

**Uniwersytet Jagielloński
w Krakowie
Instytut Nauk o Środowisku**

**Warsztaty z Biologii Ewolucyjnej
dla doktorantów**

**Ochotnica Górna
5- 10 października 2007**

SPIS TREŚCI

I	Organizatorzy i uczestnicy	3
II	Kiksy	3
III	Grupy badawcze	4
IV	Tematy zaproponowane przez uczestników	6
V	Projekty i recenzje	7
1.	Ocena wpływu niskich stężeń ołowiu w pokarmie na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej <i>Myodes glareolus</i> - Justyna Morawska – Płoskonka, Dominika Dragosz , Katarzyna Bojarska, Leszek Bujoczek	
	a) Pierwsza wersja projektu	7
	b) Recenzje	11
	c) Ostateczna wersja projektu	16
2.	Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (<i>Molinietalia</i>) na różnorodność dzikich pszczół – Agnieszka Bednarska; Michał Ciach; Dawid Moron	
	a) Pierwsza wersja projektu	20
	b) Recenzje	24
	c) Ostateczna wersja projektu	30
3.	Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej <i>Apis mellifera</i> – Małgorzata Bylicka; Karolina Kuszewska; Rafał Martyka	
	a) Pierwsza wersja projektu	34
	b) Recenzje	37
	c) Ostateczna wersja projektu	41
4.	Czy kosa zjadają owoce bogate w roślinne metabolity wtórne aby pozbyć się pasożytów układu pokarmowego? – Magdalena Lenda, Zofia Prokop, Maciej Ejsmond	
	a) Pierwsza wersja projektu	44
	b) Recenzje	47
	c) Ostateczna wersja projektu	53

Organizatorzy i recenzenci:

Dr hab. Mariusz Cichoń, Zespół Ekologii Populacyjnej INoŚ UJ,
Dr Marcin Czarnołęski, Zespół Hydrobiologii INoŚ UJ,
Mgr Łukasz Sobczyk, Zespół Ekologii Ekosystemów INoŚ UJ,
Dr Hajnalka Szentgyörgyi Zespół Ekologii Behawioralnej INoŚ UJ,

Uczestnicy:

Agnieszka Bednarska, Zespół Ekotoksykologii i Ekologii Stresu INoŚ UJ,
Katarzyna Bojarska, Zespół Biologii konserwatorskiej i Edukacji Środowiskowej INoŚ UJ
Leszek Bujoczek, Wydział Leśny AR w Krakowie
Małgorzata Bylicka, Wydział Leśny AR w Krakowie,
Michał Ciach, Wydział Leśny AR w Krakowie,
Dominika Drogosz, Zespół Ewolucji Strategii Życiowych INoŚ UJ,
Maciej Ejsmond, Zespół Ewolucji Strategii Życiowych INoŚ UJ,
Karolina Kuszewska, Zespół Ekologii Behawioralnej INoŚ UJ,
Magdalena Lenda Zespół Ekologii Behawioralnej INoŚ UJ,
Rafał Martyka, Zespół Ekologii Populacyjnej INoŚ UJ,
Justyna Morawska – Płoskonka, Zespół Ekotoksykologii i Ekologii Stresu INoŚ UJ,
Dawid Moroń, Zespół Ekologii Behawioralnej INoŚ UJ,
Zofia Prokop, Zespół Ekologii Molekularnej i Behawioralnej INoŚ UJ

I. Kiksy

Na pewno owce będą szczęśliwe siedząc w oborze i słuchając wycia wilków (JM)

Co Wy rozumiecie pod pojęciem „wilk”? (ME)

Jak się ma pies do kosa? (ZP)

Czy nie byłoby fajnie i ciekawie zabić te zwierzaki? (ZP)

Po co generalnie naciskać na ochronę przyrody? (ME)

Zróbmy klatki dla kosów w kształcie kosów – zajmą mniej miejsca (ME)

Prowadzący



Dr hab. Mariusz Cichoń

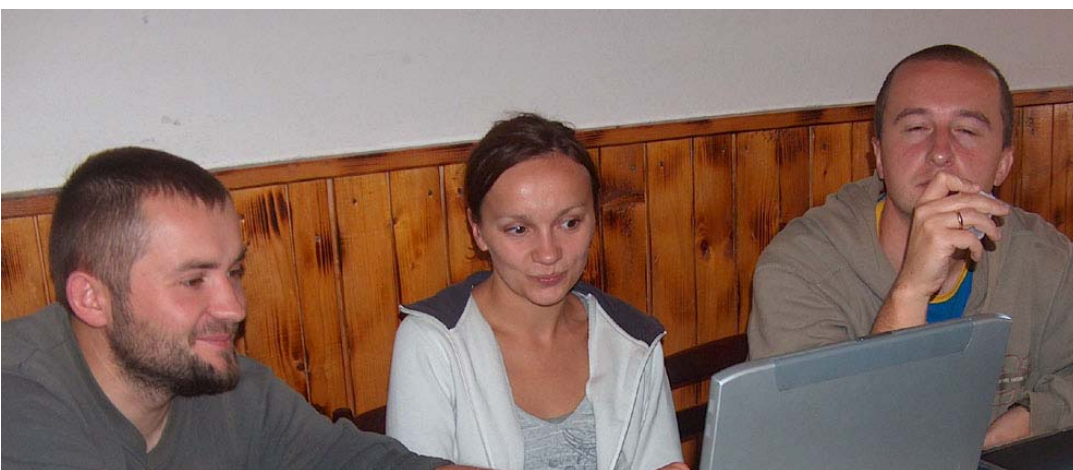


Mgr Łukasz Sobczyk

Uczestnicy



Justyna Morawska – Płoskonka, Katarzyna Bojarska, Dominika Dragosz, Leszek Bujoczek



Michał Ciach; Agnieszka Bednarska; Dawid Moron



Maciej Ejsmond, Zofia Prokop, Magdalena Lenda



Małgorzata Bylicka; Karolina Kuszewska; Rafał Martyka

Gość specjalny - Niuniuś



Tematy zaproponowane przez uczestników:

1. Odziedziczalność śpiewu ptaków. (RM)
2. Wpływ jakości pokarmu na immunokompetencję (owady). (RM)
3. Wybiórczość partnerki przez samca. (RM)
4. Wpływ liczby i masy urodzeniowej starszych braci na masę urodzeniową chłopców. (ZP)
5. Względna rola doboru pre i postkopulacyjnego u gatunków promiskuitycznych u bezkręgowców. (ZP)
6. Transfer genów z roślin GMO do mikroorganizmów glebowych. (ZP)
7. Zmiany w budżecie energetyczny na poziomie komórkowym w zależności od zanieczyszczenia. (AB)
8. Różnice w bioróżnorodności fauny w fitotelmata a innymi zbiornikami wodnymi. (AB)
9. Bioróżnorodność motyli nocnych w zależności o wysokości npm. (AB)
- 10. Wpływ użytkowania nasypów kolejowy na różnorodność fauny zapylaczy. (DM)**
- 11. Wpływ zarastania łąk (krzewy) na różnorodność gatunków dzikich pszczół. (DM)**
12. Czy różnorodność roślin kwiatowych wpływa na rozprzestrzenianie się patogenów u trzmieli. (DM)
13. Wpływ interakcji metali ciężkich i pestycydów na przeżywalność robotnic pszczoły miodnej. (KK)
14. Wpływ szerokości geograficznej na średnią długość życia robotnicy pszczoły miodnej. (KK)
15. Wpływ kondycji samicy na płęć potomstwa (gady). (KK)
- 16. Wpływ wycia (sztucznego) na poziom stersu u wilków. (KB)**
17. Zależność synantropizacji od stopnia antropopresji u niedźwiedzi. (KB)
- 18. Wpływ ciąży na zdolności poznawcze u ludzi. (KB)**
19. Wpływ UV na pasożyty piór u ptaków. (ML)
20. Czy ptaki owocożerne jedzą toksyczne dla nich owoce aby pozbyć się pasożytów. (ML)
21. Wpływ fitohormonów na cykl rozrodczy i proporcje płci u gryzoni. (ML)
22. Czy zróżnicowanie genetyczne w obrębie roślin pochodzące z rozmnażania wegetatywnego wpływa na odporność na patogeny. (ME)
23. Wpływ światła na stopień rozmnażania wegetatywnego (kłącza) u roślin runa w lasach. (ME)
24. Wpływ zróżnicowania siedlisk na zróżnicowanie zachowania u prostoskrzydłych. (ME)
25. Wpływ mikroorganizmów (transformujących metale ciężkie) na usprawnienie fitoremediacji. (JM)
26. Wpływ pokarmu roślinnego z jezior (osady) zanieczyszczonych na zdolności reprodukcyjne kaczki krzyżówki. (JM)
27. Wpływ zbiorników zaporowych na rozwój korzeni roślin szuwarowych w ciekach poniżej zapory. (JM)
28. Wpływ porodu (naturalny lub sztuczny) na instynkt macierzyński. (DD)
29. Wpływ czynników środowiskowych (wilgotność) na liczebność stonki ziemniaczanej. (DD)
30. Wpływ dystansu między miejscami urodzenia rodziców na wzrost potomstwa. (DD)
31. Wpływ obumarłych drzew (kłody bukowe) na odnowienia lasu. (LB)
32. Dynamika unaturalnienia lasu a pojawianie się rzadkich gatunków roślin. (LB)
33. Wpływ wielkości luk w drzewostanie na ekspansję gatunków charakterystycznych dla poszczególnych regli. (LB)
34. Wpływ stresu środowiskowego na strategię lęgową u ptaków. (MC)
35. Mechanizmy konkurencji u gatunków bliźniaczych. (MC)
36. Mechanizmy wyboru miejsca na spoczynek u zwierząt. (MC)
37. Wpływ stopnia rozkładu drewna świerkowego na żerowanie dzięcioła trójpalczastego. (MB)
38. Wpływ chemizmu wody (opad liści) na występowanie traszek. (MB)
39. Różnica w eksploatacji pokarmu w danym środowisku pomiędzy okresem lęgowym a okresem migracji ptaków. (MB)

Wyłuszczone tematy zostały wybrane do opracowania**Wykonano:**

- Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (*Turdus merula*).
- Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów.
- Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*.
- Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinieta*) na różnorodność dzikich pszczół

Projekty i recenzje:

1. Ocena wpływu niskich stężeń ołowiu w pokarmie na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej *Myodes glareolus* - Justyna Morawska – Płoskonka, Dominika Dragosz , Katarzyna Bojarska, Leszek Bujoczek

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów.

Justyna Morawska – Płoskonka, Dominika Dragosz , Katarzyna Bojarska, Leszek Bujoczek

Streszczenie

Zanieczyszczenie ołowiem i jego wpływ na materiał genetyczny jest ważnym problemem w dobie industrializacji. Eksperyment ma na celu doświadczalne określenie cytotoksycznego wpływu skażenia ołowiem w zależności od jego stężenia i czasu ekspozycji. Zostanie wykorzystana analiza frekwencji mikrojąder jako biomarkera skutków narażenia na ołów.

Cel projektu

Celem badań jest stwierdzenie, czy różne stężenia ołowiu zawartego w pokarmie i czas ekspozycji wpływają na stopień uszkodzenia materiału genetycznego na poziomie komórkowym.

Ołów jest pierwiastkiem silnie toksycznym częstym w środowiskach poddawanych negatywnym oddziaływaniom antropogenicznym. Wpływa niekorzystnie na kondycję i przeżywalność organizmów. Wywołuje uszkodzenia materiału genetycznego. Przypuszczamy, że stopień degradacji DNA jest zależny od dawki ołowiu. Istotnym czynnikiem, z punktu widzenia procesów mutacyjnych, może okazać się również czas ekspozycji na ten mutagen. Długa ekspozycja może wzmocnić efekt dawki na skutek kumulacji efektów wywołanych przez intoksykację.

Poziomy stężenia ołowiu w środowisku uznawane za szkodliwe dla organizmów zostały określone na podstawie testów toksykologicznych. Standardowo stosowane metody wychwytyją zazwyczaj wystąpienie silnych efektów na poziomie osobnika lub populacji. Skutki ekspozycji na ołów mogą być obserwowane już na poziomie komórkowym w postaci strukturalnych uszkodzeń DNA. Wykazano, że tego typu mutacje somatyczne pełnią kluczową rolę w procesie kancerogenezy (Gumińska i Porwit-Bóbr 1995). Zatem samo stwierdzenie braku przekroczenia norm dopuszczalnego stężenia metalu ciężkiego staje się niewystarczające, aby wykluczyć negatywne oddziaływanie na organizmy. Zastosowanie metod cytogenetycznych umożliwi wcześniejsze wykrycie toksycznego działania ołowiu, niż dotychczas stosowane testy.

Istniejący stan wiedzy

Problem skażenia ołowiem dotyczy wielu obszarów w Polsce. Źródłem jego emisji są głównie przemysł oraz transport, a do organizmu dostaje się drogą pokarmową oraz wziewną.

Szereg prowadzonych badań wskazuje na negatywne oddziaływanie tego metalu na organizmy. Badania przeprowadzone na ludziach wykazały, że w wielu regionach jego stężenia w krwi osiągają poziomy wymagający interwencji medycznej i środowiskowej (Sokal 2000). Wykazano, że ołów, akumulując się w tkankach, upośledza wiele funkcji fizjologicznych. Podobnie jak inne metale ciężkie wywołuje uszkodzenie materiału genetycznego (Neri et al. 2003). Jednak przesłanki na temat działania ołowiu na DNA pojawiają się jedynie w kontekście etiologii niektórych nowotworów (np. Gumińska i Porwit-Bóbr 1995), natomiast jest niewiele prac opisujących jego wpływ na ogólne uszkodzanie materiału genetycznego.

Badania środowiskowe wpływu ołowiu na organizmy dotyczą zasadniczo terenów, w których stężenia ołowiu są bardzo wysokie, wręcz katastrofalne (np. najbliższe okolice hut, obszary aglomeracji (Sokal 2000)). Pomija się obszary w których ołów występuje powszechnie, lecz w niskich stężeniach. Nie bierze się pod uwagę wpływu czasu ekspozycji na zanieczyszczenie a ciągła kumulacja niskich dawek metalu w organizmie może powodować wzmoczenie toksycznego działania, na które przy pierwszym kontakcie organizm był niewrażliwy.

Dodatkowo badania w środowisku naturalnym nie pozwalają na oddzielenie wpływu ołowiu od innych czynników. Wynikiem jest trudność w ustaleniu poziomu stężenia, który alarmuje o niewielkim, aczkolwiek poważnym w skutkach uszkodzeniu DNA. Przeprowadzenie eksperymentu na wpływ toksyczności ołowiu na uszkodzenia materiału genetycznego w warunkach kontrolowanych i na organizmach modelowych może ułatwić określenie dawki granicznej stanowiącej zagrożenie dla organizmu.

Zmiana informacji genetycznej wywołana działaniem metali ciężkich może pełnić ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej (Sorsa et al. 1987 za Sąsiadek i Jagielski 1994). Dzieje się tak, ponieważ kancerogeny środowiskowe mogą aktywować onkogeny oraz inaktywować geny supresorowe (Gumińska i Porwit-Bóbr 1995).

Mikrojądra to struktury występujące w obrębie komórki, powstałe z jądra komórkowego w trakcie zaburzonego procesu mitozy. Wykazano, że są one biomarkerami skutków narażenia na substancje cytotoksyczne (Mielżyńska 2000). Analiza biomarkerów umożliwia oszacowanie progę, przy którym indukowane zmiany genetyczne nie powodują jeszcze drastycznych zmian równowagi genetycznej populacji.

Test mikrojądrowy jest prostą metodą umożliwiającą szybką, tanią i powtarzalną ocenę uszkodzeń chromosomów, możliwą do przeprowadzenia na dużej liczbie komórek jest test mikrojądrowy. Metoda ta, mimo iż jest niespecyficzna, dostarcza bezpośrednich informacji o zmianach zachodzących na poziomie chromosomowym (Kubiak 1995).

Metody

Eksperyment zostanie przeprowadzony w warunkach laboratoryjnych, na gatunku nornica ruda. *Myodes glareolus* Jest to gatunek szeroko rozpowszechniony w różnych środowiskach. Jest także łatwy w hodowli. Żywi się głównie nasionami, pąkami drzew, korzonkami, korą oraz drobnymi bezkręgowcami.

Zwierzęta będą pochodziły z hodowli Zespołu Ekologii Fizjologicznej Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego. Badania przeprowadzone zostaną na 600 osobnikach w równym wieku.

Miejscem przeprowadzenia eksperymentu będzie zwierzętarnia Wydziału Biotechnologii UJ. W trakcie trwania projektu zwierzęta będą przetrzymywane pojedynczo w specjalnych klatkach w optymalnych warunkach temperatury i wilgotności, przy naturalnym oświetleniu.

Wyodrębnione zostanie dziewięć grup doświadczalnych i jedna kontrolna. Liczebność wszystkich grup będzie wynosić po 60 osobników (30 samic i 30 samców). Grupy doświadczalne będą poddawane działaniu ołowiu dodawanego do karmy w różnych stężeniach (Tab.1). Dawki zostały określone na podstawie stężeń stwierdzanych na terenach zanieczyszczonych. (Murray et al. 2000).

Karma będzie przygotowywana ze standardowej paszy laboratoryjnej, poprzez rozmoczenie granulatu i dodanie do niego odpowiedniej dawki roztworu siarczanu (VI) ołowiu, a następnie wysuszenie. Pokarm grupy kontrolnej będzie poddany przetworzeniu z dodaniem tylko jonów siarczanowych

Tabela 1. Wartości stężeń ołowiu w podawanej karmie.

Nr grupy	mg Pb/1 kg karmy
1	0
2	25
3	50
4	100
5	200
6	400
7	800
8	1600
9	3200
10	6400

Metodą oceny uszkodzeń materiału genetycznego będzie test mikrojądrowy przeprowadzony zgodnie z zaleceniami Fenech (2000). Zliczane będą mikrojądra retikulocytów z rozmazu krwi obwodowej, pobieranej z ogona za pomocą pipety. Preparaty będą wybarwiane oranżem akrydynowym. W celu uniknięcia błędów związanych z wpływem obserwatora konieczna jest automatyzacja procesu przeprowadzenia testu. Szacowanie frekwencji mikrojąder zostanie wykonane na analizatorze w laboratorium Uniwersytetu Ruhr w Bochum w Niemczech.

Test mikrojądrowy będzie przeprowadzany co miesiąc przez okres jednego roku. Materiał badawczy z danej grupy będzie pobierany w ciągu jednego dnia, zaś z poszczególnych grup w odstępach dwudniowych, aby uzyskać efekt rozłożenia prac związanych z wykonaniem testów w czasie. Osobniki należące do kolejnych grup będą dzielić dwudniowe odstępy w datach urodzenia, aby testy były przeprowadzane u wszystkich zwierząt w tym samym dniu ich życia.

Wynikiem będzie częstość występowania mikrojąder wyrażona w promilach.

Prace będą wykonywane za zgodą Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Analiza statystyczna danych

W pierwszym etapie analiz zostanie zastosowany Ogólny Model Liniowy (GLM), w którym zmienną zależną będzie częstość mikrojąder, zmienną niezależną czas, a czynnikami stężenie i płeć. W celu zbadania ewentualnych różnic w frekwencji mikrojąder w czasie pomiędzy stężeniami wykorzystana zostanie analiza regresji.

Efekty projektu

Uzyskane wyniki zostaną opublikowane w czasopismach naukowych, takich jak *Environmental Pollution* i *Environmental Toxicology and Chemistry*.

Kosztorys

Klatki do hodowli + ich wyposażenie: 100 PLN * 600 = 60 000 PLN

Pokarm: 20 PLN * 365 dni = 7 300 PLN

Sprzęt do pobrania prób i przeprowadzenia testu: 15 PLN * 60 = 90 PLN

Razem: 67 390 PLN

Literatura

- Fenech M., 2000, The *in vivo* micronucleus technique, *Mutation Research* 455: 81 – 95.
- Gumińska M., Porwit-Bóbr Z., 1995, Karcynogeny występujące w wodzie i powietrzu oraz ich wpływ na zdrowie człowieka i rozwój nowotworów, [w:] Gumińska M., Międzybrodzki J. (red.), *Biologia molekularna dla człowieka i środowiska*, wydawnictwo UJ Kraków.
- Kubiak R., 1995, Biomonitoring środowiska- uwagi ogólne, [w:] Gumińska M., Międzybrodzki J., 1995, *Biologia molekularna dla człowieka i środowiska*, Kraków.
- Mielżyńska D., 2000, Narażenie na substancje o działaniu rakotwórczym – biomarkery narażenia na substancje mutagenne, [w:] Ocena środowiskowego ryzyka zdrowotnego, zarządzanie i nadzór nad ryzykiem oraz komunikacja o ryzyku, Materiały szkoleniowe, Sosnowiec
- Murray P., G. Y., Hendershot W.H., 2000, Evaluating three trace metal contaminated sites: a field and laboratory investigation, *Environmental Pollution* 107: 127-135
- Neri M., Fucic A., Knudsen L.E., Lando C., Merlo F., Bonassi S., 2003, Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review, *Mutation Research* 544: 243-254.
- Sąsiadek M., Jagielski J., 1994, Biologiczne skutki działania czynników mutagennych, *Kosmos* 44 (3/4): 563-569
- Sokal A., 2000, Zasady zapobiegania skutkom zdrowotnym zanieczyszczenia środowiska – znaczenie dobrej praktyki zarządzania zdrowiem, środowiskiem i bezpieczeństwem, [w:] Ocena środowiskowego ryzyka zdrowotnego, zarządzanie i nadzór nad ryzykiem oraz komunikacja o ryzyku, Materiały szkoleniowe, Sosnowiec, www.ietu.katowice.pl

RECENZJE

Hajnalka Szentgyörgyi

Recenzja projektu pt.: „Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów”

Projekt porusza ważny problem epidemiologiczny, jednak niektóre kwestie wymagają dokładnego przemyślenia.

Nie ulega wątpliwości, że ołów działa negatywnie na organizm, nie tylko w dawkach powyżej dopuszczalnej normy, ale także w tych subchronicznych. Wypracowanie metody pokazującej takie działanie ołowiu jest niewątpliwie ważne, ale czy przyczyni się do „ustalenia granicznej dawki”, jak to określają autorzy jest mało prawdopodobne. Teoretycznie każda dawka ołowiu jest toksyczna, ale w pewnych granicach dawki nie powodują istotne zmiany w organizmie, choć na poziomie komórkowym mogą być to zmiany faktycznie zauważalne.

Cytowana metoda (Fenech, 2000), wydaje się być odpowiednia do oszacowania takich zmian i właśnie dlatego nie rozumiem, dlaczego autorzy chcą używać do tych zliczeń retykulocytów (zamiast limfocytów), które nie posiadają jądra komórkowego, skoro metoda opiera się na komórkach posiadających funkcjonujące jądra komórkowego?!

