

dr hab. Jarosław Tysza, prof. ING PAN
Ośrodek Badawczy w Krakowie
Instytut Nauk Geologicznych PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kołbuk

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Doroty Kołbuk, pt. *The effect of geochemical parameters of the environment (Mg/Ca) and diet on the biomineralization of the echinoderm skeleton*, przygotowanej pod kierunkiem promotora Doktora hab. Przemysława Gorzelaka z Instytutu Paleobiologii PAN została opracowana na prośbę Profesora dr. hab. Jarosława Stolarskiego, Dyrektora Instytutu Paleobiologii PAN.

Ocena indywidualnego wkładu Kandydatki opiera się na deklaracjach wszystkich autorów i wskazuje na jej dominujący udział w badaniach oraz w powstaniu trzech publikacji, w których jest pierwszą Autorką. Są to publikacje:

- (I) **Kołbuk D.** [udział 55%], 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.
- (II) **Kołbuk D.** [udział 60%], Di Giglio S., 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(6), 710-724.
- (III) **Kołbuk D.** [udział 70%], 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.

Dysertacja została zebrana w postaci zwanego tomu monograficznego, wydanego przez Instytut Paleobiologii PAN. Tom ten zawiera powyższe publikacje jako rozdziały, streszczenia w j. polskim i angielskim oraz rozdziały uzupełniające, w tym wstęp (*Introduction*), wnioski (*Conclusions*) oraz perspektywy przyszłych badań (*Future perspectives*). Te rozdziały zostały przygotowane wyłącznie przez P. mgr Dorotę Kołbuk. Z treści deklaracji wynika, że Kandydatka do stopnia odpowiada za wszystkie kluczowe etapy prac badawczych wraz z przygotowaniem publikacji. Jedynie nie jest jasne kto wykonywał eksperymenty opisane w publikacji nr I. Z deklaracji dowiadujemy się, że Autorka zajmowała się analizą danych oraz interpretacją, a w eksperymentach pomagał Promotor. Zakładam jednak, że jest to niedopatrzenie i Autorka bezpośrednio uczestniczyła w przeprowadzeniu tych eksperymentów. Pełny udział Autorki w prowadzeniu eksperymentów opisanych w pozostałych publikacjach jest jednoznacznie zadeklarowany.

Tematyka i cele rozprawy

Tytuł rozprawy dość dobrze odzwierciedla jej treść, chociaż nie precyzuje, iż wpływ diety dotyczy wzbogacenia pokarmu w magnez. Zatem „wpływ diety na biomineralizację” należy rozumieć dość wąsko, co jest spójne z „wpływem parametrów środowiska (Mg/Ca) na biomineralizację”. W obu przypadkach chodzi o wpływ stężenia magnezu na jego względną zawartość określaną w postaci stosunku (Mg/Ca) w szkielecie szkarłupni.

Jasno sprecyzowanym celem pracy doktorskiej było przeprowadzenie serii przyżyciowych eksperymentów biomineralizacyjnych na współczesnych szkarłupniach, badających wpływ zmian stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} wody morskiej oraz diety (gł. zawartości Mg) na skład chemiczny ich szkieletu mineralnego. Szczegółowe cele poszczególnych publikacji/rozdziałów są bardziej zróżnicowane, ale nadal zawierają się w celu zasadniczym. Analizując bieżące trendy w badaniach paleoceanograficznych i paleoklimatycznych częste są uproszczenia dotyczące pochodzenia jonów wapnia i magnezu w szkieletach organizmów morskich. Panuje przekonanie, że stosunek Mg/Ca w szkieletach (nie tylko szkarłupni) wynika wyłącznie z zawartości tych jonów w wodzie morskiej, zależąc jedynie od temperatury i zasolenia. W ostatnich latach zauważano istnienie tzw. „efektu witalnego”, uzależnionego od fizjologii organizmów i wpływającego na zróżnicowanie składu geochemicznego szkieletów. Fizjologia organizmów jest również uzależniona od specyficznej diety. Skupienie się zatem na słabo poznanym wpływie diety - w odniesieniu do zmian składu wody - na biomineralizację tej grupy organizmów morskich jest zatem nowatorskie.

