



Katowice, 13 listopada 2023 r.

dr hab. Agnieszka Babczyńska, prof. UŚ  
agnieszka.babczynska@us.edu.pl

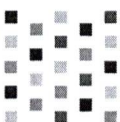
Zespół Biologii Stresu Środowiskowego  
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Recenzja pracy doktorskiej mgr Pushpalaty Kayasthy pt. Rodzaj *Paramacrobotus* (Tardigrada): taksonomia integratywna, biogeografia i oraz wpływ czynników stresowych na wybrane gatunki" (The genus *Paramacrobotus* (Tardigrada): integrative taxonomy, biogeography and effects of stress factors on the selected species).

wykonana pod kierunkiem promotora dra hab. Łukasza Kaczmarka, prof. UAM oraz promotorki pomocniczej dr Moniki Mioduchowskiej w Zakładzie Taksonomii i Ekologii Zwierząt Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

### Przedmiot recenzji

Przedmiotem recenzji jest opracowanie, liczące 288 stron, w skład którego wchodzi: streszczenie (w języku polskim) i abstract (w języku angielskim), wykaz opublikowanych artykułów ze wskazaniem tych, które stanowią podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora. Podstawę wniosku stanowi 5 artykułów, z których cztery prezentują wyniki badań własnych, a jeden jest artykułem przeglądowym. Trzy z prezentowanych artykułów zostały opublikowane w czasopiśmie: Scientific Reports, Zoological Journal of the Linnean Society i Diversity podczas gdy dwa pozostałe przedłożone zostały do recenzji jako preprinty złożone do czasopisma Scientific Reports i aktualnie przechodzą procedurę recenzyjną. Opracowanie zamykają oświadczenia współautorów artykułów, świadczące o istotnym wkładzie Doktorantki w osiągnięcie przedstawione do recenzji, co pozwala Jej ubiegać się o stopień naukowy doktora.





Na osiągnięcie poddane ocenie składają się następujące artykuły:

1. Kayastha, P., Stec, D., Sługocki, Ł., Gawlak, M., Mioduchowska, M., & Kaczmarek, Ł. (2023). Integrative taxonomy reveals new, widely distributed tardigrade species of the genus *Paramacrobotus* (Eutardigrada: Macrobiotidae). *Scientific Reports*, 13(1), 2196. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28714-w>,
2. Kayastha, P., Szydło, W., Mioduchowska, M. & Kaczmarek, Ł. (after review). Morphological and genetic variability in cosmopolitan tardigrade species - *Paramacrobotus fairbanksi* Schill, Förster, Dandekar & Wolf, 2010. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2736709/v2>,
3. Kayastha, P., Rzymiski, P., Gołdyn, B., Nagwani, A.K., Fiałkowska, E., Pajdak-Stós, A., Sobkowiak, R., Robotnikowski, G. & Kaczmarek, Ł. (2023). Tolerance against exposure to solution of magnesium perchlorate in microinvertebrates. *Zoological Journal of the Linnean Society*, (online first). <https://doi.org/10.1093/zoolinlean/zlad060>.
4. Kayastha, P., Wieczorkiewicz, F., Pujol, M., Robinson, A., Michalak, M., Kaczmarek, Ł. & Poprawa, I. (in review). Elevated external temperature affects cell ultrastructure and heat shock proteins (HSPs) in *Paramacrobotus experimentalis* Kaczmarek, Mioduchowska, Poprawa, & Roszkowska, 2020, *Scientific Reports*.
5. Kayastha, P., Mioduchowska, M., Warguła, J., Kaczmarek, Ł. (2023). A Review on the Genus *Paramacrobotus* (Tardigrada) with a New Diagnostic Key. *Diversity*. 15(9):977. <https://doi.org/10.3390/d15090977>.

Wszystkie pięć artykułów to opracowania wieloautorskie, w każdym z nich Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a jej wiodący udział w powstawaniu poszczególnych manuskryptów, na podstawie oświadczeń współautorów, nie budzi wątpliwości. Łączny IF opublikowanych manuskryptów wynosi 11,866; łączna punktacja wg MEiN – 350, co w mojej ocenie jest w zupełności wystarczające, aby ubiegać się o stopień doktora. Warto podkreślić, że wartości mają szansę na podwyższenie przy skutecznej procedurze recenzyjnej i korekcyjnej dwóch wspomnianych wyżej artykułów złożonych do czasopism równie wysoko punktowanych. Artykuły których proces publikacyjny się zakończył, zostały zweryfikowane przez ekspertów z dziedzin, jakich dotyczą badania, czego akceptacja nie podlega dyskusji. Chciałabym jednak, przyjmując rolę recenzenta, odnieść się do niektórych aspektów prac powierzonych mi do recenzji, ze szczególnym uwzględnieniem manuskryptów pozostających nadal w fazie potencjalnych zmian, w odniesieniu do aktualnych wymogów ustawowych, jak również podjąć dyskusję z Doktorantką.







