

AUTOREFERAT

Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

Efekty długotrwałej ekspozycji samic karasia srebrzystego (*Carassius gibelio* B.) na różne dawki ołowiu zawartego w pokarmie

dr inż. Ewa Łuszczek-Trojnar

Katedra Ichtiobiologii i Rybactwa
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
ul. Prof. T. Spiczakowa 6
30-199 Kraków

Kraków 2016

1. Imię i Nazwisko

Ewa Agata Łuszczek-Trojnar

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1997 – magister inżynier zootechniki, temat pracy magisterskiej „Wpływ żywienia dżdżownicą kalifornijską (*Eisenia fetida*) na rozwój, dojrzewanie i tarło karasia (*Carassius auratus auratus*)”, Katedra Ichtiobiologii i Rybactwa Wydziału Zootechnicznego (od 1998 roku Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt), Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. Włodzimierza Popka.

2002 – doktor inżynier nauk rolniczych w zakresie zootechniki, temat pracy doktorskiej „Udział szyszynki i melatoniny w dopaminergicznej kontroli sekrecji gonadotropiny dojrzewania (GtH2) u samic karpia, w cyklu rocznym”, praca wyróżniona przez Radę Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie.

promotor: Prof. dr hab. Włodzimierz Popek,

recenzenci: Prof. dr hab. Józef Surowiak,

Prof. dr hab. Krzysztof Bieniarz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

- 16 grudnia **2002** do 15 grudnia **2004** - **asystent naukowo-dydaktyczny** w Katedrze Ichtiobiologii i Rybactwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie,
- 16 grudnia **2004** – **obecnie** – **adiunkt naukowo-dydaktyczny**, Katedra Ichtiobiologii i Rybactwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
- 19 czerwca **2008** do 1 października **2010** **urlop macierzyński i wychowawczy**.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Najważniejszym osiągnięciem naukowym, będącym podstawą złożonego przeze mnie wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl publikacji z lat 2013-2015, przedstawionych pod wspólnym tytułem „Efekty długotrwałej ekspozycji samic karasia srebrzystego (*Carassius gibelio* B.) na różne dawki ołowiu zawartego w pokarmie”.

b) Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autorzy, rok wydania, tytuły publikacji naukowych, nazwa wydawnictwa, liczba punktów MNiSW wg aktualnej listy czasopism z dnia 23 grudnia 2015 roku, *Impact Factor* pisma w roku publikacji, liczba cytowań wg Web of Science)

1. **Łuszczek-Trojnar E.**, Drąg-Kozak E., Popek W. 2013. Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), after long-

term dietary exposure, and depuration periods. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5): 3122-32 (MNiSW=30 pkt) IF=2,757, liczba cytowań 6

Wkład E. Łuszczek-Trojnar: 80%; pomysł i koncepcja pracy, współudział w wykonaniu doświadczenia, opracowanie statystyczne danych, opracowanie graficzne danych, napisanie całości tekstu, korekta manuskryptu po recenzjach.

2. **Łuszczek-Trojnar E.**, Drąg-Kozak E., Szczerbik P., Socha M., Popek W. 2014. Effect of long-term dietary lead exposure on some maturation and reproductive parameters of a female Prussian carp (*Carassius gibelio* B.). *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 2465-2478 (MNiSW=30 pkt) IF=2,828 liczba cytowań 4

Wkład E. Łuszczek-Trojnar: 80%; pomysł i koncepcja pracy, współudział w wykonaniu doświadczeń, opracowanie statystyczne danych, opracowanie graficzne danych, napisanie całości tekstu, korekta manuskryptu po recenzjach.

3. **Łuszczek-Trojnar E.**, Drąg-Kozak E., Socha M., Szczerbik P., Popek W. 2015. Influence of long-term exposure to lead on its accumulation and elimination from tissues and on selected reproductive parameters in the Prussian carp (*Carassius gibelio* B.) in pond environment. *Czech Journal of Animal Science*, 60 (10): 459-472, (MNiSW=30 pkt) IF=1,183 liczba cytowań 0

Wkład E. Łuszczek-Trojnar: 80%; pomysł i koncepcja pracy, współudział w wykonaniu doświadczenia, opracowanie statystyczne danych, opracowanie graficzne danych, napisanie całości tekstu, korekta manuskryptu po recenzjach.