Jeśli chodzi o plan eksperymentu, nasuwa mi się następujące pytanie: Czy nie łatwiej byłoby podawać ołów w roztworze, niż moczyć granulaty (patrz: Massó *et al.* 2007 lub Jadhav *et al.* 2007)?

Koszty projektu wymaga przeliczeń:

Wydaję mi się że autorzy nie do końca zdają sprawę z zasad prowadzenia hodowli. Zakładając hodowlę eksperymentalną na 600 osobników nie wystarczy kupić 600 klatek, trzeba liczyć się minimalnie 700-800 klatkami, biorąc pod uwagę że klatki myje się i suszy się – założmy, że robimy to w ratach, przynajmniej raz w tygodniu każdą klatkę - , a w tym czasie też trzeba przechować zwierzęta gdzieś. Więc mamy już koszt około 80.000 PLN. Z drugiej strony zaś, nie rozumiem dlaczego zwierzęta mają być pojedynczo w klatkach? Można by było trzymać ich w grupach po parę osobników tej samej płci i dzięki temu obniżyć koszty. Czy testy będą wykonywane na wszystkich osobnikach każdorazowo, czy tylko na części, a może kumulują się próbki i dokonuje się jedną analizę na całą grupę? Przynajmniej tak wynika z obliczeń.

Drobna pomyłka w obliczeniach: sprzęt do pobierania prób i przeprowadzenia testu: 15 PLN x 60 wynosi 900 PLN a nie 90 PLN, a dodatkowo liczba wykonanych testów według opisu jest nie 60 ale min. 120 (10 grup testowanych raz w miesiącu przez 12 miesięcy to 120 prób, a nie 60), więc końcowa suma testów wynosi 1800. No chyba, że są jeszcze jakieś błędy w ilości prób do analiz.

Podsumowując, projekt jest ciekawy, ale w obecnej formie zaleciłabym odrzucenie go. Po dokonaniu poprawek zarówno metodologicznych, jak i finansowych, będzie to interesująca propozycja. Powodzenia.

Agnieszka Bednarska

Recenzja projektu „Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów”

Podstawowy brak projektu, to nie uzyskanie przez recenzenta odpowiedzi na pytanie do czego autorki dążą. Prawdopodobnie chodzi o to, że proponowany sposób sprawdzania toksyczności ołowiu znalazłoby zastosowanie aplikacyjne. Jeśli tak, to trzeba o tym napisać. Z drugiej strony autorki piszą, że metoda jest

niespecyficzna, więc nie wiadomo na ile umożliwi ona oddzielenie wpływu ołowiu od innych czynników. Brak w nim przesłanek na przyszłość. Recenzent nie jest pewien czy te badania pozwolą dowiedzieć się czegoś nowego o cytotoksycznym wpływie ołowiu, gdyż przyjęte założenia nie są w pełni poprawne, a autorzy stosują jakieś skrótowe myślowe. Projekt jest także nieprzemyślany od strony metodologicznej i w obecnej formie nie kwalifikuje się do finansowania. Należy go gruntownie przemyśleć i poprawić. Poniżej zastrzeżenia (mniej lub bardziej dokuczliwe).

Tytuł: Skoro autorzy zdecydowali, że badania będą prowadzone na konkretnym gatunku, w tytule powinni byli podać nazwę gatunkową nornicy rudej (*Cletrionomys = Myodes glareolus*). Tytuł sugeruje, że autorki zamierzają badać kilka biomarkerów, jednak w żadnym miejscu nie wspominają o innym biomarkerze niż badanie frekwencji mikrojąder. Po tytułach nie stawia się kropek.

Streszczenie: W streszczeniu znalazły się tylko informacje o celu projektu i zastosowanej metodzie. To zdecydowanie za mało jak na streszczenie całego projektu. Zamiast słowa „eksperyment” proponowałabym użyć słowa „projekt”.

Cel: Z celu projektu nie wynika po co to wszystko. Sprawdzenie czy różne stężenia ołowiu w pokarmie wpływają na stopień uszkodzeń materiału genetycznego na poziomie komórkowym, przy jednoczesnym stwierdzeniu że ołów „wywołuje uszkodzenia materiału genetycznego”, nie wnosi nic nowego. Skoro wiadomo, że jest to pierwiastek mutagenny, to zapewne wiadomo też jakie poziomy tego metalu wywołują ten mutagenny efekt. Autorki piszą o standardowych metodach badań toksyczności ołowiu, ale nie wyjaśniają co to za metody. Nie piszą również nic o normach dopuszczalnego stężenia ołowiu, choć sugerują, że takie istnieją. Taka informacja powinna znaleźć się w tekście, aby recenzent mógł sprawdzić, czy zaproponowany przez autorki zakres badanych stężeń ołowiu jest sensowny. Skąd wiadomo, że test cytogenetyczny umożliwi wcześniejsze wykrycie toksycznych skutków ołowiu, niż dotychczasowe testy, skoro autorki nie piszą nic o dotychczas stosowanych testach?

Należy podać jakie jest to „bardzo wysokie, wręcz katastrofalne stężenie” ołowiu.

Istniejący stan wiedzy: Czy aby na pewno w dotychczasowych badaniach nie brało się pod uwagę czasu ekspozycji na zanieczyszczenie, skoro wiadomo, że w przypadku metali wraz z czasem ekspozycji wzrasta ich stężenie w organizmie? Przecież skoro metale nie ulegają biotransformacji i mają tendencje do akumulowania się w organizmie, ich ilość stężenie w tkankach rośnie wraz z czasem ekspozycji. Stwierdzenie „wynikiem jest trudność” brzmi dziwnie. Proponowane ustalenie dawki granicznej stanowiącej zagrożenie dla organizmu przy eksperymencie, gdzie ekspozycja następuje przez pokarm budzi wątpliwości, bo co oznacza dawka ołowiu w pokarmie, jeśli nie kontroluje się ile tego pokarmu dany osobnik spożył? Myślę, że nie zaszkodziłoby zbadanie jak dane stężenie w pokarmie ma się od stężenia ołowiu zakumulowanego w tkankach i z tym stężeniem korelować ewentualne zmiany we frekwencji mikrojąder. Ze sformułowania „mikrojądra są biomarkerami” wynika, że każde pojedyncze mikrojądro to biomarker, a przecież to frekwencja mikrojąder ma być biomarkerem narażenia na ołów.

Metodyka: Co to są „specjalne klatki” oraz standardowy sposób hodowli zwierząt? Dlaczego do badań wybrano nornice? Metody trzeba pisać tak, aby na podstawie tego opisu inna osoba była w stanie przeprowadzić badania w ten sam sposób. „Wartość stężeń ołowiu” to po prostu stężenie ołowiu, a jednostka to mg/kg. Czy rzeczywiście do poboru krwi ma łużyć pipeta?

Skoro najpierw autorki piszą, że badane osobniki będą równowiekowe, to jakim cudem w teście mikrojądrowym będą się różnić datą urodzenia? Po co te odstępstwa?

Autorki nic nie piszą o spodziewanych wynikach i nie radzą sobie z cytowaniem literatury. W kosztorysie nie uwzględniają kosztów związanych ze współpracą w Niemczech. Brakuje numeracji stron projektu.

Dawid Moroń**Recenzja projektu „Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów”**

Celem badań jest stwierdzenie, czy różne stężenia ołowiu zawartego w pokarmie i czas ekspozycji wpływają na stopień uszkodzenia materiału genetycznego na poziomie komórkowym.

Postawiony przez autorów cel jest klarowny, jednak już w rozdziale „stan wiedzy” podają cytację, że ołów powoduje uszkodzenia materiału genetycznego! Wskazuje to na wtórność projektu. Autorzy sugerują istotność badań zniszczeń materiału genetycznego w walce z nowotworami u ludzi. To może badania przeprowadzić na szczurach, które są standardowo używane w badaniach przedklinicznych

Zaletą projektu jest połączenie dwu czynników, czyli stężenie ołowiu oraz czasu ekspozycji. Proponuje mocniejsze zaakcentowanie tego aspektu projektu.

Projekt wart jest finansowania, jednak po gruntownym przereklamowaniu i przemyśleniu celu badań.

Maciej Ejsmond**Recenzja projektu „Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenia materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów.”**

W projekcie autorzy poruszają szeroki problem zanieczyszczenia metalami ciężkimi środowiska życia organizmów. Niewątpliwie jest to problem bardzo ważny, aczkolwiek można mieć wątpliwości czy na zadane pytania nie odpowiada ugruntowana wiedza. Sami autorzy stwierdzają w celach projektu, że ołów wywołuje uszkodzenia materiału genetycznego. Zatem efekt wysokości dawki wydaje się łatwy do przewidzenia. Powszechnie wiadomo, iż metale ciężkie akumulują się w organizmach żywych, a efekty toksyczne pojawiają się po pewnym czasie. Zatem efekt czasu ekspozycji na zanieczyszczenia ołowiem także wydaje się łatwy do przewidzenia. Zastosowanie analizy frekwencji mikrojąder jako metody pomiarowej efektu toksyczności jest wg. autorów nowatorskie, ale nie jest do końca przekonujące czy jest to wystarczający argument do przeprowadzenia badań których efekt można przewidzieć z dużym prawdopodobieństwem. Poza powyższym głównym zarzutem pojawiają się także mniej ważne drobiazgi, na które pozwoliłem sobie zwrócić uwagę.

- Autorzy używają skrótów myślowych, które utrudniają czytanie, wywołują negatywne wrażenie oraz są nieścisłe np.:

w celach projektu: ołów jest pierwiastkiem „częstym w środowiskach poddawanym negatywnym oddziaływaniom antropogenicznym.” Zdanie brzmi skomplikowanie, ale np. obszary wycinanego lasu deszczowego niekoniecznie muszą być zanieczyszczone ołowiem.

W akapicie istniejący stan wiedzy zdanie „Wynikiem jest trudność ustalenia poziomu stężenia...” jest zupełnie niezrozumiałe.

- W akapicie istniejący stan wiedzy: stężenia ołowiu „osiągają poziomy wymagające interwencji środowiskowej”. Co to jest interwencja środowiskowa?

- Co autorzy rozumieją pod pojęciem „równowagi genetycznej populacji”, ponieważ termin ten jest zazwyczaj używany do określenia sytuacji gdy populacja pozostaje w stanie równowagi Hardy’ego-Weinberga.

- W akapicie Metody: Nornica ruda nie jest gatunkiem rozpowszechnionym ale w środowiskach dość konkretnego typu.

- Autorzy nie piszą na jakiej podstawie dobrali takie, a nie inne stężenia ołowiu podawanego w pokarmie.
- Założenie różnicy wieku nornic należących do kolejnych grup (dokładnie dwa dni) wydaje się być mocno nierealistyczne. Możliwość otrzymania takich wyrównanych grup wymagała by olbrzymich liczebności noworodków. Czy rzeczywiście kilkudniowe różnice w wieku zwierząt mają, tak duże znaczenie dla wyników eksperymentu?
- W akapicie Analiza danych: autorzy piszą o pierwszym etapie w którym zostanie zastosowany GLM. Brak informacji co będzie się działo w drugim etapie.
- Chyba lepiej unikać stwierdzeń potocznych typu: „stężenia ołowiu są wręcz katastrofalne”.

Karolina Kuszewska

Recenzja projektu pt: Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów.

Autorzy projektu postanowili przeprowadzić badania dotyczące wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego. Planowany eksperyment pozwoli odpowiedzieć na ważne i zarazem zagadnienie, pomimo to w projekcie można znaleźć kilka niedociągnięć.

- 1) W streszczeniu znajduje się zdanie, którego kompletnie nie rozumiem, brzmi ono: *Eksperyment ma na celu doświadczalne określenie cytotoksycznego wpływu skażenia ołowiem w zależności od jego stężenia i czasu ekspozycji.* Brakuje w tym zdaniu na co wpływa ten ołów, na komórki, na materiał DNA, z reszty projektu można się tego dowiedzieć, jednak proponowałabym poprawić to zdanie.
- 2) Kolejną rzeczą jest wybór dawki na podstawie stężeń występujących w terenach zanieczyszczonych. Skoro wiadomo że ołów źle wpływa na organizmy to pewnie też znana jest najniższa dawka, która wpływa na te organizmy w widoczny sposób (powoduje zmiany fizjologiczne, w zachowaniu), może więc po prostu należy wybrać stężenia malejące ale dopiero od tej dawki.
- 3) W pracy brakuje łacińskiej nazwy badanego obiektu.

Kolejne uwagi dotyczą formy projektu:

- 4) Czasami na końcu zdania pojawiają pojedyncze litery (spójniki) np. „a”, „i”, nie powinno się to zdarzać
- 5) Na pierwszej stronie na samym dole rozpoczęty jest kolejny rozdział projektu ale tekst jest już na następnej stronie i to też powinno być zmienione

Pomimo tych uwag uważam, że projekt jest interesujący i po uwzględnieniu poprawek można rozpocząć wykonywanie badań.

Rafał Martyka

Recenzja projektu: „Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów”

Ocena oddziaływania metali ciężkich na organizmy żywe była i jest przedmiotem szeregu badań. Zaprezentowany projekt wpasowuje się w tą tematykę i jako taki w obecnym stanie nie wydaje się być nowatorski. Autorzy chcą zbadać wpływ ołowiu na stopień uszkodzenia materiału genetycznego u nornic

rudych wykorzystując do tego celu test mikrojądrowy. W mojej opinii bardzo interesujący jest pomysł zastosowania tej metody do tego celu z uwagi na łatwość i niskie koszty jej wykonania. Jeśli faktycznie test mikrojądrowy okazałby się skutecznym biomarkerem do oceny oddziaływania ołowiu (bądź innych metali) na stopień uszkodzenia DNA w komórkach byłoby warto przeprowadzić planowane badania tak aby wykazać przydatność tej metody. Dlatego jeśli autorom właśnie o to chodziło to obecnie sformułowany cel i jego argumentacja nie są przekonujące i powinny być zmienione. Zaplanowanie badań nie budzi zastrzeżeń, a podejście eksperymentalne przemawia na korzyść tego projektu. Podsumowując, pomysł wykorzystania testu jądrowego w ocenie wpływu metali na organizmy jest ciekawy, ale według mnie źle przedstawiony. W tym momencie autorzy kładą większy nacisk na ocenę wpływu ołowiu niż na nową metodę, za pomocą której chcą to zrobić. Sądzę, że powinno być odwrotnie.

Zofia Prokop

Recenzja projektu ‘Ocena wpływu ołowiu na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej z wykorzystaniem biomarkerów’

Projekt dotyczy ważnego zagadnienia wpływu metali ciężkich na organizmy. Z przedstawionego omówienia literatury wynika, że proponowane badania mogą mieć cenny wkład w istniejący stan wiedzy poprzez pokazanie efektów ołowiu (w różnych dawkach i po różnym czasie ekspozycji) na poziomie komórkowym, które w dłuższej perspektywie mogą mieć groźne konsekwencje zdrowotne. O ile się orientuję (nie będąc specjalistką w tej dziedzinie), takie odległe w czasie efekty są często pomijane w badaniach nad szkodliwym wpływem różnych substancji. Zaletą projektu jest podejście eksperymentalne, pozwalające zminimalizować wpływ różnorodnych czynników, które mogłyby zaciemniać obraz w przypadku badań terenowych nad podobnym problemem.

Niestety po projekcie widać, że był pisany pod bardzo silną presją czasu, w związku z czym można w nim znaleźć liczne niedociągnięcia. Brak jasno sformułowanych przewidywań oraz wyjaśnienia, co dokładnie projekt wnosi do tego, co już wiadomo. Można się do tych informacji dokopać, czytając kilkakrotnie punkty dotyczące celów projektu oraz istniejącego stanu wiedzy – kiedy już się to robi, to projekt brzmi przekonująco, jak zaznaczyłam powyżej – ale dokopywania się lepiej chyba nie wymagać od człowieka, który ma podjąć decyzję o finansowaniu projektu. Ponadto, autorzy nie podają, przy jakiej frekwencji mikrojąder można mówić o zagrożeniu dla organizmu, co jest sprawą kluczową jeśli chcą oszacować progowe wartości stężenia i ekspozycji na ołów, przy których takie zagrożenie się pojawia.

Mam również pewne zastrzeżenia co do sposobu przeprowadzenia planowanego eksperymentu i analiz. Po pierwsze, w układzie eksperymentalnym brakuje dodatkowej grupy kontrolnej, karmionej zupełnie czystym pokarmem (jony siarczanowe, jak sądzą, również mogą wywierać negatywny wpływ na organizm). Po drugie, badanie poszczególnych grup eksperymentalnych w różnym czasie nie jest dobrym pomysłem: nawet jeśli kontrolujemy wiek osobników, nie możemy wykluczyć wpływu dnia przeprowadzenia pomiaru na jego wynik. Należałoby raczej za każdym razem badać po 6 osobników z każdej grupy (przy 10 grupach), żeby mieć pewność, że ewentualny efekt dnia nie nałoży się na efekt grupy. Opis analiz statystycznych trzeba doprecyzować – w obecnym kształcie trudno zrozumieć, do czego używana będzie analiza regresji (rozumiem, że do zbadania efektu wzrostu stężenia, ale opis sugeruje że może również chodzić o czas). W kosztorysie brak wzmianki o przeprowadzaniu analiz w Bochum.

Język wymaga dopracowania, miejscami pojawiają się zdania nielogiczne („...czy różne stężenia ołowiu (...) wpływają na stopień uszkodzenia materiału genetycznego na poziomie komórkowym”) lub zbyt ogólnikowe („Zanieczyszczenie ołowiem i jego wpływ na materiał genetyczny jest ważnym problemem”).

OSTATECZNA WERSJA PROJEKTU

Ocena wpływu niskich stężeń ołowiu w pokarmie na uszkodzenie materiału genetycznego u nornicy rudej *Myodes glareolus*

Justyna Morawska – Płoskonka*, Dominika Dragosz* , Katarzyna Bojarska*, Leszek Bujoczek**

* Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

** Wydział Leśny, Akademia Rolnicza, Kraków

Streszczenie

Jednym z metali ciężkich występujących w środowiskach zanieczyszczonych jest ołów. Posiada on silne właściwości mutagenne i kancerogenne poznane poprzez analizy stężeń występujących na terenach silnie skażonych. Zasadniczym celem proponowanego projektu jest określenie wpływu niskich stężeń ołowiu w pokarmie i czasu ekspozycji na stopień uszkodzenia materiału genetycznego. Przeprowadzony zostanie test mikrojądrowy

na retikulocytach krwi nornicy rudej hodowanej w warunkach laboratoryjnych. Wyniki badań mogą znaleźć zastosowanie we wczesnym wykrywaniu mutagennego działania ołowiu, co umożliwi podjęcie działań zapobiegających powstawaniu nowotworów.

Cel projektu

Ołów jest silnie toksycznym metalem ciężkim, który występuje często w środowiskach poddawanych zanieczyszczeniom antropogenicznym. Dostaje się do organizmu przede wszystkim drogą pokarmową i akumuluje się w jego tkankach.

Wiadomo, że ekspozycja na wysokie stężenia ołowiu powoduje uszkodzenia DNA, a w konsekwencji wzrost zachorowalności na nowotwory (Neri et al. 2003). Przypuszczamy, że działanie niskich stężeń tego metalu w długiej perspektywie czasowej także może prowadzić do kancerogenezy. Dlatego wczesne wykrycie uszkodzeń DNA wywołanych przez ołów może być podstawą podjęcia działań prewencyjnych. Jednak dotychczas nie zbadano wpływu niskich stężeń ołowiu na stopień uszkodzenia materiału genetycznego po dłuższym czasie ekspozycji.

Celem proponowanego projektu jest określenie wpływu niskich stężeń ołowiu i czasu ekspozycji na stopień uszkodzenia materiału genetycznego. Możliwe będzie także zaobserwowanie, jaka ilość ołowiu zawartego w spożywanym w ciągu roku pokarmie zostanie zakumulowana w kościach. W planowanym eksperymencie będziemy określać stopień uszkodzenia DNA za pomocą frekwencji mikrojąder w retikulocytach u nornicy rudej.

Przewidujemy, że:

- 1) Wyższe stężenie ołowiu będzie miało silniejszy efekt genotoksyczny.
- 2) Wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji częstość mikrojąder w komórkach wzrośnie.
- 3) Interakcje między czasem ekspozycji na ołów a jego stężeniem będą miały zasadniczy wpływ na stopień uszkodzenia materiału genetycznego.

Zakładamy możliwość, że zależności efektu genotoksycznego od badanych czynników mogą nie być liniowe.

Istniejący stan wiedzy

Metale ciężkie akumulują się w tkankach, dlatego ich stężenie wzrasta wraz z czasem ekspozycji. W organizmie nie ulegają one biotransformacji i są wiązane przez wyspecjalizowane białko - metalotioneinę (Migula i Laskowski 200...). Głównym miejscem akumulacji ołowiu są kości. W dotychczasowych badaniach nie zostało jednak sprecyzowane, jak stężenie w pokarmie przekłada się na stężenie w tkance kostnej.

Wykryto mutagenne właściwości wysokich stężeń tego pierwiastka w środowisku pełniące ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej (Sorsa i in. 1987 za Sasiadek i Jagielski 1994). W wyniku ekspozycji na ołów może dochodzić do aktywacji onkogenów oraz inaktywacji genów supresorowych (Gumińska i Porwit-Bóbr 1995).

Badania wpływu metali ciężkich na organizmy były prowadzone głównie na mikroorganizmach (testy Ames) lub w hodowlach komórkowych (Gumińska i Porwit-Bóbr 1995). Hodowle *in vitro* mogą być utrzymywane tylko przez krótki czas, zatem nie dawały możliwości stwierdzenia, jaki jest wpływ długości trwania ekspozycji na metal oraz procesu starzenia się na stopień uszkodzenia DNA. Udowodniono, że wraz ze starzeniem się organizmu wzrasta liczba błędów w mitotycznym podziale komórki (Lubka i in. 2004).

Test mikrojądrowy jest prostą metodą umożliwiającą szybką, tanią i powtarzalną ocenę uszkodzeń chromosomów, możliwą do przeprowadzenia na dużej liczbie komórek. Metoda ta dostarcza bezpośrednich informacji o zmianach zachodzących na poziomie chromosomowym (Kubiak 1995). Mikrojądra to struktury występujące w obrębie komórki, powstałe z jądra komórkowego w trakcie zaburzonego procesu mitozy. Wykazano, że są one biomarkerem skutków narażenia na substancje cytotoksyczne (Mielżyńska 2000). Częstość pojawiania się mikrojąder uważana jest za wskaźnik podatności na nowotwory i choroby degeneracyjne (Cierniak i Kapiszewska 2002).

Metody

1. Obiekt i miejsce eksperymentu

Prace będą wykonywane za zgodą Komisji Etycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Eksperyment zostanie przeprowadzony w warunkach laboratoryjnych na gatunku nornica ruda *Myodes glareolus*. Gryzoń ten jest łatwy w hodowli. Zwierzęta będą pozyskane nieodpłatnie z hodowli Zespołu Ekologii Fizjologicznej Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego. Miejscem eksperymentu będzie zwierzętarnia Wydziału Biotechnologii UJ.

