

Sopot, dn. 28.02.2022

Dr hab. Monika Kędra, prof. IOPAN
Zakład Ekologii Morza
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
Powstańców Warszawy 55
81-712 Sopot

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kołbuk
„The effect of geochemical parameters of the environment (Mg/Ca) and diet on the
biomineralization of the echinoderm skeleton”

(w języku polskim: “Wpływ geochemicznych parametrów środowiska (Mg/Ca) oraz diety na
biomineralizację szkieletu szkarłupni”)
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Przemysława Gorzelaka

Recenzję rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kołbuk opracowano na podstawie pisma z dnia 5.01.2022 roku, przesłanego przez Dyrektora Instytutu Paleobiologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, prof. dr hab. Jarosława Stolarskiego wraz z dołączonym egzemplarzem rozprawy.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Paleobiologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem promotora dr hab. Przemysława Gorzelaka.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska bez wątpienia wpisuje się w nurt współczesnych badań ekologicznych i paleobiologicznych; ma także cenny, multidyscyplinarny charakter. Doktorantka w przedstawionej pracy skoncentrowała się na szkarłupniach oraz na wpływie parametrów geochemicznych wody morskiej oraz diety na proces biomineralizacji szkieletu. Badania dotyczące biomineralizacji szkieletów organizmów morskich są ważnym zagadnieniem w badaniach organizmów, środowiska oraz ich interakcji (zarówno współcześnie jak i w przeszłości geologicznej). Wiadomo, że obecnie zachodzące na skutek rosnącej antropopresji zmiany w morzach mają wpływ na indywidualne organizmy, a w konsekwencji na całe zbiorowiska organizmów i funkcjonowanie ekosystemów. Dlatego też badania interakcji pomiędzy organizmami a środowiskiem pozwalają lepiej zrozumieć w jaki sposób kształtują się zbiorowiska bentosowe oraz pełnione przez nie funkcje w ekosystemie. Ponadto, rozpoznanie zależności pomiędzy czynnikami zewnętrznymi a składem biochemicznym szkieletów umożliwia odzwierciedlanie warunków panujących w środowisku (w przeszłości, obecnie, ale i w przyszłości).

Wybór szkarłupni, jako grupy badanych organizmów, jest w pełni uzasadniony. Szkarłupnie są różnorodną i liczną grupą zwierząt, występującą licznie w zbiorowiskach bentosowych, a w niektórych rejonach są dominantami pod względem biomasy bentosu (np. Iken i in. 2010, Gutt i in. 2019). Występują powszechnie w morzach i oceanach i mogą stanowić ważny element sieci troficznych, a tym samym obiegu węgla i innych pierwiastków. Ponadto, stanowią ważne źródło informacji paleobiologicznych, jako że są grupą o długiej historii ewolucyjnej i dobrze zachowują się w zapisie kopalnym. Szkarłupnie to grupa

zwierząt szczególnie narażonych na zmieniające się warunki środowiskowe, w tym te, które uważane są za istotne czynniki wpływające na biomineralizację szkieletów, jak na przykład wzrost temperatury wody morskiej, zmiany zasolenia czy zmiany pH związane z postępującym zakwaszaniem oceanów. Mimo prowadzonych w ostatnich latach badań, wiele aspektów tych zależności pozostaje nieznanymi lub słabo rozpoznanych. Szczególne interesujące są zagadnienia dotyczące wpływu na biomineralizację szkieletów czynników innych niż środowiskowe, takich jak dieta czy fizjologia indywidualnych organizmów.

Podjęta w rozprawie tematyka dotycząca mechanizmów kontrolujących biomineralizację szkieletów szkarłupni jest więc w pełni uzasadniona i bez wątpienia ważna, zarówno z punktu widzenia ekologii współczesnych ekosystemów morskich, fizjologii zwierząt oraz badań paleobiologicznych, a także oceny warunków środowiskowych panujących w przeszłości czy prognozowanych na przyszłość.

Na rozprawę doktorską mgr Kołbuk składają się streszczenie (po polsku i po angielsku), wstęp, a następnie, przedstawione w postaci trzech kolejnych rozdziałów, trzy spójne tematycznie artykuły. Rozprawa kończy się podsumowaniem w formie wniosków (Conclusions) oraz Perspektywami (Future perspectives), i poza polską wersją Streszczenia w całości napisana jest po angielsku. Całość pracy liczy 115 stron i zawiera ponadto spis treści, podziękowania i oświadczenia Autorów prac. Dobrą praktyką jest umieszczenie na początku pracy informacji na temat projektów, z których sfinansowano badania – ta informacja znalazła się jedynie w poszczególnych pracach.