- Łączna wartość publikacji wynosi **90** punktów wg kryteriów MNiSW z 23 grudnia 2015 roku,
- Sumaryczny *impact factor* publikacji wg listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **6,778**.

Oświadczenia współautorów prac stanowi załącznik nr 4

Omówienie celu naukowego wymieniowych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

Ryby, jako mieszkańcy wód powierzchniowych są szczególnie narażone na znajdujące się tam zanieczyszczenia, gdyż nie mogą opuścić swego środowiska życia. Obecność metali ciężkich w ekosystemach wodnych na całym świecie jest dobrze udokumentowana, a wyniki pracy wielu naukowców dowodzą ich akumulacji w różnych tkankach ryb i innych zwierząt wodnych, a także negatywnych skutków takiej akumulacji. Można też śledzić dostępne wyniki licznych badań oceniających efekty ostrej toksyczności wybranych metali ciężkich u zwierząt, w tym także u ryb. Nagłe wystąpienie ostrego skażenia w środowisku naturalnym jest możliwe, lecz bardziej prawdopodobne jest występowanie skażeń chronicznych. O wiele częściej ryby są narażone na niskie stężenia metali ciężkich w środowisku wodnym, utrzymujące się przez wiele miesięcy lub lat. Nie dają one natychmiastowych objawów, możliwych i łatwych do zaobserwowania w przeżywalności, wyglądzie czy zachowaniu ryb, lecz potencjalnie są równie niebezpieczne, gdyż metale po dostaniu się do organizmu ryb ulegają bioakumulacji, zwiększającej się wraz z trwaniem ekspozycji. O ryzyku takich ekspozycji dla człowieka świadczą publikowane na niektórych portalach długie listy gatunków ryb morskich szczególnie niepolecanych do spożycia przez dzieci, kobiety w ciąży i osoby starsze o obniżonej odporności, właśnie z powodu nadmiernej koncentracji w ich tkankach metali ciężkich (np. http://www.fda.gov/Food/Foodborne_Illness_Contaminants/_Metals/ucm115644.htm). Długotrwale utrzymujące się niskie stężenia metali w wodach powierzchniowych mogą też oddziaływać na ryby, które są wrażliwym bioindykatorem skażenia (Authman i in. 2015). U ryb stale przebywających w wodach zanieczyszczonych metalami ciężkimi w bardzo niskich stężeniach obserwowano spadek kondycji i obniżenie płodności, które może prowadzić do powolnego zaniku populacji (Krishnani i in. 2003, Ebrahimi i Taherianfard 2011, Duphy i in. 2014). Wśród metali ciężkich wyróżnia się mikroelementy niezbędne do życia, jak miedź, cynk czy żelazo, a także pierwiastki zupełnie zbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Do tych ostatnich zalicza się rtęć, kadm czy ołów (Sfakianakis i in. 2015).

Polskie normy koncentracji ołowiu w wodach powierzchniowych wynoszą średnio 7.2 µg/L (Dziennik Ustaw poz. 1482, 2014) oraz 200 mg/kg w osadach dennych (Dziennik Ustaw nr 55 poz. 498, 2002). Raporty monitoringu wód powierzchniowych publikowane corocznie na stronach Wojewódzkich Inspektoratów Ochrony Środowiska donoszą, że normy te w wielu miejscach są przekraczane, szczególnie w osadach dennych. Ołów, jak wiele innych metali ciężkich z łatwością akumuluje się w organizmach żywych, co więcej, posiada zdolność przenikania przez barierę krew-mózg. To przyczynia się do wystąpienia negatywnych efektów oddziaływania ołowiu w mózgowych centrach ośrodkowego układu nerwowego, mogących zaburzać gospodarkę hormonalną oddziałując na przebieg różnych procesów fizjologicznych jak wzrost, metabolizm czy rozród i dlatego ołów jest zaliczany do grupy substancji określanych mianem „endocrine disruptors”. Takie działanie potwierdzają wyniki wielu badań testujących wpływ tego metalu w zatruciach ostrych, przy wysokich jego stężeniach (Olojo i in. 2005). Bioakumulacja ołowiu w tkankach ryb może też okazać się ryzykowna dla ludzi, którzy jako potencjalni konsumenci mięsa rybiego mogą przyjąć nadmierne ilości toksycznego metalu. Negatywne skutki działania ołowiu u ludzi objawiają się obniżeniem sprawności intelektualnej, osłabieniem pamięci, zdolności uczenia się, wzrostem ciśnienia tętniczego krwi i rozwojem innych zaburzeń układu krwionośnego, dlatego badania nad akumulacją