2. Model eksperymentu

Zwierzęta będą przetrzymywane pojedynczo w klatkach do hodowli zwierząt laboratoryjnych w warunkach stałej temperatury i wilgotności oraz przy naturalnym oświetleniu.

Badania przeprowadzone zostaną na 420 osobnikach. Dwutygodniowe zwierzęta zostaną losowo przydzielone do siedmiu grup: dwóch kontrolnych i pięciu doświadczalnych, po 60 osobników każda (w równym stosunku płci).

Skażona pasza zostanie przygotowywana ze standardowej paszy laboratoryjnej, poprzez rozmoczenie granulatu i dodanie do niego odpowiedniej dawki roztworu siarczanu (VI) ołowiu, a następnie wysuszenie. Pokarm grup kontrolnych będzie poddany analogicznemu przetworzeniu z dodaniem tylko jonów siarczanowych w przypadku kontroli nr 2 i tylko czystej wody w przypadku kontroli nr 1 (Tab.1). Proces przetworzenia nie wpłynie na jakość paszy. Stężenia ołowiu w pokarmie wyznaczono na podstawie danych literaturowych dotyczących gleby na terenach słabo zanieczyszczonych. Wartości zmniejszono 100 razy, aby uzyskać hipotetyczną zawartość w bazie pokarmowej zwierząt. Tygodniowa ilość paszy (ustalona w oparciu o informacje ustne od osób prowadzących hodowlę w Instytucie Nauk o Środowisku UJ) ważona będzie przed każdym podaniem, podobnie jak nie zjedzone pozostałości.

W dniu poboru krwi zwierzęta zostaną zważone.

Tabela 2. Wartości stężeń ołowiu w podawanej paszy.

Nr grupy	mg Pb/ kg s.m. paszy
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32

3. Test genotoksyczności

Metodą oceny uszkodzeń materiału genetycznego będzie test mikrojądrowy. Materiał zostanie pobrany w miesięcznych odstępach przez okres 1 roku (wszystkie próby tego samego dnia). Analizowane będzie częstość występowania mikrojąder w retikulocytach krwi obwodowej pobranej przyżyciowo mikropipetą z ogona (standardowa metoda). Uzasadnieniem wykorzystania retikulocytów jest dokładnie opracowana i sprawdzona metodyka testu mikrojądrowego na retikulocytach małych zwierząt. Z krwi zostaną sporządzone preparaty mikroskopowe odpowiednio utrwalone i wybarwione oranżem akrydynowym. W celu uniknięcia błędów związanych z wpływem obserwatora konieczna jest automatyzacja procesu przeprowadzenia testu. Szacowanie frekwencji mikrojąder zostanie wykonane na analizatorze w laboratorium Uniwersytetu Ruhr w Bochum w Niemczech, dokąd wszystkie utrwalone preparaty zostaną wysłane jednorazowo po zakończeniu eksperymentu. Laboratoria w Polsce nie posiadają takiej aparatury, a jej zakup wiązałby się z wyższymi kosztami niż wysłanie próbek za granicę. Wynikiem będzie częstość występowania mikrojąder wyrażona w promilach.

4. Oznaczenie zawartości ołowiu w kościach

Po zakończeniu eksperymentu zostanie oznaczone stężenie ołowiu w kościach. Zwierzęta zostaną uśmiercone, a ich obojczyki poddane mineralizacji. Oznaczenia stężenia dokonamy przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej.

5. Analiza statystyczna wyników

Zastosowany zostanie Ogólny Model Liniowy (GLM) z analizą kontrastów. Zmienną zależną będzie częstość mikrojąder, zmiennymi niezależnymi czas, czynnikami stężenie i płeć, kowariatą masa spożytej paszy i masa zwierzęcia. Do pokazania stężenia ołowiu w kościach jako funkcji stężenia w pokarmie zostanie zastosowana analiza regresji.

Efekty projektu

Uzyskane wyniki zostaną opublikowane w czasopismach naukowych, takich jak *Environmental Pollution* i *Environmental Toxicology and Chemistry*.

Kosztorys

Klatki do hodowli + ich wyposażenie: 100 PLN * 600 = 60 000 PLN

Pokarm: 20 PLN * 365 dni = 7 300 PLN

Sprzęt do pobrania prób i przeprowadzenia testu mikrojądrowego: 5 PLN * 420 * 12 = 25 200 PLN

Wysyłanie prób do analiz i ich koszt: 20 000 PLN

Oznaczenie stężenia ołowiu w kościach: 5000 PLN

Wynagrodzenie dla pracowników technicznych: 20 PLN * 356 * 4 = 29 200

Razem: 146 700 PLN

Literatura

- Cierniak A., Kapiszewska M., 2002, Metoda mikrojąder w badaniach epidemiologicznych. Postępy Biologii Komórki 29, s. 365-378.
- Fenech M., 2000, The *in vivo* micronucleus technique, *Mutation Research* 455, s. 81 – 95.
- Gumińska M., Porwit-Bóbr Z., 1995, Karcynogeny występujące w wodzie i powietrzu oraz ich wpływ na zdrowie człowieka i rozwój nowotworów, [w:] Gumińska M., Międzybrodzki J. (red.), *Biologia molekularna dla człowieka i środowiska*, wydawnictwo UJ Kraków.
- Kubiak R., 1995, Biomonitoring środowiska- uwagi ogólne, [w:] Gumińska M., Międzybrodzki J., 1995, *Biologia molekularna dla człowieka i środowiska*, Kraków.
- Lubka M., Wojda A., Witt M., 2004, Mikrojadra w komórkach człowieka – powstawanie, zawartość oraz wykorzystanie diagnostyczne i prognostyczne, *Postępy Biologii komórki* 31/2, s. 299-311.
- Migula P., Laskowski R., 200..., *Ekotoksykologia*, PWN.
- Neri M., Fucic A., Knudsen L.E., Lando C., Merlo F., Bonassi S., 2003, Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review, *Mutation Research* 544, s. 243-254.
- Niklińska M., Chmiel M., 1997, Porównanie oporności na metale ciężkie u mikroorganizmów glebowych z rejonów silnie zanieczyszczonych miedzią lub cynkiem. Drobnoustroje w środowisku. Katedra Mikrobiologii Wydział Rolniczy Akademia Rolnicza im. Hugo Kołataja w Krakowie, s. 491-501.
- Sąsiadek M., Jagielski J., 1994, Biologiczne skutki działania czynników mutagennych, *Kosmos* 44 (3/4), s. 563-569.

2. Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół – Agnieszka Bednarska; Michał Ciach; Dawid Moroń

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół

Agnieszka Bednarska*, Michał Ciach**, Dawid Moroń*

*Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

**Wydział Leśny, Akademia Rolnicza, Kraków

Streszczenie

Proponowany projekt dotyczy wpływu zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół (*Apioidea*). Podczas badań zamierzamy sprawdzić przy jak dużym udziale krzewów i drzew na łąkach trzęślicowych dochodzi do spadku bioróżnorodności badanych zapylaczy.

Chcielibyśmy także zaproponować właściwy sposób gospodarowania na tego typu łąkach, najbardziej optymalny dla zachowania wysokiej różnorodności pszczół dzikich. Pszczoły są uznawane za zapylaczy niezmiernie ważnych z punktu widzenia życia wielu roślin oraz ze względów ekonomicznych.

Powierzchnie eksperymentalne, z których pszczoły będą odławiane zostaną wyznaczone na łąkach w okolicach Krakowa. Jednak wyniki badań będą miały bezpośrednie przełożenie na praktyczne zastosowanie w czynnej ochronie przyrody prowadzonej zarówno w kraju, jak i w całej Europie, gdzie liczba zapylaczy drastycznie maleje.

Cel projektu

Pszczoły są najważniejszą grupą zapylaczy, od których zależy rozmnażanie wielu gatunków roślin kwiatowych, jakość i ilość nasion i owoców oraz ich zróżnicowanie genetyczne. Zapylacze mają ogromne znaczenie gospodarcze, zapylając ponad połowę roślin uprawianych przez człowieka, jednak ich ilość z roku na rok maleje. Jednym ze sposobów zachowania wysokiej bioróżnorodności dzikich pszczół jest ochrona ich siedlisk.

Siedliska zamieszkiwane przez pszczoły to głównie otwarte tereny, pochodzenia antropogenicznego, które wymagają koszenia w celu zachowania ich charakteru. Przykładem siedlisk zamieszkiwanych przez pszczoły są łąki trzęślicowe. W klimacie umiarkowanym łąki te to zespoły nieklimaksowe cechujące się jednym z wyższych poziomów różnorodności roślin kwiatowych i związanych z nimi zapylaczy. Notowane w ostatnich latach zaniechanie użytkowania łąk kośnych prowadzi do ich zarastania i zmian w różnorodności fauny i flory.

Celem projektu jest poznanie wpływu zarastania łąk na różnorodność dzikich pszczół. Projekt ten pozwoli na odpowiedź na następujące pytania:

1. Jak różnorodność i liczebność dzikich pszczół zmieni się wraz ze wzrostem stopnia pokrycia siedliska przez krzewy i drzewa?
2. Jak zmieni się udział poszczególnych specjalistów pokarmowych (oligo- i polielektyczne), udział gatunków społecznych bądź samotnych oraz gniazdujących w ziemi bądź w roślinności?

Spodziewany się negatywnego wpływu zarastania na liczebność i różnorodność fauny pszczół, wzrostu udziału gatunków polielektycznych oraz społecznych, które w trudniejszych warunkach zwykle radzą sobie lepiej oraz wzrostu udziału gatunków gniazdujących w roślinności. Poznanie odpowiedzi na powyższe pytania pozwoli na zaplanowanie optymalnego sposobu gospodarowania na tych łąkach w celu ochrony zamieszkujących je zapylaczy

Istniejący stan wiedzy

Dzikie pszczoły mają zasadnicze znaczenie w utrzymywaniu różnorodności roślin kwiatowych. Ponadto udział pszczół w wielkości plonów uzyskanych dzięki ich zapyleniu w krajach UE i Stanach Zjednoczonych wart jest miliardy euro rocznie (Kremen in., 2003; Williams 1994). Tym bardziej alarmujący jest fakt, że liczba zapylaczy w krajach Europy Zachodniej maleje (O'Tool 1993; Biesmeijer i in., 2006; Fitzpatrick i in., 2007). Ważnym czynnikiem negatywnie oddziałującym na spadek liczebności i różnorodności zapylaczy jest zanikanie ich siedlisk. Proces utraty siedlisk zapylaczy jest potęgowany zaniechaniem ekstensywnego rolnictwa oraz prowadzeniem planowych zalesień, będących częścią polityki rolno-leśnej UE. Bez prowadzenia właściwej gospodarki na łąkach trześlcowych, siedliska te znikną, a wraz z nimi wysoka różnorodność pszczół. Na łąkach okolic Krakowa, które zostaną objęte badaniami w tej pracy dotychczas stwierdzono obecność ponad 100 gatunków dzikich pszczół (Moroń, informacja ustna). Dodatkowo, przeprowadzenie badań na terenach, o których posiadamy informacje, przyniesie poważne oszczędności finansowe, ograniczając ilość pracy i liczbę wyjazdów w teren, związanych z wyznaczeniem powierzchni badawczych. Oprócz badań florystycznych (Dubiel, 1996) oraz projektu Witek (projekt KBN) dotyczącego mrówek i modraszków z rodzaju *Maculinea*, również Skórka i in. (2007) prowadził badania nad wpływem sukcesji na różnorodność motyli na wspomnianych terenach. Jednak problem zarastania łąk przez krzewy i drzewa w powiązaniu z malejącą różnorodnością pszczół dzikich nie był dotąd badany. Jeżeli proces ten prowadzi do zanikania pszczół należy prowadzić odpowiednie zabiegi gospodarcze, utrzymujące te murawy w najbardziej optymalnym stadium sukcesji. Jak dotąd nie dowiedziono, które z tych stadiów jest najbardziej optymalne dla utrzymania wysokiej bioróżnorodności dzikich pszczół. Spodziewamy się, że zależność pomiędzy różnorodnością i/lub liczebnością pszczół będzie maleć wraz ze stopniem pokrycia terenu przez krzewy i drzewa, jednak nie można wykluczyć, że jakiś niski stan zakrzewienia będzie wpływać korzystnie na bioróżnorodność pszczół. Uzyskane wyniki pozwolą zaproponować najbardziej optymalny sposób gospodarowania korzystny dla utrzymania wysokiej różnorodności zapylaczy. Zachowanie siedlisk dogodnych dla pszczół powinno być priorytetem zarówno dla osób zajmujących się ochroną naturalnych siedlisk, oraz pszczół jak również zainteresowanych poprawą gospodarki rolnej.

Materiały i Metody

Przeprowadzenie badań

W celu przeprowadzenia badań wyznaczonych zostanie 6 kategorii powierzchni badawczych różniących się stopniem pokrycia krzewami i drzewami: 0, 20, 40, 60, 80 i 100% pokrycia w oparciu o zdjęcia lotnicze badanego terenu. Dla każdej kategorii planuje się wyznaczenie 10 powierzchni, spośród których zostaną wylosowane trzy. Poszczególne powierzchnie o wielkości nie mniejszej niż 3 ha będą od siebie oddalone o co najmniej 500 m. Na każdej powierzchni wyznaczone zostaną 200 metrowe transekty oddalone od krawędzi powierzchni o nie mniej niż 50 m. Na powierzchniach, gdzie procent pokrycia przez krzewy będzie utrudniał prowadzenie odłowu z użyciem siatki, obszar przez który będzie przebiegał transekt zostanie oczyszczony z gałęzi zachodzących na transekt. Rozpoczęcie odłowu pszczół planuje się na początek kwietnia. Od tego czasu, aż do końca sierpnia, co dwa tygodnie będą prowadzone odłowy na poszczególnych transektach przy użyciu siatki entomologicznej. Zaplanowany okres trwania odłowu pozwoli na wyeliminowanie ewentualnych różnic związanych z sezonem. Odłowy będą wykonywane zawsze przez tą samą osobę, przy użyciu siatki entomologicznej o określonej średnicy i w ten sam sposób, w celu standaryzacji metody. Metoda odłowu przy użyciu siatki entomologicznej, zdaniem autorów jest najlepsza do odpowiedzi na postawione pytania. Inna metoda, jaką są pułapki wodne (ang. *pan traps*) jest bardziej selektywna w stosunku do poszczególnych grup. Zebrany materiał będzie przenoszony do laboratorium w celu oznaczenia przynależności gatunkowej, oraz określenia ich liczebności. Gatunki podlegające ochronie prawnej (*Bombus* sp.) zostaną oznaczone przyżyciowo w terenie i wypuszczone.

Na poszczególnych powierzchniach, losowo wyznaczone zostanie 10 powierzchni kołowych o średnicy 1 m w celu określenia różnorodności roślin kwiatowych, liczby kwiatów kwitnący i średniej wysokości roślinności. Powierzchnie kołowe będą sprawdzane trzykrotnie w trakcie prowadzenia odłowów (koniec kwietnia, koniec czerwca i koniec sierpnia). Pozwoli to na oszacowanie bazy pokarmowej pszczoł na tych terenach, gdyż jej zmiany prawdopodobnie mogą być związane ze stopniem pokrycia przez krzewy.

Okres realizacji projektu: 1 rok.

Analiza wyników

Dla poszczególnych powierzchni zostanie policzona liczba gatunków (bogactwo gatunkowe), wskaźniki różnorodności gatunkowej Shannona-Wienera oraz wskaźnik dominacji Simpsona dla pszczoł zebranych podczas całego sezonu odłowu (kwiecień-sierpień).

Jak wynika ze sposobu sformułowania hipotez badawczych oraz zastosowanego adekwatnie układu eksperymentalnego, zasadniczym celem badań jest stwierdzenie zależności między stopniem zarastania terenu przez krzewy i drzewa a bogactwem i różnorodnością pszczoł.

Konsekwentnie, główną metodą analizy danych będzie analiza regresji, w której zmiennymi niezależnymi będzie stopień pokrycia terenu przez drzewa i krzewy, oraz cechy badanej roślinności (stanowiące miarę dostępności pokarmu) zaś mierzone wskaźniki – zmiennymi zależnymi. Zostanie również sprawdzona proporcja pomiędzy oligo- i polielektycznymi pszczołami, gatunkami społecznymi a samotnymi oraz gatunkami gniazdujących w ziemi a gniazdującymi w roślinności oraz ich zależność od stopnia pokrycia terenu przez krzewy.

Posiadane środki techniczne i kosztorys badań

Instytut Nauk o Środowisku posiada dwa własne samochody terenowe, co jest niezbędne przy tak szeroko zaplanowanych pracach terenowych. Posiadamy także (INoŚ) sprzęt niezbędny do pracy w terenie, jak np. siatki entomologiczne, klucze do oznaczania roślin. Zasadnicza część pracy, w tym prace florystyczne, zostanie wykonana przez wykonawców projektu, którzy są doktorantami. Dwie osoby są zatrudnione na stanowiskach inżynieryjno-technicznych w Instytucie Nauk o Środowisku, a jedna nie ma zatrudnienia ani stypendium. Zważywszy, że obecnie każdy z nich wykonuje już pracę wykraczającą poza wymiar etatu, a wynikającą z prowadzonych przez nich prac doktorskich, dodatkowe niewielkie wynagrodzenie wydaje się w pełni uzasadnione. W celu precyzyjnego oznaczenia zebranego materiału konieczne będzie zatrudnienie specjalisty z dziedziny pszczoł.

Do realizacji projektu niezbędny będzie zakup zdjęć lotniczych badanego terenu odczynników (octan etylu do usypiania pszczoł), szpilek, pudeł i gablot entomologicznych.

Szczegółowy kosztorys:

1. Praca w terenie, na które składają się diety oraz wyjazdy w teren 1500 zł
2. Zakup zdjęć i potrzebnych materiałów - 1000 zł
3. Umowa zlecenie dla specjalisty, usługa obca - 2000zł
4. Wynagrodzenie dla realizatorów projektu - 3 osoby x 5000 zł = 15000 zł
5. Koszty udziału w konferencji zagranicznej - 5000 zł.
6. Adjustacja lingwistyczna, usługa obca - 1500 zł.

Suma kosztów 26 000zł

Efekty projektu

1. Publikacje w międzynarodowych czasopismach naukowych, takich jak np. *Biological Conservation*, *Conservation Biology*, *Journal of Applied Ecology*. Wszystkie te wydawnictwa mieszczą się w górnych 25% czasopism tzw. Listy Filadelfijskiej pod względem „współczynnika przebiccia” (*impact factor*).
2. Prezentacje (referaty i plakaty) na międzynarodowych konferencjach dotyczących ochrony przyrody.
3. Praktyczne konkluzje wynikające z badań będą wykorzystywane przy tworzeniu planów ochrony rezerwatów przyrody.

Literatura

- Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313:351-354
- Dubiel E (1996) Łąki Krakowa. Część I. Klasa Molinio-Arrhenatheretea. *Studia Ośr Dok Fizjo* 24:145-171
- Fitzpatrick Ú, Murray TE, Paxton RJ, Breen J, Cotton D, Santorum V, Brown MJF (2007) Rarity and decline in bumblebees – a test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biol Conserv* 136:185-194
- Kremen C, Williams NM, Thorp RW (2002) Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proc Nat Acad Sci USA* 99:16812-16816
- O’Toole C (1993) Diversity of native bees and agroecosystems. In: LaSalle J, Gauld I (eds) *Hymenoptera and Biodiversity*. Commonwealth Agricultural Bureau International, London
- Skórka P, Settele J, Woyciechowski M (2007) Effects of management cessation on grassland butterflies in southern Poland. *Agric Ecosyst Environ* 121:319-324
- Williams IH (1994) The dependence of crop pollination within the European Union on pollination by honey bees. *Agr Zool Rev* 6:229-257

RECENZJE**Marcin Czarnoleski**

recenzent: Marcin Czarnołęski

projekt: **Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół**

autorzy: **Agnieszka Bednarska, Michał Ciach, Dawid Moroń**

1. Ogólnie projekt oceniam bardzo dobrze. Autorzy przyłożyli wagę do uzasadnienia praktycznych walorów uzyskanych wyników. Po przeczytaniu „Istniejącego stanu wiedzy” brakuje mi jednak pewności czy cokolwiek wiadomo na temat wpływu zarastania łąk bądź stopnia pokrycia łąk krzewami na różnorodność zapylaczy. wspomniane są jedynie badania na łąkach przy kampusie, a czy ktoś badał to zjawisko na świecie? Poza tym, wymieniany jest fakt badania takiej zależności przez P. Skórkę na motylach i M. Witek na mrówkach i modraszkiach ale nie wiadomo do jakich wniosków doprowadziły te badania.
2. Streszczenie dość chaotyczne i przegadane. Jednocześnie brakuje informacji dotyczących tego jakie dane będą zbierane (np. baza pokarmowa).
3. Niejasne do końca jak statystycznie traktowane będą dane zebrane w seriach czasowych. Np. baza pokarmowa będzie określana co 2 miesiące i jak te serie zostaną później potraktowane w analizach regresji? Uśrednione, zsumowane, czy formalnie będzie zachowana informacja o przynależności do serii czasowej?
4. Wyniki projektu będą tylko mówiły tylko o tym czy istnieje zależność między charakterem łąki a stopniem zróżnicowania gatunkowego pszczół które po niej latają. Należałoby dążyć do rozróżnienia efektów dwu mechanizmów: wpływu charakterystyki łąki na decyzje związane z furazowaniem pszczół (charakterystyka łąki wpływa na bazę pokarmową) oraz wpływu charakterystyki łąki na gniazdowanie pszczół. Dodatkowo być może do jakiegoś stopnia te dwa zjawiska są z kolei ze sobą powiązane – decyzja pszczół o założeniu gniazda może być uzależniona od bazy pokarmowej na łące. Co prawda projekt przewiduje badanie bazy pokarmowej, ale otwarcie nie podawane są żadne hipotezy związane z wpływem pokarmu na różnorodność pszczół.
5. Istotne z punktu widzenia postawionych celów projektu byłoby zbadanie czy zmianom bioróżnorodności gatunkowej pszczół towarzyszą zmiany ogólnej liczebności pszczół (niezależnie od przynależności gatunkowej). Być może problem negatywnego wpływu zapylaczy nie istnieje gdyż, co prawda spada różnorodność zapylaczy wraz z zarastaniem łąk, ale jednocześnie rośnie liczebność kilku gatunków pszczół, i ogólny potencjał zapylania przez pszczoły w danym środowisku nie spada.
6. Poletka badawcze będą od siebie oddalone o 500 m, nie wiadomo czy to wystarczy aby zapewnić niezależność statystyczną danych. Ponadto nie wiadomo, czy zadbano aby poletka należące do jednej kategorii stopnia zarośnięcia łąki były tak samo (średnio) oddalone od siebie jak poletka należące do różnych kategorii. Jak się mają zasięgi lotów furazowych (od gniazda) do wyznaczonego dystansu 500 m dzielącego poletka? Czy np. pszczoły żyjące w tym samym gnieździe położonym pomiędzy dwoma poletkami (w pasie demarkacyjnym 500 m) mogą korzystać z obu poletek badawczych naraz, albo czy pszczoły mające gniazdo na jednym z poletek mogą furazować na terenie innych poletek badawczych?

