



prof. dr hab.
Krzysztof Kukula
Katedra Biologii Środowiska
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 28 września 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Ocena toksycznego wpływu wybranych fungicydów na organizm ryb”

wykonanej przez mgr inż. **Agnieszkę Ludwikowską**

pod kierunkiem dr hab. lek. wet. Hanny Lutnickiej

w Katedrze Hodowli Drobiu, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny

Uniwersytetu Rolniczego

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Rozprawę stanowi praca licząca 149 stron. Oprócz części tekstowej zawiera ona 15 tabel i 14 ryciny oraz 113 fotografii. Zastosowany podział rozprawy na rozdziały i podrozdziały jest logiczny, dzięki czemu zgromadzony materiał przedstawiony został w sposób czytelny.

Autorka podjęła interesujący temat wpływu powszechnie stosowanych fungicydów na ryby, będące dobrymi organizmami modelowymi dla środowiska wodnego. Wzięte zostały pod uwagę zmiany histopatologiczne i zmiany ultrastruktury komórek w wybranych narządach karpia, oraz analizowano także wskaźniki metaboliczne i hematologiczne mogące świadczyć o zaburzeniach stanu fizjologicznego ryb pod wpływem związków chemicznych. Ponieważ fungicydy są szeroko stosowanymi pestycydami w środowisku wodnym stwierdzane są często w znaczących ilościach. Skład chemiczny tych substancji powoduje, że mogą wpływać niekorzystnie na zwierzęta wodne, ale także ograniczać możliwości wykorzystania wód powierzchniowych przez człowieka.

Ryby są dobrymi organizmami modelowymi, ze względu na ich szczytowe położenie w łańcuchu troficznym ekosystemów wodnych. Zaburzenia środowiska, szczególnie antropogeniczne, wpływają na poszczególne osobniki i widoczne są w postaci zmian wskaźników populacyjnych. Należy podkreślić, iż mimo powszechności występowania w środowisku dane o wpływie fungicydów i ich pozostałości na ryby są niewystarczające.

Przedstawiona do recenzji rozprawa poświęcona jest zatem istotnemu problemowi. Nie ma zbyt wiele badań, w których poruszone byłyby zagadnienia wpływu fungicydów na organizm ryby z perspektywy zmian histopatologicznych, a jeszcze mniej opracowań skupia się na zmianach wewnątrzkomórkowych.

Autorka umiejętnie wypełnia lukę istniejącą do tej pory w naszej wiedzy. Wykorzystała nowoczesne metody badawcze. Pokazała, że z powodzeniem potrafi zastosować klasyczne techniki mikroskopii świetlnej, ale, co szczególnie warto podkreślić, wykazała się umiejętnością przygotowania i analizy preparatów w elektronowym mikroskopie skaningowym i transmisyjnym. Praca imponuje dużą liczbą dobrych technicznie zdjęć mikroskopowych doskonale ilustrujących podjęty temat. Dużą wartość mają także wykonane przez Autorkę szerokie badania fizjologiczne. Wybrane do analiz parametry fizjologiczne zostały dobrze dobrane do postawionych celów badawczych.

Choć ocena ogólna recenzowanej rozprawy jest moim zdaniem pozytywna, to jednak Autorka nie ustrzegła się błędów, a niektóre części pracy wymagają wyjaśnień.

W rozdziale **Wstęp** scharakteryzowane zostały grupy fungicydów, rodzaje substancji czynnych i ich trwałość w środowisku. Autorka podkreśliła, że nawet niskie stężenia substancji toksycznych mogą po dłuższym czasie ekspozycji wywoływać nieodwracalne zmiany w środowisku.

Charakter rozdziału **Wstęp** z natury wymaga skrótów, ale niektóre sformułowania są zbyt ogólnikowe i nie brzmią najlepiej, np. na stronie 6, drugi akapit „*Globalny rynek ochrony upraw wykazuje umiarkowaną tendencję wzrostową...*”, czy strona 7: „*Fungicydy wydają się być nieodłącznym elementem współczesnej gospodarki...*”. Powinno się unikać takich uproszczeń, jak brak przymiotników w pierwszym zdaniu ze strony 13, gdzie są wskazane właściwości fungicydów, np. rozpuszczalność, ale bez doprecyzowania czy jest ona duża, czy mała. Trudno także zaakceptować stwierdzenie z końcowego akapitu ze strony 16: „*...substancje toksyczne dają obraz zmian bioznaczników hematologicznych...*”, które myli skutki z przyczynami.

