

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr. Kamila Janelta**

### **Wieloaspektowa analiza encystacji niesporczaka *Thulinus ruffoi* (Tardigrada, Isohypsibioidea: Doryphoribiidae)**

**Wykonanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. Izabeli Poprawy, prof. UŚ**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi szczegółowy i bardzo bogato ilustrowany opis wyników badań Autora nad procesem encystacji u jednego z gatunków niesporczaków z gromady Eutardigrada. Proces ten jest znany tardigradologom od ponad stu lat, nie doczekał się jednak dotąd kompleksowych badań i narosło wokół niego nieco kontrowersji. Autor – w mojej ocenie – rozwiął większość z nich, stosując w tym celu szeroki wachlarz metod mikroskopowych.

#### **Merytoryczna ocena rozprawy**

Rozprawa doktorska została przygotowana w pełnej zgodzie z art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669).

Praca stanowi oryginalne podejście do wybranego problemu naukowego dotyczącego biologii organizmów zdolnych do kryptobiozy. Autor trafnie wybrał tu organizm modelowy, który pod tym kątem nie był wcześniej badany, opracował metodę pozwalającą wywołać u niego encystację oraz szczegółowo prześledził ten proces za pomocą metod niestosowanych dotąd na tę skalę w badaniach nad Tardigrada. Zarówno wstęp, dobór metod jak i przeprowadzenie dyskusji jasno pokazują ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną kandydata. Zastosowanie zaawansowanych technik mikroskopii oraz samodzielne uzyskanie funduszy na badania w formie projektu badawczego PRELUDIUM oraz grantu dla młodych naukowców WNP pokazują, że Autor ma zdolność do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym, praca spełnia warunki formalne cytowanej powyżej Ustawy dotyczące oryginalności, wiedzy teoretycznej oraz samodzielności.

Za najważniejsze merytoryczne aspekty pracy uważam i) szerokie podejście do tematu encystacji u badanego gatunku niesporczaka, w tym opracowanie metody, za pomocą której możemy indukować formowanie cyst, ii) przeanalizowanie procesów towarzyszących encystacji przy pomocy różnorodnych metod mikroskopowych oraz iii) ostateczne udowodnienie, że encystacji nie towarzyszy histoliza.

#### **Uwagi formalne i zagadnienia do wyjaśnienia**

Celem rozprawy była wieloaspektowa analiza procesu encystacji u słodkowodnego gatunku niesporczaka *Thulinus ruffoi*. Autor dość szczegółowo precyzuje, jakie aspekty (zagadnienia) wchodziły w skład tej analizy – wymieniając ich dziewięć – nie stawia jednak formalnie żadnej hipotezy, której falsyfikacja miałyby doprowadzić do osiągnięcia tych celów. W mojej ocenie jest to jeden ze słabszych punktów recenzowanej pracy.

Skany z użyciem SBEM zostały przeprowadzone na jednej tylko cysty. Zdaję sobie sprawę z tego, że jest to procedura skomplikowana i czasochłonna, ale moim zdaniem liczba badanych obiektów powinna być trochę większa – w obecnej sytuacji nie możemy mieć pewności, że zeskanowana cysta była typową, nieodbiegającą w jakiś sposób od normy.

Medium hodowlanym była woda mineralna znanej na polskim rynku marki, autor nie precyzuje jednak składu jonów rozpuszczonych w tej wodzie (dostępny zwykle na etykietce, przy czym partie pochodzące z różnych ujęć lub pobrane w różnych terminach mogą się znacząco różnić między sobą). Zapadanie i wychodzenie ze stanu życia utajonego zależy od wielu czynników, jednym z nich jest zasolenie środowiska i związany z nim szok osmotyczny – moim zdaniem informacja o zawartości jonów rozpuszczonych lub przynajmniej o przewodnictwie elektrolitycznym wody powinna znaleźć się w pracy, tym bardziej, że badane zwierzęta były przenoszone z wody mineralnej do wody dejonizowanej – różnica musiała być zauważalna dla tak małych organizmów.