Publikacje składające się na rozprawę ukazały się w latach 2019-2021 i są to:

- I. Kołbuk D, Dubois P, Stolarski J, Gorzelak P, 2019, Effects of seawater chemistry (Mg^{2+}/Ca^{2+} ratio) and diet on the skeletal Mg/Ca ratio in the common sea urchin *Paracentrotus lividus*, *Marine Environmental Research* 145; 22–26, <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.02.006>
- II. Kołbuk D, Giglio SD, M'Zoudi S, Dubois P, Stolarski J, Gorzelak P, 2020, Effects of seawater Mg^{2+}/Ca^{2+} ratio and diet on the biomineralization and growth of sea urchins and the relevance of fossil echinoderms to paleoenvironmental reconstructions. *Geobiology* 18: 710– 724. <https://doi.org/10.1111/gbi.12409>
- III. Kołbuk D, Dubois P, Stolarski J, Gorzelak P, 2021, Impact of seawater Mg^{2+}/Ca^{2+} on Mg/Ca of asterozoan skeleton – Evidence from culturing and the fossil record, *Chemical Geology* 584, 120557. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2021.120557>

W/w prace zostały opublikowane w trzech międzynarodowych recenzowanych czasopismach, o wysokiej renomie, z pierwszego kwartyła, i o wysokich IF (łącznie IF: 11.553 i 380 pkt MEiN): *Marine Environmental Research* (IF: 3.131 i 100 pkt MEiN), *Geobiology* (IF: 4.407 i 140 pkt MEiN), *Chemical Geology* (IF: 4.015 i 140 pkt MEiN).

Do pracy dołączono oświadczenia Autorki i Współautorów wszystkich publikacji określające ilościowo wkład każdego z nich w powstanie artykułów. Z oświadczeń tych wynika, iż udział Doktorantki był rzędu 55 – 70 % i obejmował wszystkie etapy procesu badawczego, aczkolwiek nie we wszystkich publikacjach tak samo: tj. sformułowanie koncepcji badań (Prace II i III), wykonanie eksperymentów badawczych (Praca II i III), analizę danych i interpretacja wyników (Prace I, II i III), przygotowanie ilustracji oraz napisanie manuskryptów (Prace II i III) lub jego pierwszej wersji („early draft”, Praca I).

Doktorantka jest pierwszą Autorką w każdej publikacji, jednak nie jest Autorką korespondencyjną w żadnej z nich.

W mojej opinii udział Doktorantki w badaniach i powstaniu publikacji nie budzi zastrzeżeń, a na uwagę zasługuje, że prace są publikowane we współpracy z Université Libre de Bruxelles w Belgii.

Wszystkie Rozdziały (publikacje) stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie i metodycznie, i w logiczny oraz konsekwentny sposób przedstawiają kolejne etapy pracy, dzięki którym Doktorantka osiągnęła postawiony cel, tj. wykazała jaki wpływ na skład chemiczny szkieletu szkarłupni mają zmiany Mg^{2+}/Ca^{2+} wody morskiej i diety. Aby osiągnąć wyznaczony cel Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentów biomineralizacyjnych na współczesnych szkarłupniach, na różnych niespokrewnionych gatunkach, w różnych, odpowiednio dobranych warunkach środowiskowych, i karmionych pokarmem o różnych charakterystykach. Badaniom stosunku Mg/Ca w szkieletach szkarłupni towarzyszyły badania mające na celu ustalenie kondycji zwierząt i stopnia regeneracji szkieletu. W Streszczeniu Doktorantka w sposób przejrzysty opisała w jaki sposób planowała kolejne eksperymenty, przez co można prześledzić jej tok rozumowania oraz powody, dla których zdecydowała się na konkretne eksperymenty i rozwiązania. Obok celu Doktorantka postawiła dwa dodatkowe pytania badawcze: 1) czy woda morska jest jedynym źródłem jonów w procesie biomineralizacji szkarłupni, oraz 2) czy dobrze zachowane skamieniałości szkarłupni mogą być stosowane w sposób wiarygodny w rekonstrukcjach paleośrodowiskowych. Na te pytania Doktorantka następnie odpowiada w pracy, w kolejnych Rozdziałach. Hipotezy badawcze pojawiają się również w Rozdziale I: 1) że woda morska jest jedynym źródłem jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} na potrzeby biomineralizacji szkieletów szkarłupni, 2) że szkarłupnie mogą służyć jako wiarygodny wskaźnik (proxy) stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} wody morskiej. Te hipotezy mogłyby być w dużej mierze rozciągnięte na całość pracy i ujęte w streszczeniu czy we wstępie. Praca obejmuje także badania geochemiczne (Mg/Ca) skamieniałości jurajskich i mioceńskich jeżowców i rozgwieżdżone oraz rekonstrukcje stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} w ówczesnych morzach. W sumie, z pracy wyłania się spójny obraz wpływu środowiska (wybranych parametrów wody morskiej) oraz diety na skład mineralogiczny szkieletów, a uzyskane wyniki będą miały znaczenie dla rekonstrukcji warunków paleośrodowiskowych. Tym samym praca ma implikacje zarówno ekologiczne i oceanograficzne, jak i paleobiologiczne.