Obok skrótów, których przykłady podałem powyżej pojawiają się we **Wstępie** zbędne dodatki, w postaci umieszczonych w nawiasach wyjaśnień ter minów oczywistych np. na

stronie 6 „... substancje aktywne (biologicznie czynne)”, czy na stronie 16 wyjaśnienie terminu „bioindykator”. W tym rozdziale pojawiają się też oderwane od kontekstu fragmenty np. drugi akapit na stronie 9, czy początkowe zdanie z drugiego akapitu na stronie 15. W tej części pracy są też nieliczne błędy stylistyczne, np. w tytule Tabeli 1, na stronie 12 w zdaniu zaczynającym się od słów: „Ze względu na stabilność...”, czy też zwroty potoczne np. „obszary czyste ekologicznie”. Błędne jest również użycie w pierwszym akapicie podrozdziału **Cel pracy** określenia „gatunek” do organizmów (glony, mięczaki, ryby), które nie mają rangi gatunku.

Wszystkie powyższe uwagi mają w większości charakter redakcyjny, są łatwe do poprawienia i nie obniżają wartości pracy. Natomiast większy ciężar gatunkowy ma brak wyraźnie określonej hipotezy badawczej. W ostatniej części **Wstępu** Autorka szeroko opisuje powody podjęcia tematu i formułuje **Cel pracy**, ale hipotezy badawczej nie przedstawia.

Rozdział **Materiał i metody** zawiera szczegółowy opis testowanych fungicydów. Autorka wybrała 3 preparaty, które różnią się budową chemiczną i trwałością w środowisku. Zastosowane stężenia wyjściowe poszczególnych fungicydów zostały dobrane na podstawie znanej z literatury wartości LC_{50} . Odniesienie do LC_{50} to niezwykle ważne ustalenie w przygotowaniu eksperymentu. Autorka ograniczyła się jednak do stwierdzenia, że: „Zastosowane stężenia stanowią nie więcej niż 25% tej wartości”. Czyli ile? Brakuje tu konkretnych informacji, jaki procent wartości LC_{50} stanowiły użyte do doświadczeń stężenia poszczególnych preparatów. We Wstępie w tabeli 3 są pewne dane na ten temat, ale rozbieżności między użytymi stężeniami a danymi z tej tabeli należy wyjaśnić. Interesujące, choć z różnych względów trudne, byłoby określanie rzeczywistego stężenia fungicydów w wodzie z akwarium w kolejnych dniach eksperymentu.

Dalej Autorka opisuje techniczną stronę eksperymentu - rozdziały **Zwierzęta doświadczalne** (na marginesie, zwrot z 1. zdania „... wykorzystano ryby z gatunku karp *C. carpio* L.” nie brzmi dobrze.) i **Układ doświadczenia**. Niestety opis jest zbyt skrótowy i w efekcie przebieg doświadczenia nie jest jasny. Zbyt skrótowe przedstawienie układu doświadczenia powoduje także trudności w interpretacji wyników.

Doświadczenie wykonywano przez 3 lata (2011-2013). „Wiosną pozyskiwano ryby do doświadczenia”... i od tego momentu trudno czytelnikowi odtworzyć jego przebieg. Stąd poniższe pytania:

1. Czy analizy patomorfologiczne i fizjologiczne wykonywano na tych samych zwierzętach?
2. Co robiono, gdy w czasie doświadczenia któryś z osobników padł?
3. W tabeli 5 podano, że w akwariach było po 10 osobników (powinno być „liczba” nie „ilość”, podobnie w odniesieniu do aplikacji). Czy była to całkowita liczba ryb w doświadczeniach?

Największe wątpliwości budzi podrozdział **Analiza statystyczna danych**. Pierwszy akapit wskazuje, że prawdopodobnie wykorzystano test – t lub jego nieparametryczny odpowiednik, o czym pośrednio, ale nie jednoznacznie, świadczą tabele z części wynikowej pracy. Natomiast w drugim akapicie mowa jest m.in. o badaniu normalności rozkładów poszczególnych parametrów metabolicznych i hematologicznych, o teście Levene’a, teście post hoc Tukeya oraz analizie wariancji, ... ale wyników tych analiz w dalszej części pracy nie można znaleźć! Dodać należy, że przy tym układzie doświadczenia poprawnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie analizy wariancji w układzie powtarzanych pomiarów.

Autorka nie pokusiła się o zbadanie czy istniały korelacje między parametrami hematologicznymi czy metabolicznymi a czasem ekspozycji na fungicyd.

