

Rzeszów, 28.11.2022 r.

dr hab. Teresa Noga, prof. UR
Zakład Gleboznawstwa, Chemii Środowiska i Hydrologii
Instytut Nauk Rolniczych, Ochrony i Kształtowania Środowiska
Uniwersytet Rzeszowski
ul. Zelwerowicza 8B, 35-601 Rzeszów

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Krzywdy pt.
„Biogeografia morskich okrzemek bentosowych w świetle badań mikrobiomu pancerzy żółwi *Caretta caretta* gniazdujących na wybrzeżach śródziemnomorskich”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Krzywdy prezentuje morfologiczne i molekularne dane na temat składu gatunkowego okrzemek wyhodowanych z materiałów pobranych z pancerzy żółwi *Caretta caretta* gniazdujących na wybrzeżu Morza Śródziemnego na plaży Dalyan w Turcji oraz z pancerzy żółwi *Caretta caretta* i *Chelonia mydas* przebywających tymczasowo w Centrum Badań Żółwi Morskich, Ratownictwo i Rehabilitacja Żółwi Morskich w Puli na Chorwacji. Badania przeprowadzono w oparciu o obserwacje w mikroskopie świetlnym (LM), skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) oraz analizy genetyczne (m.in. filogenetyczne i rekonstrukcje drzewa filogenetycznego).

Tytuł pracy sformułowano poprawnie i merytorycznie. Moim zdaniem można zamieścić w tytule także nazwisko odkrywcy po nazwie łacińskiej gatunku *Caretta caretta*.

Doktorantka w swojej pracy doktorskiej postawiła kilka celów badawczych, z których podstawowym było sprawdzenie w warunkach laboratoryjnych możliwości hodowli okrzemek pobranych z pancerzy morskich żółwi z dala od gospodarza. Pozostałe cele uwzględniają pozyskanie danych morfologicznych i molekularnych na temat składu okrzemkowego mikrobiomu pancerzy *C. caretta*, w tym uzyskanie sekwencji DNA z taksonów okrzemek epizoicznych, a także możliwość znalezienia gatunków okrzemek potencjalnie nowych dla nauki oraz uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy migracje badanych żółwi mogą wpływać na geograficzne rozprzestrzenianie się okrzemek. Założone cele zostały osiągnięte.

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z 5 głównych rozdziałów (z licznymi podrozdziałami) stanowiących spójną tematycznie całość oraz literatury, spisu ilustracji i rycin, trzech załączników, a także streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. W mojej opinii literatura oraz spis ilustracji i rycin powinny stanowić kolejne rozdziały pracy (6 i 7), ale jest to uwaga typowo redakcyjna. Praca rozpoczyna się wstępem, obejmującym także opis obszaru badań, cele i hipotezy badawcze, w dalszej kolejności znajdują się rozdziały zawierające materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. W pracy zawarto 74 ryciny i 10 tabel. Wśród rycin znajdują się plansze ze zdjęciami taksonów okrzemek wyizolowanych z materiałów pobranych z pancerzy badanych żółwi. Fotografie wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego i skaningowego mikroskopu elektronowego. Na podkreślenie i wyróżnienie zasługuje fakt, że Doktorantka wykonała fotografie dla każdego wyizolowanego szczepu, ponadto rozmieszczenie każdego taksonu przedstawiła na starannie przygotowanych mapach w oparciu o zebrane dane literaturowe. Całość pracy zajmuje 196 stron, spis literatury zawiera ponad 270

pozycji.