ołowiu w ciele ryb wydają się wysoce pożądane. Wśród różnych efektów oddziaływania ołowiu badano też jego wpływ na rozród. Doświadczenia prowadzone na ssakach dowodzą, że negatywny wpływ ołowiu na ośrodki kontrolujące procesy rozrodcze zachodzi na osi podwzgórze-przysadka-gonady (Lucchi i in. 1981). Zwierzęta wodne, w tym ryby mogą być jeszcze bardziej niż lądowe ssaki narażone na ten metal, gdyż wody powierzchniowe będące środowiskiem życia ryb są jednocześnie odbiornikiem wszelkich zanieczyszczeń z gleby, powietrza i działalności ludzkiej. Długotrwała chroniczna ekspozycja na ten metal może nie objawiać się widocznymi skutkami takimi jak obniżone przyrosty, zmiany kondycji, czy przeżywalności, ale oddziałując permanentnie na ośrodki nerwowe kontrolujące rozród ryb, jak i na gruczoły rozrodcze może prowadzić do osłabienia zdolności reprodukcyjnych tych zwierząt, co w konsekwencji może się przyczynić do powolnego zaniku populacji ryb w danym akwenu (Kime 1995). Pewne przesłanki ku takim obawom dają rezultaty badań, które stwierdzają osłabienie transformacji spermatogoniów w spermatocyty u dojrzewających pstrągów tęczowych przy niskich stężeniach ołowiu w wodzie (Ruby i in. 1993), negatywne efekty na rozród strzebli potokowej w postaci zmian w zachowaniu tarłowym, opóźnienie rozwoju jajników, obniżenie płodności, obniżenie produkcji spermatocytów i oocytów, wydłużenie okresów pomiędzy kolejnymi tarłami i zahamowanie rozwoju embrionalnego (Weber 1993), zahamowanie rozwoju gonad u sumy *Clarias batrachus* (Katti i Sathyanesan 1983). Obserwowano też spadek sekrecji estradiolu u mikuna podczas ekspozycji na ołów (Thomas 1988), a także fakt, że u tego samego gatunku ołów wraz z Aroclorem 1254 istotnie obniżał poziom LH w odpowiedzi na stymulację analogiem LHRH (Khan 2000).

Jak donoszą raporty monitoringu wód powierzchniowych maksymalne dopuszczalne stężenia ołowiu w wodzie bywają przekroczone znacznie rzadziej niż w osadach dennych, gdyż ołów szybko sedymentuje osadzając się w dnie zbiorników wodnych, gdzie osiąga stężenia wielokrotnie przewyższające dopuszczalne normy skażenia. Tam jest akumulowany przez bezkręgowce denne, stale przebywające w skażonych osadach, które z kolei są głównym źródłem diety wielu ryb karpiowatych. Drogą biomagnifikacji metale ciężkie z osadów dennych przenoszone są na wyższe stopnie łańcucha pokarmowego. Ryby narażone stale na te same podwyższone koncentracje ołowiu w pokarmie mogą go nieustannie akumulować w organizmie. Czy w chronicznej ekspozycji akumulacja ołowiu w ciele ryb będzie się wciąż zwiększała, czy przestanie rosnać, gdy osiągnie określony poziom, a może następnie samoistnie spadnie? Czy niskie stężenia ołowiu stale obecne w pokarmie, mogą wywołać niepożądane efekty rozrodcze, zaburzyć dojrzewanie gonad, wpłynąć na rozwój oocytów czy uwalnianie hormonów rozrodczych? Czy niskie koncentracje ołowiu w elementach naturalnych ekosystemów wodnych nie przekraczające dopuszczalnych limitów, a więc nie wzbudzające alarmu Inspektoratów Ochrony Środowiska, lecz stale obecne mogą przyczynić się do obniżenia przeżywalności ryb czy przyrostów ich biomasy? Mimo dostępności wyników wielu publikacji prezentujących efekty akumulacji ołowiu w ciele ryb oraz niesłabnącego zainteresowania naukowców problemami skażenia środowiska, nie badano dotąd efektów długotrwałej ekspozycji na ołów i akumulacji tego metalu w ciele ryb oraz jego eliminacji z organizmu po długotrwałej ekspozycji. Brak danych naukowych na ten temat legł u podstaw decyzji o podjęciu badań w tym kierunku.