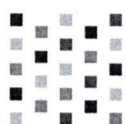
## Ocena treści rozprawy doktorskiej

Jak wspomniano wcześniej, na rozprawę doktorską składa się autoreferat oraz 5 manuskryptów bezpośrednio odnoszących się do jej tytułu i tematyki. Do recenzji trafił ogromny, bardzo obszerny materiał zarówno z punktu widzenia spektrum stosowanych metod jak i uzyskanych wyników, których analiza niewątpliwie była czasochłonna i wymagała kompleksowego myślenia, dla którego z kolei niezbędne jest wnikliwe odczytanie Doktorantki w literaturze przedmiotu. Doceniam szeroki horyzont, który i dla mnie jako recenzentki okazał się, w miarę lektury, bardzo inspirujący.

Przedstawione do oceny osiągnięcie dotyczy, w ogólnym ujęciu, biologii, systematyki i wrażliwości na stresory środowiskowe drobnych bezkręgowców, wśród których na pierwszy plan wysuwają się niesporczaki, jednak w eksperymentach ekotoksykologicznych Autorka uwzględnia również skorupiaki, nicienie i wrotki.

Temat podjęty przez mgr Pushpalatę Kayasthę jest znacznie bardziej złożony niż wynikałoby z powyższego, ogólnego sformułowania. Na stopień skomplikowania problemu badawczego składają się bowiem i, w moim odbiorze, wysuwają na pierwszy plan, następujące zagadnienia: (i) doprecyzowanie pozycji systematycznej i zróżnicowania międzypopulacyjnego rodzaju *Paramacrobiotus* i wybranych gatunków w obrębie tego rodzaju, (ii) analiza dostępności potencjalnych nisz ekologicznych dla wybranych gatunków z rodzaju *Paramacrobiotus* w kontekście ich kosmopolityczności, (iii) wskazanie, na podstawie wybranych parametrów biochemicznych, histologicznych oraz historii życiowych, wrażliwości niesporczaków, na tle innych ekstremofili, na czynniki fizyczne (temperatura) i chemiczne (nadchloran magnezu). Sama Doktorantka z kolei podaje w swoim autoreferacie 5 jednoznacznie sformułowanych celów, do których kolejno odniosę się również w niniejszej recenzji.

Zagadnienia wskazane w punktach 1 i 2 Autorka opracowuje w artykułach pierwszym, opublikowanym w czasopiśmie Scientific Reports oraz drugim, będącym w trakcie procedury recenzyjnej. W pierwszym z nich Doktorantka, stosując podejście taksonomii integratywnej, na którą składa się powiązanie tradycyjnych metod taksonomicznych w oparciu o dane morfologiczne na podstawie obrazów mikroskopowych oraz metod molekularnych, dokonała opisu nowego dla nauki gatunku niesporczaka, *Paramacrobiotus gadabouti*. Analizy morfometryczne i molekularne uzupełnione zostały analizą sposobu rozmnażania osobników pozyskanych z naturalnego środowiska, po uprzedniej hodowli w warunkach laboratoryjnych. Na podstawie przeprowadzonych analiz Autorka charakteryzuje nowo opisany gatunek jako kosmopolityczny, której to cesze sprzyja między innymi partenogenetyczna strategia rozmnażania się. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o komentarz w następującej sprawie:



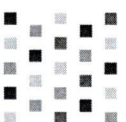


**W jaki sposób partenogeneza gatunku sprzyja jego kosmopolityzmowi?** Argumentem dla tej strategii reprodukcyjnej jest stabilny rozwój populacji w niezmiennych warunkach. Gatunki kosmopolityczne rozprzestrzeniając się zasiedlają nowe nisze, nieidentyczne z dotychczas zajmowanymi. A więc dostosowanie populacji do nowych warunków może być skuteczne dzięki zmienności osobniczej, którą skutecznie się osiąga w strategii rozmnażania płciowego, nie negując jednocześnie plastyczności fenotypowej o różnym mechanizmie. **Być może partenogeneza jest skuteczna, i staje się powszechna, gdy populacja osiągnie pewien poziom stabilności w nowym miejscu jej występowania? W jaki sposób Autorka mogłaby skomentować tę, być może pozorną, sprzeczność? Czy można brać pod uwagę sytuację, że warunki laboratoryjne, z definicji wysoce stabilne, sprzyjają rozmnażaniu partenogenetycznemu podczas gdy w warunkach środowiskowych jednak dominowałaby strategia rozmnażania płciowego? Czy, w takim przypadku, przewidywałaby Pani eksperyment, który pozwoliłby rozstrzygnąć tego typu wątpliwość?**

Do tej części osiągnięcia mam jeszcze jedno pytanie: **w jakim stopniu metoda taksonomii integratywnej miała dotychczas zastosowanie w taksonomii niesporczaków? Czy uważa Pani, że jej powszechne zastosowanie, jeśli jeszcze nie jest takim, może zmienić postrzeganie systematyki tej grupy zwierząt?**

Niezależnie od odpowiedzi na powyższe pytania, uzyskane, jak się spodziewam, podczas obrony, stwierdzam, że wysiłek podjęty przez Doktorantkę w rozstrzygnięciach wskazanych wyżej pozwolił jej na osiągnięcie celu, który sformułowała w autoreferacie jako opisanie nowego gatunku w obrębie rodzaju *Paramacrobotus* przy zastosowaniu taksonomii integratywnej.

W artykule drugim Autorka zawarła odpowiedź na pytanie o wzorzec dystrybucji partenogenetycznych gatunków z rodzaju *Paramacrobotus* oraz zaprezentowała test hipotezy „wszystko jest wszędzie” w odniesieniu do tej grupy niesporczaków, co jest odpowiedzią na tak właśnie sformułowany cel nr 2. W artykule tym Autorzy, stosując szerokie spektrum metod morfometrycznych, molekularnych oraz modelowych, wnioskuje, że istnieją niesporczaki, w szczególności w obrębie gatunku *Paramicrobiotus*, których zasięg występowania pozwala na określenie ich kosmopolitycznymi. Podobnie jak w pierwszej pracy, wśród argumentów pojawia się partenogeneza. Jednocześnie, odnosząc się do wskazanego wyżej celu weryfikują hipotezę „everything is everywhere” w odniesieniu do gatunku *Paramacrobotus fairbanksi*. Nie podważając przeprowadzonego wnioskowania, chciałabym prosić Doktorantkę o kilka dodatkowych wyjaśnień: Hipoteza EiE pierwotnie (lata 1913, 1934) dotyczyła mikroorganizmów – istot o jakościowo i ilościowo wysokiej zmienności, jednak w artykule jest ona stosowana w argumentacji względem organizmów wielokomórkowych. **Czy znane są Pani inne przykłady organizmów (określa je Pani jako „small invertebrates”) innych niż Procaryota, które**

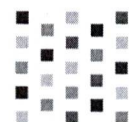






**wpasowałyby się w tę hipotezę i czy jedynym kryterium jest rozmiar?** W omawianym artykule, w analizie zróżnicowania populacji Autorzy posługują się narzędziami morfometrycznymi, przedstawiając uzyskane wyniki graficznie (Figs 2 i 3). Mam jednak wątpliwości, czy uprawnione jest przeprowadzanie łącznej analizy wartości uzyskanych dla osobników z populacji hodowlanej i dzikiej. Moim zdaniem – nie, gdyż zarówno bezwzględne i względne wartości pomiarów ciała podlegają presji środowiska, która jest niejednakowa w takim zestawieniu. Ponadto sugerowałabym umieszczanie informacji dotyczących różnic statystycznie istotnych na wykresach, aby spełniały one postulat samowyjaśnialności zwłaszcza w sytuacji, gdy tytuł zapowiada te różnice. Mylące jest również opatrzenie tym samym podpisem Tabel 5 i 6. Niezależnie od wspomnianych wyżej uwag bardzo wysoko oceniam dyskusję, z której wynika dojrzałe, świadome i krytyczne podejście do własnych badań i dostępnych danych porównawczych. Pozwoliło to jednocześnie na ustosunkowanie się Autorów do hipotez zawartych zarówno we wstępie omawianego artykułu jak i w celu sformułowanym w autoreferacie przez Doktorantkę.