SEKCJA DS. NAUKI

07.12.2022

W P Ł Y N Ę Ł O

Na podstawie badań prowadzonych podczas czterech sezonów lęgowych w latach 2014, 2015, 2016 i 2018, po wyizolowaniu 62 szczepów okrzemek z pancerzy żółwi *Caretta caretta* z miejsca gniazdowania oraz 37 szczepów wyizolowanych z prób pobranych u wybrzeży Chorwacji i scharakteryzowaniu wyhodowanych szczepów pod względem morfologicznym, a także w oparciu o analizę danych molekularnych, powstała oryginalna i wartościowa rozprawa doktorska. Recenzowana praca napisana jest poprawnie merytorycznie i stylistycznie.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Krzywdy rozpoczyna się od obszernego wstępu, zawierającego podstawowe informacje na temat okrzemek oraz środowiska życia morskich żółwi *Caretta caretta* jako gospodarzy dla innych gatunków w oparciu o bogatą literaturę z tej dziedziny. Następnie Doktorantka przedstawia informacje dotyczące biogeografii morskich okrzemek, uwzględniając wpływ migracji żółwi na ich przestrzenne rozmieszczenie oraz prezentuje (także na mapach) miejsca gniazdowania *C. caretta* w Morzu Śródziemnym wraz z krótkim opisem terenu badań. W ostatnich akapitach wstępu znajdują się cele badań i hipotezy badawcze.

Uwagi:

1) Według mnie podrozdział 1.6. *Obszar badań* lepiej byłoby zatytułować *Stan zbadania terenu*, ponieważ przedstawia głównie dane literaturowe dotyczące badań nad okrzemkami w obszarze Morza Śródziemnego.

Kolejny rozdział w monografii stanowi metodyka, w której Doktorantka opisuje metody pobierania prób w terenie oraz hodowli okrzemek, zamieszczając obszerną listę wyizolowanych szczepów w kilkunastu tabeli. Następnie przedstawia kolejne etapy analizy mikroskopowej (LM i SEM) i genetycznej, która obejmowała izolację genomowego DNA, reakcję PCR, elektroforezę, a także analizę filogenetyczną z rekonstrukcją drzewa filogenetycznego i analizę głównych składowych PCA.

Uwagi:

1) Moim zdaniem w rozdziale Materiały i metody, na początku, powinna znaleźć się także informacja o terminach pobierania materiałów w terenie, tj. w jakich latach pobierano materiał, ile razy w roku, itp. Informacje o terminach pobierania materiałów z pancerzy żółwi morskich można znaleźć wprawdzie w wynikach, jednak uważam, że powinny zostać umieszczone także w podrozdziale dotyczącym poboru prób.

2) Doktorantka nie cytuje w rozdziale Materiały i metody dwóch zamieszczonych w nim tabel, tj. Tabeli 2 i 5. (Na stronie 34 jest zacytowana prawdopodobnie pomyłkowo Tabela 1, zakładam, że powinna to być Tabela 2, natomiast na stronie 51 jest dwukrotnie cytowana Tabela 4 – przypuszczam, że drugie cytowanie powinno odnosić się do Tabeli 5?).

3) Na stronie 49, w podrozdziale dotyczącym analizy mikroskopowej LM i SEM, znajduje się informacja o filtrach membranowych używanych w analizie SEM, których średnica porów wynosiła 5 μm . Uważam, zwłaszcza po przeglądnięciu plansz ze zdjęciami wykonanymi w SEM, że jest to raczej niemożliwe. Biorąc pod uwagę rozmiary skorupki okrzemek, z którymi Doktorantka pracowała w niniejszej pracy, przy zastosowaniu filtrów o średnicy porów 5 μm utraciłaby ona większość analizowanego materiału. Moim zdaniem były to filtry o średnicy 2 μm lub 3 μm , a jeśli używane były także takie o średnicy 5 μm , to chyba w bardzo nielicznych przypadkach.

