

Łódź, 28.09.2015

Prof. dr hab. Piotr Frankiewicz  
Katedra Ekologii Stosowanej  
Uniwersytet Łódzki

## **OCENA**

**pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Ludwikowskiej  
pt. „Ocena toksycznego wpływu wybranych fungicydów na organizm ryb”**

Zrównoważone gospodarowanie wodami, zgodne ze wskazaniami ramowej Dyrektywy Wodnej, wymaga dobrego rozpoznania zagrożeń na jakie narażone są, w wyniku antropopresji, ekosystemy słodkowodne. Podczas gdy biocenotyczne skutki nadmiernej eutrofizacji czy zanieczyszczeń metalami ciężkimi są stosunkowo dobrze zbadane, to dostające się do wód toksyczne środki ochrony roślin są wciąż jednym ze słabo rozpoznanych niebezpieczeństw, zwłaszcza dla stojących na szczycie łańcucha pokarmowego kręgowców wodnych. Stąd, przeprowadzone przez doktorantkę badania wpływu subtoksycznych, a więc najczęściej spotykanych w środowisku, stężeń wybranych fungicydów, na organizm karpia, zasługują na duże uznanie. Autorka podjęła się ambitnego i trudnego zadania oceny oddziaływania fungicydów zarówno na wytypowane narządy karpia, gdzie śledzone były zmiany histopatologiczne i ultrastrukturalne, jak i na jego stan fizjologiczny, określany na podstawie wskaźników metabolicznych i hematologicznych. Ponieważ karp jest gatunkiem dominującym w krajowej akwakulturze, a prawdopodobieństwo zanieczyszczenia stawów hodowlanych pestycydami jest znaczne, wyniki przeprowadzonych badań mogą mieć, obok wartości poznawczych, także znaczenie aplikacyjne.

Praca obejmuje 173 strony, zawierających, obok tekstu, aż 113 wysokiej jakości fotografii, 14 rycin i 15 tabel. Cytowana literatura liczy 115 pozycji. W odróżnieniu od pozostałych części maszynopisu, przygotowanych pod względem edytorskim bardzo starannie, spis literatury został opracowany mniej uważnie, co jest niestety często obserwowane przy nanoszeniu do ostatniej chwili zmian w tekście, za którymi nie idzie uaktualnianie spisu cytowanych prac. Zapewne z tego powodu nie znalazłem w tekście

cytowania aż 13 prac (Canton 1976; Crestani i wsp. 2007; Gosiewski i wsp. 2012; Konwick i wsp. 2006; Krzysztofik i wsp. 1994; Kuck i wsp. 1995; Laskowski i Migula 2004; Leonard 1990; Rand i Petrocell 1985; Schmidt-Nielsen 2008; Van den Bring i wsp. 2000; Van Wijngaarden i wsp. 1998), znajdujących się w spisie literatury. Z drugiej strony w spisie nie znalazło się 5 prac cytowanych w tekście (de Jonge i wsp. 1998; Scott i Sloman 2004; Duncombe 1964; Iwanova 1970; Atamanalp i Yanik 2014). W kilku przypadkach brak jest także zgodności pomiędzy spisem literatury a cytowaniem w tekście, co do liczby autorów, lub roku opublikowania pracy. I tak w spisie podano prawidłowo Silbergeld 1974, a w tekście na stronie 15: Silbergeld i wsp. 1974; z kolei w przypadku pracy Schwaiger i wsp. - w spisie widnieje rok 1997, a w tekście na stronie 142, błędnie, rok 1998; na tej samej stronie w cytowanej pracy Betelho i wsp. 2012 nazwisko autora zapisane jest błędnie jako „Bothelo”. Chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na konieczność stosowania ujednoliconych zasad cytowania, a więc np. konsekwentnego używania pełnych nazw czasopism (co nie zawsze miało miejsce).

Chciałbym podkreślić, że praca doktorska napisana jest poprawnym i jasnym językiem. Jednak radziłbym unikać niefortunnie brzmiących sformułowań typu „zmiany o charakterze istotności statystycznej”, jakie można znaleźć na stronie 120.

Podczas czytania kolejnych rozdziałów pracy zwraca uwagę komunikatywnie napisany wstęp, świadczący o dobrej orientacji Autorki w podjętej tematyce badań oraz jasno sformułowane cele badawcze. Co prawda Doktorantka optymistycznie napisała we wstępie, powołując się na pracę Jadwigi Kalety, że produkcja pestycydów na świecie wynosiła na początku XXI wieku ok. kilku tysięcy ton rocznie, ale muszę zweryfikować tę informację, gdyż niestety są to setki tysięcy ton i takie właśnie wartości podaje zresztą autorka cytowanego artykułu.

Zastosowane w pracy metody nie budzą wątpliwości w przypadku pierwszego etapu badań eksperymentalnych. Co do układu eksperymentalnego w drugim etapie pojawiają się pewne niejasności. Autorka pisze, że każdej grupie eksponowanej na fungicyd podporządkowano grupę kontrolną. Patrząc jednak na wyniki dotyczące analizy wskaźników metabolicznych i wskaźników białokrwinkowych przedstawione na wykresach i w tabelach widać wyraźnie, że ryby eksponowane na mankozeb i prochloraz posiadały wspólną grupę kontrolną (wartości średnie i odchylenia standardowe są dla  $K_M$  i  $K_P$  identyczne), a eksponowane na tebukonazol osobną grupę. Mogę się domyślać, że eksperyment z ekspozycją na mankozeb i prochloraz był wykonywany w tym samym czasie, a eksperyment z ekspozycją na tebukonazol w innym i stąd obecność grupy kontrolnej  $K_T$ . Ale jeśli tak, to