W trzecim celu mgr Pushpalata Kayastha postanowiła zbadać skutki narażenia *Paramacrobiotus* na różne czynniki stresowe stosując zróżnicowane parametry charakteryzujące fitness zwierząt. Z zadaniem tym mierzy się w artykułach 3 i 4, z których w pierwszym czynnikiem stresowym jest nadchloran magnezu w ekstremalnie wysokich stężeniach, w drugim – temperatura w szerokim spektrum wartości z 42 °C jako najwyższą. Szczególnie interesującym wydaje mi się eksperyment z wykorzystaniem różnych stężeń nadchloranu magnezu – występującego na Marsie w stężeniach znacznie przekraczających ziemskie. Umieszczanie zwierząt eksperymentalnych w warunkach pozaziemskich odwzorowywanych w ziemskich laboratoriach jest zadaniem niezwykle trudnym i może być naukowo kontrowersyjnym przy nieprzemyślanych założeniach doświadczenia. Wynika to z tego, że w szeroko rozumianej przestrzeni kosmicznej zestaw czynników odmiennych od ziemskich jest tak szeroki i wywiera tak silną presję, że wybór jednego z nich może nie odzwierciedlić realnej presji uwzględniając także szeroki wachlarz potencjalnych odpowiedzi organizmu na różnych poziomach organizacji. Świadomość ryzyka i wielu niewiadomych musiała mieć także Doktorantka, planując ekspozycję na skrajnie wysokie stężenia badanego związku. W przypadku niniejszej pracy przekonująco zabrzmiał wybór ekstermofili z różnych grup bezkręgowców i argument o poszukiwaniu źródeł potencjalnych molekularnych mechanizmów tolerancji lub adaptacji do warunków skrajnych. Przyjmując słuszną strategię, zgodnie z którą badania biochemiczne czy molekularne poprzedzane są analizą przeżywalności, do oceny toksyczności nadchloranu magnezu Autorzy publikacji nr 3 zastosowali parametry historii życiowej związanej z mobilnością i przeżywalnością przedstawicieli ekstremofili w kontakcie z toksyną. Nie mam zastrzeżeń co do przebiegu eksperymentu, dyskusji i wniosku. Prosiłabym jedynie o dwa krótkie wyjaśnienia: **czym spowodowana była decyzja o wyborze maksymalnego stężenia nadchloranu magnezu, niemal dwukrotnie przewyższające stężenie**





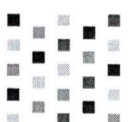


znane z materiału marsjańskiego, które samo w sobie i tak znacznie przekracza ziemskie stężenia tego związku, oraz z czego wynikał czas ekspozycji (24 i 72 godziny)? W szerszym kontekście prosiłabym również o komentarz na temat odniesienia analiz ekspozycji w roztworach wodnych podczas gdy w przestrzeni kosmicznej występują warunki bezwodne, które z kolei prowokują ekstermofile do kryptobiozy. I na koniec, czy przeprowadzone analizy zmieniają Pani pogląd na niesporczaki jako organizmy tolerujące skrajne warunki środowiskowe, w porównaniu z innymi zwierzętami zestawionymi w Pani porównaniach?

Kwestie narażenia ekstremofili na skrajne warunki środowiskowe omawia także kolejny z artykułów, poświęcony histologicznym i biochemicznym (poziom komórek HSP-pozytywnych) parametrom niesporczaków z gatunku *Paramacrobiotus experimentalis* w odpowiedzi na spektrum temperatur od 20 °C do -42 °C. Także i z tymi badaniami zapoznałam się z satysfakcją, zarówno metodyczną jak i sposobem analizy i wnioskowania. W szczególności zwróciła moja uwagę metoda ilościowej oceny zawartości HSP metoda cytometrii przepływowej. **Chciałabym zapytać Doktorantkę po pierwsze o źródło metody (nie podane w manuskrypcie) i o plusy i minusy tej metody z punktu widzenia doświadczenia i praktyki jej zastosowania.** Niezależnie od potencjału metody mam jednak pewne zastrzeżenia co do uwzględnienia w pomiarze i analizie komórek pochodzących z osobników z grupy poddanej ekspozycji na temperaturę 42 °C. Fig. 5 przedstawia wskaźniki związane z HSP. Gwiazdki na wykresach wskazują statystycznie istotne różnice, jednak niejasne jest, w jakim zestawieniu stwierdzono te różnice. Czy w porównaniu z grupą o najniższej temperaturze ekspozycji? Nie ma tej informacji w podpisie rysunku. Ponadto, w opisie rezultatów Autorzy na stronie 6/24 podają informację, że w tej grupie nie przeżyły żadne osobniki. Uważam więc, iż uwzględnianie ich w analizie cytometrycznej jest nieuzasadnione, gdyż wówczas wartości ilościowe są przypadkowe, nie odzwierciedlają rzeczywistego poziomu stresu komórkowego. **Proszę Doktorantkę o komentarz w tej sprawie.**