Wyniki, w rozprawie doktorskiej Pani mgr Marty Krzywdy, stanowią niewątpliwie najobszerniejszy rozdział. Najpierw opisuje szczegółowo wszystkie taksony okrzemek, jakie wyizolowała z materiałów pobranych z pancerzy żółwi morskich. Przedstawia konsekwentnie przy każdym taksonie numery odpowiednich szczepów, analizę morfologiczną z odniesieniem do odpowiednich fotografii (wykonanych zarówno w świetlnym jak i skaningowym

mikroskopie SEM) oraz do drzewa filogenetycznego, wykreślonego na podstawie identyfikacji zweryfikowanej z zastosowaniem sekwencji rbcL. Dla każdego taksonu przygotowała także mapę rozmieszczenia na podstawie danych literaturowych. Ostateczne zrekonstruowane drzewo filogenetyczne zamieściła w Załączniku 3. Więcej uwagi poświęca licznym szczepom z rodzaju *Navicula* (26 szczepów), których dane morfometryczne prezentuje w Tabeli 8 oraz dodatkowo, celem podsumowania zmienności analizowanych cech, na Rycinie 56 (analiza głównych składowych PCA). Ostatni podrozdział wyników przedstawia analizę biofilmu karapaksów żółwi wykonaną w skaningowym mikroskopie elektronowym, która wykazała, że okrzemki stanowiły jeden z głównych składników mikroflory epizoicznej wspomnianych karapaksów. Wśród najczęściej występujących okrzemek na fragmentach pancerzy Doktorantka obserwowała przedstawicieli z rodzajów: *Navicula* spp., *Tripterion* sp. i *Achnanthes* ssp., których identyfikacja do gatunku najczęściej nie była możliwa, m.in. ze względu na wysoki stopień degradacji pancerzyków lub obecność śluzu.

Uzyskane wyniki zostały poprawnie i w sposób interesujący przedyskutowane w oparciu o bogatą i dobrze dobraną literaturę, zarówno dotyczącą poszczególnych analizowanych szczepów okrzemek, jak i składu biofilmu. Doktorantka poruszyła w dyskusji problem biogeografii okrzemek i ich rozprzestrzeniania przez zwierzęta morskie, w tym wypadku żółwie *Caretta caretta*. Nadmieniła także, że zebrane dane nie pozwalają jednoznacznie określić jaką rolę w dystrybucji okrzemek odgrywają morskie żółwie, dlatego istnieje potrzeba kontynuowania badań, aby w przyszłości móc odpowiedzieć na pytanie, które okrzemki zostały przywleczone na karapaksach żółwi z innych lokalizacji.

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie interesujących i bardzo istotnych wniosków. Badania te niewątpliwie przyczyniły się w znaczącym stopniu do wzbogacenia wiedzy na temat składu gatunkowego okrzemek zasiedlających pancerze morskich żółwi *C. caretta* w Morzu Śródziemnym, a uzyskane dane dotyczące sekwencji DNA mogą posłużyć do kolejnych badań, ponieważ stanowią bibliotekę referencyjną.

Nie mam istotnych uwag do wyników i dyskusji. Obydwa rozdziały przeczytałam z prawdziwą przyjemnością i dużym zainteresowaniem. Uważam tylko, że na str. 73, na której Doktorantka podaje długość okryw według danych literaturowych (5 wiersz od góry), dane te powinny być poparte odpowiednią literaturą. Właściwe byłoby także stosowanie zapisu „ilość/liczba prążków”, a nie „gęstość prążków” (zwrot ten pojawia się wielokrotnie, zarówno w tekście pracy jak i w tabelach).

Składający się z 271 pozycji spis literatury oparty jest zarówno na literaturze zaliczanej do klasyki problemu, jak i tej najnowszej. Mam jednak wiele uwag do opracowanego piśmiennictwa, zarówno w samym wielostronicowym spisie, jaki i w całym tekście manuskryptu.