dlaczego w przypadku aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) wartości  $K_M$  i  $K_P$  się różnią? Podobne niejasności są w przypadku grup kontrolnych przy badaniu wskaźników czerwonokrwinkowych. Większe wątpliwości budzi jednak sposób prowadzenia kontroli. Zmiany wskaźników metabolicznych i hematologicznych pod wpływem działania fungicydów są odnoszone do wartości tych wskaźników mierzonych w grupach kontrolnych na początku danego eksperymentu. Prawdziwa kontrola powinna jednak polegać na równoległych pomiarach badanych wskaźników przez cały okres eksperymentu, także u ryb z grupy kontrolnej, bo tylko wtedy mielibyśmy pewność, że obserwowane zmiany wskaźników w grupach poddanych działaniu fungicydów nie są np. wynikiem stresu związanego z manipulacjami jakim poddawane były ryby podczas eksperymentu. Kolejna uwaga odnośnie metod dotyczy analiz statystycznych. Doktorantka pisze o stosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji do testowania istotności różnic w wartościach wskaźników metabolicznych i hematologicznych pomiędzy badanymi grupami ryb. Tymczasem w rozdziale „Wyniki” nie znalazłem żadnych rezultatów tych analiz. Swoją drogą prawidłową procedurą przy testowaniu tego typu danych byłaby analiza wariancji z powtarzaniem pomiarów.

Jeśli chodzi o wyniki badań, to przedstawione są w sposób przejrzysty, a ich opis można łatwo śledzić dzięki licznym fotografiom, rycinom i tabelom. Co prawda większość informacji zawartych w tabelach i na rycinach się dubluje, ale rozumiem, że Autorce chodziło o ułatwienie czytelnikowi śledzenia wyników. Jednak przy przygotowywaniu pracy do publikacji radzę pozostać przy rycinach, uzupełniając je jedynie wartościami odchylenia standardowego. Szczególnie wartościową częścią pracy, nie budząc wspomnianych wcześniej zastrzeżeń metodycznych jest, w mojej opinii, analiza patomorfologiczna wybranych narządów karpia oraz elementów morfotycznych krwi obwodowej. Śledząc prowadzoną przez doktorantkę czytelną i zwięzłą analizę świetnie wykonanych zdjęć, nie mamy wątpliwości jak niebezpieczne dla ryb są nawet niewielkie dawki fungicydów.

Również wyniki dotyczące zmian wskaźników metabolicznych i hematologicznych pod wpływem działania fungicydów są bardzo interesujące, choć wiarygodność ich interpretacji i wyciąganych wniosków byłaby zdecydowanie wyższa, gdyby w eksperymentach przyjęto właściwy sposób prowadzenia kontroli, a do analizy wyników zastosowano silniejszą procedurę testowania.

Przechodząc do zwięzle napisanego rozdziału „Dyskusja wyników” chciałbym podkreślić, że Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury przedmiotu oraz umiejętnością właściwej interpretacji uzyskanych wyników badań. Wyciągnięte wnioski są prawidłowe i spójne z postawionymi celami pracy.

Z obowiązku recenzenta chciałbym jeszcze wskazać na kilka drobnych potknięcia, które należałoby usunąć podczas przygotowywania publikacji. Wymieniam je w kolejności napotykania w tekście:

1. We wzorze na objętość krwinki czerwonej (str. 28) podana jest błędna jednostka - zamiast  $m^3$  powinny być  $\mu m^3$ .
2. W nagłówkach tabel: 10, 11 i 12 umieszczona jest informacja, że „x” oznacza brak analiz w danym czasie trwania eksperymentu, chociaż takie sytuacje nie miały miejsca. Niestety w przypadku kopiowania i wklejania nagłówków podobnych tabel, czasami pojawiają się takie lapsusy.
3. Na stronie 124 znajdujemy informację, że odsetek monocytów w okresie ekspozycji na prochloraz zmniejszył się istotnie po 14 dniach ekspozycji, a z tabeli wynika, że najniższy odsetek monocytów wystąpił już po 24 godzinach!
4. W dyskusji, na stronie 136, Autorka stwierdza, że największą sekrecję kortyzolu we krwi ryb narażonych na fungicydy notowano w pierwszych godzinach narażenia, co jest nadinterpretacją, gdyż na rycinie 2 wyraźnie widać, że miało to miejsce jedynie w przypadku ekspozycji ryb na mankozeb, a w przypadku dwóch pozostałych herbicydów nastąpił gwałtowny spadek stężenia tego hormonu.

Na koniec chciałbym jeszcze podzielić się refleksją, że z punktu widzenia ekologa czuję pewien niedosyt, gdyż brakuje w tej pracy informacji czy wpływ fungicydów na parametry metaboliczne, hematologiczne i patomorfologiczne, był także odzwierciedlony w tempie wzrostu badanych ryb i w ich kondycji. Wystarczyło przecież zmierzyć i zważyć ryby z każdej grupy na początku i na końcu eksperymentu, by uzyskać dodatkowe, ciekawe dane, które mogłyby rozszerzyć interpretację uzyskanych wyników.

Przedstawione przeze mnie niedoskonałości obecne w pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Ludwikowskiej w żadnym razie nie zmieniają mojej generalnie pozytywnej oceny pracy, którą uważam za cenny wkład do poznania negatywnych skutków przenikania pestycydów do ekosystemów wodnych. Mam nadzieję, że moje uwagi przyczynią się do doskonalenia warsztatu badawczego doktorantki.

**Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i stąd wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Ludwikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Piotr Franuliewicz*