Merytorycznie nie mam zastrzeżeń do prac (Rozdziałów) wchodzących w przedstawioną do recenzji dysertację. Naukowa jakość artykułów składających się na rozprawę została już zweryfikowana na etapie recenzji w czasopiśmie, w których prace te zostały opublikowane - w rozprawie pojawiają w formie przyjętych do publikacji manuskryptów. W przedłożonej mi do oceny rozprawie nie ma też istotnych uchybień metodycznych, interpretacyjnych czy edytorskich, które zasługiwałyby na uwypuklenie. Temat prac jest bardzo interesujący, zachęcający do dalszej refleksji naukowej, stąd kilka pytań, które wymieniam poniżej wraz z uwagami do poszczególnych części rozprawy.

W Streszczeniu (wersja polska i angielska) Doktorantka w sposób spójny i zwięzły przedstawia krótki wstęp oraz informację jakie przesłanki i luki w naszej wiedzy

spowodowały podjęcie tego tematu badawczego oraz jakie przeprowadziła eksperymenty, by te luki uzupełnić. Następnie opisuje krótko każdy z przeprowadzonych eksperymentów wraz z wynikami i wnioskami. Z kolei we Wstępie (po angielsku) przedstawia najważniejsze informacje dotyczące szkarłupni, morfologii i biomineralizacji ich szkieletu, mikrostruktury stereomu, a także zastosowania szkarłupni w badaniach paleośrodowiskowych. Doktorantka przedstawia także jak warunki środowiskowe, szczególnie parametry chemiczne wody morskiej, mogą wpływać na procesy biomineralizacji szkieletu (a tym samym na związek pomiędzy chemizmem szkieletu i wody morskiej, czyli warunków w jakich te organizmy żyły). Ponadto przedstawia przegląd najnowszej literatury tematu, w którym wykazuje, że w ostatnim czasie pojawiły się badania wskazujące na to, że również inne czynniki środowiskowe mogą mieć wpływ na skład chemiczny szkieletu, podobnie jak dieta szkarłupni czy czynniki biologiczne, związane z fizjologią tych zwierząt, być może różną dla poszczególnych gatunków czy osobników. Wstęp zakończony jest spisem bogatej literatury (85 pozycji), zarówno tej najnowszej jak i starszej, co wskazuje na dobrą znajomość literatury przedmiotu – poza tymi pozycjami kolejne pozycje cytowane są w poszczególnych Rozdziałach. Z mojego punktu widzenia warto byłoby we wstępie umieścić również krótką informację o roli, jaką szkarłupnie – liczny i częsty element zbiorowisk bentosowych – pełnią w środowisku (czy istnieją jakieś przesłanki pozwalające stwierdzić, że ta rola mogła się zmieniać w szerszej perspektywie czasowej?), a także wspomnieć o tym jak bardzo jest to zróżnicowana grupa pod względem taksonomicznym (czy możemy podejrzewać, że mechanizmy budujące szkielet mogą się różnić pomiędzy rodzinami, rodzajami czy nawet gatunkami? Ta kwestia jest częściowo dyskutowana w Rozdziale III). To ostatnie wydaje mi się szczególnie ważne również w kontekście wyboru poszczególnych gatunków do eksperymentów - badania przeprowadzono na płytkowodnych jeżowcach (występującym w północnym Atlantyku *Psammechinus miliaris*, z rodziny Parechinidae, występującym we wschodnim Atlantyku i Morzu Śródziemnym *Paracentrotus lividus*, z rodziny Parechinidae oraz tropikalnym i pacyficznym *Prionocidaris baculosa*, z rodziny Cidaridae), czerwonej rozgwieździe *Asterias rubens* oraz wężowidle *Ophiocomina nigra*. W jaki sposób wybrano poszczególne gatunki do eksperymentów? Jest całkowicie zrozumiałe, że ważnym czynnikiem mogła być tutaj po prostu dostępność i łatwość hodowli poszczególnych gatunków. Nasuwa się tu jednak pytanie jak daleko można uogólniać uzyskane dla poszczególnych gatunków wyniki oraz na ile mogą one być specyficzne dla danego gatunku/rodziny. Czy miejsce, z którego pozyskano organizmy, a tym samym warunki panujące w danym ekosystemie (np. Atlantyk vs Morze Śródziemne vs Pacyfik) może mieć znaczenie dla uzyskanych wyników?