Dominika Dragosz

Recenzja projektu: Wpływ zarastania łąk trzęślicowych na różnorodność dzikich pszczół

Projekt dokładnie przemyślany, pozwalający na udzielenie odpowiedzi na postawione pytania.

Podjęty problem jest ważny zarówno z punktu naukowego (poznanie stanu bioróżnorodności ważnej grupy organizmów w różnych siedliskach), jak również praktycznego (ochrona siedlisk). Nieczęste jest podjęcie ochrony obszarów w zasadzie stworzonych przez działalność ludzką.

Poczyniona przez autorów (zwłaszcza w streszczeniu) obietnica wskazania konkretnych sposobów gospodarowania pozostaje obietnicą, gdyż brak sprecyzowania jakiego typu działania mogą wchodzić w grę. Może to świadczyć o braku pomysłu na wykorzystanie wniosków.

Trafny jest pomysł badania gatunków dzikich w ich siedliskach. Jest to z reguły trudne metodycznie, jednak autorzy zanalizowali bardzo wiele aspektów takich badań i mają świadomość ograniczeń.

Klarownie przedstawiona metodyka i analiza otrzymanych wyników pozwalająca na weryfikację postawionych hipotez. Nie wiem tylko dlaczego badane powierzchnie mają mieć 3 ha i być oddalone o 50m.

Autorzy dokładnie przemyśleli również koszty i starali się znaleźć kompromis pomiędzy poprawnym przeprowadzeniem badań, a oszczędnością. Choć zamieszczenie uzasadnienia w punkcie Istniejący stan wiedzy nie jest odpowiednie, lepiej byłoby w kosztorysie ogólnym.

Kilka uwag:

- Istniejący stan wiedzy W 6: słowo *negatywnie* niepotrzebne
- Sformułowanie *fauna pszczół – czy nie różnorodność dzikich pszczół*
- Istniejący stan wiedzy W 9: *Bez prowadzenia...*- sugeruje, że łąki trzęślicowe to ich jedyne siedliska
- Poza rozdz. materiały i metody nie ma mowy o szacowaniu bazy pokarmowej.

Maciej Ejsmond

Recenzja projektu „Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół.

W projekcie „Wpływ zarastania łąk trzęślicowych...” autorzy poruszają bardzo ważny problem spadku bioróżnorodności gatunków związanych z terenami otwartymi w Europie. Projekt wydaje się być przemyślany i spójny logicznie, jednak nie udało się autorom uniknąć niedociągnięć:

- Najważniejszym zarzutem jest brak pokazania kontekstu badań – zapyłacze są jedną z wielu ważnych grup ekologicznych. Liczne badania pokazują, iż negatywny wpływ zmiany typu gospodarowania na różnorodność gatunkową dotyczy także ptaków, pajaków, wielu grup bezkręgowców.

- Analogicznie do poprzedniego (wg. mojej oceny) błędu, autorzy twierdzą, iż „zachowanie siedlisk dogodnych dla pszczół powinno być priorytetem dla osób zajmujących się ochroną przyrody”. Brak dowodów (przynajmniej autorzy ich nie przedstawili), iż dzikie gatunki zapyłaczy są zwornikową grupą ekologiczną dla tego typu siedliska. Problemy ochrony przyrody i stanu jaki chcemy utrzymać są mocno arbitralne, dlaczego ochrona gatunków dzikich zapyłaczy ma mieć absolutne pierwszeństwo przed ochroną np. drobnych ssaków? Stwarza to wrażenie mocno jednostronnego patrzenia na problemy ochrony przyrody.

- W celach projektu brak wytłumaczenia dlaczego należy spodziewać się takich, a nie innych trendów w liczebnościach poszczególnych specjalistów pokarmowych.

- Brak także wyjaśnienia dlaczego jest zasadne badanie gatunków gnieźdzących się w ziemi i w roślinności – można odnieść wrażenie, że te grupy zostały dodane na wszelki wypadek. Autorzy nie dają także żadnych przewidywać na temat zmian proporcji liczebności w obrębie tej grupy.

- Sądę, że odpowiedź na pytanie postawione w celach projektu pozwala na znacznie więcej niż tylko określenie sposobu gospodarowania na konkretnym kompleksie łąk *Molinietalia* w okolicach Krakowa.
- Zdanie „Jeżeli proces ten prowadzi do zanikania pszczół...” nijak nie pasuje do akapitu Istniejący stan wiedzy i sprawia wrażenie wtrąconego bez powiązania z całością tego fragmentu wniosku.
- Mało przekonujące jest, iż wcześniejsza znajomość terenu pozwoli na poważne oszczędności finansowe, zwłaszcza jeżeli i tak autorzy planują zakup zdjęć lotniczych na podstawie których będzie wyznaczane położenie powierzchni badawczych.
- Co to jest projekt Witek? Wbrew pozorom nie każdy zna Magdalenę Witek.
- W rozdziale Istniejący stan wiedzy, autorzy nie piszą jasno, jaki jest stan wiedzy na świecie w tym temacie. Zdanie „Jednak problem zarastania łąk przez krzewy i drzewa...” w kontekście poprzedzających je zdań wskazuje, iż główną motywacją podjęcia tego tematu jest brak badań tego problemu na tym konkretnym kompleksie łąk.
- W metodach autorzy planują wyznaczenie 60 powierzchni 3 ha odległych od siebie o co najmniej 0.5 km każda – czy na pewno autorzy dobrze przemyśleli plan eksperymentalny? Przecież nawet regularna siatka, w której węzłach były by powierzchnie, zachowująca te wymagania będzie miała ogromne wymiary. Czy rzeczywiście są tak rozległe tereny tego typu łąk w okolicach Krakowa?
- W Analizie wyników autorzy nie precyzują co kryje się pod zwrotem „cechy badanej roślinności”.
- Bardzo wskazane było by podanie jakiego charakteru zależności autorzy spodziewają się stosując regresję (krzywoliniowa, prostoliniowa) i dlaczego taki a nie inny.
- W akapicie Posiadane środki techniczne autorzy piszą, iż są obciążeni pracą poza wymiar etatu. Nasuwa się wątpliwość czy będą w stanie wygospodarować czas na realizację ewentualnie przyznanego grantu.

Katarzyna Bojarska

Recenzja projektu „Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół”.

Ogólne wnioski

Temat jest ciekawy, ważny i aktualny, zwłaszcza z punktu widzenia ochrony przyrody. Projekt sprawia wrażenie przemyślanego, a moje uwagi krytyczne dotyczą w większości drobnych nieprecyzyjności i mają charakter polemiczny.

Uwagi techniczne

W wielu miejscach brakuje wcięć na początkach akapitów oraz przecinków - to co zauważyłam, zaznaczyłam na mojej kopii.

Uwagi krytyczne

1. Tytuł

Wydaje mi się, że warto zastąpić określenie „zarastanie” jakimś innym lub po prostu napisać, że chodzi o drzewa i krzewy.

2. Streszczenie

„bioróżnorodności badanych zapylaczy” - może lepiej napisać np. różnorodności gatunkowej? Bioróżnorodność to pojęcie dość ogólne.

3. Cel

„Zapylacze mają... jednak ich ilość” – chyba lepiej napisać „liczebność”

II akapit - Zacząłabym od zdania „W klimacie umiarkowanym...”. Zmieni to rozłożenie akcentu w ten sposób, że czytelnik od razu wie, że siedliska pszczół, choć pochodzenia antropogenicznego, są warte zachowania ze względu ich bioróżnorodność.

Nie wyjaśniono, dlaczego spośród łąk wybrano akurat trzęślicowe.

„Spodziewamy się..., które w *trudniejszych* warunkach *radzą sobie lepiej...*” Te określenia należy sprecyzować.

4. Istniejący stan wiedzy

Nie wyjaśniono, co to są gatunki oligo- i polielektyczne, a wydaje mi się, że nie każdy czytelnik będzie to wiedział.

„Dodatkowo, przeprowadzenie badań na terenach, ...” - to zdanie lepiej pasowałoby do rozdziału „Materiały i metody”.

5. Materiały i metody

Nie napisano, ile transektów będzie na każdej badanej powierzchni.

Należy uzasadnić wybór minimalnej odległości między powierzchniami w oparciu o istniejący stan wiedzy.

„Od tego czasu *aż do końca sierpnia...*” - niepotrzebny patos.

Oszacowanie dostępności bazy pokarmowej - wydaje mi się, że 10 m² na 3 ha to za mało.

6. Analiza wyników

II zdanie – to nie jest układ eksperymentalny.

7. Posiadane środki techniczne i kosztorys badań

Nie mam zastrzeżeń.

Leszek Bujoczek

Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (Molinietalia) na różnorodność dzikich pszczół

Zaproponowany w projekcie temat badań, (szczególnie dla terenu Polski) jest istotny i podjęty w odpowiednim czasie. Aktualność podjętej problematyki związana jest z szybko zachodzącymi zmianami w siedliskach zapylaczy, będącymi skutkiem zmian w gospodarce prowadzonej przez człowieka i wymaga podjęcia pilnych działań.

Kluczową informacją otrzymanych wyników powinien być najkorzystniejszy stopień pokrycia łąk przez gatunki krzewiaste w odniesieniu do różnorodności zapylaczy, gdyż obecnie dofinansowania UE do wykaszania łąk nie biorą tego pod uwagę i mają moim zdaniem wiele minusów. Natomiast sama informacja, o zmniejszaniu się różnorodności zapylaczy ze wraz stopniem zarastania jest spodziewana.

Niezbyt jasny jest dla mnie sens i sposób wyboru 10 powierzchni z różnym stopniem pokrycia krzewami, a następnie losowania 3 powierzchni. Jeśli wybór 10 powierzchni jest subiektywny to cała procedura losowania wydaje się zbędna. Prościej było by wybrać od razu po 3 powierzchnie najbardziej reprezentatywne (jak to ma miejsce przy wykonywaniu zdjęć fitosocjologicznych) dla każdej kategorii. Ewentualnie podzielić cały obszar łąk na podstawie zdjęć lotniczych na kategorie i wtedy wylosować po 3 powierzchnie.

W mojej opinii korzystne byłoby wprowadzenie kilku danych w części dotyczącej istniejącej wiedzy dla poparcia wybranego terenu badań:

- jaki jest obszar łąk trzęślicowych w Polsce i Europie i jaki stanowią one udział w ogólnej liczbie siedlisk preferowanych przez zapylacze. Dane te wskazałyby na ile wybrane siedlisko jest reprezentatywne dla ogólnej istoty problemu.

- podanie kilku gatunków zagrożonych szczególnie związanymi z łąkami trzęślicowymi.
Projekt wymaga także wniesienia poprawek językowych. Zauważono m.in. kilka literówek :

- „Dziki pszczoły mają zasadnicze znaczenie...” str.2
- „Tym bardziej alarmujący jest fakt, że liczba...” str.2
- „... liczby kwiatów kwitnący i średniej wysokości drzew.” – str.3

Niezbędne poprawki są niektóre wyrażenia jak np. „nie ma zatrudnienia” str. 3. lub „proces utraty” str.2

Przeniósł bym także informację „ przyniesie znaczne oszczędności ... „ z akapitu „Istniejący stan wiedzy” i ujął ją na wstępie opisu przewidywanych kosztów.

Karolina Kuszewska

Recenzja projektu pt: Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczoł.

Celem autorów projektu będzie zbadanie wpływu zarastania łąk trzęślicowych na różnorodność dzikich pszczoł. Uważam, że wykonanie tych badań jest ważne ze względu na dość duże znaczenie zapylaczy zarówno przyrodnicze jak i gospodarcze. Wyniki tych badań mogłyby być w przyszłości wykorzystane do czynnej ochrony tej grupy organizmów. Recenzowany projekt został zaprojektowany poprawnie jednak mam do niego kilka uwag:

- 1) Do wykonania badań zostały wybrane tylko łąki trzęślicowe a można było także wybrać inny typ zbiorowisk roślinnych np. murawy kserotermiczne gdzie także jest duża różnorodność zapylaczy.
- 2) W projekcie używane są stwierdzenia oligo- i polielektyczne i nie jest wyjaśnione co znaczą te słowa
- 3) W metodach opisany jest sposób określenia zróżnicowania roślin kwiatowych i jednym z pomiarów jest wysokość rośliny, nie bardzo wiem do czego ta miara miałaby służyć, a nie jest to wyjaśnione w tekście.

Kolejne uwagi dotyczą już samej formy projektu:

- 4) Czasami na końcu zdania pojawiają pojedyncze litery (spójniki) np. „a”, „i”, nie powinno się to zdarza
- 5) Na trzeciej stronie na samym dole rozpoczęty jest kosztorys ale cała tabela znajduje się na kolejnej stronie i to też powinno być zmienione.
- 6) Można było zastosować interlinię pomiędzy tekstem łatwiej czytało by się projekt i miałby on jaśniejszy układ.

Pomimo powyższych uwag projekt uważam za ciekawy i wysoko go oceniam.

Małgorzata Bylicka

Ocena projektu badawczego: Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczoł

Uwagi ogólne do całego tekstu

Tekst generalnie napisany dość dobrym stylem, ale obecne nieliczne błędy literowe i stylistyczne. Miejscami brak konsekwencji w formie cytowania literatury w tekście.

Tytuł – można wspomnieć również o liczebności pszczoł.

Streszczenie – nowe myśli powinny stanowić odrębne akapity, a nie tylko być rozpoczynane od nowej linii.

Cele projektu – cele jasno określone, a uzasadnienie podjęcia tego tematu przekonujące.

Stan wiedzy

– „...zależność pomiędzy różnorodnością i/lub liczebnością pszczół będzie maleć wraz ze stopniem pokrycia terenu.....” – niejasny zapis, rozumiem, że chodzi o zależność pomiędzy dwoma wartościami a stopniem pokrycia terenu, ale to zdanie nie przedstawia.

Metodyka badawcza

- czy na zdjęciach lotniczych widoczna jest frakcja młodych krzewów, które nie są wyższe od roślinności zielnej, posiadają formę zbliżoną do niej, a z pewnością wpływają na obiekt badań?
- „nie mniejsze niż 3 ha” czyli brak stałej wielkości powierzchni, można ją sprecyzować podając przynajmniej przedział wielkości. Obecny zapis może sugerować że powierzchnie mogą się znacznie różnić. Nie będzie to miało wpływu na odłow, gdyż transekty są stałe, natomiast może mieć znaczenie w czasie badań roślinności kwiatowej.
- „gatunki podlegające ochronie...zostaną oznaczone w terenie i wypuszczone” – wnioskuję, że tę grupę autorzy doskonale znają lub niezbędna będzie obecność specjalisty w czasie kontroli terenowej

Temat ciekawy i warty realizacji, proponowane metody zapewniają skompletowanie danych niezbędnych do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania. Dodatkowo ważne jest praktyczne zastosowanie wyników badań w ochronie środowiska, a konkretnie zbiorowisk łąk trzęślicowych i dzikich pszczół. Poruszenie tego tematu może być bodźcem do podobnych badań na innych zespołach roślinnych i zwierzęcych. Po naniesieniu drobnych poprawek projekt uzyska finansowanie.

Magdalena Lenda

Recenzja projektu badawczego A. Bednarskiej, M. Ciacha, D. Moronia pt. „ Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (Molinietalia) na różnorodność dzikich pszczół.

Temat projektu jest dla mnie niezmiernie ciekawy, ponieważ dotyczy bardzo ważnego aspektu w ekologii, jakim jest sukcesja i jej wpływ na bioróżnorodność. Istotne jest powiązanie oddziaływania zarastania unikatowych łąk trzęślicowych, ze stopniem różnorodności dzikich pszczół, które są jedną z najważniejszych grup zapylaczy roślin kwiatowych. Zaniechanie użytkowania łąk faktycznie może powodować spadek liczby odpowiednich dla pszczół siedlisk, a tym samym zmniejszać ich różnorodność gatunkową.

Cele projektu oraz przewidywania są jasno sprecyzowane. Zaplanowana metodyka jest przemyślana i uważam, ją za właściwą. Jednakże opis badań moim zdaniem powinien być dokładniejszy. Nie jestem pewna, czy nie byłoby zasadne określanie gatunków drzew i krzewów, które wkraczają na badane łąki. Obecność większej liczby drzew i krzewów owocowych może powodować na wiosnę wzrost różnorodności dzikich pszczół. Oczywiście w przypadku, gdy udział w zarastaniu miały by głównie rośliny wiatropylne, zjawisko to nie będzie występowało.

Nie mam zastrzeżeń, odnośnie statystycznego opracowania wyników. Opis projektu jest spójny, zwiezły i logiczny, jednakże uważam, że autorzy powinni wyjaśnić stosowaną specjalistyczną terminologię – „oligo- i polilektyczne”.

Myślę, iż planowane badania powinny być finansowane z pieniędzy publicznych, ze względu na wagę problemu i nowe spojrzenie na problem sukcesji.

PROJEKT OSTATECZNA WERSJA**Wpływ zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół**

Agnieszka Bednarska*, Michał Ciach**, Dawid Moroń*

*Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

**Wydział Leśny, Akademia Rolnicza, Kraków

Streszczenie

Projekt dotyczy wpływu zarastania łąk trzęślicowych (*Molinietalia*) na różnorodność dzikich pszczół (*Apioidea*). Podczas badań zamierzamy sprawdzić przy jak dużym udziale krzewów i drzew na łąkach trzęślicowych dochodzi do spadku różnorodności badanych zapylaczy. Chcielibyśmy także zaproponować właściwy sposób gospodarowania na tego typu łąkach, najbardziej optymalny dla zachowania wysokiej różnorodności dzikich pszczół. Wyniki badań będą miały bezpośrednie przełożenie na praktyczne zastosowanie w czynnej ochronie przyrody prowadzonej zarówno w kraju, jak i w całej Europie, gdzie liczba zapylaczy drastycznie maleje.

Cel projektu

Pszczoły są najważniejszą grupą zapylaczy, od których zależy rozmnażanie wielu gatunków roślin kwiatowych, jakość i ilość nasion i owoców oraz ich zróżnicowanie genetyczne. Zapylacze mają ogromne znaczenie gospodarcze, zapylając ponad połowę roślin uprawianych przez człowieka, jednak ich liczebność z roku na rok maleje. Jednym ze sposobów zachowania wysokiej bioróżnorodności dzikich pszczół jest ochrona ich siedlisk.

Siedliska zamieszkiwane przez pszczoły to głównie otwarte tereny, pochodzenia antropogenicznego, które wymagają koszenia w celu zachowania ich charakteru. Przykładem siedlisk zamieszkiwanych przez pszczoły są łąki trzęślicowe. Notowane w ostatnich latach zaniechanie użytkowania trzęślicowych łąk kośnych prowadzi do ich zarastania i zmian w różnorodności roślin kwiatowych i związanych z nimi zapylaczy.

Celem projektu jest poznanie wpływu zarastania łąk na różnorodność dzikich pszczół. Projekt ten pozwoli na odpowiedź na następujące pytania:

3. Jak różnorodność i liczebność dzikich pszczół zmieni się wraz ze wzrostem stopnia pokrycia siedliska przez krzewy i drzewa?
4. Jak zmieni się udział poszczególnych specjalistów pokarmowych (oligo- i polielektyczne, czyli związanych ze specyficzną lub różnorodną bazą pokarmową), udział gatunków społecznych bądź samotnych oraz gniazdujących w ziemi bądź w roślinności?

Spodziewamy się negatywnego wpływu zarastania na liczebność i różnorodność fauny pszczół, przy czym zakładamy: spadek udziału gatunków oligolektycznych – związanych z konkretnymi grupami roślinności, które mogą zanikać w pierwszej kolejności; wzrostu udziału gatunków społecznych, które w warunkach mniejszej dostępności pokarmu zwykle radzą sobie lepiej, magazynując pokarm oraz spadku udziału gatunków gniazdujących w glebie. Zakładamy, że proces zarastania łąk będzie wpływał na zmniejszenie bazy pokarmowej zapylaczy. Poznanie odpowiedzi na powyższe pytania pozwoli na zaplanowanie optymalnego sposobu gospodarowania na tych łąkach w celu ochrony zamieszkujących je zapylaczy.

Istniejący stan wiedzy

Dzikie pszczoły mają zasadnicze znaczenie w utrzymywaniu różnorodności roślin kwiatowych. Ponadto udział pszczół w wielkości plonów uzyskanych dzięki ich zapyleniu w krajach UE i Stanach Zjednoczonych wart jest miliardy euro rocznie (Kremen in., 2003; Williams 1994). Tym bardziej alarmujący jest fakt, że liczba zapylaczy w krajach Europy Zachodniej maleje (O'Tool 1993; Biesmeijer i in., 2006; Fitzpatrick i in., 2007). Ważnym czynnikiem negatywnie oddziałującym na spadek liczebności i różnorodności zapylaczy jest zanikanie ich siedlisk. Problem zarastania łąk nie był dotychczas przedmiotem zainteresowania naukowców. Proces utraty siedlisk zapylaczy jest potęgowany zaniechaniem ekstensywnego rolnictwa oraz prowadzeniem planowych zalesień, będących częścią polityki rolno-leśnej UE. Bez prowadzenia właściwej gospodarki na łąkach trzęślicowych, siedliska te znikną, a wraz z nimi wysoka różnorodność pszczół. W klimacie umiarkowanym łąki te to zespoły nieklimaksowe cechujące się jednym z wyższych poziomów różnorodności roślin kwiatowych i związanych z nimi zapylaczy. Zostały one uznane przez Radę Europy za siedliska podlegające obowiązkowej ochronie (Dyrektywy Rady 92/43/EWG).

Łąki trzęślicowe cechują się wysokim bogactwem gatunkowym zamieszkujących je pszczół. Pszczoły mogą być uznane za grupę zwornikową, której występowanie pozwala na sprawne funkcjonowanie całego siedliska. W zbiorowiskach łąk trzęślicowych stwierdzono dotychczas obecność ponad 100 gatunków dzikich pszczół (Moroń, informacja ustna). Jednak problem zarastania tego typu łąk przez krzewy i drzewa w powiązaniu z malejącą różnorodnością pszczół dzikich nie był dotąd badany. Jeżeli proces ten prowadzi do zanikania pszczół należy prowadzić odpowiednie zabiegi gospodarcze, utrzymujące te murawy w najbardziej optymalnym stadium sukcesji. Jak dotąd nie dowiedziono, które z tych stadiów jest najbardziej optymalne dla utrzymania wysokiej bioróżnorodności dzikich pszczół. Spodziewamy się, że zależność pomiędzy różnorodnością i liczebnością pszczół będzie maleć wraz ze stopniem pokrycia terenu przez krzewy i drzewa. Jednak nie można wykluczyć, że jakiś niski stan zakrzewienia będzie wpływać korzystnie na bioróżnorodność pszczół. Uzyskane wyniki pozwolą zaproponować najbardziej optymalny sposób gospodarowania korzystny dla utrzymania wysokiej różnorodności zapylaczy. Zachowanie siedlisk dogodnych dla pszczół powinno być priorytetem zarówno dla osób zajmujących się ochroną naturalnych siedlisk, oraz pszczół jak również zainteresowanych poprawą gospodarki rolnej.