Cele naukowe prezentowanego cyklu prac:

- zbadanie wpływu chronicznej ekspozycji na ołów na przeżywalność i przyrosty masy ciała badanych samic karasia srebrzystego

- zbadanie akumulacji ołowiu w tkankach samic karasia srebrzystego podczas 24 miesięcy ekspozycji na różne dawki tego metalu, w warunkach akwaryjnych oraz stawowych.
- określenie czy akumulacja ołowiu w tkankach jest zależna od dawki ekspozycji.
- próba określenia dawki ołowiu i czasu chronicznej ekspozycji ryb, które prowadzą do akumulacji tego metalu w mięśniach ryb na poziomie przekraczającym maksymalną dozwoloną koncentrację bezpieczną dla zdrowia człowieka, jako potencjalnego konsumenta mięsa ryb.
- zbadanie eliminacji ołowiu z poszczególnych tkanek karasia srebrzystego podczas 12-miesięcznego okresu puryfikacji, następującego po uprzednim 12 miesięcznym okresie ekspozycji na różne dawki tego metalu.
- określenie czasu eliminacji ołowiu z mięśni ryb do poziomu bezpiecznego dla konsumpcji, po uprzedniej ekspozycji ryb na ten metal.
- zbadanie czy łuska – jako tkanka możliwa do pobrania przyżyciowo może służyć jako materiał wskaźnikowy aktualnego skażenia ryb ołowiem oraz skażenia ryb występującego w przeszłości.
- zbadanie wpływu ołowiu podczas 12 i 24 miesięcznej ekspozycji jak i po okresie 12-miesięcznej puryfikacji (po wcześniejszej 12 miesięcznej ekspozycji) na rozwój oocytów w okresie dojrzewania samic karasia srebrzystego
- określenie wpływu długotrwałej ekspozycji na ołów na rozmiary oocytów dojrzewających ryb
- zbadanie wpływu różnych dawek ołowiu podczas chronicznej ekspozycji i podczas puryfikacji na rozwój gonad (określony indeksem gonadosomatycznym GSI)
- zbadanie wpływu długotrwałej akumulacji ołowiu na spontaniczną oraz stymulowaną analogiem LHRH (stymulator sekrecji LH) i pimozydem (bloker receptorów dopaminergicznych) sekrecję LH w okresie okołotarłowym.
- porównanie wyników badania akumulacji, eliminacji oraz efektów rozrodczych uzyskanych w warunkach akwariowych i stawowych.

Jako materiał do badań wybrano gatunek - karaś srebrzysty, ze względu na jego liczne zalety jako ryby doświadczalnej i hodowlanej. Niewielkie rozmiary ciała tej ryby pozwoliły na przeprowadzenie doświadczenia w warunkach akwariowych, a jednocześnie w warunkach stawowych, co pozwoliło na porównanie efektów tych doświadczeń. Karaś srebrzysty, szeroko rozpowszechniony w Europie i Azji, jest łatwy w utrzymaniu, odporny na zmiany środowiskowe i jest częstym obiektem połowów wędkarskich oraz komercyjnych. Wiele europejskich populacji tego gatunku stanowią triploidalne samice, rozmnażające się gynogenetycznie (Boroń i in. 2011). Takie właśnie ryby zostały wykorzystane w niniejszych doświadczeniach, co pozwoliło wyeliminować czynnik płci w badaniach akumulacji, eliminacji oraz w ocenie efektów rozrodczych.