Ocena języka i struktury rozprawy

Recenzowana praca jest opracowaniem monograficznym napisanym w języku angielskim, zawierającym wspomniane wieloautorskie opublikowane rozdziały. W języku polskim zostało napisane 4-stronicowe streszczenie. Całość tekstu jest nienaganna językowo. Terminologia zarówno w języku angielskim jak również polskim (Streszczenie) jest użyta poprawnie i zrozumiale. Struktura pracy jest bardzo przejrzysta, a sama praca jest dobrze zredagowana.

Ocena metodyki badawczej

Badania mają charakter aktualistyczno-eksperymentalny, słusznie zakładając, iż mechanizmy kontrolujące wbudowanie Mg i Ca w szkielety organizmów są uniwersalne. Ich poznanie jest konieczne do zrozumienia biogeochemii organizmów mineralizujących, a w konsekwencji do wiarygodnej rekonstrukcji paleośrodowiska. Wiarygodność badań eksperymentalnych była testowana badaniami geochemicznymi szkarłupni kopalnych, pochodzących z jury i miocenu basenu polskiego z interwałów charakteryzujących się odpowiednio niskim i wysokim stosunkiem Mg^{2+}/Ca^{2+} wody morskiej. Zasadnicze badania oparły się na kilku seriach eksperymentów biomineralizacyjnych, opisanych w trzech osobnych rozdziałach, a zarazem artykułach dysertacji. Wszystkie eksperymenty wykonano na żywych szkarłupniach, w tym na trzech gatunkach jeżowców oraz jednym gatunku rozgwiazdy i wężowidła. Zróżnicowanie taksonomiczne osobników wybranych do badań jest zupełnie wystarczające do zrealizowania celu badań.

Wykonanie eksperymentów w tej samej placówce (*Marine Biology Lab, Université Libre de Bruxelles*), przy wsparciu tego samego personelu zapewniło porównywalne standardy badań. Wszystkie eksperymenty wykonano zarówno w warunkach kontrolnych oraz

zmodyfikowanych. Procedura ta była konieczna do poprawnego odniesienia oraz interpretacji wyników. W warunkach kontrolnych stosowano wodę morską o stosunku molowym ok. 5,2 mol/mol Mg^{2+}/Ca^{2+} , natomiast w warunkach zmodyfikowanych obniżano ten stosunek przez roztwory o niższej zawartości Mg^{2+} lub wzbogacanie w Ca^{2+} .

Podstawą badań eksperymentalnych jest ich replikacja. Pierwsza seria eksperymentów została wykonana w 12 niezależnych akwariach jednolitrowych. W każdym z nich umieszczono po jednym jeżowcu z obłamanymi trzema kolcami. Kolce w ciągu 14 dni ulegały regeneracji czyli ponownej mineralizacji w wodzie morskiej o dwóch stosunkach Mg/Ca oraz dwóch rodzajach diety (wysoko- oraz niskomagnezowej). To daje najmniej 4 kategorie parametrów eksperymentalnych, replikowanych 3-krotnie – na trzech okazach. W tej części pracy brakuje opisu parametrów eksperymentalnych hodowli każdego okazu w zestawieniu z wynikami eksperymentów. Ponumerowanie 12 okazów (akwariów) oraz przedstawienie tych wartości w załączonych tabelach byłoby w tym przypadku optymalne.

Bardzo korzystne byłoby również fotograficzne udokumentowanie okazów oraz ich regenerowanych kolców przed i po eksperymencie. Jeżeli kolce zostały przecięte i wypolerowane, udokumentowanie przekrojów byłoby cenną dokumentacją graficzną eksperymentu. Dobry przykładem jest dokumentacja w publikacji promotora (Gorzelać i in., 2011, JSB, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.07.008>). Dokumentacja ilościowa dwóch pozostałych eksperymentów jest zdecydowanie bogatsza i zawiera komplet danych zestawionych w kilku załączonych tabelach (jako *Supplementary files*). Publikacje te (II i III) zawierają również dokumentację fotograficzną przykładowych okazów.