Materialy i Metody

Przeprowadzenie badań

W celu przeprowadzenia badań wyznaczonych zostanie 6 kategorii płątów badawczych różniących się stopniem pokrycia krzewami i drzewami: 0, 20, 40, 60, 80 i 100% pokrycia w oparciu o zweryfikowane w terenie zdjęcia lotnicze badanego terenu. Dla każdej kategorii planuje się wyznaczenie 10 powierzchni, spośród których zostaną wylosowane trzy. W każdym płacie wyznaczone zostaną 200 metrowe transekty oddalone od jego krawędzi o nie mniej niż 50 m. Poszczególne płaty o powierzchni nie mniejszej niż 3 ha będą od siebie oddalone o co najmniej 500 m. Dystans oddzielający poszczególne transekty pozwala na uniknięcie problemu przemieszczania się osobników między mini i związanej z tym niezależności prób. Na powierzchniach, gdzie procent pokrycia przez krzewy będzie utrudniał prowadzenie odłowu z użyciem siatki, obszar przez który będzie przebiegał transekt zostanie oczyszczony z gałęzi zachodzących na transekt.

Rozpoczęcie odłowu pszczół planuje się na początek kwietnia. Do końca sierpnia, co dwa tygodnie będą prowadzone odłowy na poszczególnych transektach przy użyciu siatki entomologicznej. Zaplanowany okres trwania odłowu pozwoli na wyeliminowanie ewentualnych różnic związanych z sezonem. Odłowy będą wykonywane zawsze przez tą samą osobę, przy użyciu siatki entomologicznej o określonej średnicy i w ten sam sposób, w celu standaryzacji metody. Metoda odłowu przy użyciu siatki entomologicznej, zdaniem autorów jest najlepsza do odpowiedzi na postawione pytania. Inna metoda, jaką są pułapki wodne (ang. *pan*

traps) jest bardziej selektywna w stosunku do poszczególnych grup. Gatunki podlegające ochronie prawnej (*Bombus* sp.) zostaną oznaczone przyżyciowo w terenie i wypuszczone, a pozostały zebrany materiał będzie przenoszony do laboratorium w celu oznaczenia przynależności gatunkowej i określenia ich liczebności.

Na poszczególnych powierzchniach, losowo wyznaczone zostanie 10 powierzchni kołowych o średnicy 1 m w celu określenia różnorodności roślin kwiatowych, liczby kwiatów kwitnących i średniej wysokości roślinności. Powierzchnie kołowe będą sprawdzane trzykrotnie w trakcie prowadzenia odłowów (koniec kwietnia, koniec czerwca i koniec sierpnia). Pozwoli to na oszacowanie bazy pokarmowej pszczoł na tych terenach, gdyż jej zmiany prawdopodobnie mogą być związane ze stopniem pokrycia przez krzewy. Okres realizacji projektu: 1 rok.

Analiza wyników

Dla poszczególnych powierzchni zostanie określona całkowita liczba osobników, liczba gatunków (bogactwo gatunkowe) oraz wskaźniki różnorodności gatunkowej Shannona-Wienera i wskaźnik dominacji Simpsona dla pszczoł zebranych podczas całego sezonu odłowu (kwiecień-sierpień). Dane na temat bazy pokarmowej pszczoł zebrane na powierzchniach kołowych podczas całego sezonu posłużą do obliczenia średnich wskaźników: różnorodności roślin kwiatowych, liczby kwiatów kwitnących oraz średniej wysokości roślinności.

Jak wynika ze sposobu sformułowania hipotez badawczych oraz zastosowanego adekwatnie układu eksperymentalnego, zasadniczym celem badań jest stwierdzenie zależności między stopniem zarastania terenu przez krzewy i drzewa a bogactwem i różnorodnością pszczoł. Konsekwentnie, główną metodą analizy danych będzie analiza regresji, w której zmiennymi niezależnymi będzie stopień pokrycia terenu przez drzewa i krzewy, oraz średnie wskaźniki badanej roślinności (stanowiące miarę dostępności pokarmu) zaś mierzone wskaźniki – zmiennymi zależnymi. Zostanie również sprawdzona proporcja pomiędzy oligo- i polilektycznymi pszczołami, gatunkami społecznymi a samotnymi oraz gatunkami gniazdujących w ziemi a gniazdującymi w roślinności oraz ich zależność od stopnia pokrycia terenu przez krzewy.

Posiadane środki techniczne i kosztorys badań

Instytut Nauk o Środowisku posiada dwa własne samochody terenowe, co jest niezbędne przy tak szeroko zaplanowanych pracach terenowych. Posiadamy także (INoŚ) sprzęt niezbędny do pracy w terenie, jak np. siatki entomologiczne, klucze do oznaczania roślin. Zasadnicza część pracy, w tym prace florystyczne, zostanie wykonana przez wykonawców projektu, którzy są doktorantami. Dwie osoby są zatrudnione na stanowiskach inżynieryjno-technicznych w Instytucie Nauk o Środowisku, a jedna nie ma zatrudnienia ani stypendium. Zważywszy, że obecnie każdy z nich wykonuje już pracę wykraczającą poza wymiar etatu, a wynikającą z prowadzonych przez nich prac doktorskich, dodatkowe niewielkie wynagrodzenie wydaje się w pełni uzasadnione. W celu precyzyjnego oznaczenia zebranego materiału konieczne będzie zatrudnienie specjalisty z dziedziny pszczoł. Do realizacji projektu niezbędny będzie zakup zdjęć lotniczych badanego terenu odczynników (octan etylu do usypiania pszczoł), szpilek, pudeł i gablot entomologicznych.

Szczegółowy kosztorys:

7. Praca w terenie, na które składają się diety oraz wyjazdy w teren 1500 zł
8. Zakup zdjęć i potrzebnych materiałów - 1000 zł
9. Umowa zlecenie dla specjalisty, usługa obca - 2000zł
10. Wynagrodzenie dla realizatorów projektu - 3 osoby x 5000 zł = 15000 zł
11. Koszty udziału w konferencji zagranicznej - 5000 zł.
12. Adjustacja lingwistyczna, usługa obca - 1500 zł.

Suma kosztów 26 000zł

Efekty projektu

4. Publikacje w międzynarodowych czasopismach naukowych, takich jak np. *Biological Conservation*, *Conservation Biology*, *Journal of Applied Ecology*. Wszystkie te wydawnictwa mieszczą się w górnych 25% czasopism tzw. Listy Filadelfijskiej pod względem „współczynnika przebiccia” (*impact factor*).
5. Prezentacje (referaty i plakaty) na międzynarodowych konferencjach dotyczących ochrony przyrody.
6. Praktyczne konkluzje wynikające z badań będą wykorzystywane przy tworzeniu planów ochrony rezerwatów przyrody.

Literatura

- Biesmeijer J. C., Roberts S. P. M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A. P., Potts S. G., Kleukers R., Thomas C. D., Settele J., Kunin W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-354.
- Dubiel E. 1996. Łąki Krakowa. Część I. Klasa Molinio-Arrhenatheretea. *Studia Ośr. Dok. Fizjo.* 24: 145-171.
- Fitzpatrick Ú., Murray T. E., Paxton R. J., Breen J., Cotton D., Santorum V., Brown M. J. F. 2007. Rarity and decline in bumblebees – a test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biol. Conserv.* 136: 185-194.
- Kremen C., Williams N. M., Thorp R. W. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 16812-16816.
- O’Toole C. 1993. Diversity of native bees and agroecosystems. In: LaSalle J., Gauld I. (eds) *Hymenoptera and Biodiversity*. Commonwealth Agricultural Bureau International, London.
- Skórka P., Settele J., Woyciechowski M. 2007. Effects of management cessation on grassland butterflies in southern Poland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 121: 319-324.
- Williams I. H. 1994. The dependence of crop pollination within the European Union on pollination by honey bees. *Agr. Zool. Rev.* 6: 229-257.

3. Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera* – Małgorzata Bylicka; Karolina Kuszewska; Rafał Martyka

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*.

Karolina Kuszewska¹, Rafał Martyka¹, Małgorzata Bylicka²

¹ Instytut Nauk o Środowisku, UJ; ² Wydział Leśny AR w Krakowie

Streszczenie

Proponowany projekt dotyczy wpływu powszechnie stosowanego pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej. Aby móc odpowiedzieć na to pytanie zaplanowano eksperyment, w którym pszczołom zostaną zaaplikowane różne dawki pestycydu. Przewidujemy, że zastosowana substancja toksyczna obniży sprawność układu immunologicznego.

Cel projektu

Układ immunologiczny pełni ważną rolę w ochronie organizmów przed patogenami, a jego sprawne funkcjonowanie jest jednym z warunków przeżycia i wydania potomstwa (Price 1980). Utrzymanie efektywnie działającego układu odpornościowego uzależnione jest od dostępności zasobów, a ich brak może osłabiać odporność. Innym czynnikiem negatywnie oddziałującym na funkcje immunologiczne są zanieczyszczenia środowiska. Substancje toksyczne działające na organizmy obniżają sprawność immunologiczną powodując ich zwiększoną podatność na choroby i pasożyty (Galloway, Depledge 2001). Procesy detoksykacji są kosztowne i dlatego musi istnieć kompromis między zasobami przeznaczonymi na funkcje immunologiczne i mechanizmy odtruwające. Stąd, należy się spodziewać, że osobniki narażone na kontakt z substancjami szkodliwymi mogą charakteryzować się zmniejszoną wydajnością systemu odpornościowego.

Dotychczas stwierdzono, że istnieje niekorzystny wpływ metali ciężkich na układ immunologiczny owadów (Sorvari et al. 2007). Powszechne stosowanie pestycydów w rolnictwie spowodowało, że mogą one również stanowić potencjalny czynnik obniżający immunokompetencję osobników. Pomimo tego nie wiadomo w jakim stopniu pestycydy mogą wpływać na poziom odpowiedzi immunologicznej u owadów. Dlatego celem niniejszego projektu jest odpowiedź na pytanie czy powszechnie stosowany pestycyd (Imiadachlopid) wpływa na poziom immunokompetencji u robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*. Przewidujemy, że robotnice poddane działaniu tego pestycydu będą wykazywać obniżony poziom odpowiedzi immunologicznej. W celu weryfikacji tej hipotezy planujemy wykonanie eksperymentu w którym robotnice będą poddawane działaniu różnych dawek pestycydu.

Wybór pszczoły miodnej jako obiektu badań podyktowany jest znaczeniem gospodarczym, jej strategią życiową i szczególnym narażeniem na pestycydy. Jako owad socjalny pszczoła żyje w wysokich zagęszczeniach bliskospokrewnionych osobników, co stwarza sprzyjające warunki dla rozprzestrzeniania się patogenów. Efektywnie działający układ immunologiczny pojedynczych osobników może zatem oddziaływać na kondycję i produktywność całej kolonii. Dodatkowo pszczoła miodna jest dobrym obiektem do wykonania tego typu badań, ponieważ jest łatwa w hodowli.

Istniejący stan wiedzy

Dotychczas wykonano szereg badań pokazujących wpływ zanieczyszczonego środowiska na system immunologiczny człowieka i innych kręgowców (Galloway, Depledge 2001). Natomiast ciągle niedostateczna jest wiedza w tym temacie u bezkręgowców (Sorvari et al. 2007). System odpornościowy tej grupy organizmów jest mniej specyficzny i mniej złożony niż u kręgowców (Beck, Habicht 1996). Powoduje to że, wpływ substancji toksycznych na funkcjonowanie układu odpornościowego kręgowców i bezkręgowców może być inny. Układ immunologiczny u owadów oparty jest na odpowiedzi komórkowej, w której główną rolę odgrywają hemocyty (komórki fagocytyjace) (Karp 1990). Sprawność działania tego układu jest obniżana przez zanieczyszczenia (Galloway, Depledge 2001), co zostało potwierdzone badaniami na metalach ciężkich (Eeva et al. 2004, Sorvari et al. 2007). Przypuszczać należy, że również inne substancje toksyczne, w tym pestycydy, będą miały podobny wpływ na immunokompetencję owadów. Według naszej wiedzy do tej pory nie przeprowadzono badań w tym zakresie. Efekt obniżonej odporności pojedynczych osobników jest bardziej widoczny u koloniach owadów społecznych, ponieważ życie w ścisłych relacjach ułatwia przenoszenie infekcji (Schmid-Hempel 1998). Dlatego też szereg prac o immunokompetencji wykonano na owadach o takiej strategii życiowej (Eeva et al. 2004, Vainio et al. 2004). Nie były one jednak prowadzone w kontekście wpływu pestycydów na odporność.

Metodyka badań

Aby rozwiązać postawiony problem planujemy wykonanie eksperymentu. Do tego celu wykorzystamy po 72 robotnice pszczoły miodnej pochodzące z 10 uli. Będą one pobierane w pierwszym dniu po przepoczwazaniu. Osobniki z każdego ula będą przetrzymywane w osobnych klateczkach w inkubatorze (temperatura 33 °C, względna wilgotność 70%) i karmione roztworem wody z cukrem (1:1). Po 24 godzinach pobytu w inkubatorze wszystkie osobniki zostaną uśpione przy pomocy CO₂. Następnie każdemu osobnikowi pomiędzy 3 a 4 segmentem odwłoka zostanie zaimplantowana nylonowa nić (grubość 0,3 mm, długość 0,5 mm), za pomocą której będziemy badać poziom odpowiedzi immunologicznej. Robotnice z każdej klateczki zostaną losowo przydzielone do 6 grup eksperymentalnych po 12 osobników każda. W czterech grupach zostaną zaaplikowane różne dawki powszechnie stosowanego w rolnictwie pestycydu (Imiadachlopid). Planujemy zastosować następujące dawki pestycydu: 60, 30, 15 i 7,5 ng /pszczołę, rozpuszczonego w acetonie. Dawki zostały dobrane tak, aby nie powodować wysokiej śmiertelności. Najwyższa proponowana dawka (60 ng/pszczołę) jest wartością przy której ginie 50% osobników pszczoły miodnej (A. Bednarska – inf.uszna). Każdemu osobnikowi zostanie zaaplikowany 1µl roztworu na tułów przy pomocy pipety. W kolejnej grupie pszczołom będzie aplikowany 1 µl acetonu bez pestycydu. Natomiast w ostatniej grupie pszczoły zostaną nakropione tylko 1 µl soli fizjologicznej. Pszczoły z każdej grupy eksperymentalnej będą znakowane innym kolorem przy pomocy markera. Po 48 godzinach od zaaplikowania dawki pszczoły zostaną uśmiercone poprzez zamrożenie, a nylonowe implanty wyciągnięte. W związku z kontaktem bezpośrednim z hemolimfą nylonowe nici są otaczane hemocytami, którym towarzyszy proces melanizacji (Götz 1986). Liczba komórek i ilość melaniny zgromadzonej na implancie będzie oceniana na podstawie stopnia zaciemnienia implantu (Schmid-Hempel, Schmid-Hempel 1998). Jednocześnie u wszystkich osobników zostanie określona wielkość ciała poprzez pomiar długości komórki radialnej (na prawym skrzydle) (Bertsch 1984).

Do opracowania statystycznych wyników użyjemy modelu liniowego mieszanego (GLMM). Zmienną zależną będzie pomiar immunokompetencji, natomiast czynnikiem ustalonym grupa eksperymentalna. Dodatkowo wielkość ciała zostanie wprowadzona do modelu jako kowariata aby kontrolować jej potencjalny wpływ na poziom odpowiedzi komórkowej. Ul będzie w tym modelu czynnikiem losowym.

Kierownik projektu (KK) ma doświadczenie w pracy z pszczołami, natomiast jeden z wykonawców (RM) posiada doświadczenie w badaniach immunologicznych.

W projekcie wykorzystamy pszczoły z pasieki Instytutu Nauk o Środowisku UJ. Urządzenia niezbędne do wykonania eksperymentu są w posiadaniu wyżej wymienionej jednostki i wykonawcy mają do niego dostęp.

Efekty projektu

Wyniki zostaną opublikowane w Apidologie lub Ecotoxicology i zaprezentowane na międzynarodowej konferencji toksykologicznej oraz posłużą do napisania 2 prac magisterskich.

Kosztorys

1. Wynagrodzenia dla wykonawców projektu (3 osoby)	10 000 zł
2. Zakup rodzin pszczelich	4 000 zł
3. Zakup odczynników (pestycyd, aceton) i materiałów (tipsy, pencety, eppendorfy, nici nylon)	3 000 zł
4. Udział w konferencji dla wykonawców	15 000 zł
Suma	32 000 zł

Literatura:

- Beck G., Habicht G. S. 1996. Immunity and the invertebrates. *Scientific American* 11: 42-46.
- Bertsch A. 1984. Foraging in male bumble bees (*Bombus lucorum* L.): maximizing energy or minimizing water load? *Oecologia* 62: 325-336.
- Eeva, T., Sorvari, J., Koivunen, V., 2004. Effects of heavy metal pollution on red woodant (*Formica* s. str.) populations. *Environmental Pollution* 132: 533-539.
- Galloway T. S., Depledge M. H. 2001. Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.
- Götz P. 1986. Encapsulation in arthropods. *In Immunity in invertebrates. Edited by M. Brehélin.* Springer-Verlag, Berlin. pp. 153-170.
- Karp R. D. 1990. Cell-mediated immunity in invertebrates. *Bio-Science* 40: 732-737.
- Price P. W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton: Princeton University Press.
- Schmid-Hempel P. 1998. Parasites in social insects. Princeton: Princeton University Press.
- Schmid-Hempel R., Schmid-Hempel P. 1998. Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Functional Ecology* 12: 22-30.
- Sorvari J., Rantala L. M., Rantala M. J., Hakkarainen H., Eeva T. 2007. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. *Environmental Pollution* 145: 324-328.
- Vainio, L., Hakkarainen, H., Rantala, M.J., Sorvari, J., 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*: effects of the nest, body size and sex. *Evolutionary Ecology* 18: 75-84.

RECENZJE

Marcin Czarnoleski

recenzent: Marcin Czarnołęski

projekt: Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*.

autorzy: Karolina Kuszewska, Rafał Martyka, Małgorzata Bylicka

1. Ogólnie projekt oceniam bardzo dobrze. Przejrzyście opisane i dobrze dobrane metody statystyczne. Realistyczny plan eksperymentu.
2. Projekt dotyczy wciąż mało zbadanego problemu: wpływu zmian warunków środowiska na funkcjonowanie układu immunologicznego bezkręgowców. Wyniki badań mogą być wykorzystane w tzw. badaniach podstawowych ale będą miały zapewne istotne znaczenie w badaniach stosowanych – określony będzie wpływ różnych dawek pestycydu na sprawność immunologiczną pszczoły miodnej. Jednak autorzy w niewielkim stopniu określają w projekcie w jaki sposób można będzie wykorzystać wyniki ich badań, np. do lepszego określenia dawek pestycydów z punktu widzenia ich skuteczności działania na szkodniki, czy wręcz przeciwnie, z punktu widzenia ograniczania niepożądanego wpływu na owady pożyteczne z punktu widzenia gospodarczego. Należałoby takie myśli zawrzeć w „Celach”, a także powinny one wpłynąć na „Efekty projektu”. Można na przykład upowszechnić wyniki wśród rolników i ogrodników stosujących pestycydy, pszczelarzy, zorganizować warsztaty, itp.
3. Streszczenie jest zbyt lakoniczne, mogłoby więcej mówić o przyjętej metodzie, np. jaka odpowiedź immunologiczna będzie badana. Zdanie pierwsze i ostatnie streszczenia można połączyć w jedno konkretne stwierdzenie. Poza tym w streszczeniu należy unikać niepotrzebnych „wypełniaczy” takich jak na przykład: „aby móc odpowiedzieć na to pytanie zaplanowano eksperyment”.
4. Cel projektu, ostatnie zdanie. Wykazanie obniżonej sprawności układu immunologicznego u organizmów narażonych na działanie toksyn nie musi świadczyć o tym, że rzeczywiście istnieje jedna pula zasobów, która jest dzielona między detoksyfikację i immunologię (czyli, że jest „trade-off między tymi funkcjami”). Przecież gdyby organizm w ogóle był pozbawiony zdolności do detoksyfikacji, więc nie zużywał na tę funkcję energii, nadal mógłby cierpieć z powodu obniżonej sprawności immunologicznej w środowisku zanieczyszczonym, i byłby to bezpośredni efekt wpływu zanieczyszczeń na procesy fizjologiczne, a nie objaw istnienia „trade-offu” między detoksyfikacją i immunologią.
5. Badania stopnia zaciemnienia nici przez melanocyty prowadzi się po uprzednim utrwaleniu preparatu (odpowiednie odczynniki), i poddaje analizie obrazu zdjęcia preparatów spod lupy. Brakuje takiej informacji w projekcie i uwzględnienia kosztów zakupu odczynników w kosztorysie. Nie wiadomo również czy zespół dysponuje dostępem do odpowiedniej aparatury pomiarowej: lupa z kamerą/aparatem, program komputerowy do analizy obrazu.
6. W kosztorysie dużą część stanowią wynagrodzenia i udział w konferencji (ponad 78%). Eksperyment i zbieranie danych będą trwały kilkanaście dni, a wynagrodzenie wynosi po 3300 zł na osobę.
7. Czy zaplanowane badania wystarczą by zebrać dane aż do dwóch prac magisterskich?
8. Błąd w „penceta”, powinno być „pinceta”.

☺ Złośliwość na marginesie

Nie mam pewności czym są „tipsy” w materiałach użytych do badań (ale zastrzegam, że nie znam żargonu). Chyba nie chodzi o metodę zwiększania powabu i drapieżności obiektu badań?

Agnieszka Bednarska

Recenzja projektu „Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*”

Temat projektu jest ważny z punktu widzenia ekotoksykologii. Problem stosowania pestycydów na wielką skalę dotyczy nie tylko naszego kraju, ale całego świata. Również wybranie obiektu badań jakim jest pszczoła miodna *Apis mellifera*, ze względu na jej znaczenie gospodarcze wydaje się zasadne. Jednak w projekcie brakuje mi jasnego sprecyzowania jakie mogą być szersze praktyczne konsekwencje uzyskania takich a nie innych wyników. Brakuje pomysłów na przyszłość.

