

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI MGR ANNY PIWONI-PIÓREWICZ

POD TYTUŁEM:

SKŁAD CHEMICZNY WĘGLANOWYCH SZKIELETÓW
BAŁTYCKICH BEZKRĘGOWCÓW BENTOSOWYCH

1. Przegląd ogólny pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Piwoni-Piórewicz wykonana została w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie pod kierunkiem profesora Piotra Kuklińskiego. Praca jest opracowaniem monograficznym liczącym 147 stron i obejmującym sześć rozdziałów. Poza polskim streszczeniem liczącym 7 stron, całość pracy przygotowana została w języku angielskim. Praca w języku angielskim ma tytuł "*Chemistry of carbonate skeletons of benthic invertebrates from the Baltic Sea*".

Rozdziały pracy obejmują: (1) wstęp do problematyki pracy [*General introduction*] (15 stron), (2) analizę zmienności biogenicznego węglanu wapnia u bentosowych bezkręgowców z Morza Bałtyckiego [*The variability in biogenic CaCO₃ in the benthic invertebrates of the Baltic Sea*] (9 stron), (3) studium przypadku stanowiące analizę składu pierwiastkowego węglanowych (różne odmiany polimorficzne) szkieletów bezkręgowców z Zatoki Gdańskiej mających podobne rozmiary [*Elemental composition of size-grouped shells composed of different CaCO₃ polymorphs: a case study of invertebrates from the Gulf of Gdansk (the Baltic Sea)*] (13 stron), (4) studium przypadku będące analizą sezonalnej zmienności w zawartości metali w kalcytowych szkieletach pąkli *Amphibalanus improvisus* oraz mszywiolów *Einhornia crustulenta* z Zatoki Gdańskiej [*The effect of seasonally changing environmental variables on metal concentrations in calcitic skeletons: a case study of the barnacle Amphibalanus improvisus and bryozoan Einhornia crustulenta from the Gulf of Gdansk (Baltic Sea)*] (20 stron), (5) analiza zmienności mineralogicznej oraz składu pierwiastkowego w szkieletach morskich bezkręgowców badanych wzdłuż gradientu zasolenia w Morzu Bałtyckim i Cieśninie Skagerrak [*Variability of mineral types and elemental concentrations in CaCO₃ skeletons secreted by benthic invertebrates along the salinity gradient in the Baltic Sea and Skagerrak*] (17 stron), oraz ostatni rozdział (6) będący

podsumowaniem i konkluzjami [Summary and conclusions] (6 stron). Dodatkowym załącznikiem jest płyta CD z elektroniczną wersją pracy.

Bałtyk jest obszarem niezwykle ciekawym dla prowadzenia badań kalcyfikacji organizmów, gdyż w akwenu tym istnieją silne gradienty fizykochemiczne w oczywisty sposób wpływające na fizjologię organizmów (w tym fizjologię związaną z procesami biomineralizacyjnymi), rzadko spotykane w innych typowo pełnomorskich warunkach. Zasolenie w Morzu Bałtyckim jest niskie (6,1-27,2‰), ale wykazujące dużą zmienność wewnątrz tego akwenu. Bałtyk charakteryzują także duże różnice sezonalne dotyczące podstawowych parametrów fizykochemicznych wody. Do tej pory nie ma zbyt wielu systematycznych i nowoczesnych opracowań dotyczących biomineralizacji węglanowej organizmów z Morza Bałtyckiego. Główną motywacją podjęcia prac nad ocenianą rozprawą doktorską było zatem „*zdobycie kompleksowej wiedzy na temat węglanowych szkieletów wytwarzanych przez powszechnie występujące bezkręgowce bentosowe z Morza Bałtyckiego oraz określenie trendów zmienności chemicznej (stężenie Ca, Na, Sr, Mg, Ba, Mn, Cu, Pb, V, Y, U i Cd) i mineralogicznej (kalcyt, aragonit lub połączenie obu) tych szkieletów w odpowiedzi na sezonowe oraz przestrzenne wahania środowiska morskiego*” (str. 13 Streszczenia).