Uwagi:

1) Wielokrotnie w tekście manuskryptu, podczas wymieniania kilku źródeł literaturowych w poszczególnych nawiasach, widoczny jest spory chaos w ułożeniu cytowań (poszczególne pozycje literaturowe podajemy zawsze w kolejności według roku ukazania się publikacji):

str. 14 (jest: Fourtanier i Kociolek 2003, Mann 1999, powinno być: Mann 1999, Fourtanier i Kociolek 2003), str. 17 (Casale i in. 2008, Bjorndal 1997), str. 18 (Ireland 1980, Avens i Lohmann 2003a, Avens i Lohmann 2004, Avens i in. 2003b), str. 20 (Bustard 1976, Dodd 1988, Frazier i in. 1985, Margaritoulis 1985), (Fleger i in. 1976, Frazier i in. 1985, Hollenberg i Noris 1977), str. 25 (Alfaro i in. 2008, Donoso i Dutton 2010, Kalez i in. 2005), (Bonfil i in. 2005, Block i in. 2001), str. 132 (Car i in. 2019, Alvarez- i Blanco 2014 – tutaj brakuje też drugiej części nazwiska Alvarez-Blanco i Blanco), str. 137 (Hoagland i in. 1993, Hoagland i in. 1986 – tutaj wystarczyłby zapis Hoagland i in. 1986, 1993).

2) Brakuje też konsekwencji w zapisie publikacji dwuautorskich – w większości tekstu manuskryptu nazwiska łączy spójnik „i”, jednak pod koniec pracy (głównie w dyskusji) dwa nazwiska rozdziela przecinek.

3) Nie rozumiem zupełnie, dlaczego Doktorantka bardzo wiele publikacji wieloautorskich cytuje w tekście pracy podając nazwisko tylko pierwszego autora (zawsze zapisujemy nazwisko pierwszego autora i dodajemy „i in.”), lub dwunazwiskowe publikacje zapisuje nazwiskiem tylko pierwszego autora, a jakby tego było mało to niektóre publikacje mające tylko jednego autora zapisuje ze skrótem „i in.”. Dotyczy to następujących cytowań:

str. 13: (Round 1990); str. 14: (Mann 1996); str. 16: (Casale 2008); str. 17: (Meylan i in. 1983), (Limpus i in. 1992); str. 23: (Henson 2007), (Edwards 2016), (Ajani 2016), (Calbet 2004), (Bonnet 2016); str. 24: (Pesant 2015), (Malviya 2016), (Muñiz 2018); str. 32: (Çolak i in. 2010), (Louvrou i in. 2007, 2012); str. 51: (Alverson i in. 2007); str. 65: (Desiderato 2021); str. 66: (López-Fuerte 2019), (Hassan 2006), (Desiderato 2021); str. 83: (Desianti 2019); str. 107: (Konno i in. 2008); str. 110: (Krayesky 2009); str. 116: (Louvrou i in. 2012); str. 126: (Robinson 2016), (Bourjea 2015); str. 131: (Robinson 2016), (Majewska 2019); str. 133: (Majewska 2017); str. 134: (Majewska 2017), (Kaleli 2020); str. 135: (Majewska 2015a); str. 136: (Underwood i in. 1998); str. 137: (Robinson 2016).

4) W tekście pracy zacytowano 67 pozycji literaturowych, których nie udało mi się odnaleźć w spisie literatury:

str. 13: (Kaczmarska i in. 2013), (Härnström i in. 2011); str. 14: (Fourtanier i Kociolek 2003), (Bogusz 2018); str. 15: (Stal 2010), (Gárate-Lizárraga i Muñetón-Gómez 2009), (Hart 1935), (Holmes i Croll 1984); str. 16: (IUCN 2007); str. 19: (Lescinsky 2001), (Giesbrecht 1892); str. 20: (Margaritoulis 1985); str. 23: (Pierre i Keller 2004); str. 24 i 25: (Sunagawam 2020), (Passy 2007), (Chen i in. 2007), (Baldwin i in. 2003), (Limpus i Limpus 2003), (Limpus 2008), (Alfaro i in. 2008), (Donoso, Dutton 2010), (Kalez i in. 2005), (Snover 2002); str. 26: (Lohmann i in. 2012); str. 29: (Lucchetti 2009); str. 31: *źródło internetowe*; str. 32: (Balkis 2005), (Foged 1985), (Majewska i in. 2014); str. 51: (Górecka i in. 2021); str. 52: (Hall 1999), (Thompson i in. 1994); str. 53: (Booth & Marchant 1987), (Guillou i in. 1999), (Stamatakis 2014); str. 55: (Ashworth 2022), (Majewska 2021); str. 64: (Beltrones i in. 2017), (El-Hadary i in. brak podanego roku wydania), str. 73: (Cholonky1963 – także na stronie 131), (Żelazna-Wieczorek i in. 2014); str. 80: (Dillwyn 1803), (Guiry i Guiry 2015), (Lobban 1983); str. 83: (Hustedt 1956); str. 87: (Majewska i in. 2020 – także na stronie 136); str. 111: (Kryk i in. 2020 – także na str. 132), (Ersanli, Gonulol 2005 – także na str. 138); str. 126: (Groombridge i Luxmoore 1989); str. 127: (Wahl 2008), (Wigglesworth-Cooksey i Kirst 2005); str. 128: (Kanjier i in. 2020); str. 130: (Lange-Bertalot i in. 2001); str. 132: (Pliński i Witkowski 2020), (Desrosires 2014), (Car i in. 2019); str. 133: (Yun et al. 2016); str. 134: (Krammer i Lange-Bertalot 1991); str. 135: (Delta Ebro, Clavero 2009); str. 136: (Frankovich i in. 2018); str. 138: (Revelles i in. 2007), (Laurent i in. 1998), (Carreras 2006), (Underwood i Provot 2000); str. 139: (Simberloff 2009), (Ruiz i in. 1997), (Carlton i in. 1995).

5) Nie udało mi się także odnaleźć w tekście pracy 26 pozycji literaturowych, które widnieją w spisie literatury:

Admiraal i in. (1987), Balkis, Koray (2001), Bjorndal (1985, 1996), Bogusz i in. (2008), Bresette i in. (2010), Chambault i in. (2016, 2017), Dillwyn (1802–1809), Fontaine, Kociolek (2003), Godfrey, Godley (2008), Guiry, Guiry (2016), Hartley i in. (1986), Harper i in. (2012), Holloway-Adkins, Hanisak (2017), Ibarbalz i in. (2019), Jin i in. (1992), Kaczmarska i in. (2001), Lucchetti, Sala (2010), Medlin, Kaczmarska (2005), Nivière i in. (2018), Riaux-Gobin i in. (2021), Prasad i in. (2018), Stoermer, Julius (2003), Sunagawa i in. (2020) oraz Wigglesworth-Cooksey, Cooksey (2005).

6) Spis literatury, niestety, nie został starannie zredagowany. Brak jednolitego formatowania (np. strony rozdzielane są różnej długości pauzami, nazwiska w wieloautorskich publikacjach rozdzielane są najczęściej przecinkami, ale czasem łączone „and” lub „&”, po nazwie czasopisma raz jest przecinek, innym razem nie ma, itp.). Na pierwszy rzut oka bibliografia wydaje się być wprawdzie sporządzona alfabetycznie, ale przy bardziej wnikliwym przeglądaniu widać wyraźny chaos (np. Grudzińska i in. (2013) na str. 188, Prasad i in. (2018) na str. 167, Underwood, Smith (1998) i Underwood, Paterson (2003) na str. 168 – to tylko te

najbardziej widoczne „pomieszania” – tych pomniejszych, związanych z ułożeniem alfabetycznym według kolejnych liter, czy też dotyczących ułożenia wieloautorskich publikacji już tutaj nie przytaczam). Są to oczywiście zwykle błędy edytorskie, ale warto zwrócić na nie uwagę, zwłaszcza jeśli praca będzie przygotowywana w przyszłości do druku. Rozumiem, że przy tak długiej liście publikacji, precyzyjna edycja tekstu okazała się nie lada wyzwaniem.

Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Krzywdy została napisana poprawnym stylem, ale zdarzają się w kilku miejscach drobne błędy językowe. Problemem są także znaki interpunkcyjne, a konkretnie poprawne stosowanie przecinków w tekście manuskryptu (wielokrotnie w tekście brakuje przecinków tam, gdzie powinny być zastosowane, natomiast często znajdują się w miejscu, gdzie nie ma potrzeby stawiania przecinka).

– Jeżeli przywołujemy w tekście ryciny i nie używamy skrótu, tak jak to zastosowała Doktorantka w swojej pracy, to proszę zwracać uwagę na liczbę pojedynczą i mnogą, tj. (Rycina 1), ale (Ryciny 1–3), a nie (Rycina 1–3) [patrz np. str. 29, 76, 83, 90, etc.]. Problem ten znika jeśli użyjemy skrótu: Ryc. 1, Ryc. 1–3.

– Formatowanie tytułów rozdziałów (warto to sprawdzić po napisaniu pracy – nie wszystkie tytuły rozdziałów są pisane z dużych liter, patrz str. 54).

– Proszę przeczytać zdanie ze strony 34: „Miejsce poboru prób (...)” – zdanie długie, złożone, ale dla mnie zupełnie niezrozumiałe. Ma Pani takie zdania jeszcze w kilku miejscach w pracy, czasem źle odmienione końcówki wyrazów, czasem urwana myśl „w pół zdania” – tekst robi się wtedy niezrozumiały (przytoczę tutaj tylko kilka, np. str. 127: zdanie drugie i zdanie czwarte w podrozdziale 4.2. wyraźnie są źle sformułowane stylistycznie, str. 132: zdanie drugie w podrozdziale 4.3. – urwane w połowie?, ostatnie zdanie w dyskusji też razi, ze względu na „trudny styl”, a zakończenie powinno być dopracowane, ponieważ podsumowuje całokształt pracy).

– Proszę nie rozpoczynać nowego zdania od pisania skrótem nazwy łacińskiej (np. patrz strona 55: *A. elongata*..., str. 69: *E. gracilis* i jeszcze to „samotne *E.*” pozostawione na końcu wersu – przyzna Pani, że nie wygląda to dobrze?).

Podsumowując, recenzowana praca pomimo drobnych błędów językowych i interpunkcyjnych oraz niedociągnięć o charakterze redakcyjnym w opracowaniu bibliografii, została napisana w sposób prawidłowy i staranny. Pani mgr Marta Krzywda wykazała się dojrzałością badawczą, ogromnym zaangażowaniem i pracowitością, a przygotowana rozprawa stanowi cenne źródło wiedzy na temat biogeografii morskich okrzemek bentosowych, które porastają pancerze żółwi *Caretta caretta*. Doktorantka zaprezentowała pierwsze dane dotyczące filogenezy molekularnej okrzemek zasiedlających pancerze żółwi morskich gniazdujących na tureckim wybrzeżu Dalyan oraz przebywających w Centrum Badań Żółwi Morskich w Chorwacji, a także z miejsc gniazdowania tych żółwi ze strefy bentosowej na plaży Dalyan. Wyizolowała 60 szczepów okrzemek reprezentowanych przez 12 rodzajów, a uzyskane dane dotyczące sekwencji DNA posłużyły Jej do przygotowania biblioteki referencyjnej. Będą one w przyszłości służyć pomocą w kolejnych badaniach realizowanych w tym temacie, zwłaszcza że jak sama Autorka nadmienia, taksony, których nie zidentyfikowała do gatunku mogą być prawdopodobnie nowymi dla nauki.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w 13 art. Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789, ze zmianami, w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – Dz. U. z 2018 poz. 1669) i w związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Nauk o Morzu i Środowisku Uniwersytetu Szczecińskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Marty Krzywdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Teresa Noga