W rozdziale opisującym metody brak też bardziej szczegółowych danych np. na temat ogólnej liczby osobników z hodowli, które wykorzystano w celu pozyskania cyst (jak wiele spośród nich encystowało – a więc jaki był współczynnik sukcesu zastosowanych procedur?), jak często prowadzono obserwacje encystujących osobników (dowiadujemy się tego z opisu do schematu), ile w sumie cyst wyizolowano do dalszych eksperymentów. Nie jest też jasne jak długo przebywały w stanie encystacji osobniki wykorzystywane do eksperymentów opisanych w rozdziale 3.1.4, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.5 – tak istotne dane powinny być przedstawione jasno i czytelnie, jak sam autor zauważa są one istotne dla eksperymentu.

Również rozdział Wyniki zawiera niedopowiedzenia, które moim zdaniem powinny zostać uzupełnione. Autor zauważa na przykład, że „W czasie inkubacji osobników w niskiej temperaturze wykazywały one zróżnicowane wzorce zachowań” – np. niektóre umierały, inne występowały w formie simplex, pojedyncze były zdolne do partenogenezy. Wskazane byłoby zamieszczenie tu bardziej dokładnych danych – zwłaszcza na temat śmiertelności, ale też częstotliwości formy simplex itp. Opisując wyniki zastosowania nowatorskiej metody, Autor stwierdza, że „Formowanie cyst miało miejsce dopiero po ponad miesiącu”. Moim zdaniem wypadałoby podać przynajmniej kiedy uformowały się pierwsze, po ilu dniach encystowała większość, a kiedy ostatnie osobniki. Najlepiej zamieścić też informację o średnim czasie do encystacji z miarą zmienności (np. SD). Podobnie jak w przypadku czasu potrzebnego do encystacji, więcej szczegółowych danych przydałoby się odnośnie procesu ekscystacji – zwłaszcza brakuje tu miary zmienności.

Niektóre z encystujących osobników spontanicznie przerywały encystację w niższej temperaturze: to bardzo interesująca obserwacja, warto odnotować na ten temat więcej informacji – zwłaszcza jak często do tego dochodziło, czy miało to jakiś związek np. z zawartością układu pokarmowego, wiekiem lub czasem przebywania w formie cysty?

Niektóre spośród niesporczaków przeniesionych do temperatury pokojowej nie wybudzały się w ciągu tygodnia i były uznawane za martwe. U czytelnika rodzi się tu pytanie: jak często dochodziło do takiej sytuacji, a więc jak duża była śmiertelność wśród encystowanych niesporczaków? To pytanie bardzo istotne, ponieważ dane na ten temat powiedzą nam, jak duża jest szansa, że autor przygotowując preparaty trafił na cystę, która była już martwa, uzyskując pomiar odbiegający od rzeczywistego dla cysty żywej.

Do czynników wywołujących encystację autor za literaturą zalicza stres osmotyczny, niskie stężenie tlenu, zmiany pH, wahania temperatury, brak pokarmu. W swej pracy kontrolował tylko jeden z tych czynników, ale warunki, w których przebywały poszczególne zwierzęta mogły się różnić pod względem pozostałych (np. zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie będzie zależała od nawet drobnych różnic w temperaturze i głębokości wody, ale też np. od występowania bakterii). Czy były one mierzone oraz jak duże mogły być te różnice zdaniem Autora?

### Uwagi redakcyjne

Tytuł: Moim zdaniem powinien brzmieć „...analiza encystacji u (modelowego) gatunku niesporczaka...” – w końcu autor nie badał tylko jednego niesporczaka, a całkiem sporą ich serię.

We wstępie autor kilkakrotnie używa odnośnie badanej grupy określenia „stworzenia”. Osobiście preferuję słowo „żyjątko”, choć oba sformułowania są raczej potoczne i pewnie powinniśmy w naukowym tekście zastąpić je słowem „organizm”.