Do badań wybrano rozpowszechnione w Bałtyku organizmy kalcyfikujące należące do czterech typów: mięczaki (małże: *Cerastoderma glaucum*, *Mya arenaria*, *Limecola balthica*, *Mytilus* sp. i ślimaki *Hydrobia* sp.), mszywioly (*Einhornia crustulenta*, *Cribrilina cryptoecium*, *Cryptosula pallasiana*, *Electra pilosa*, *Escharella immersa*), stawonogi (pąkle: *Amphibalanus improvisus*, *Semibalanus balanoides*) oraz pierścienice (*Spirorbis tridentatus*). Materiał został zebrany z 15 stanowisk w Bałtyku i Sagerrak (w latach 2007-2016), ze stanowisk tych zostały również pobrane dane temperaturowe oraz dotyczące zasolenia.

W ramach bardzo ogólnie sformułowanego celu głównego, Doktorantka wyznaczyła cztery cele szczegółowe, które dotyczyć miały: (1) zbadania różnic w stężeniu metali pomiędzy kalcytem i aragonitem w szkieletach badanych organizmów, (2) zbadania wpływu sezonalnych zmian czynników środowiskowych (temperatura, zasolenie, biomasa fitoplanktonu i produkcja pierwotna brutto) na parametry chemiczne szkieletów organizmów bałtyckich, (3) zbadania wpływu różnic zasolenia wzdłuż gradientu między Bałtykiem a Cieśną Duńską (Skagerrak) na parametry chemiczne i mineralogiczne węglanu wapnia w szkieletach badanych organizmów, oraz (4) określenia wpływu kontroli biologicznej

organizmu na skład węglanowego szkieletu. Przyjętą hipotezą badawczą było to, że "*skład chemiczny i mineralogiczny szkieletów zbudowanych z węglanu wapnia i wytwarzanych przez bentosowe organizmy bezkręgowce odzwierciedla stan warunków środowiskowych*" (str. 14 Streszczenia).

2. Ocena merytoryczna pracy

Podjęta przez doktorantkę tematyka pracy jest bardzo ambitna - głównie z uwagi na niezwykle postęp naukowy jaki dokonał się w ostatnich latach w badaniach biomineralizacji organizmów. Metody badawcze które powszechnie stosowano jeszcze kilka lat temu aby przesądzać o biologicznym lub środowiskowym charakterze procesów wywierających przemożny wpływ na mineralizację organizmów, dziś są najczęściej tylko metodami wspomagającymi, zaś nacisk jest obecnie położony na badania eksperymentalne związane z ekspresją genów, proteomiką, etc. Nie znaczy to jednak, że ważnych problemów nie można pokazać dysponując tylko niektórymi metodami badawczymi, i badając tylko końcowy produkt procesu biomineralizacji - szkielet. Można to robić, ale trudno wtedy oczekiwać jednoznacznych odpowiedzi. Doktorantka dysponowała tylko dwiema podstawowymi metodami badań szkieletu - dyfrakcją proszkową (mineralogia) oraz spektrometrią emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (geochemia) - które biorąc pod uwagę główne pytania badawcze były właściwie dobrane, choć - jak wykaże poniżej - nie wystarczające aby uzyskać jednoznaczną odpowiedź. Poniżej w porządku chronologicznym pracy, przedstawiam swoją ocenę pracy i uwagi krytyczne:

(I) Rozdział 1.8 rozprawy dotyczy materiałów i metod. Doktorantka badała mineralogię szkieletów organizmów posługując się metodą dyfrakcji proszkowej. Stosując tę metodę Doktorantka proszkowała szkielety w mózdzieniu agatowym po wcześniejszym oczyszczeniu próbek z organizmów inkrustujących, zdarcie skalpelem warstwy organicznej (periostracum u mięczaków), poddaniu próbki kąpieli w myjce utradźwiękowej oraz osuszeniu w temperaturze 70°C.