W celu projektu należy sprecyzować o dostępność jakich zasobów autorom chodzi. Sformułowania „mechanizmy odtruwające” i „wydajność systemu odpornościowego” brzmią dziwnie. To, że pestycydy mogą stanowić potencjalny czynnik obniżający immunokompetencję osobników jest mało odkrywcze, gdyż wiadomo, że pestycydy są stosowane żeby zabijać szybko i skutecznie. Należało tak sformułować hipotezy badawcze, żeby jasno z nich wynikało, że wcale nie musi być tak, że jeśli pestycyd nie zabił organizmu to znaczy, że mu nie zaszkodził. A to, w jakim stopniu mu zaszkodził i jaki to może mieć skutek dla jego dalszego życia (podatność na choroby, pasożyty) można sprawdzić badając poziom odpowiedzi immunologicznej. Autorzy nie wspominają na ile obniżenie poziomu immunokompetencji przyczynia się do wzrostu podatności na pasożyty i choroby.

Podana nazwa pestycydu jest błędna i prawdopodobnie chodzi o imidaklopid. Zdanie „niedostateczna jest wiedza ... u bezkręgowców”, sugeruje, że to nie naukowcy, a bezkręgowce czegoś niewiedzą”. Stężenie pestycydów należało podać w nanogramach jednostek aktywnych na osobnika. Podanie samych nanogramów nic nie mówi o dawce, bo pestycyd może być w różnej formie (płyn, granulaty, proszek). Powinno się podać pełne nazwisko kierownika i wykonawcy, a nie dwuliterowe skróty KK i RM. Błędny jest sposób cytowania literatury w tekście (razi angielskie „et.al”). Również sposób cytacji w spisie literatury nie jest konsekwentny. Pojawiają się błędy w interpunkcji, ortografii i stylistyce oraz skróty myślowe.

Generalnie uważam, że projekt jest ciekawy, dotyczy ważnych zagadnień i ważnych organizmów i po dopracowaniu, jest wart finansowania.

Magdalena Lenda

Recenzja projektu K. Kuszewskiej, R. Martyki, M. Bylickiej pt. „Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*”

Autorzy w swoim projekcie poruszają niezmiernie ważny wpływ pestycydów, często używanych w rolnictwie, na organizm owadów z gatunku *Apis mellifera*. Wykazanie, iż środki ochrony roślin mogą upośledzać odpowiedź immunologiczną u pszczoły miodnej jest bardzo istotne na przykład ze względu na jej znaczenie gospodarcze oraz między innymi na ekologię zapylaczy (jest możliwe, iż ten sam związek będzie podobnie wpływał na inne owady). Projekt byłby ciekawym uzupełnieniem istniejących badań, potwierdzających toksyczny wpływ pestycydów na osobniki z omawianego gatunku. Uważam, iż plan eksperymentu jest przemyślany i logiczny. Przewidywania określone są w jasny sposób. Nie mam zastrzeżeń co do proponowanego statystycznego opracowania wyników. W opisie projektu autorzy cytują jedno z najnowszych prac, opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

Zastanawiam się czy nie warto by umieścić w tytule nazwy pestycydu, którego oddziaływanie będzie testowane. Wydaje mi się, że autorzy powinni lepiej uzasadnić w projekcie, dlaczego warto prowadzić badania nad immunokompetencją, pomimo, iż znany jest wpływ Imiadachloropridu na przeżywanie robotnic pszczoły miodnej.

Nie jest dla mnie jasne, dlaczego nić nylonowa będzie implantowana akurat pomiędzy 3 a 4 segmentem odwłoka. Moim zdaniem rola nici nylonowej, powinna zostać podana wcześniej niż przy końcu opisu eksperymentu, tym bardziej, że dużo wcześniej była wzmianka o planach jej użycia.

Podsumowując, moim zdaniem jest to ciekawy projekt i jest warty sfinansowania z pieniędzy publicznych.

Leszek Bujoczek

Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*

Zaproponowana w projekcie tematyka badań jest ciekawa i w moim odczuciu warta podjęcia. Cel został jasno określony a sposób opis jego realizacji wydaje się przemyślany i dobrze zaplanowany. Projekt jest napisany logicznie i przejrzyste co sprawia pozytywne wrażenie.

Brak wiedzy na temat podjętego zagadnienia nie pozwala odnieść mi się do merytorycznej części opracowania. Wątpliwości moje budzi natomiast wielkość próby. Grupy składające się z 12 robotnic, które dodatkowo ze względu na różnice w wielkości ciała mogą różnie reagować na dawkę pestycydu, wydają się zbyt małe aby wnioskować statystycznie. Należało by się zastanowić nad zwiększeniem próby, gdyby okazało się wielkość ciała ma istotny wpływ na odpowiedź immunologiczną owadów.

Justyna Morawska

Recenzja projektu: Wpływ pestycydu na immunokompetencję u pszczoły miodnej *Apis mellifera*

Przedstawiony przez autorów pomysł projektu poczytuję jako interesujący zarówno z perspektywy biologa-naukowca jak i pszczelarzy. Sens podjęcia tego problemu został umiejętnie uargumentowany. Wyjątkowo dokładnie zostały opracowane rozdziały: Istniejący stan wiedzy jak i Metodyka badań. Autorzy wykazali się znajomością zagadnienia, rozrznaniem w literaturze oraz pomysłem na ambitne upowszechnienie swoich badań (Czasopisma, konferencja).

Rzuca się jednak w oczy pośpiech w pisaniu projektu przejawiający się pewną liczbą błędów literowych i interpunkcyjnych. Brakowało jasnego określenia na początku pracy (Streszczenie, Cel projektu) o jaki pestycyd chodzi. Istotą problemu/cel powinien być wspomniany na samym początku a nie w połowie rozdziału.

Zastanawiam się czy cytacja (Price 1980) jest potrzebna, informacja ta zdaje się być powszechnie wiadomą. Brakuje wyjaśnienia, czym podyktowane jest uśmiercanie pszczół akurat po 48h. W rozplanowaniu kosztorysu wzbudza moje zainteresowanie proporcja korzyści finansowych wykonawców w stosunku do kosztu przeprowadzenia eksperymentu, czy 25000 / 7000 to odpowiedni układ?

Projekt kwalifikuje się do finansowania

Justyna Morawska

Michał Ciach

Recenzja projektu: Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*

Autorzy w swym projekcie poruszyli ważny problem wpływu chemizacji na środowisko. Zaproponowany układ badawczy obejmujący powszechnie stosowane w ochronie roślin pestycydy oraz ich wpływ na gatunek ważny z punktu widzenia gospodarki człowieka podnosi wartość pracy. Przedstawiona metodyka badań wydaje się być dobrze skonstruowana i pozwolić na odpowiedź na postawione pytanie badawcze.

Jednak:

Co autorzy spodziewają się wnieść nowego do stanu naszej wiedzy? Z zaprezentowanego w projekcie przeglądu istniejącego stanu wiedzy (a robionego przecież w trudnych warunkach terenowych) już wynika, że metale ciężkie oraz pestycydy wpływają negatywnie na system immunologiczny kręgowców. W celu projektu zawarte jest zdanie o negatywnym wpływie metali ciężkich na układ immunologiczny owadów. Zatem należy się spodziewać, że i u tej grupy organizmów pestycydy będą działały niekorzystnie. Co zresztą autorzy spodziewają się właśnie wykazać. Czy zatem tak łatwo przewidywalny wynik wart jest inwestycji czasowej i finansowej w jego osiągnięcie? Z przedstawionego projektu wynika, że w zasadzie autorzy „wiedzą jak jest”, ale „na pszczołach nikt tego jeszcze nie robił”. Czy kilka dni szperania w bazach publikacji nie pozwoli na odpowiedź na postawione pytanie?

Autorzy projektu zaznaczają, że kierownik projektu oraz z jeden z wykonawców mają wiedzę i doświadczenie w zakresie zarówno pszczoł jak i funkcjonowania układu immunologicznego. Mogliby oni zatem pokusić się o wykonanie pracy przeglądowej (szybciej i taniej) o wpływie pestycydów na immunokompetencję zwierząt (jeśli jeszcze takiej nie ma). Myślę, że publikacja takiego przeglądu mogłaby trafić do znacznie lepszego czasopisma i być bardziej cytowaną niż ta będąca efektem planowanego eksperymentu.

Michał Ciach

Zofia Prokop

Recenzja projektu ‘Wpływ pestycydu na immunokompetencję pszczoły miodnej *Apis mellifera*.

Recenzowany projekt wpisuje się w ważną i ciekawą tematykę wpływu pestycydów na funkcjonowanie organizmów. Autorzy dość przejrzysto i przekonująco uzasadniają cel przeprowadzenia badań. Istniejący stan wiedzy w dziedzinie, której dotyczy projekt, został omówiony w sposób jasny i dostępny. Błędem jest natomiast umieszczenie zdecydowanie zbyt dużej części przeglądowej w punkcie poświęconym celom projektu. Cel i przewidywania, które powinny być istotą tej części tekstu, znalazłam dopiero w połowie drugiego akapitu. Cały pierwszy akapit z ‘celu projektu’ należałoby moim zdaniem przenieść do punktu następnego (przy okazji pomogłoby to uniknąć powtarzania niektórych informacji dwa razy).

Formułując swoje przewidywania, autorzy napisali tylko, że spodziewają się spadku immunokompetencji w wyniku działania pestycydu. Nie wspomnieli czy spodziewają się jakiegokolwiek trendu ze wzrostem dawki pestycydu, mimo że zamierzają zastosować cztery dawki. Może się to wydawać oczywiste, jednak należałoby tę oczywistość ująć w słowa. Tym bardziej że jest to istotne przy planowaniu analiz statystycznych: autorzy chcą użyć GLMM z grupą eksperymentalną jako czynnikiem ustalonym, jednak takie podejście zakłada, że różnice mogą wystąpić równie dobrze pomiędzy dowolnymi poziomami czynnika (grupami eksperymentalnymi). W przypadku planowanych badań tak oczywiście nie jest.

Planowana metodyka badań została opisana przejrzysto i nie pozostawia pytań co do sposobu przeprowadzenia eksperymentu. Brakuje mi jednak wyjaśnienia jakim rodzajem związku jest imiadachlopid, jaki jest mechanizm jego działania na fizjologię owadów oraz w jakim okresie czasu po zastosowaniu dawki 60ng ginie 50% osobników.

Nie jest dla mnie jasne, w jaki sposób projekt składający się z jednego eksperymentu i badający jedną zmienną zależną mógłby zostać wykorzystany do napisania dwóch prac magisterskich?

Ogólnie projekt przekonuje (przynajmniej mnie) do zasadności planowanych badań, chociaż należy go dopracować. Miejscami dobrze byłoby popracować nad językiem i spójnością wypowiedzi, ale tu już może się trochę czepiam ☺.

Zofia Prokop

PROJEKT WERSJA OSTATECZNA**Wpływ pestycydu na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*.**Karolina Kuszewska¹, Rafał Martyka¹, Małgorzata Bylicka²¹ Instytut Nauk o Środowisku, UJ; ² Wydział Leśny AR w Krakowie**Streszczenie**

Proponowany projekt dotyczy wpływu powszechnie stosowanego pestycydu (Imidaklopid) na immunokompetencję robotnic pszczoły miodnej. W planowanym eksperymencie poddamy pszczoły działaniu różnych dawek pestycydu, a następnie zmierzmy poziom komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Przewidujemy, że zastosowana substancja toksyczna obniży sprawność układu odpornościowego.

Cel projektu

Układ immunologiczny pełni ważną rolę w ochronie organizmów przed patogenami, a jego sprawne funkcjonowanie jest jednym z warunków przeżycia i wydania potomstwa (Price 1980). Czynnikiem negatywnie oddziałującym na funkcje immunologiczne są zanieczyszczenia środowiska. Substancje toksyczne działające na organizmy obniżają sprawność immunologiczną powodując ich zwiększoną podatność na choroby i pasożyty (Galloway, Depledge 2001). Dotychczasowe badania wykazały, że istnieje niekorzystny wpływ metali ciężkich na układ immunologiczny owadów (Sorvari et al. 2007). Powszechne stosowanie pestycydów w rolnictwie powoduje, że mogą one również stanowić potencjalny czynnik obniżający immunokompetencję osobników. Wysokie dawki pestycydów z reguły działają śmiertelnie na owady, z kolei niskie mogą wywierać jedynie niekorzystny wpływ na różne funkcje fizjologiczne. Jednak nie wiadomo jak reaguje układ immunologiczny owadów mających kontakt z dawkami pestycydów, które nie powodują śmiertelności, a są obecne w środowisku.

Celem niniejszego projektu jest odpowiedź na pytanie czy powszechnie stosowany pestycyd (Imidaklopid) wpływa na poziom immunokompetencji u robotnic pszczoły miodnej *Apis mellifera*. Przewidujemy, że robotnice poddane działaniu tego pestycydu będą wykazywać obniżony poziom odpowiedzi immunologicznej. W celu weryfikacji tej hipotezy planujemy wykonanie eksperymentu, w którym robotnice będą poddawane działaniu różnych dawek pestycydu.

Wybór pszczoły miodnej jako obiektu badań podyktowany jest znaczeniem gospodarczym, jej strategią życiową i szczególnym narażeniem na pestycydy. Jako owad socjalny pszczoła żyje w wysokich zagęszczeniach bliskospokrewnionych osobników, co stwarza sprzyjające warunki dla rozprzestrzeniania się patogenów. Efektywnie działający układ immunologiczny pojedynczych osobników może zatem oddziaływać na kondycję i produktywność całej kolonii. Dodatkowo pszczoła miodna jest dobrym obiektem do wykonania tego typu badań, ponieważ jest łatwa w hodowli.

Istniejący stan wiedzy

Dotychczas wykonano szereg badań pokazujących wpływ zanieczyszczonego środowiska na system immunologiczny człowieka i innych kręgowców (Galloway, Depledge 2001). Natomiast nie wiele wiadomo na temat funkcjonowania układu immunologicznego w warunkach zanieczyszczeń u bezkręgowców (Sorvari i in. 2007). System odpornościowy tej grupy organizmów jest mniej specyficzny i mniej złożony niż u kręgowców (Beck, Habicht 1996). Powoduje to że, wpływ substancji toksycznych na funkcjonowanie układu odpornościowego kręgowców i bezkręgowców może być inny. Układ immunologiczny u owadów oparty jest na odpowiedzi komórkowej, w której główną rolę odgrywają hemocyty (komórki fagocytujące) (Karp 1990). Sprawność działania tego układu jest obniżana przez zanieczyszczenia (Galloway, Depledge 2001), co zostało potwierdzone badaniami na metalach ciężkich (Eeva i in. 2004, Sorvari i in. 2007). Przypuszczać należy, że również inne substancje toksyczne, w tym pestycydy, będą miały podobny wpływ na immunokompetencję owadów. Według naszej wiedzy do tej pory nie przeprowadzono badań w tym zakresie. Efekt obniżonej odporności pojedynczych osobników jest bardziej widoczny u koloniach owadów społecznych, ponieważ

życie w ścisłych relacjach ułatwia przenoszenie infekcji (Schmid-Hempel 1998). Dlatego też szereg prac o immunokompetencji wykonano na owadach o takiej strategii życiowej (Eeva et al. 2004, Vainio i in.. 2004). Nie były one jednak prowadzone w kontekście wpływu pestycydów na odporność.

Metodyka badań

Aby rozwiązać postawiony problem planujemy wykonanie eksperymentu. Do tego celu wykorzystamy po 72 robotnice pszczoły miodnej pochodzące z 10 uli. Będą one pobierane w pierwszym dniu po przepoczwazaniu. Osobniki z każdego ula będą przetrzymywane w osobnych klateczkach w inkubatorze (temperatura 33 °C, względna wilgotność 70%) i karmione roztworem wody z cukrem (1:1). Po 24 godzinach pobytu w inkubatorze wszystkie osobniki zostaną uśpione przy pomocy CO₂. Następnie każdemu osobnikowi pomiędzy 3 a 4 segmentem odwłoka zostanie zaimplantowana nylonowa nić (grubość 0,3 mm, długość 0,5 mm), za pomocą której będziemy badać poziom odpowiedzi immunologicznej. Robotnice z każdej klateczki zostaną losowo przydzielone do 6 grup eksperymentalnych po 12 osobników każda. W czterech grupach zostaną zaaplikowane różne dawki powszechnie stosowanego w rolnictwie pestycydu (Imidaklopid). Planujemy zastosować następujące dawki pestycydu: 60, 30, 15 i 7,5 ng jednostek aktywnych/pszczołę, rozpuszczonego w acetonie. Dawki zostały dobrane tak, aby nie powodować wysokiej śmiertelności. Najwyższa proponowana dawka (60 ng jednostek aktywnych/pszczołę) jest wartością przy której ginie 50% osobników pszczoły miodnej (A. Bednarska – inf.ustna). Każdemu osobnikowi zostanie zaaplikowany 1 µl roztworu na tułów przy pomocy pipety. W kolejnej grupie pszczołom będzie aplikowany 1 µl acetonu bez pestycydu. Natomiast w ostatniej grupie pszczoły zostaną nakropione tylko 1 µl soli fizjologicznej. Pszczoły z każdej grupy eksperymentalnej będą znakowane innym kolorem przy pomocy markera. Po 48 godzinach od zaaplikowania dawki pszczoły zostaną uśmiercone poprzez zamrożenie, a nylonowe implanty wyciągnięte. W związku z kontaktem bezpośrednim z hemolimfą nylonowe nici są otaczane hemocytami, którym towarzyszy proces melanizacji (Götz 1986). Liczba komórek i ilość melaniny zgromadzonej na implancie będzie oceniana na podstawie stopnia zaciemnienia po jego uprzednim utrwaleniu. Określenie stopnia zaciemnienia nici będzie wykonane za pomocą analizy obrazu zdjęcia implantu pod lupą (Schmid-Hempel, Schmid-Hempel 1998). Jednocześnie u wszystkich osobników zostanie określona wielkość ciała poprzez pomiar długości komórki radialnej (na prawym skrzydle) (Bertsch 1984).

Do opracowania statystycznego wyników użyjemy modelu liniowego mieszanego (GLMM). Zmienną zależną będzie pomiar immunokompetencji, natomiast czynnikiem ustalonym grupa eksperymentalna. Dodatkowo wielkość ciała zostanie wprowadzona do modelu jako kowariata aby kontrolować jej potencjalny wpływ na poziom odpowiedzi komórkowej. Ul będzie w tym modelu czynnikiem losowym.

Kierownik projektu (KK) ma doświadczenie w pracy z pszczołami, natomiast jeden z wykonawców (RM) posiada doświadczenie w badaniach immunologicznych. W projekcie wykorzystamy pszczoły z pasieki Instytutu Nauk o Środowisku UJ. Urządzenia niezbędne do wykonania eksperymentu (inkubator, lupa, aparat cyfrowy, program do analizy obrazu) są w posiadaniu wyżej wymienionej jednostki i wykonawcy mają do niego dostęp.

Efekty projektu

Wyniki zostaną opublikowane w *Apidologie* lub *Ecotoxicology* i zaprezentowane na międzynarodowej konferencji toksykologicznej oraz posłużą do napisania 1 pracy magisterskiej. Zdobyta wiedza posłuży do lepszego określenia dawek pestycydu z punktu widzenia ograniczania niepożądanego wpływu na owady pożyteczne. Wyniki będą rozpowszechnione również wśród rolników i pszczelarzy.

Kosztorys

5. Wynagrodzenia dla wykonawców projektu (3 osoby)	3 000 zł
6. Zakup rodzin pszczołach	4 000 zł
7. Zakup odczynników (pestycyd, aceton, odczynniki do utrwalenia implantu) i materiałów (tipsy, pincety, eppendorfy, nici nylon)	5 000 zł
8. Udział w konferencji dla wykonawców	15 000 zł
Suma	27 000 zł

Literatura

- Beck G., Habicht G. S. 1996. Immunity and the invertebrates. *Scientific American* 11: 42-46.
- Bertsch A. 1984. Foraging in male bumble bees (*Bombus lucorum* L.): maximizing energy or minimizing water load? *Oecologia* 62: 325-336.
- Eeva, T., Sorvari, J., Koivunen, V., 2004. Effects of heavy metal pollution on red woodant (*Formica* s. str.) populations. *Environmental Pollution* 132: 533-539.
- Galloway T. S., Depledge M. H. 2001. Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.
- Götz P. 1986. Encapsulation in arthropods. *In* Immunity in invertebrates. *Edited by* M. Brehélin. Springer-Verlag, Berlin. pp. 153-170.
- Karp R. D. 1990. Cell-mediated immunity in invertebrates. *Bio-Science* 40: 732-737.
- Price P. W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton: Princeton University Press.
- Schmid-Hempel P. 1998. Parasites in social insects. Princeton: Princeton University Press.
- Schmid-Hempel R., Schmid-Hempel P. 1998. Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Functional Ecology* 12: 22-30.
- Sorvari J., Rantala L. M., Rantala M. J., Hakkarainen H., Eeva T. 2007. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. *Environmental Pollution* 145: 324-328.
- Vainio, L., Hakkarainen, H., Rantala, M.J., Sorvari, J., 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*: effects of the nest, body size and sex. *Evolutionary Ecology* 18: 75-84.

4 Czy kosa zjadają owoce bogate w roślinne metabolity wtórne aby pozbyć się pasożytów układu pokarmowego? – Magdalena Lenda, Zofia Prokop, Maciej Ejsmond

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

M. Lenda, Z. Prokop, M. Ejsmond
Ochotnica Górna 08.10.2007

Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (Turdus merula)

Streszczenie

W zaproponowanym przez nas projekcie chcemy zbadać czy kosa mogą obniżyć swój stopień zapasożycenia przez wybieranie owoców o dużej zawartości metabolitów wtórnych roślin a konkretnie amigdaliny. Odpowiedź na to pytanie zostanie udzielona w wyniku przeprowadzenia dwóch eksperymentów. W jednym zbadamy wpływ zapasożycenia na wybór owoców irgi (zawiera amigdalinę). W drugim zbadamy efektywność amigdaliny w redukcji zapasożycenia.

Cele projektu

Istotą planowanych badań jest odpowiedź na pytanie czy kosa konsumują owoce zawierające wysokie stężenia amigdaliny w celu zwalczania pasożytów wewnętrznych. Amigdalina, z grupy glikozydów cyjanogennych, należy do tzw. roślinnych metabolitów wtórnych (*Plant secondary metabolites* - PSM). Powszechnie uważa się, iż PSM występujące w owocach chronią je przed atakiem patogenów i roślinożerców. Roślinne metabolity wtórne, toksyczne dla tego typu organizmów (np. glikozydy) zawarte są w wielu owocach (np. irga, psianka, czeremcha itd.) chętnie zjadanych przez ptaki. Stawiamy hipotezę, iż przyczyną jest antypasożytnicze działanie PSM. Liczne badania *in vitro* oraz *in vivo* pokazują, iż wiele związków spośród PSM wykazuje silne właściwości antypasożytnicze dla np. nicieni, plazińców, pierwotniaków (Athanasiadou i Kyriazakis 2004). Zgodnie z postawioną hipotezą przewidujemy, że:

1. owoce zawierające amigdalinę będą częściej wybierane przez osobniki zapasożyczone niż te pozbawione pasożytów (eksperyment 1).
2. spożywanie amigdaliny obniży stopień zapasożycenia (eksperyment 2).