W Rozdziale I (Kołbuk i in. 2019), Doktorantka przedstawia wyniki eksperymentu mającego na celu wykazać jaki wpływ może mieć zmieniający się stosunek molowy Mg^{2+}/Ca^{2+} w wodzie morskiej (wpływ podwyższonej koncentracji Ca^{2+}) i dieta na skład chemiczny szkieletu jeżowca *Paracentrotus lividus*. Jeżowce pochodziły z akwakultury – czy może to mieć wpływ na interpretację wyników (w porównaniu do pozostałych eksperymentów, gdzie organizmy pochodziły ze środowiska)? Doktorantka we wstępie zaznacza, że znane są badania, które wykazują, że w zależności od rodzaju pokarmu zmienia się stosunek Mg/Ca w szkieletach szkarłupni, co stało się jedną z motywacji do przeprowadzenia eksperymentu. W swoim badaniu (i w kolejnych) stosowała sztuczne

pożywienie (Ziegler Bros, o znanym składzie i zawartości Mg), niedostępne w środowisku naturalnym. Dlaczego do eksperymentu wybrano właśnie takie zawartości MgCO_3 i czy znajdują one odzwierciedlenie w naturalnych pokarmach dostępnych dla jeżowców? Jeżowce przed eksperymentem nie były karmione – wybór logiczny i słuszny, również ze względu na konieczność eliminacji wpływu wcześniej skonsumowanego pokarmu. Czy intensywność żerowania, a więc wysoka dostawa Mg^{2+} do organizmu, mogła mieć wpływ na uzyskane wyniki? Czy Doktorantka zgodziłaby się ze stwierdzeniem, że wykazane różnice pomiędzy jeżowcami trzymanymi w wodzie o niskim i wysokim stężeniu Mg^{2+} oraz karmionymi pokarmem o niskim i wysokim stężeniu MgCO_3 mogą wskazywać na to, że jeżowce czerpią jony konieczne do mineralizacji szkieletu z tego źródła, które akurat jest dostępne? W dyskusji Doktorantka zwraca uwagę, że dieta wzbogacona w Mg powinna być brana pod uwagę w czasie rekonstrukcji stosunków molowych $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ w wodzie morskiej. Aczkolwiek zgadzam się z tym wnioskiem, to zastanawiam się jednak na ile jest możliwe zastosowanie go w praktyce – czy znamy stosunek $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ potencjalnego pożywienia kopalnych jeżowców (czy innych szkarłupni), a nawet czy znamy ich potencjalne pożywienie? Ta kwestia jest przedyskutowana w świetle wiedzy i badań nad współczesnymi jeżowcami i częściowo dla materiału kopalnego, ale prosiłabym o przedyskutowanie w czasie obrony tego aspektu pod kątem praktycznym – czy w świetle obecnej wiedzy takie kompleksowe badania są możliwe do wykonania? Drobną uwagę edytorską dotyczącą Tabeli 1: w tabeli znalazło się MgCa_{sw} zamiast $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}_{\text{sw}}$ i $\text{MgCa}_{\text{sw}}*\text{Diet}$ zamiast $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}_{\text{sw}}*\text{Diet}$.

W Rozdziale II (Kołbuk i in. 2020), Doktorantka rozszerza poprzednie badania i przedstawia wyniki kolejnego eksperymentu, zaprojektowanego w tym samym celu, ale z wykorzystaniem jeżowca ze strefy umiarkowanej *Psammechinus miliaris* oraz tropikalnego *Priocidaris baculosa*. Badane organizmy były znakowane manganem, a stosunek Mg/Ca oznaczony dla różnych elementów szkieletu. Zmiany stosunku molowego $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ w wodzie uzyskane zostały poprzez podwyższenie koncentracji Ca^{2+} i obniżenie Mg^{2+} . Ponadto, Doktorantka bada skamieniałości Echinoida, aby ocenić na ile mogą one być wiarygodnym źródłem informacji o stosunku molowym $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ w wodzie morskiej w przeszłości. W tym badaniu mgr Kołbuk potwierdza wcześniejsze odkrycia także dla nowobadanych gatunków, a dodatkowo stwierdza, że również zmienność, zarówno indywidualna jak i pomiędzy poszczególnymi elementami szkieletu, może być wysoka, co utrudnia wiarygodne rekonstrukcje paleoceanograficzne. W przypadku tego rozdziału moje pytania dotyczą części metodycznej: 1) W przypadku tego eksperymentu organizmy były głodzone przez dwa tygodnie, tydzień dłużej niż w pierwszym eksperymencie – z czego wynika ta różnica?; 2) Czy woda w akwariach była natleniana? Jakie było początkowe stężenie tlenu w wodzie w przypadku pomiarów tempa zużycia tlenu?