Biorąc pod uwagę dużą ilość przebadanych próbek wybrana metoda określenia mineralogii próbek była właściwa, jednak w pracy wyraźnie brakuje oceny stanu zachowania próbek. Bardzo często za pewnik przyjmuje się, że uzyskane za życia dzisiejszych organizmów szkielety, zachowane są w sposób "doskonały". Jest jednak bardzo wiele prac dowodzących, że szkielet jeszcze żyjącego organizmu może wykazywać bardzo silne ślady

bioerozji, a drażenia mikroorganizmów, mogą radykalnie przekształcać parametry mineralogiczne muszli. Na przykład Nothdurft et al. 2007 (*Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 5423-5438) wykazali, że drażące szkielety aragonitowych koralowców kokoidalne sinice *Solentia* odpowiedzialne są za wytrącenie wtórnych złogów kalcytu, które mogą w świeżo tworzonym szkielecie zajmować nawet do 60% objętości. Z tego względu, że stosunki Sr/Ca i Mg/Ca różnią się znacząco w pierwotnym szkielecie aragonitowym i wtórnym kalcytowym (odpowiednio: 6,3 mmol/mol i 12 mmol/mol vs. 9.9 mmol/mol i 4.5 mmol/mol) obecność drażeń praktycznie wyklucza takie materiały z badań geochemicznych. Na obecność drażeń sinic w muszlach mięczaków z Bałtyku zwracały uwagę Pawłowska et al. 2008 (w: M. Wisshak, L. Tapanila (eds.), *Current Developments in Bioerosion*. Erlangen Earth Conference Series, doi: 10.1007/978-3-540-77598-0_6). Choć jak wspomniałem, z uwagi na dużą ilość próbek trudno byłoby stosować dużo bardziej pracochłonne metody określania mineralogii bez proszkowania materiału (bezpośrednio na wypolerowanej powierzchni próbki np. spektroskopią ramanowską), jednak za spore metodologiczne uchybienie uważam brak przesiewowej dokumentacji stanu zachowania badanych szkieletów. Można było to zrobić na wybranej serii płytek cienkich i dokumentację w mikroskopie optycznym. Czytając dalszą część pracy pozostaje mi zatem tylko wierzyć, że Doktorantka faktycznie dysponowała dobrze zachowanym materiałem, a muszle w widoczny sposób podrażone nie brane byłyby pod uwagę w badaniach.

Podobnie pozostaje niedosyt, że badania zawartości pierwiastków wykonane były tylko metodą ICP-OES (spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej). Metoda jest bardzo czuła, ale wymaga rozpuszczenia badanego materiału, a zatem uzyskany wynik jest wynikiem uśrednionym z całej próbki. O ile uśrednienie to nie ma większego znaczenia w przypadku np. wapnia (szkielety wapienne) to obecność takich pierwiastków jak Mg, Mn, a niekiedy innych pierwiastków śladowych czy ziem rzadkich może wykazywać wyraźną zonację związaną np. z obecnością warstewek organicznych w szkielecie. Uśrednienie może zatem zacierać istotne różnice pomiędzy szkieletami w trakcie ich wzrostu i nie pomoże tu wydzielenie ich klas wielkości. Dlatego poza przeprowadzeniem badań ICP-OES należało wykonać proste mapowania przekrojów wybranych okazów np. metodą WDS (*wavelength dispersive spectroscopy*) aby sprawdzić czy przestrzenne rozmieszczenie kluczowych w analizach środowiska pierwiastków (np. Mg) nie jest np. silnie heterogeniczne.

Z powyższą uwagą powiązany jest inny metodologiczny kłopot: brak jest powiązania koncentracji pierwiastków z obecnością fazy mineralną lub/i fazy organicznej (matrycy organicznej) szkieletu. Różnica koncentracji pierwiastków w tych dwóch fazach może być

znacząca (np. Mg, Mn) dlatego metoda "uśredniania" wyników w pomiarach ICP-OES mogła potencjalnie zatrzeć istotne różnice między badanymi taksonami różniącymi się np. składem pierwiastkowym tylko frakcji organicznej.