W opisie gatunku nie znajdziemy informacji o przynależności systematycznej badanego gatunku – wprawdzie z tytułu rozprawy wiemy, że należy do Isohypsibioidea: Doryphoribiidae, ale czytelnik nieobeznany w tej konkretnej grupie nie znajdzie w pracy dość podstawowej informacji na temat tego, czy *Thu. ruffoi* należy do Eutardigrada czy Heterotardigrada.

We wstępie, na 11 stronie Autor sugeruje, że niesporczaki występują na obu biegunach Ziemi: znamy Tardigrada z Arktyki i Antarktydy, ale na samym biegunie notowane nie były.

Na 13 stronie czytamy, że podczas anhydrobiozy oddychanie zwierząt jest spowolnione 600-krotnie: z pewnością nie dotyczy to każdego gatunku zwierzęcia zdolnego do anhydrobiozy, warto by było sprecyzować o który tutaj chodzi.

Na tej samej stronie autor stwierdza, że encystacja to proces, który „ewoluował, aby wytworzyć zdolność do przetrwania niekorzystnych warunków środowiskowych”. To niefortunne nawiązanie do teleologii jest na pewno wynikiem skrótu myślowego, ewolucja jest procesem, który nie dąży do określonego celu, choć w retrospekcji może sprawiać takie wrażenie.

Tabele znalazły się w drugim tomie pracy, co utrudnia troszkę odbiór treści – przynajmniej w przypadku czytelników, którzy lubią mieć wszystko pod ręką, jak piszący te słowa. Mamy je w pracy tylko dwie i nie są zbyt obszerne – moim zdaniem nie zaszkodziłoby je umieścić w treści. Jeśli jednak zamieszczamy je w drugim tomie, to na pewno warto poinformować o tym czytelnika w miejscu, gdzie odsyłamy go do tabeli (Tabela 1, Tom 2).

W rozdziale Metody Autor powołuje się na międzynarodowe normy odnośnie temperatury pokojowej, nie cytuje jednak literaturowych źródeł do tych norm – to ważne, ponieważ normy bywają zmieniane.

Podczas opisywania wyników warto byłoby za każdym przypomnieć czytelnikowi, na ilu obiektach przeprowadzone były opisywane obserwacje i jak często były stwierdzane; czytamy np. że „mięśnie somatyczne były przytwierdzone do wpukleń integumentu, co nie zawsze było widoczne” (jak często było widoczne?); „tylko jeden aparat gębowo-gardzielowy był obserwowany w cystach” (na ile przebadanych w ten sam sposób cyst?); „pazurki mogły być

kompletnie ukryte pomiędzy fałdami ciała lub częściowo wystawać poza jego obrys” (jak często były ukryte, a jak często wystawały?). Długość ciała encystujących zwierząt ulegała zredukowaniu ze stanem sprzed uformowania cysty – jak bardzo się kurczyły? (%)

Wymienione wyżej usterki – zarówno formalne jak i redakcyjne – wynikają raczej z przeoczenia Autora podczas pisania pracy i będą bardzo łatwe do usunięcia na etapie przygotowywania do publikacji tych części rozprawy, które jeszcze nie zostały opublikowane. W moich oczach nie wpływają one znacząco na wartość recenzowanej pracy, którą oceniam wysoko.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona przez mgr. Kamila Janelta rozprawa doktorska pod tytułem „Wieloaspektowa analiza encystacji niesporczaka *Thulinus ruffoi* (Tardigrada, Isohypsibioidea: Doryophoribiidae)” jest oryginalną pracą dotyczącą jednego z ważniejszych aspektów biologii niesporczaków oraz ogólnie bezkręgowców zdolnych do zapadania w stan kryptobiozy, a przez to stanowi znaczący dorobek w zakresie nauk biologicznych. Rozprawa w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez obowiązujące w Polsce prawo dotyczące stopni i tytułów naukowych. W związku z tym, wnioskuję do Rady Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr. Kamila Janelta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