Realizacja celów 4 i 5 z 22-giej strony autoreferatu została udokumentowana w ostatnim z załączonych manuskryptów. W mojej ocenie stanowi on gruntowną monografię poświęconą rodzajowi *Paramacrobiotus* opracowaną w oparciu, między innymi, o wcześniejsze osiągnięcia Doktorantki. Zwieńczeniem manuskryptu, jak i, moim zdaniem, całego osiągnięcia poddanego niniejszej ocenie, jest czytelny, w odbiorze osoby niezwiązanej naukowo z tą grupą zwierząt, klucz do oznaczania gatunków w obrębie badanego rodzaju. Domyślam się, że stanowi on duże udogodnienie dla tardigradologów.

Podsumowując analizę treści pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji stwierdzam, iż rozprawa doktorska w jednoznaczny sposób dokumentuje i dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej kandydatki w dyscyplinie, zgodnie z wymogami obowiązującej ustawy. Jak wspomniałam we wstępnej części recenzji, Pani mgr Pushpalata Kayastha posiadała gruntowne rozeznanie, które





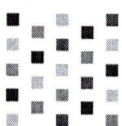
pozwoili jej sformułować przesłanki, zaplanować analizy i eksperymenty, prawidłowo je zanalizować, przedyskutować i sformułować wnioski. Pomimo zgłaszanych uwag i zastrzeżeń nie mogę nie docenić ogromnego odczytania Doktorantki, swobody i naukowego rozmachu w stawianiu pytań i sięganiu po narzędzia, a także współpracy w licznych zespołach, bez której uzyskanie przedstawionych osiągnięć nie byłoby możliwe.

Nie ulega również wątpliwości, że przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnoszące wiele naukowej nowości, dotyczącego szeroko rozumianej interakcji niesporczaków z rodzaju *Paramacrobionus* ze środowiskiem. Treść zarówno autoreferatu, jak i opublikowanych artykułów odpowiada podjętym założeniom w sposób dokumentujący i dowodzący, że podjęto metodologicznie prawidłową próbę rozwiązania problemu badawczego, uzyskane wyniki poddano adekwatnej analizie statystycznej i czytelnie wyrażono graficznie. Następnie, jak wspomniałam wyżej, w sposób nie budzący zastrzeżeń przeprowadzono wnioskowanie. Stwierdzam także, że na podstawie treści materiałów można przyjąć, że Kandydatka, mgr Pushpalata Kayastha, posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Świadczy o tym dodatkowo pokaźna liczba innych publikacji, niewskazanych jako podstawa wniosku o stopień doktora.

### Forma rozprawy doktorskiej

Stwierdzam, że rozprawę stanowi zbiór pięciu opublikowanych lub podlegających procedurze recenzyjnej i powiązanych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych autoreferatem, dostarczony do recenzentki w formie nieprzyjaznego środowiskowo jednostronnie drukowanego tomu w sztywnej oprawie. Materiał jest kompletny, uporządkowany, czytelny i stanowi logiczną całość. Pozytywnie zwraca uwagę język autoreferatu: jest to dojrzały, elegancki język naukowy. Autorka precyzyjnie wyraża swoje myśli, bez nadmiaru słów, w sposób skondensowany, ale przy tym jednoznaczny. Doktorantka w logicznej kolejności wprowadza kolejne treści.

Forma rozprawy doktorskiej z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń.







### Wniosek końcowy

Praca doktorska mgr Pushpalaty Kayasthy stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Doktorantka, w mojej ocenie, wykazała się dużym zaangażowaniem w realizację projektu doktorskiego, szeroką wiedzą wynikającą z odczytania oraz umiejętnością zadawania nowych pytań na podstawie zdobywanego doświadczenia i odpowiedzi uzyskiwanych z wcześniej rozwiązywanych zagadnień. Ponadto posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam zatem, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2023 poz. 742). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

*Agnieszka Jabczyńska*