(2) W rozdziale II, Doktorantka zbadła mineralogię oraz skład geochemiczny (12 pierwiastków) u przedstawicieli 13 taksonów fauny bentosowej z 15 stanowisk Bałtyku (m.in. Zatoki Gdańskiej, ale również u wybrzeży Szwecji oraz Cieśniny Duńskiej). Podsumowanie pomiarów mineralogicznych zawiera Tabela 2.2. Najbardziej kompletne są pomiary dot. *Mytilus* sp. których okazy pochodziły z 9 stanowisk (od GN, B1 do B9) które charakteryzowały się różnicą zasolenia (Fig. 2.1). Pomiary *Mytilus* sp. sugerują, że przesuając się od Bałtyku w kierunku Morza Północnego (pełnego zasolenia) w muszlach *Mytilus* sp. wzrasta zawartość aragonitu (od 31 do 49 wt%) i odpowiednio maleje zawartość kalcytu. Pozostałe małże miały wyłącznie aragonitowe muszle, ale też ich muszle pochodziły jedynie z Zatoki Gdańskiej. Stabilność składu mineralogicznego (aragonit) wykazywały również osiadłe stawonogi (okazy ze stanowisk wzdłuż gradientu zasolenia GN, B5-B8), oraz osiadła pierścienica (stanowiska B8, B10). Doktorantka w dyskusji (str. 47) bierze pod uwagę różne hipotezy mogące wyjaśnić przesunięcie w udziale różnych odmian polimorficznych w budowie szkieletu małży (np. wyższa temperatura wody mogąca sprzyjać mineralizacji aragonitowej zaś niższa kalcytowej; a także, preferowanie tworzenia kalcytu w warunkach mniejszego zasolenia (jest to odmiana CaCO₃ energetycznie mniej wymagająca w takich warunkach). W dyskusji do tego rozdziału brak jest jednak konkluzji czy zwiększanie zawartości aragonitu w muszlach *Mytilus* sp. ma związek z przesuwaniem obszarów próbkowania w kierunku większego zasolenia (w rozdziale brak jest zestawienia wyników z danymi temperaturowymi, co mogłoby pozwolić przetestować pierwszą hipotezę). Taka sugestia jest jednak zawarta wcześniej w tekście "Malejąca proporcja aragonitu w muszlach małży *Mytilus* sp. w niższych zasoleniach, wskazuje, że organizmy te mają zdolność produkowania mniej rozpuszczalnej formy kalcytowej w erozyjnych warunkach środowiskowych (cel 3)" (str. 15 Streszczenia). Zmiany mineralogii mszywiolów z badanych stanowisk nie podlegają już takim prostym zależnościom.

Pomiary koncentracji pierwiastków śladowych wykazały, że Cd, Cu, Pb, U, V i Y wykazywały najwyższą koncentrację w szkieletach aragonitowo-kalcytowych mszywiolów *C. pallasiana* i *E. crustulenta* natomiast aragonitowe muszle małży i ślimaków pobrane w Zatoce Gdańskiej nie miały podwyższonych zawartości tych metali. Doktorantka konkluduje, że ta "charakterystyka chemiczna podważa ogólną rolę środowiska w kontrolowaniu

transportu metali do szkieletów i świadczy o ważnej roli kontroli biologicznej podczas procesu biomineralizacji" (str. 16 Streszczenia), co może mieć związek z efektywnością filtracji mszywiolów lub/i absorpcją metali na powierzchni kolonii (str. 50 Rozprawy).

Pomiary wykonane przez doktorantkę są nowe, wskazują na złożoność reakcji różnych organizmów, sugerują biologiczny efekt w koncentracji niektórych pierwiastków śladowych i przez to są stymulujące do dalszych badań.

