczak, A., Pełechata, A., Wasilewicz, M., Górski, D. 2017 – Dylematy ochrony i rekultywacji jezior miejskich: przykład Jeziorka Czerniakowskiego w Warszawie – W: Wiśniewski R. (red.) Ochrona i Rekultywacja Jezior, PZiITS Toruń, 2017: 55-71.

W opinii współautorów, materiał pozwala na opublikowanie kilku prac w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports.

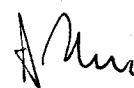
Moja działalność związana z ochroną i rekultywacją środowisk wodnych wiąże się też ze znaczną intensyfikacją działalności około-naukowej (ekspertyzy, wykłady o charakterze eksperckim) oraz popularyzatorskiej (artykuły i wykłady popularne, wykłady na konferencjach organizowanych przez organizacje pożytku publicznego, etc.).

F) Aktualnie współpracuję przy realizacji projektu dr Barbary Pietrzak „Mechanizmy kształtowania się indywidualności behawioralnej zwierząt”, razem z doktorantką zajmuję się wpływem sygnałów chemicznych informujących o różnych zagrożeniach na zachowanie larw ważek, a także przymierzam się do napisania projektu na najbliższy konkurs NCN.

LITERATURA

- Chen B., Feder M.E., Kang L. 2018 – Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress – *Mol. Ecol.* 27: 3040-3054.
- Darwin C.R. 1839 – Narrative of the surveying voyages of His Majesty's Ships Adventure and Beagle between the years 1826 and 1836, describing their examination of the southern shores of South America, and the Beagle's circumnavigation of the globe. Journal and remarks. 1832-1836 – London: Henry Colburn (p.p. 257-258).
- Dawidowicz P. & Loose C. 1992 – Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia* – *Limnol. Oceanogr.* 37: 1589-1595.
- Dodson S. 1990 – Predicting diel vertical migration of zooplankton – *Limnol. Oceanogr.* 35: 1195-1200.
- Grinnell J. 1917 – The Niche-Relationships of the California Thrasher – *The Auk* 34: 427-433.
Hutchinson, G.E. (1957) Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22, 415-427
- Iwasa Y. 1982 – Vertical migration of zooplankton: a game between predator and prey. *Am. Nat.* 120: 171-180.
- Lampert W. 1989 – The adaptive significance of diel vertical migration of zooplankton – *Funct. Ecol.* 3: 21-27.
- Lampert W. & Trubetskova I. 1996 – Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia* – *Funct. Ecol.* 10: 631-635.

- Loose C. & Dawidowicz P. 1994 – Trade-Offs in Diel Vertical Migration by Zooplankton: The Costs of Predator Avoidance – Ecology 75: 2255-2263.
- MacArthur J.W. & Baillie W.H. 1929 – Metabolic activity and duration of life. I. Influence of temperature on longevity in *Daphnia magna*. J. Exp. Zool. 53: 221-242.
- Marsh, C.D. 1900 – The plankton of fresh water lakes – Science 11: 374–389.
- Orcutt J.D. & Porter K.G. 1983 – Diel vertical migration by zooplankton: constant and fluctuating temperature effects on life history parameters of *Daphnia* – Limnol. Oceanogr. 28: 720-730.
- Orcutt J.D. & Porter K.G. 1984 – The synergistic effects of temperature and food concentration on life history parameters in *Daphnia* – Oecologia 63: 300-306.
- Pijanowska J. & Kloc M. 2004 – *Daphnia* response to predation threat involves heat-shock proteins and acid and tubulin cytoskeleton – Genesis 38: 81-86.
- Reichwaldt E.S., Wolf I.D., Stibor H. 2005 – Effects of a fluctuating temperature regime experienced by *Daphnia* during diel vertical migration on *Daphnia* life history parameters – Hydrobiologia 543: 199-205.
- Ringelberg J. 2010 – Diel Vertical Migration of Zooplankton in Lakes and Oceans. Springer, Netherlands.
- Ritossa F. 1962 – A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* – Experientia 18: 571-573.
- Skowron R. 2015 – Extreme thermal phenomena of surface water in the lakes of Northern Poland – Limnol. Rev. 9: 97-109.
- Pauwels K., Stoks R., De Meester L. 2005 – Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna* – J. Evol. Biol. 18: 867-872.
- Pauwels K., Stoks R., Decaestecker E, De Meester L. 2007 – Evolution of heat shock protein expression in a natural population of *Daphnia magna*. Am. Nat. 170: 800-805.



Podpis