Dawki ołowiu wybrano na podstawie literatury, z zakresu koncentracji występujących i spotykanych w bentosie wód powierzchniowych, na które ryby w naturze mogą być narażone. Różni autorzy wykazują nawet wyższe stężenia ołowiu w bezkręgowcach dennych, które mogą być naturalnym pokarmem ryb karpiowatych (0-792 µg/g suchej masy (Hudson i in. 1978, Woodward i in. 1994), lecz w celu weryfikacji zakładanych hipotez wybrano następujące stężenia: 8, 13, 24 oraz 49 mg Pb/kg granulatu. Granulat pełnoporcjowy zawierający powyższe koncentracje ołowiu został przygotowany w profesjonalnej wytwórni pasz z wykorzystaniem octanu ołowiu. Grupa kontrolna otrzymywała granulat pełnoporcjowy zawierający około 0,1 mg Pb/kg. Ten sam granulat był podawany rybom doświadczalnym w okresie puryfikacji. Doświadczenia wykonano w akwariach, gdzie ryby były żywione przez cały rok tą samą dawką dzienną granulatu stanowiącą około 3% ich masy ciała. Do badań wykorzystano 440 samic karasi, które

zostały podzielone na pięć grup (cztery grupy doświadczalne i jedna kontrola) zostały rozlokowane w 14 trzylitrowych akwariach, tak by utrzymać odpowiednie obsady zapewniające komfortowe warunki tlenowe i przestrzenne dla ryb, a jednocześnie utrzymywać grupy w powtórzeniach w celu zachowania warunków doświadczalnych. Utrzymywano średnią temperaturę wody na poziomie 17°C. Inne parametry wody pH 7,7, tlen rozpuszczony ok. 10,5 mg/L, twardość ok. 127 mg CaCO₃/L. Po 3, 6, 12, 15, 18 i 24 miesiącach trwania doświadczenia z każdej grupy odławiano losowo ok. 8 ryb w celu poboru tkanek do analizy akumulacji ołowiu w tkankach. Po 12 miesiącach ekspozycji każdą grupę ryb doświadczalnych podzielono na dwie nowe grupy, z których jedna poddana została 12 miesięcznej puryfikacji poprzez zmianę granulatu na kontrolny (zawierający 0,1 mg Pb/kg), a pozostała część ryb nadal pozostawała pod wpływem ołowiu w niezmiennych dawkach przez kolejne 12 miesięcy.

Równocześnie z doświadczeniem prowadzonym w akwariach (*prace pkt 4 b 1 i 2*) przeprowadzono takie same badania w środowisku stawowym (*praca pkt 4 b 3*). W tym celu staw doświadczalny o powierzchni 50 m² podzielono na 10 poletek. Pięset samic karasia srebrzystego podzielono na 5 grup, z których każdą obsadzono w dwóch sąsiadujących poletkach stawowych, dzięki czemu otrzymano obsadę 0,4 kg/m³. Przez okres 24 miesiące ryby otrzymywały paszę skażoną różnymi dawkami ołowiu – analogicznie do ryb w akwariach. Dzienna dawka zadawanej paszy wynosiła około 3% biomasy ryb, choć ryby przebywające w stawach o naturalnym dnie mogły dodatkowo spożywać bezkręgowce denne, ich udział w diecie szacowano na minimalny.

Przebywające w stawach ryby podlegały różnym zmianom środowiska, zależnym od pory roku. Podczas zimowego obniżenia temperatury wody na skutek naturalnego spowolnienia metabolizmu ryby nie pobierały paszy, wobec czego w tym układzie doświadczalnym wystąpił naturalny okres przerwania ekspozycji na ołów.

Doświadczenie w stawach wykonano w celu porównania efektów z tymi odnotowanymi w doświadczeniu przeprowadzonym w warunkach laboratoryjnych, ściśle kontrolowanych i stałych. W naturze ryby poddane są zupełnie innym czynnikom środowiskowym, które mogą wpływać na efekty zaobserwowane w warunkach laboratoryjnych. Doświadczenia, których wyniki opublikowałam w pracach *pkt 4 b 1 i 2* finansowano z kierowanego przeze mnie **projektu badawczego N311 012 31/3829**, natomiast badania, których wyniki opublikowałam w pracy *pkt 4 b 3* finansowano w ramach statutowej działalności Katedry Ictiobiologii i Rybactwa.