Stan wiedzy

Dotychczasowe prace poświęcone preferencjom pokarmowym ptaków owocożernych skupiały się na roli zawartości cukrów, lipidów i białek. Prace uwzględniające zawartość PSM w owocach, badały najczęściej ograniczający wpływ tych związków na spożycie przez ptaki. Hipoteza wybiórczej toksyczności zakłada, iż wtórne metabolity roślin zawarte w owocach są toksyczne dla organizmów, które nie przyczyniają się do dyspersji nasion, natomiast są nieszkodliwe dla zwierząt, które koewoluowały jako rozsiewacze (Cipolini i Levey 1997). Potwierdzenia tej hipotezy dostarczają prace pokazujące, iż ptaki owocożerne (np. jemioluszką) nie metabolizują amigdaliny (Strumpv i in. 1999). W organizmach innych zwierząt rozkład tego glikozydu prowadzi do uwolnienia cyjanowodoru, który blokuje oddychanie komórkowe. Innym przykładem jest *Toxoscome curviroste*, ptak będący głównym rozsiewaczem nasion papryki chilli i odżywiający się jej owocami, które są silnie toksyczne dla innych zwierząt, np. myszy (Teewksbury i Nabhan, 2001).

Hipoteza ta nie wyjaśnia jednak faktu, że wiele owoców zawierających toksyczne PSM cechuje się również niską zawartością substancji odżywczych, a mimo to jest chętnie zjadanych przez ptaki, nawet w obecności owoców bardziej obfitych w nutrieny (Snow, ~1999). Przykładem może być jarzębina, zawierająca kwas parasorbowy (w większych dawkach letalny np. dla myszy) lub irga, zawierająca amigdalinę. Owoce obu gatunków są ubogie w substancje odżywcze, a mimo to stanowią znaczącą część diety ptaków, mimo występowania w tym samym czasie głogu, czarnego bzu i innych znacznie bardziej odżywczych owoców (Snow, ~1999).

Proponowane badania mają na celu sprawdzenie czy zjadanie przez ptaki owoców o wysokiej zawartości PSM może mieć związek z obroną przed pasożytami. Pasożyty są obecnie powszechnie uważane za jeden z najważniejszych czynników wpływających na dostosowanie organizmów. Skuteczność niektórych PSM (m.in. z grup glikozydów, alkaloidów, saponin i tanin) w zwalczaniu pasożytów została zaobserwowana u ssaków przeżuujących (Athanasidou i Kyriazakis, 2004). Według naszej wiedzy nie było jednak żadnych badań w tym temacie na ptakach.

Metodyka badawcza

1) Opis układu badawczego

Elementami naszego układu badawczego będą: kosa, pasożyty jelitowe, amigdalina, owoce irgi i głogu. Jako obiekt naszych badań wybraliśmy kosa (*Turdus merula*, rodzina Turdidae), ponieważ u osobników tego gatunku duży udział w diecie stanowią owoce zawierające wysokie zawartości PSM. Kosy można dość łatwo odławiać, dodatkowym argumentem jest zapewniona współpraca z osobą, która ma doświadczenie w prowadzeniu wieloletniej hodowli tych ptaków. Wybraliśmy pasożyty jelitowe, ponieważ nadają się do przeprowadzenia sztucznego zapasożycenia kosów oraz kontrola zapasożycenia opiera się na badaniach kału, co minimalizuje wywierany na ptaki stres. Amigdalinę wybraliśmy ponieważ jest to jeden z najbardziej toksycznych związków zawartych w owocach irgi - produkt metabolizmu tego glikozydu blokuje oddychanie komórkowe. Spośród owoców wchodzących w skład diety kosa, Irga posiada najwyższą zawartość amigdaliny. Głóg owocuje w tym samym czasie co irga, a nie zawiera w miąższu amigdaliny i innych silnie toksycznych PSM, natomiast ma znacznie więcej składników odżywczych.

2) Plan badań

2.1) Wybiórczość pokarmowa kosów w zależności od stopnia zapasożycenia (eksperyment 1).

W eksperymencie zamierzamy użyć 90 samców kosa odłowionych z zakrzaczeń nad brzegiem Wisły między Salwotorem a Tyńcem. Odłowione ptaki przewieziemy do Instytutu Nauk o Środowisku UJ i umieścimy w indywidualnych klatkach w laboratorium, w temperaturze 20°C i fotoperiodzie adekwatnym do daty odłowienia.

Przez kolejnych 5 dni będziemy aklimatyzować ptaki do warunków laboratoryjnych. W tym czasie będziemy im podawać pożywkę dla kosów opracowaną na potrzeby innych badań (Walasz, 19..), składającą się z gotowanego jajka, białego sera i startej marchewki. Codziennie począwszy od dnia odłowów będziemy od każdego osobnika pobierać próbkę odchodów i wymieniać podściółkę w klatce. Z pomocą parazytologa oznaczymy na podstawie tych próbek różnorodność gatunkową pasożytów jelitowych. Otrzymane wyniki pozwolą nam wybrać 3 do 5 najczęściej występujących gatunków nicieni jelitowych, które użyjemy później do sztucznego zapasożycenia ptaków. Do tego zabiegu wybraliśmy nicienie ponieważ mają one cykl życiowy bez stadium wymagającym żywiciela pośredniego (formą infekcyjną dla ptaków mogą być jaja zawarte w odchodach).

Po 5 dniach aklimatyzacji podamy ptakom środek antypasożytniczy. Po tygodniu od odpasożycenia skontrolujemy jego efektywność badając odchody na obecność form życiowych pasożytów. Procedurę

odpaszożycania będziemy powtarzać do momentu skutecznego wyleczenia ptaków. Kiedy to nastąpi, zwierzęta podzielimy na 2 grupy: eksperymentalną i kontrolną, po 45 osobników każda. Ptakom z grupy eksperymentalnej, po kilkugodzinnym przegłodzeniu, podamy w pokarmie jaja nicieni w liczbie ustalonej na podstawie danych literaturowych (prace nad sztucznym zapaszożycaniem ptaków). Ptaki z grupy kontrolnej również zostaną przegłodzone, a następnie nakarmione pokarmem bez jaj nicieni. Efektywność zapaszożycania w grupie eksperymentalnej skontrolujemy po odpowiednim czasie (dobranym na podstawie znajomości cykliów życiowych użytych gatunków nicieni).

Po potwierdzeniu skutecznego zapaszożycania w grupie eksperymentalnej przeprowadzimy badanie wybiórczości pokarmowej. W tym celu do każdej klatki (w obu grupach) podamy 600 owoców (300 owoców głogu + 300 owoców irgi). Dla każdego ptaka, po zjedzeniu przez niego pierwszych 100 owoców obliczymy proporcję jaką w tej liczbie stanowiły owoce irgi. Otrzymane wyniki przeanalizujemy przy pomocy testu t Studenta dla średnich z grup, gdzie zmienną niezależną będzie obecność zapaszożycania, a zmienną zależną – proporcja zjedzonych owoców irgi. Odrzucenie w teście hipotezy zerowej pozwoli nam stwierdzić, że zapaszożycenie ma wpływ na rodzaj wybieranych owoców.

2.2) Wpływ amigdaliny na zapaszożycenie (eksperyment 2).

W tym eksperymencie użyjemy 90 samców kosa odłowionych i przetrzymywanych tak jak w eksperymencie 1. Po 10 dniach aklimatyzacji, na podstawie analizy odchodów ocenimy stopień zapaszożycania wszystkich osobników. Następnie podzielimy je na dwie grupy: eksperymentalną i kontrolną (po 45 osobników) w taki sposób by średnie oraz wariancje zapaszożycania były jak najbardziej zbliżone w obu grupach. Przez kolejne 5 dni ptakom w grupie eksperymentalnej będzie podawany codziennie wodny roztwór amigdaliny, a grupie kontrolnej czysta woda (strzykawką do dzioba). Ilość podanej amigdaliny zostanie dobrana na podstawie średniej zawartości tego związku w owocach, pomnożonej przez średnią liczbę owoców irgi spożywanej w ciągu dnia przez kosa (obserwacje ptaków w hodowli). Każdego dnia w czasie trwania eksperymentu będą pobierane próbki kału z klatki każdego ptaka oraz wymieniana podściółka. Liczba form życiowych w próbkach kału określi stopień zapaszożycania zwierząt.

Otrzymane wyniki zostaną przeanalizowane za pomocą analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami (Repeated measures ANOVA) z czynnikiem ustalonym „zabieg” (obecność i brak amigdaliny w podawanej wodzie). Zmienną zależną będzie stopień zapaszożycania ptaków. Statystycznie istotny wpływ badanego czynnika „zabieg” pozwoli stwierdzić, że spożycie amigdaliny wpływa na stopień zapaszożycania u badanych ptaków. Spodziewamy się również efektu czynnika czasowego (kolejne dni eksperymentu), gdyż zapaszożycenie może zmieniać się w czasie. Ewentualnie, istotna statystycznie interakcja czynnika „zabieg” z dniem wykaże, że dynamika zmian zapaszożycania różni się między grupą kontrolną a eksperymentalną.

Formy rozpowszechniania

Wyniki chcielibyśmy zamieścić w renomowanym czasopiśmie naukowym i zaprezentować na konferencji międzynarodowej ESEB.

Literatura

- Athanasiadou, Kyriazakis (2004) „Plant secondary metabolites: antyparasitic effect and their role in ruminant production systems” *Proceedings of the Nutrition Society*
- Cipollini, Levey (1997) “Secondary metabolites of fleshy vertebrate – dispersed fruits: adaptive hypothesis and implications for seed dispersal”, *American Naturalist*
- Snow (1999) „birds and berries”
- Struempv, Dube, Rio (1999) “The cyanogenic glycoside amygdalin does not deter consumption of rippen fruit by *Cedar waxwing*”, *The Auk*
- Teewksburry, Nabhan; (2001) “Directed deterrence by Capsaicin in chilis”, *Nature*
- Walasz (19..) Praca doktorska

RECENZJE

Hajnalka Szentgyörgyi

Recenzja projektu pt „Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych kosa (*Turdus merula*)”

Projekt, czy raczej plan projektu przedstawia ciekawy problem badawczy, ale:

Tytuł projektu oddaje tylko część zagadnień poruszanych w projekcie i to tej części mniej ciekawej: o wpływie amigdaliny na poziom pasożytów jelitowych u kosa. Znacznie bardziej interesujące dla biologa jest druga kwestia: czy kosy „świadomie” wybierają owoce zawierające amigdalinę zależność od poziomu swojego zapasożycenia, zakładając optymistycznie, iż takowe działanie istnieje.

Z tym się wiąże następny poważny zarzut: Sami autorzy piszą, iż niewiele wiadomo na temat przeciwpasożytniczego działania PSM u ptaków, a już na pewno niewiele na temat działania amigdaliny u kosów. (Z literatury wiemy, że amigdalina jest glikozydem o działaniu przeciwnowotworowym, przynajmniej takie są wyniki badań *in vitro*, natomiast na temat działania przeciwpasożytniczego nie znalazłam żadnej wzmianki). Dlaczego więc autorzy planują rozpoczęcia eksperymentów od wybiórczości pokarmowej u zapasożycionych i niezapasożycionych osobników, skoro nie wiemy jak i czy w ogóle badany związek działa na wybrany przez nas gatunek modelowy.

Dlaczego tylko nicienie jelitowe autorzy biorą pod uwagę, jeśli chodzi o badanie działań przeciwpasożytniczych amigdaliny? Różnego rodzaju pierwotniaki pasożytnicze lub płazińce zamieszkujące układ trawienny mogą mieć równie poważne konsekwencje zdrowotne, jak i nicienie. Dodatkowo, skoro nie wiemy czy i jak działa badany związek, może ono równie dobrze lub jeszcze wyraźniej działać na pasożyty inne, niż nicienie.

Eksperymenty są logicznie zaplanowane, ale pewne kwestie wymagają przemyślenia. Wiedza autorów i podejrzewam, że także dane dostępne z literatury są dość ogólnikowe na temat możliwych pasożytów u kosa. Dlaczego akurat 3-5 gatunków nicieni chcą autorzy użyć do ponownego zapasożycenia? Jaki bezpieczny środek można stosować u ptaków?

Eksperyment 1: Co to znaczy „po skutecznym wyleczeniu”? Natychmiast jak zabraknie śladów w kale po badanych pasożytach? Czy po okresie rekonwalescencji ptaków po podaniu środka antypasożytniczego? Jak wiemy tzw. „odrobaczenie” poważnie wycieńcza organizm, więc jest to efekt, którego nie można ignorować. Dlaczego podajemy w sumie 600 owoców, skoro po 100 zjedzonych obliczamy proporcje?

Eksperyment 2: Dlaczego ptaki są dłużej aklimatyzowane? Na podstawie czego określimy poziom zapasożycenia skoro nawet nie wiemy jakie gatunki i w jakich ilościach znajdziemy (patrz uwagi do eksperymentu 1)? Czy amigdalina będzie podawana raz dziennie, czy w kilku mniejszych dawkach? Czy kosy trawia też w całości nasiona irgi, czy tylko miąższ? Jeśli nie, to jak wyliczyć dawkę na podstawie liczby nasion, skoro amigdalina występuje głównie w nasionach?

I w końcu ostatni zarzut, a może właśnie duży plus powyższego projektu: autorzy nie podały żadne koszty związane z wykonaniem projektu, rozumiem, że nie potrzebują dofinansowania swoich badań.

Podsumowując mogę powtórzyć pierwsze zdanie recenzji: jest to ciekawe zagadnienie, natomiast zdecydowanie wymaga dopracowania kwestii zarówno metodologicznej jak i finansowej. Życzę autorom powodzenia.

Dawid Moroń

Recenzja projektu „Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (Turdus merula)”.

Celem pracy jest (1) zbadanie czy owoce zawierające amigdalinę będą częściej wybierane przez osobniki zapasożyczone oraz (2) czy spożywanie amigdaliny obniży stopień zapasożyczenia.

Pytania postawione przez autorów projektu są nowatorskie oraz sens ich postawienia jest dobrze uzasadniony. Jest również klarownie postawione jaka hipotezę autorzy zamierzają obalić.

Autorzy nie uzasadnili dlaczego wybrali do badań samce. Możemy się spodziewać różnic w zapasożyczeniu między samcami a samicami. Czy te różnice autorów nie interesują?

Można było uniknąć prostych błędów takich jak: jednozdaniowe akapity, brak kursywy w nazwach gatunków w języku łacińskim itd.

Projekt jest wart finansowania po niewielkich poprawach

Dominika Drogosz

Recenzja projektu

Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa

Streszczenie jest zbyt pobieżne, brak informacji o metodyce.

Cel badań jest klarowny, jednak wprowadzenie dwóch różnych ujęć (w Streszczeniu i Celu projektu) powoduje zamieszanie, nie do końca jest jasne o co w zasadzie chodzi.

Hipotezy zostały jasno postawione, a wybór tematu dobrze uzasadniony. Autorzy szczegółowo przemyśleli problem co poskutkowało odpowiednim doбором metodyki, która w moim przekonaniu umożliwi odpowiedź na postawione pytania.

W kontekście przytoczonego stanu wiedzy problem jest nowatorski, gdyż proponowane badania dadzą konkretną odpowiedź, czy z pozoru niekorzystne i kosztowne dla organizmu zachowanie może mieć głębsze podłoże.

Kilka uwag:

- * W kontekście projektu wydaje się niekonieczne wyjaśnienie hipotezy wybiórczej toksyczności, skoro nie ma mowy o tym, że potwierdzenie postawionych przypuszczeń wskazuje, że takie zjawisko może nieskutkować.
- * Brak konkretnej informacji dlaczego dwa osobne doświadczenia.
- * Brak informacji popartych literaturą konkretnie o kosie i jego preferencjach pokarmowych.
- * Wybrano irgę ponieważ jest w niej najwięcej amigdaliny, a jak problem będzie się miał do przypadku owocu mało odżywczego i z niską zawartością tej substancji, a też jedzonym?
- * Stwierdzenie, że wyniki będą zamieszczone w renomowanym czasopiśmie wskazuje, że autorów nie interesuje dotarcie do konkretnych odbiorców, a jedynie renoma.

Justyna Morawska

Recenzja projektu: Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (Turdus merula)

Z wielkim rozczarowaniem odkryłam, że nie mam zbyt wiele możliwości jeżeli chodzi o wytknięcie autorom nielogiczności, złych argumentacji i zwracania uwagi na niedomagania w znajomości tematu. Problem badawczy jest nowatorski a określenie i argumentacja celu są w pełni opracowane. Dla większej klarowności zmieniłabym jednak kolejność zdań w Celu: ... *Liczne badania...* przed ...*Stawiamy hipotezę-* to jednak szczegół.

Chciałabym także nadmienić o metodzie doboru fotoperiodu. Pierwszy raz spotkałam się z jego ustalaniem zgodnie z czasem odłowienia. Brawo za spostrzegawczość!

Zastanawiające są natomiast dwie rzeczy.

Eksperyment jest przeprowadzany tylko na samcach. Czy autorzy nie obawiają się, że w przyszłości ktoś przez nieuwagę zacznie generalizować ten problem i mówić ogólnie **o kosach** leczących się z pasożytów, zamiast tak jak jest w przeprowadzanym eksperymencie, **o samcach kosów**? Takie uogólnienie może powodować niejasności, stąd sugeruję wziąć także pod uwagę samice. Drugą sprawą jest uzasadnienie dlaczego w eksperymencie dotyczącym badania wybiórczości czas aklimatyzacji wynosi 5 dni a w eksperymencie dot. Wpływu amigdaliny wynosi on 10 dni.

Nazwy łacińskie piszcie kursywą.

Projekt zdecydowanie nadaje się do finansowania.

Ukłony, Justyna Morawska

Katarzyna Bojarska

Recenzja projektu „Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (Turdus merula)”

Autorzy projektu podejmują próbę nowatorskiego wyjaśnienia zjawiska powszechnie występującego w przyrodzie. Poruszony problem wydaje się być bardzo ciekawy, a sposób weryfikacji hipotezy dobrze przemyślany.

Sformułowanie „właściwości antypasożytnicze dla nicieni” sugeruje, że odrobaczamy nicienie.

Przy pierwszym wspomnieniu o gatunku rośliny należy podać łacińską nazwę gatunkową.

Nie podano literatury do stwierdzenia, że pasożyty są uważane za ważny czynnik doboru naturalnego.

Określenie „owoce zawierające wysokie zawartości” można podać w formie lepiej przyswajalnej dla czytelnika.

Zdanie: „Amigdalinę wybraliśmy ponieważ jest to jeden z najbardziej toksycznych związków zawartych w owocach irgi...” sugeruje, że zawierają one również inne toksyczne substancje. Jeżeli tak jest, należałoby o tym wspomnieć.

W metodyce należałoby uzasadnić wybór płci obiektu badań.

Wydaje mi się, że początki akapitów powinny być zaznaczone wcięciem.

Małgorzata Bylicka**Ocena projektu badawczego: Rola amigdaliny występującej w owcach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (*Turdus merula*)****Uwagi ogólne do całego tekstu**

Projekt napisany jest ciężkim do czytania stylem (zdania wielokrotnie złożone z licznymi powtórzeniami, pojawiają się zdrobnienia). Dodatkowo tekst wymaga formatowania (nazwy łacińskie powinny być pisane kursywą, nie jest również konieczne pisanie nazw gatunków czy związków z dużej litery, brak konsekwencji w spisie literatury). Nowe myśli powinny stanowić odrębne akapity, a nie tylko być rozpoczynane od nowej linii. Jeśli miejsca gdzie dokonano takiego zabiegu rzeczywiście są nowymi myślami należy uważać, by nie powstały akapity jednozdaniowe.

Tytuł – przy takiej metodyce należy sprecyzować do nicieni

Streszczenie – również należałoby sprecyzować do nicieni

Cele projektu – postawiono hipotezę, a brak jest uzasadnienia potrzeby wykonania takiego projektu

Stan wiedzy – „nutrienty” niepotrzebne, jest polskie słowo nutrient = składnik pokarmowy.

Metodyka badawcza

– „90 samców kosa” – to dużo, czy wykonawcy mimo, że „kosa można dość łatwo odławiać” są w stanie schwytać taką ilość ptaków? Uważam, że nawet przy posiadanej praktyce w tej dziedzinie i dużej liczebności kosa schwywanie, w krótkim czasie (a to konieczne) takiej ilości jest nierealne, dodatkowo stosując selekcję samców.

– „odłowione ptaki przewieziemy do INoŚ i umieścimy w indywidualnych klatkach” – Jaki jest wymiar klatki przeznaczonej dla jednego kosa i czy Instytut posiada laboratorium tej wielkości, aby je wszystkie zmieścić?

– „5 dni będziemy aklimatyzować ptaki” – w związku z problemami z odłowem czy każdy ptak będzie miał 5-dniową aklimatyzację, czy też w celu wyrównania rozpoczęcia eksperymentu dla wszystkich ptaków, jedne będą miały ten okres dłuższy, a inne krótszy.

– „wybraliśmy nicienie” i ten fakt być może rozwiązuje problem ze złożonymi cyklami rozrodczymi pasożytów, ale tworzy następny. Nie mamy pewności czy nicienie są tą grupą pasożytów przeciwko, którym ptaki stosują amigdalinę. W naturalnym środowisku jest wiele owoców o toksycznych właściwościach (co autorzy podkreślają wielokrotnie), które ptaki mogą pobierać i nie sprawdzając działania amigdaliny na większej liczbie gatunków pasożytów (wszystkich stwierdzonych w doświadczeniu) możemy uzyskać wynik, że substancja (ta konkretna) nie wpływa na pasożyty (nicienie). Warto wykonać pilotażowy eksperyment i w pierwszym rzędzie sprawdzić jak działa amigdalina na pasożyty uzyskane z odchodów kosa.

– „podamy 600 owoców” – a nie mamy możliwości zmuszenia ptaków do ich zjedzenia. Znane mi przypadki sugerują, że ptaki (lub część z nich) często nie chcą jeść podawanych owoców.

– Dzienna dawka amigdaliny podawana jednorazowo może okazać się za wysoka, lepiej podawać ją np. w pokarmie. Nie gwarantuje nam ona 100% przyswojenia substancji przez ptaki, ale jeśli decydujemy się na takie ustępstwo przy zapasozycaniu – „podamy w pokarmie jaja nicieni” to nie będzie to wielki błąd również w tym wypadku. Ominiemy w ten sposób stresujący dla ptaków zabieg wstrzykiwania toksyny.