(3) W rozdziale III Doktorantka zbadała szkielety 5 taksonów (pąkli *A. improvisus*, mięczaków *C. glaucum*, *M. arenaria*, *L. balthica* i *Mytilus* sp.) w czterech klasach wielkości ("ontogenetycznych"). Stwierdzono, że stężenie metali śladowych zmniejszało się wraz z rozmiarem szkieletu (np. Pb, V, Mn, U - Fig. 3.3.), co mogło mieć związek ze zmniejszaniem tempa metabolizmu, wzrostu i kalcyfikacji u organizmów u organizmów starszych. Dane te nie zostały powiązane z sezonalnymi zmianami geochemizmu wody morskiej.

(4) W rozdziale IV przeprowadzona jest wielosezonowa analiza temperatury, zasolenia, biomasy fitoplanktonu i produkcji pierwotnej brutto w badanych stanowiskach w korelacji ze stężeniem Ca, Mg, Sr, Na, Ba, Cd, Cu, Pb, U, V, Mn i Y w kalcytowych szkieletach mszywiolów *E. crustulenta* i aragonitowych pąkli *A. improvisus*. Główną konkluzją Doktorantki jest stwierdzenie pozytywnej korelacji temperatury i stężenia Mg i Sr w badanych szkieletach. Niestety brak jest informacji o możliwych sezonalnych fluktuacjach w zawartości tych pierwiastków w wodzie morskiej. Jak pokazują badania na innych grupach organizmów (np. koralowców Coral Reefs 2005 24(1):23-29) różnice w koncentracji Sr w wodzie morskiej mogą sięgać 2.4% co może wywoływać różnicę ok. 4°C przy kalibracji zawartości Sr/Ca w szkielecie).

(5) W Rozdziale V Doktorantka badała wpływ gradientu zasolenia (6.1 – 26,6‰) na geochemię szkieletów organizmów. Stężenie Ca, Mg i Sr malało w szkieletach małży *Mytilus* sp., zaś Ca i Mg malało u pąkli *A. improvisus* wraz ze zwiększaniem się zasolenia. O obu gatunków koncentracja Na wzrastała wraz z rosnącym zasoleniem. U innych badanych taksonów (mszywioly *E. crustulenta*, *C. pallasiana*, pąkle *S. balanoides* i pierścienice *S. tridentatus*) stężenie Ca, Mg, Sr i Na zwiększało się w większym zasoleniu. Stężenie metali śladowych Mn, Ba, Cu, Pb, Y, V, Cd i U w szkieletach małży *Mytilus* sp., pąkli *A. improvisus* i mszywiolów *E. crustulenta* miało tendencję malejącą przy wyższych zasoleniach. U organizmów, których występowanie ograniczone było do wyższych zasoleń (Fig. 5.3),

koncentracja metali w szkieletach organizmów była zmienna bez widocznego wyraźnego wpływu konkretnego zasolenia (Tab. 5.2). Doktorantka konkluduje, że profile geochemiczne szkieletów są najbardziej zależne od biodostępności metali przy różnych zasoleniach wody morskiej (wykonano pomiary chemizmu - Fig. 5.2) oraz większych kosztów metabolicznych organizmu pod wpływem niskiego zasolenia. Z punktu widzenia głównych konkluzji pracy najważniejsze jest ostatnie zdanie rozdziału: "*the concentrations of trace metals in skeletons are related to the physiology and accumulation strategy adopted by each species for each metal*". Tym samym Autorka znajduje argumenty podważające początkowo przyjętą hipotezę badawczą, że "*skład chemiczny [i mineralogiczny] szkieletów zbudowanych z węglanu wapnia i wytwarzanych przez bentosowe organizmy bezkręgowce odzwierciedla stan warunków środowiskowych*".