Bardzo celowe (analizy tempa wzrostu szkieletu) było zastosowanie precyzyjnego znakowania szkieletów manganem, a następnie obrazowania mikroskopią katodoluminescencyjną po zakończonych eksperymentach. Pomiary analityczne wykonywano przy wykorzystaniu mikrosondy elektronowej CAMECA SX 100. Punktowe analizy ilościowe zawartości Mg i Ca w strefach eksperymentalnego wzrostu zwielokrotniono aby zbadać ich zróżnicowanie w mikroskali oraz uniknąć niereprezentatywnych wyników. Całość otrzymanych danych konsekwentnie poddano kilku analizom statystycznym dla potwierdzenia ich istotności (relacji pomiędzy badanymi parametrami). Co ciekawe, wykonano również analizy punktowe kolców poniżej części zregenerowanej, ale dane te nie zostały dołączone. Mogłby być to wartościowy materiał porównawczy, pokazujący różnicę lub jej brak pomiędzy mineralizacją przed i w trakcie eksperymentu. Wiele organizmów w warunkach stresowych (małe akwarium, narażenie na nieznane bodźce itp.) wykazuje nietypową fizjologię, która może mieć wpływ na wyniki eksperymentu.

Ocena rezultatów pracy

Wszystkie serie eksperymentów doktorantki jednoznacznie potwierdzają zależność stosunku Mg/Ca w szkielecie szkarłupni od stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} w wodzie morskiej. Szkielet mineralizowany w wodzie o obniżonym stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} wykazuje niższy stosunek Mg/Ca, co konsekwentnie wykazano w opisanych badaniach. Porównanie tych stosunków w szkieletach szkarłupni jurajskich i mioceńskich również potwierdza tę zależność. Okazy pochodzące z jurajskiego „morza kalcytowego” o niższym stosunku Mg/Ca wykazują obniżone wartości w szkieletach jeżowców i rozgwiazd. Odwrotny trend jest widoczny w okazach pochodzących

z miocénskiego „morza aragonitowego”. W tym przypadku wysoki stosunek Mg do Ca występował w morzu jak też w szkieletach szkarłupni. Spójność tych wyników opartych na replikowanych analizach różnych taksonów szkarłupni w zestawieniu z wcześniejszymi publikacjami potwierdza ich wiarygodność. Ta część wyników nie powinna zaskakiwać, chociaż ich zasadnicze znaczenie wyłania się przy testowaniu dalszych hipotez badawczych.

Autorka zastanawia się nad intrygującą ścieżką transportu magnezu podczas regeneracji kolców. Okazuje się, że jony magnezu dostarczane są nie tylko z wody morskiej przez epidermę otulającą kolce, ale również pochodzą z pokarmu. Takie wnioskowanie jest zupełnie klarowne, gdyby nie brak bezpośredniego kontaktu końcówki kolca z komórkami ciała jeżowca. Zagadkowa jest zatem ścieżka transportu jonów Mg, pochodzących z diety. W tym przypadku Doktorantka stawia wstępną tezę, iż transport jonów może być dokonywany przez wyspecjalizowane komórki, mające zdolność do migracji bezpośrednio z ciała organizmu. Przykładem takich komórek, jak słusznie czytamy w pierwszej pracy (Kołbuk i in., 2019), mogą być fagocyty lub sferulocyty. Takie odkrycia generują dalsze pytania i otwierają nowe ścieżki badań.