W Rozdziale III (Kołbuk i in. 2021), Doktorantka kontynuuje swoje badania i przedstawia wyniki kolejnego rozszerzonego eksperymentu, zaprojektowanego w tym samym celu, ale tym razem do badań wybrała rozgwieżdżkę *Asterias rubens* oraz wężowidło *Ophiocomina nigra* inkubowane w wodzie o trzech różnych stosunkach molowych $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$. Ponadto Doktorantka przeprowadza rekonstrukcję $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ w morzach jurajskich i miocenkich ma podstawie badań kopalnych rozgwieżdżek. Czy w przypadku tego eksperymentu zwierzęta były wcześniej głodzone, a jeśli tak, to jak długo? Wężowidła w

większości nie przeżyły tego eksperymentu – czy Doktorantka ma pomysł dlaczego tak się stało i jaki mechanizm mógł zostać zaburzony przez obniżenie dostępnego magnezu? Czy przyczyną tego mogło być znakowanie manganem? Rozgwiadzy natomiast wydają się być dobrym wskaźnikiem stosunków molowych Mg^{2+}/Ca^{2+} w wodzie morskiej, co jest bardzo ciekawym wynikiem.

Praca kończy się podsumowaniem w postaci Wniosków oraz bardzo ciekawymi przemyśleniami na temat kierunku ewentualnych przyszłych badań (Future perspectives).

Podsumowanie:

Wyżej wymienione drobne uwagi i pytania nie wpływają negatywnie na merytoryczną ocenę pracy doktorskiej. Postawiony cel badawczy został osiągnięty, Doktorantka odpowiada na postawione pytania badawcze, a uzyskane wnioski oceniam wysoko, jako ważne zarówno z punktu widzenia paleoceanografii jak i współczesnej oceanografii, w tym ekologii morza.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej rozprawy zaliczyłabym wykazanie, że stosunek molowy Mg^{2+}/Ca^{2+} wody morskiej ma wpływ na skład chemiczny szkieletu szkarłupni (szkarłupnie przetrzymywane w wodzie o obniżonym stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} wytwarzają szkielet o obniżonym stosunku Mg/Ca) podobnie jak i dieta (szkarłupnie karmione pokarmem wzbogaconym w Mg wytwarzają szkielet o podwyższonym stosunku Mg/Ca). Równie istotnym wynikiem jest wykazanie, że pomiędzy gatunkami (i wyższymi poziomami taksonomicznymi), poszczególnymi organizmami czy nawet różnymi częściami szkieletu występuje duża zmienność chemizmu szkieletu. Ma to duże implikacje w kontekście badań paleoceanograficznych i jest ważnym osiągnięciem przedstawionej rozprawy. Istotne z punktu widzenia prognozowania warunków (paleo)środowiskowych jest również wskazanie, która z grup szkarłupni jest lepszym wskaźnikiem warunków środowiskowych (rozgwiadzy). Nie bez znaczenia dla przyszłych badań mają również aspekty metodologiczne – opis wymagających i czasochłonnych eksperymentów i następujących po nich analiz stanowi ważną informację dla innych badaczy zainteresowanych manipulacyjnymi badaniami eksperymentalnymi na szkarłupniach i innych organizmach morskich.

Wniosek końcowy:

Rozprawa doktorska mgr Doroty Kołbuk jest oryginalnym opracowaniem reprezentującym wysoki poziom merytoryczny i nowość naukową. Sformułowane wnioski są dobrze udokumentowane i przedyskutowane na tle literatury przedmiotu. Doktorantka wykazała się umiejętnością formułowania problemów naukowych, planowania badań oraz trafnego doboru metod badawczych i eksperymentalnych umożliwiających rozwiązywanie tych problemów.

W związku w powyższym stwierdzam, iż przedłożona rozprawa spełnia wymogi formalne i ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Składam niniejszym wniosek do Rady Naukowej Instytutu Paleobiologii PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Doroty Kołbuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Monika Kędra