Podsumowując uważam, że Doktorantka wykonała pionierską, choć nie przełomową pracę. Wyniki badań nie pozwalają jednoznacznie określić co jest przyczyną takich a nie innych trendów/zmienności w mineralogii szkieletów badanych organizmów, czy w koncentracji pierwiastków śladowych. Doktorantka przywołała w dyskusjach szereg pozycji literatury, co świadczy o dość dobrej znajomości tematyki. Słabością dyskusji w większości rozdziałów jest kłopot z wyraźnym wyartykułowaniem bronionej tezy - Autorka gubi się w ilości argumentów, wywód nie ma klarownej struktury. Przykładem jest dyskusja o zawartości aragonitu w muszlach *Mytilus* sp.. To z jednej strony brak doświadczenia w klarownym przedstawianiu wywodów, z drugiej strony Doktorantka nie dysponowała mocnym narzędziem weryfikującym stawiane tezy. Takim narzędziem byłyby np. eksperymenty które pozwoliłyby przetestować wpływ wyodrębnionych czynników (spośród ogromnej liczby innych czynników oddziałujących w warunkach naturalnych) na mineralogię/skład chemiczny. Eksperymenty z jednej strony pozwoliłyby precyzyjnie kontrolować zmianę jednego lub kilku sprzężonych z sobą czynników, z drugiej strony mogłyby pozwolić (przez staranny dobór materiału biologicznego) ograniczyć zmienność genetyczną, która dodatkowo wpływa na zmienność biomineralizacyjną badanych w naturalnym środowisku organizmów. Uśrednienie wyników w wyniku zastosowanej metodyki pomiarów geochemicznych mogło również utrudnić znalezienie bardziej wyrazistych różnic we wzorach biomineralizacji wzdłuż np. gradientu zasolenia. Innym pominiętym w pracy aspektem jest mikrostruktura szkieletu i jej wpływ na zapisane w szkielecie sygnatury geochemiczne. Różnice mikrostrukturalne są bowiem bardzo czułym wskaźnikiem różnic aktywności biomineralizacyjnej (np. u koralowców Scleractinia: np. *Scientific Reports* 2016, 6, 27579; *Journal of Morphology* 2011,

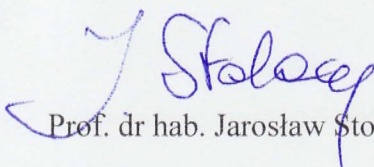
272(2):191-203; *Nature Communications* 2019 10:2896). Badania mikrostruktur pozwoliłyby nie tylko zorientować się w kwestii składu geochemicznego badanych jednostek mikrostrukturalnych, ale również zbadać stan zachowania próbek w mikroskali (czego w pracy brak).

Jeśli jednak praca ta ma wskazywać kierunki dalszych badań w 4 przedstawionych celach szczegółowych to zadanie to spełnia bardzo dobrze. Doktorantka prowadziła badania szerokim frontem jeśli chodzi o dobór materiałów (obraz szerszy niż tylko skoncentrowane na jednej wybranej grupie organizmów) i udokumentowała zakres "uśrednionych" zmian jakich każdy badający szkielety bałtyckich organizmów może się spodziewać. Nie ulega wątpliwości, że przedstawiony przez Doktorantkę materiał dowodowy pokazuje, że szkielety badanych organizmów nie były tworzone w warunkach równowagi z geochemią otaczających wód. Materiał pokazuje również różnorodność reakcji organizmów na zmieniające się warunki, nawet jeśli zmienność warunków wyrażona jest w wielu rozdziałach jedynie parametrami takimi jak zasolenie, temperatura, a nie skład chemiczny wody.

Praca napisana została poprawnym językiem angielskim. Spis literatury przygotowany jest w ujednolicony, staranny sposób. Figury są czytelne, podpisy po nimi zrozumiałe.

4. Wnioski końcowe

Stwierdzam, że rozprawa mgr Anny Piwoni-Piórewicz pt. „Chemistry of carbonate skeletons of benthic invertebrates from the Baltic Sea” ("Skład chemiczny węglanowych szkieletów bałtyckich bezkręgowców bentosowych") stanowi znaczący przyczynek do poszerzenia wiedzy na temat mineralogii oraz składu chemicznego szkieletów bałtyckich bezkręgowców i czynników biotycznych i abiotycznych które na te cechy szkieletów wpływają. Tym samym rozprawa mgr Anny Piwoni-Piórewicz spełnia warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnioskuje o dopuszczenie mgr Anny Piwoni-Piórewicz do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.


Prof. dr hab. Jarosław Stolarski