Równie interesujące są rezultaty, dotyczące pozostałych czynników wpływających na skład chemiczny szkieletów. Doktorantka wykazała jednoznaczny wpływ diety na stosunek Mg/Ca w szkieletach badanych szkarłupni współczesnych. Dieta wysokomagnezowa wzbogaca zmineralizowany szkielet w Mg i odwrotnie. Tym samym część jonów w szkielecie pochodzi z wody morskiej, a część z pokarmu. W konsekwencji Autorka słusznie konkluduje, że rekonstrukcje stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} pierwotnej wody morskiej na podstawie analiz geochemicznych (Mg/Ca) szkieletu szkarłupni mogą być obciążone znacznymi błędami (do ponad 60%) wynikającymi z diety. Zapewne dieta może być zróżnicowana ze względu na takson, ale również ze względu na sezonowość, lokalne środowisko, populację itp. Jeśli zatem weźmiemy pod uwagę to, że stosunek Mg/Ca zależy nie tylko od składu wody morskiej, jej temperatury, ale również od diety - jak wykazuje Doktorantka, a także od zasolenia, to rekonstrukcja paleotemperatur przestaje być trywialna.

Kolejnym ważnym rezultatem dysertacji jest odkrycie znacznego zróżnicowania stosunku Mg/Ca w skali osobniczej, m. in. pomiędzy różnymi typami płytek, a nawet pomiędzy różnymi typami stereomu w tych samych płytkach. Przyczyna takiego zróżnicowania nie została wyjaśniona, ale Doktorantka wiąże to zjawisko z tajemniczym „efektem witalnym” organizmu. Takie zróżnicowanie badanego stosunku może również wpływać na dodatkowe błędy w rekonstrukcjach wód morskich.

Autorka wykonała również wiele znakowań stref wzrostu manganem, co pozwoliło na określenie biomineralizacyjnego tempa wzrostu, przy wykorzystaniu mikroskopu katodoluminescencyjnego. Okazało się, że jeżowce inkubowane w wodzie o niskim stosunku molowym Mg^{2+}/Ca^{2+} rosły wolniej, wytwarzając szkielet o obniżonym Mg/Ca. Wolniejszy wzrost przy obniżonym stosunku molowym Mg^{2+}/Ca^{2+} jest jednak zastanawiający, ponieważ nawet w najniższym stężeniu Mg^{2+} w wodzie morskiej ilość tych jonów jest w nadmiarze w stosunku do potrzeb biomineralizacyjnych. W przypadku każdego eksperymentalnego stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} zastosowanego w badaniach jest konieczność usuwania jonów Mg^{2+} względem jonów Ca^{2+} , ponieważ nadmiar Mg^{2+} hamuje kalcyfikację. W przypadku otwornic podobne eksperymenty wykonane na dwóch gatunkach o nisko- i wysoko-magnezowych

kalcytowych skorupkach wykazały brak wyraźnej korelacji Mg^{2+}/Ca^{2+} w wodzie morskiej z tempem wzrostu skorupki. Z drugiej jednak strony, najwyższe tempo wzrostu występowało zawsze w warunkach zbliżonych do naturalnych, tj. przy stosunku molowym $Mg^{2+}/Ca^{2+} = \sim 5$ (Mewes i in., 2014, <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2014.09.003>). W przypadku zarówno szkarłupni, jak i otwornic, może to wynikać z adaptacji do aktualnych warunków fizyko-chemicznych. Każda istotna zmiana może powodować fizjologiczny stres i większe koszty energetyczne. W związku z tym Autorka wykonała również pomiary tempa respiracji jako wskaźnika metabolizmu (pośrednio jako miary stresu). Wyniki nie potwierdzają negatywnego wpływu niższego stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} na oddychanie badanych organizmów (Kołbuk i in., 2020), a to oznacza, że spadek tempa wzrostu z powodu obniżenia stosunku Mg^{2+}/Ca^{2+} w wodzie morskiej nie można wiązać ze znacznym stresem metabolicznym.