Kosztorys – czyżby wnioskodawcy nie potrzebowali środków finansowych ☺?

Temat ciekawy, ważny i warty realizacji (co nie jest podkreślone przez autorów), jednak nie jest możliwe uzyskanie finansowania bez dopracowania metod jego wykonania, które w obecnej formie nie gwarantują uzyskania niezbędnych wyników.

Michał Ciach

Recenzja projektu: Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa (*Turdus merula*)

Autorzy wybierając temat swojego projektu poruszyli interesujące zagadnienie, które może pomóc w odpowiedzi na pytanie czy wybór pokarmu przez zwierzęta jest determinowany przez ich kondycję zdrowotną. Poznanie relacji pomiędzy zwierzętami owocożernymi a ich pokarmem oraz znaczenie w tej relacji pasożytów może być ważne dla poznania podłoża procesu koewolucji gatunków roślin zoochorycznych oraz ich wektorów. Można postawić sobie dalej idące pytanie czy roślina ma cel w tym, aby ptaki były silnie zapasożyczone. Wyjaśnienie zawartego w tytule pracy związku z pewnością wzbudzi zainteresowanie i dyskusję wśród ekologów i nie przejdzie bez echa.

Wybór kosa jako obiektu badań wydaje się być trafny, jednak nie jest on umotywowany w projekcie.

1. Zawarte w celu projektu zdanie „Powszechnie uważa się, iż PSM występujące w owocach chronią je przed atakiem patogenów i roślinożerców” powinno być poparte cytacjami, które skłoniły autorów do jego użycia. Jednak przyjęcie takiej tezy jest nieco dyskusyjne. Owoce są produkowane po to by zostać zjedzone. Ich produkcja jest zapewne niezwykle kosztowna dla rośliny a stosowanie (również kosztownych) metod samoobrony przed „roślinożercami” nie jest spójne. Chyba, że roślina chce selektywnie wybierać przez kogo ma być zjedzona a przez kogo nie. I tu może mieć znaczenie amigdalina – substancja toksyczna selektywnie. Autorzy powinni zatem poświęcić nieco więcej uwagi związkowi „owoc-konsument”.

2. W celu projektu brakuje jasno postawionej hipotezy badawczej. Z tekstu można się domyślać co Autorzy chcą osiągnąć, jednak cel musi być wyrażony jasno.

3. Recenzentowi nasuwa się wątpliwość o kolejność przeprowadzenia planowanych dwóch zabiegów eksperymentalnych. W pierwszej kolejności należałoby poznać wpływ amigdaliny na pasożyty. A potem preferencje pokarmowe kosa.

4. Przedstawiony przez Autorów stan wiedzy nieco łagodzi niepokoje Recenzenta wyrażone w punkcie 1. Nie mniej jednak rola amigdaliny powinna być dokładniej przedyskutowana w kontekście znaczenia dla roślin oraz ich konsumentów.

5. Autorzy wydają się wyrażać zdumienie faktem, że rośliny zawierające PSM i niską zawartość substancji odżywczych są mimo wszystko konsumowane. Istotną rolę odgrywa tu jednak ilość substancji szkodliwych zawarta a nie sam fakt obecności. Przykładem niech będzie fakt powszechnie znanego dobroczynnego wpływu wina czerwonego na układ krążenia człowieka. A z drugiej strony wiemy jednocześnie, że alkohol zabija.

Reasumując autorzy powinni zwrócić większą uwagę na ilościowy skład substancji toksycznych w owocach. Co zresztą jest zasadne w kontekście planowanego eksperymentu.

6. W metodach pojawiają się nieprecyzyjne określenia „duży udział”, „dość łatwo”, „jednen z najbardziej”. Co one znaczą zdaniem Autorów?

7. Autorzy twierdzą, że „kosa można łatwo odławiać”. Zdaniem Recenzenta to bardzo względna teza. Autorzy powinni się pochwalić metodą pozwalającą chwycić ptaki z dużą łatwością.

8. Autorzy nie precyzują w jakim wieku będą osobniki użyte w eksperymencie. Preferencje pokarmowe, stopień zapasożyczenia mogą wykazywać różnice zależne od wieku. Rozpoznawanie ptaków starszych niż pierwszoroczne jest praktycznie niemożliwe. Sugeruję zatem wybrać do eksperymentu ptaki będące w pierwszym roku ich życia.

9. Schwytnięcie 90 samców kosa, będących w pierwszym roku ich życia „w zakrzaczeniach nad brzegiem Wisły między Salwatorem a Tyńcem” może nie być „dość łatwe”. Ile czasu może to zająć trójce autorów? A jeśli zatrudnią zawodowych osoby do pomocy to czy przewidzieli

Rafał Martyka**Recenzja projektu: „Rola amigdaliny występującej w owocach w zwalczaniu pasożytów jelitowych u kosa *Turdus merula*”**

Problem badawczy zaprezentowany w powyższym projekcie wydaje się być interesujący i nowatorski. Generalnie zagadnienia związane z interakcjami pasożyt-gospodarz i czynnikami je kształtującymi są jednymi z istotniejszych problemów biologii ewolucyjnej. Autorzy chcą wykazać, że zjadanie owoców pewnych gatunków roślin może mieć działanie antypasożytnicze. Jest to o tyle ciekawe, że owoce niektórych gatunków rzeczywiście nie posiadają wysokiej wartości energetycznej, a są jednak chętnie zjadane przez ptaki. To może oznaczać, że zjadanie tych owoców przez ptaki przynosi inne korzyści. Ponadto istnieją dane empiryczne, że pewne substancje zawarte w owocach, takie jak antocyjany lub karotenoidy mogą pozytywnie wpływać na immunokompetencję zjadających je ptaków. To niewątpliwie uzasadnia podjęciem tego tematu, gdyż faktycznie określone substancje zawarte w owocach mogą negatywnie oddziaływać na pasożyty.

Dodatkowym atutem proponowanych badań jest podejście eksperymentalne, które gwarantuje zebranie odpowiednich danych do przetestowania postawionych hipotez. Projekt jest jasny i zwięzły, odpowiednio uzasadnia podjęty problem i sposób przeprowadzenia badań. Dotyczy to także analiz statystycznych, które są poprawne i nie budzą zastrzeżeń. Mam jednak kilka uwag odnośnie kilku spraw. Po pierwsze zastanawiam się dlaczego autorzy zdecydowali się badać tylko samce. Czy przy tak dużym eksperymencie i środkach, które będą potrzebne do jego realizacji nie warto byłoby zbadać zarówno samce jak i samice. Wiadomo, że płcie mogą różnić się w podatności na pasożyty. Jedna płć może być bardziej zapasożycona niż druga. Jeśli więc zjadanie pewnych owoców działa antypasożytniczo spodziewać się można także różnic międzypłciowych w ilości zjadanych owoców. Sądzę, że takie dodatkowe dane byłyby bardzo interesujące. Widzę również problem związany z odłowem ptaków i ich ilością. 90 (zastanawiam się czemu akurat 90, a nie 100?) ptaków w obu eksperymentach to dużo. Czy autorzy będą dysponować odpowiednim miejscem aby przetrzymywać te ptaki w odpowiednich warunkach? Nie jest to dobrze wyjaśnione, gdzie to będzie, jakiej wielkości będą klatki, itp. Poza tym odłów takiej ilości ptaków nastęrczy również szereg trudności. Nie spodziewam się aby mogłyby być one wszystkie złowione w ciągu 1-2 dni (może to trwać znacznie dłużej), co wynika z faktu, że gatunek ten chwyta się w sieci naprawdę trudno. Nie jest jasne jak autorzy chcą kontrolować ilość zjadanych owoców przez ptaki umieszczone w klatkach. Czy będą one zliczane w jakiś odstępach czasu od momentu ich podania przez te kolejne 5 dni, czy zostaną one zliczone dopiero w 5 dniu? Myślę, że istotne jest określenie jak szybko ptak zjadł tą określoną liczbę owoców. Poza tym nie wiadomo jak będą one ptakom podawane, w pojemniku, na tacy, na podściółkę. Niestety nie jest to dobrze wyjaśnione. Co mnie dziwi to fakt, że autorzy nie chcą badać innych parametrów odłowionych ptaków, które mogą mieć wpływ na zapasożycenie. Sugerowałbym pomiary masy i skoku w celu określenia kondycji poszczególnych ptaków, gdyż wiadomo, że kondycja ma wpływ także na zapasożycenie. Ptaki w lepszej kondycji mogą być mniej zapasożyczone, co może także wpływać na ilość zjadanych owoców.

Podsumowując, projekt ten oceniam wysoko i byłbym za jego finansowaniem, aczkolwiek chciałbym aby autorzy odnieśli się do wyżej postawionych przeze mnie kwestii i je sprecyzowali.

OSTATECZNA WERSJA PROJEKTU

M. Lenda, Z. Prokop, M. Ejsmond
Ochotnica Górna 08.10.2007

Czy kosy zjadają owoce bogate w roślinne metabolity wtórne aby pozbyć się pasożytów układu pokarmowego?

Streszczenie

W zaproponowanym przez nas projekcie chcemy zbadać, czy kosy (*Turdus merula*) mogą obniżyć swój stopień zapasożycenia przez wybór i konsumpcję owoców irgi poziomej (*Cotoneaster horizontalis*). Owoce te zawierają w miąższu wysokie stężenie amigdaliny – glikozydu cyjanogennego o udokumentowanym działaniu toksycznym na wiele grup organizmów. Odpowiedź na zadane w tytule pytanie zostanie udzielona na podstawie dwóch eksperymentów. W pierwszym zbadamy wpływ zapasożycenia na wybór owoców irgi. W drugim zbadamy efektywność owoców irgi w redukcji zapasożycenia.

Cele projektu

Istotą planowanych badań jest odpowiedź na pytanie czy kosy konsumują owoce irgi w celu zwalczania pasożytów wewnętrznych. Miąższ tych owoców zawiera wysokie stężenia roślinnych metabolitów wtórnych (*plant secondary metabolites* - PSM), w szczególności amigdaliny (Stiebel 2003). Powszechnie uważa się, iż PSM występujące w owocach roślin chronią je przed atakiem patogenów i roślinożerców (np. Lewak, Kopcewicz 2007). Jednocześnie wiele z takich owoców jest chętnie zjadanych przez ptaki. Stawiamy hipotezę, iż przyczyną wybierania przez ptaki owoców o wysokiej zawartości PSM jest antypasożytnicze działanie tych związków. Liczne badania *in vitro* oraz *in vivo* pokazują, iż wiele z nich wykazuje silne właściwości antypasożytnicze (działając np. nicienie, plazińce, pierwotniaki) (Athanasiadou i Kyriazakis 2004). Zgodnie z postawioną hipotezą przewidujemy, że:

1. owoce irgi będą częściej wybierane przez osobniki zapasożyczone, niż te pozbawione pasożytów (eksperyment 1).
2. spożywanie owoców irgi obniży stopień zapasożycenia kosów (eksperyment 2).

Stan wiedzy

Dotychczasowe prace poświęcone preferencjom pokarmowym ptaków owocożernych skupiały się na roli zawartości cukrów, lipidów i białek. Prace uwzględniające zawartość PSM w owocach, badały najczęściej ograniczający wpływ tych związków na spożycie przez ptaki.

Hipoteza wybiórczej toksyczności zakłada, iż wtórne metabolity roślin zawarte w owocach są toksyczne dla organizmów, które nie przyczyniają się do dyspersji nasion. Natomiast są nieszkodliwe dla zwierząt, które koewoluowały jako rozsiewacze (Cipolini i Levey 1997). Potwierdzenia tej hipotezy dostarczają prace pokazujące, że ptaki owocożerne (np. jemioluska) nie metabolizują amigdaliny (Strumpv i in. 1999). Dowiedziono natomiast toksycznego wpływu tego związku na wiele grup organizmów, np. nicieni (Izrael i inni 1973). Metabolizowanie tego glikozydu przez zwierzęta, prowadzi do uwolnienia cyjanowodoru, który blokuje oddychanie komórkowe. Innym przykładem jest *Toxoscome curviroste*, ptak będący głównym rozsiewaczem nasion papryki chilli i odżywiający się jej owocami, które są silnie toksyczne dla innych zwierząt, nie przyczyniających się do dyspersji rośliny, np. myszy (Teewksbury i Nabhan 2001).

Hipoteza ta nie wyjaśnia jednak faktu, iż wiele owoców zawierających toksyczne PSM cechuje się również niską zawartością substancji odżywczych, a mimo to są chętnie zjadane przez ptaki, nawet w

obecności owoców bardziej obfitych w składniki pokarmowe (Snow 1988). Przykładem może być jarzębina, zawierająca kwas parasorbowy (w większych dawkach letalny np. dla myszy) lub irga, zawierająca amigdalinę. Owoce obu gatunków są ubogie w substancje odżywcze, a mimo to stanowią znaczącą część diety wielu ptaków, mimo występowania w tym samym czasie głogu, czarnego bzu i innych znacznie bardziej odżywczych owoców (Snow 1988, Stiebel 2003).

Proponowane badania mają na celu sprawdzenie czy zjadanie przez ptaki owoców o wysokiej zawartości PSM może mieć związek z obroną przed pasożytami. Pasożyty są obecnie powszechnie uważane za jeden z najważniejszych czynników wpływających na dostosowanie organizmów. Skuteczność niektórych PSM (m.in. z grup glikozydów, alkaloidów, saponin i tanin) w zwalczaniu pasożytów została zaobserwowana u hodowlanych ssaków przeżuujących (Athanasiadou i Kyriazakis 2004). Według naszej wiedzy nie było jednak żadnych publikowanych badań w tym temacie na ptakach, a tym bardziej pod kątem świadomej wybiórczości pokarmu ze względu na obecność pasożytów.

Metodyka badawcza

1) Opis układu badawczego

Elementami naszego układu badawczego będą: kos (*Turdus merula*) jego pasożyty jelitowe - nicienie, owoce irgi poziomej (*Cotoenaster horizontalis*) i głogu jednoszyjkowego (*Crataegus monogyna*). Jako obiekt naszych badań wybraliśmy kosa, ponieważ u osobników tego gatunku duży udział w diecie stanowią owoce zawierające wysokie zawartości PSM. Kosy można stosunkowo łatwo odławiać, a dodatkowym argumentem jest zapewniona współpraca z osobą, która ma doświadczenie w odławianiu i prowadzeniu wieloletniej hodowli tych ptaków. Wybraliśmy pasożyty jelitowe - nicienie, ponieważ nadają się do przeprowadzenia sztucznego zapasożycania kosów i są podstawy, aby przypuszczać, iż mogą być wrażliwe na amigdalinę. Kontrola zapasożycenia opiera się na badaniach kału, co minimalizuje wywierany na ptaki stres. Owoce irgi wybraliśmy ponieważ wchodzi w skład diety kosa oraz zawierają w miększu PSM, w tym toksyczne dla wielu zwierząt stężenia amigdaliny. Głóg owocuje w tym samym czasie co irga, nie zawiera amigdaliny w miększu dojrzałych owoców, ani innych silnie toksycznych PSM, natomiast ma znacznie więcej składników odżywczych.

W eksperymentach zostaną użyte pierwszoroczne samce kosa, odłowione w dwóch turach, odpowiadających dwóm eksperymentom: we wrześniu (po zakończeniu pierzenia) 2008 oraz 2009, z terenów podmiejskich Krakowa. Użycie wyłącznie samców pozwoli uniknąć dodatkowej zmienności związanej z efektem płci. Odłowione ptaki przewieziemy do Instytutu Nauk o Środowisku UJ i umieścimy w laboratorium w indywidualnych klatkach o wymiarach 1.5m × 1m × 1m. W laboratorium będzie utrzymywana temperatura 20°C i fotoperiod adekwatny do daty odłowienia. Przed rozpoczęciem eksperymentu, ptaki będą aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez okres minimum 7 dni. O ile nie zaznaczono inaczej w opisie eksperymentu, ptaki będą karmione standardową pożywką dla kosów opracowaną na potrzeby innych badań (Walasz 19..), składającą się z gotowanego kurzego jaja, białego sera i startej marchwi. Podściółka w każdej klatce będzie wymieniana codziennie.

2) Plan badań

2.1) Wybiórczość pokarmowa kosów w zależności od stopnia zapasożycenia układu pokarmowego (eksperyment 1).

Eksperyment przeprowadzimy na próbie 60 samców kosa. Codziennie począwszy od dnia odłowów, w momencie wymiany podściółki w klatce, będziemy od każdego osobnika pobierać próbkę odchodów. Z pomocą parazytologa oznaczymy na podstawie tych próbek różnorodność gatunkową pasożytów jelitowych.

Ponadto, z odchodów zebranych od wszystkich osobników odwirujemy jaja pasożytów, które posłużą następnie do eksperymentalnego zapasożycenia ptaków.

Po okresie aklimatyzacji podamy ptakom środek antypasożytniczy, dobrany po konsultacji z weterynarzem wrocławskiego ogrodu zoologicznego. Po tygodniu od zabiegu odpasożycenia skontrolujemy jego efektywność badając odchody na obecność form życiowych pasożytów. Procedurę odpasożycania będziemy powtarzać do momentu skutecznego wyleczenia ptaków (gdy nie stwierdzimy żadnych form życiowych pasożytów w kale). W okresie po zabiegu (ewentualnie zabiegach) odpasożycania ptaki będziemy ważyć oraz sprawdzać stopień ich otłuszczenia (wg standardów Akcji Bałtyckiej), monitorując w ten sposób ich kondycję. W przypadku osłabienia kondycji przez zabieg, ptaki zostaną poddane rekonwalescencji do momentu odzyskania odpowiedniej kondycji. Kiedy to nastąpi, zwierzęta podzielimy na 2 grupy: eksperymentalną i kontrolną, po 30 osobników każda. Osobniki będą dobierane w ten sposób, by średnia i wariancja masy ciała była jak najbardziej zbliżona w obu grupach. Ptakom z grupy eksperymentalnej, po kilkugodzinnym przegłodzeniu, podamy w pokarmie jaja pasożytów w liczbie ustalonej na podstawie danych literaturowych (prace nad sztucznym zapasożycaniem ptaków). Ptaki z grupy kontrolnej również zostaną przegłodzone, a następnie nakarmione pokarmem bez jaj pasożytów. Efektywność zapasożycenia w grupie eksperymentalnej skontrolujemy po odpowiednim czasie (dobranym na podstawie znajomości cykli życiowych użytych gatunków).

Po potwierdzeniu skutecznego zapasożycenia w grupie eksperymentalnej, przeprowadzimy badanie wybiórczości pokarmowej. W tym celu do każdej klatki (w obu grupach) podamy 600 owoców (300 owoców głogu + 300 owoców irgi, na osobnych tackach). Nie będziemy w tym czasie podawać im standardowej pożywki. Dla każdego ptaka, po zjedzeniu przez niego pierwszych 100 owoców obliczymy proporcję jaką w tej liczbie stanowiły owoce irgi. Otrzymane wyniki przeanalizujemy przy pomocy testu t Studenta dla średnich z grup, gdzie zmienną niezależną będzie obecność zapasożycenia, a zmienną zależną – proporcja zjedzonych owoców irgi. Odrzucenie w teście hipotezy zerowej pozwoli nam stwierdzić, że zapasożycenie ma wpływ na rodzaj wybieranych owoców.

2.2) Wpływ owoców irgi na stopień zapasożycenia układu pokarmowego u kosów (eksperyment 2).

Eksperyment przeprowadzimy na próbie 60 samców. Po okresie aklimatyzacji, na podstawie analizy odchodów ocenimy stopień zapasożycenia wszystkich osobników, na podstawie liczby i różnorodności gatunkowej form życiowych pasożytów w odchodach. Następnie podzielimy je na dwie grupy po 30 osobników, w taki sposób by średnie oraz wariancje zapasożycenia były jak najbardziej zbliżone w obu grupach.

Przez kolejne 5 dni ptakom z jednej grupy będziemy podawać owoce irgi, a ptakom z drugiej grupy owoce głogu. Nie będziemy w tym czasie podawać im standardowej pożywki. W kolejnych dniach eksperymentu dla każdego ptaka będzie obliczana masa zjedzonych owoców, a następnie sumowana po zakończeniu eksperymentu. W dniu bezpośrednio poprzedzającym eksperyment oraz po 5 dniach jego trwania określony będzie stopień zapasożycenia zwierząt.

Otrzymane wyniki zostaną przeanalizowane za pomocą ogólnego modelu liniowego (GLM) z czynnikiem ustalonym „zabieg” (karmienie irgą lub głogiem) oraz masą zjedzonych owoców jako zmienną ciągłą. Zmienną zależną będzie różnica zapasożycenia danego ptaka między ostatnim dniem eksperymentu a dniem poprzedzającym eksperyment. Statystycznie istotny wpływ badanego czynnika „zabieg” pozwoli stwierdzić, że gatunek zjadanych owoców wpływa na stopień zapasożycenia ptaków. Statystyczna istotność czynnika ciągłego będzie oznaczać wpływ masy zjadanych owoców na zapasożycenie. Istotna interakcja między czynnikiem ustalonym a zmienną ciągłą będzie oznaczać, że wpływ masy na zapasożycenie zależy od ich gatunku.

Formy rozpowszechniania

Wyniki chcielibyśmy zamieścić w renomowanym czasopiśmie naukowym i zaprezentować na konferencji międzynarodowej ESEB.

Kosztorvs:

60 klatek – (1 klatka kosztuje ok. 150 zł) 9 000 zł

pokarm dla ptaków – 200 zł w pierwszym roku badań + 200 zł w następnym roku – 400 zł

wynagrodzenie dla 5 wykonawców (3 autorów projektów i parazytolog) – 25 000 zł

wynagrodzenie dla osób biorących udział w odławianiu – 8 000zł

komputer z oprogramowaniem – 5 000 zł

środek przeciwpasożytniczy – 500 zł

Literatura

Athanasiadou, Kyriazakis (2004) “Plant secondary metabolites: antyparasitic effect and their role in ruminant production systems” *Proceedings of the Nutrition Society*

Cipollini, Levey (1997) “Secondary metabolites of fleshy vertebrate – dispersed fruits: adaptive hipotesis and implications for seed dispersal”, *American Naturalist*

Lewak, Kopcewicz (2007) ”Fizjologia roślin“

Snow (1988) „birds and berries”

Stiebel Holger (2003) “Frugivorie bei mitteleuropäischen Vögeln : der Mutualismus zwischen Vögeln und ornithochoren Pflanzen ; Ernährung frugivorer Vögel und Konsequenzen für die Samenausbreitung“

Oldenburg, Univ., Diss., 2003

Struempv, Dube, Rio (1999) “The cyanogenic glycoside amigdalín does not deter consumption of rippen fruit by *Cedar waxwing*”, *The Auk*

Teewksburry, Nabhan (2001) “Directed deterrence by Capsicain in chilis”, *Nature*

Walasz (19..) Praca doktorska