Rozdział **Wyniki** podzielony jest na logiczne części. Najdłuższy jest podrozdział **Analiza patomorfologiczna** (60 stron). Znalazły się w nim szczegółowe opisy obserwowanych zmian histopatologicznych i ultrastruktury komórek badanych narządów. Jest to najmocniejsza część pracy. Rozdział jest ilustrowany przez 113 fotografii spod mikroskopów. Zdjęcia są bardzo czytelne i dobrze prezentują zmiany wywołane przez fungicydy. Moim zdaniem tą część pracy wzmocniłaby tabela (lub tabele) podsumowująca, zwracająca uwagę na najważniejsze zmiany w tkankach i komórkach. W wersji skróconej takie podsumowanie znalazło się dopiero w pierwszym wniosku na stronie 145.

Wyniki badań zmian wskaźników hematologicznych zostały zaprezentowane w postaci wykresów liniowych i tabel. Porównywane były każdorazowo wartości z próby kontrolnej z wartościami uzyskanymi w danym terminie dla każdego z badanych fungicydów. Istotność różnic między średnimi była zatem badana testem dla dwóch średnich. Autorka nie

zdecydowała się jednak na porównania wyników między testowanymi fungicydami, czy na analizy trendów, co pozwoliłoby na pełniejsze wykorzystanie zebranych materiałów.

Zastanawiające są duże różnice między wartościami niektórych parametrów w grupach kontrolnych. Może to świadczyć o dużej zmienności wewnątrzpopulacyjnej ryb użytych do doświadczeń.

W rozdziale **Wyniki**, podobnie, jak w rozdziale **Wstęp**, o czym już wspominałem, pojawiają się zbędne wyjaśnienia oczywistych terminów np. strona 30 – „naczynia włosowate (kapilary)”.

Dyskusja wyników jest poprowadzona poprawnie, choć i tu pojawiają się wątpliwości, co do trafności zaproponowanych przez Autorkę rozwiązań. W moim odczuciu na tej części pracy zaciążył stosunkowo skromny zestaw wybranej przez Autorkę pozycji literatury (jedynie 115 pozycji). Przy czym z tej liczby dużą część stanowi literatura o charakterze ogólnym. W efekcie pojawiają się akapity np. strona 135, akapit 1, czy strona 136, akapit 2, niepoparte literaturą. Podobnie podawane są bez wskazania źródeł informacje (np. strona 140) niebędące wynikiem własnych badań Autorki. W **Dyskusji** znalazły się (np. strony 136-137) zbyt szerokie opisy wyników, będące powtórzeniami z rozdziału **Wyniki**, z komentarzami własnymi Autorki, bez elementów dyskusji z innymi autorami.

Moim zdaniem ciekawym elementem dyskusji mogłyby stać się szersze rozważania wiążące uzyskane przez Autorkę wyniki z obecnością fungicydów w wodach powierzchniowych.

Przedstawione w rozdziale V **Wnioski** są poprawne, choć wniosek ostatni jest zbyt ogólny i nie wynika z przedstawionych przez Autorkę materiałów.

Spis literatury został przygotowany niestarannie. Brak jest ujednoliconego systemu cytowania i nazwy czasopism raz są pełne, innym razem skrócone. Ze znajdujących się w spisie literatury pozycji aż 12 prac nie jest cytowanych w tekście (m.in. Canton 1976; Konwick i wsp. 2006; Krzysztofik i wsp. 1994; Kuck i wsp. 1995; Schmidt-Nielsen 2008; Van den Bring i wsp. 2000; Van Wijngaarden i wsp. 1998), a jednocześnie Autorka zacytowała prace, których nie ma w spisie literatury (Scott i Sloman 2004; Duncombe 1964; Iwanova 1970; Atamanalp i Yanik 2014).

Podsumowując stwierdzam, że w przedstawionej do oceny rozprawie został w sposób oryginalny i właściwy zbadany interesujący problem naukowy. Rozprawa wnosi wiele informacji na temat wpływu fungicydów na organizm ryby, a uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w ocenie zagrożeń środowiska wodnego przez środki chemiczne stosowane do ochrony roślin. Wskazane w recenzji uchybienia nie obniżają rangi rozprawy. Po wprowadzeniu poprawek i uzupełnień przedstawiona rozprawa może stać się podstawą ciekawych artykułów naukowych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska „**Ocena toksycznego wpływu wybranych fungicydów na organizm ryb**”, wykonana przez Panią mgr inż. Agnieszkę Ludwikowską spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr 65, poz. 595), dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Ludwikowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr. hab. Krzysztof Kukula