Podsumowanie oceny

Zestawiając wszystkie punkty recenzji pracy doktorskiej mgr Doroty Kołbuk, podkreślę:

1. Dominujący udział doktorantki we wszystkich artykułach/rozdziałach dysertacji. We wszystkich artykułach Kandydatka do stopnia jest pierwszą autorką;
2. Bardzo dobrą koncepcję pracy, podejmującą ważki temat wpływu składu chemicznego (Mg^{2+}/Ca^{2+}) wody morskiej oraz zawartości Mg w pokarmie na biomineralizację, w tym na stosunek Mg/Ca w szkielecie szkarłupni;
3. Adekwatnie dobraną metodykę badań, a szczególnie dobrze zaplanowane, kontrolowane oraz replikowane serie eksperymentalne metodą *in vivo*. Analizy geo/chemiczne oraz obrazowania stref biomineralizacji zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu nowoczesnych, precyzyjnych narzędzi pomiarowych (np. mikrosondy elektronowej CAMECA SX 100) oraz mikroskopów (m. in. mikroskopu katodoluminescencyjnego);
4. Dobrze dobrany współczesny materiał do badań, testujący szersze spektrum szkarłupni, uzupełniony analizą okazów kopalnych, reprezentujących różne stany oceanu światowego, ze względu na stosunek Mg^{2+}/Ca^{2+} w wodzie morskiej;
5. Zastosowanie adekwatnych metod statystycznych opartych na analizie wariancji (ANOVA);
6. Bardzo skuteczną i konsekwentną realizację celu badań. Wszystkie publikowane prace dążą do tego samego celu, stopniowo uzupełniając metodykę badawczą oraz testując kolejne grupy szkarłupni, reprezentowane przez ich wybrane gatunki;
7. Cenne i niezwykle intrygujące rezultaty badań (streszczone powyżej). Wiele z wyników dysertacji prowokuje dalsze badania, a nawet otwiera nowe ścieżki badawcze.
8. Ciekawą i dość wszechstronną dyskusję wyników, uzupełnioną perspektywami dalszych badań.

Do jedynych mankamentów pracy należą:

1. Ograniczona dokumentacja analityczna i graficzna pierwszej serii eksperymentów (Kołbuk i in., 2019) przy zastosowaniu dobrej metodyki eksperymentalnej, replikacji eksperymentów oraz wykorzystaniu analiz statystycznych;
2. Brak przedstawienia, omówienia i porównania wyników geochemicznych, pochodzących z pierwotnej części kolca (poniżej strefy zregenerowanej);
3. Tylko częściowy sukces eksperymentów na węzowidłach, ze względu na ich wysoką śmiertelność.

Należy dodać, że wyniki pierwszej serii eksperymentów oparte są na ograniczonej liczbie osobników, co zostało podkreślone w treści pracy (Kołbuk i in., 2019). Wydaje się, że ta seria eksperymentów miała charakter serii rekonesansowej, dającej podstawy do dalszych badań. Uwagi te nie wpływają na wysoką ocenę metodyki, rezultatów i przeprowadzonej dyskusji. Wyniki wszystkich serii eksperymentalnych są bardzo konsekwentne i wiarygodne.

Wniosek końcowy

Zestawiając wszystkie punkty oceny, mogę stwierdzić, że cele rozprawy zostały osiągnięte. Kandydatka do stopnia naukowego doktora przedstawiła niezwykle cenne wyniki prac eksperymentalnych, porównując je do rekonstrukcji opartych na skamieniałościach. Połączenie metod *in vivo* oraz *in fossilio* dało bardzo oryginalne oraz spójne rezultaty. Badania zostały opublikowane w uznanych czasopismach międzynarodowych. Nie mam wątpliwości, że wszystkie prace opublikowane w ramach rozprawy przejdą do klasyki w tematyce biomineralizacji bezkręgowców oraz metodyki rekonstrukcji paleośrodowiska na podstawie danych geochemicznych.

Na tej podstawie stwierdzam, że praca spełnia warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Recenzowana rozprawa doktorska jest oryginalnym opracowaniem Autorki i wnosi istotny wkład w dziedzinę nauk o Ziemi i środowisku. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kołbuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę ponadprzeciętny poziom dysertacji oraz jej ważne, oryginalne rezultaty, wnioskuję rozważenie wyróżnienia przedłożonej pracy doktorskiej.

Jarosław Tysza