Praca pkt 4 b 1. Łuszczek-Trojnar E., Drąg-Kozak E., Popek W. 2013. Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), after long-term dietary exposure, and depuration periods. Environmental Science and Pollution Research: 20(5): 3122-32

Celem badań podjętych w tej pracy była ocena przeżywalności, przyrostów masy ciała oraz akumulacji ołowiu w różnych tkankach samic karasia srebrzystego podczas 24 miesięcznej ekspozycji na różne dawki tego metalu w paszy. W dalszej części eksperymentu wykonano analizę eliminacji ołowiu z tkanek podczas 12 miesięcznej puryfikacji, następującej po uprzedniej 12-miesięcznej ekspozycji.

Rezultaty uzyskane w wyniku analiz wykazały brak wpływu ekspozycji na ołów na przeżywalność ryb.

Po 12 miesiącach ekspozycji na ołów nie wykazano istotnych różnic w masie ciała pomiędzy grupami ryb otrzymującymi różne dawki tego metalu. Po kolejnych 12

miesiącach ekspozycji największe przyrosty zaobserwowano w grupie otrzymującej najniższą z dawek (8 mgPb/kg) gdzie masa ryb wynosiła średnio 74 ± 20 g. Natomiast najniższe przyrosty wykazały ryby przez 12 miesięcy eksponowane na najwyższą z dawek (49 mgPb/kg), a przez kolejne 12 miesięcy poddane puryfikacji poprzez zaprzestanie skażenia (masa tych ryb wynosiła 34 ± 7 g). Masa ciała ryb tych dwóch grup różniła się statystycznie istotnie. Średnia masa ryb kontrolnych wynosiła $51,2 \pm 8$ g i nie różniła się statystycznie istotnie od masy ryb doświadczalnych.

Wyniki badania akumulacji ołowiu w poszczególnych tkankach w okresie trwania ekspozycji (po 3, 6, 12, 15, 18 i 24 miesiącach ekspozycji) wykazały dużą zależność od tkanki. Profil akumulacji ołowiu w badanych tkankach można przedstawić w następujący sposób: nerka>kość>wątroba>łuski>skrzela>jelito tylne>mięśnie>jelito przednie>skóra. W badanych tkankach poza skórą akumulacja ołowiu zwiększała się wraz z trwaniem ekspozycji na różne jego dawki, aż do czasu osiągnięcia poziomu wysycenia, charakterystycznego i zależnego od tkanki i od zadanej dawki metalu. Obserwowano wzrost akumulacji w pierwszych 12 miesiącach trwania ekspozycji, podczas gdy w kolejnych 12 miesiącach stężenie ołowiu w różnych tkankach nie zmieniało się już istotnie. Jego poziom balansował w granicy koncentracji maksymalnej, charakterystycznej dla dawki i tkanki, utrzymując się w stanie równowagi pomiędzy dawkami ołowiu wciąż dostającego się z pokarmem do organizmu, a ołowiem aktywnie usuwanym w procesie naturalnej puryfikacji. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że ryby są zdolne w pewnym stopniu regulować poziom ołowiu w swoim organizmie, zależnie od dawki, na jaką są eksponowane. Niższe dawki ołowiu podczas ekspozycji powodowały niższe maksymalne poziomy koncentracji tego metalu w tkankach.

Tkanka mięśniowa młodych ryb jest bardzo wrażliwa na ołów i akumulacja tego metalu do koncentracji przekraczającej maksymalny dozwolony poziom dla konsumpcji człowieka (0,3 mg Pb/kg wg Rozporządzenia Komisji WE nr 1881/2006) został przekroczony już przed upływem 3 miesięcy ekspozycji. Ta wrażliwość na akumulację odzwierciedla się też podczas puryfikacji, która po zaprzestaniu ekspozycji jest szybka i efektywna dla tkanki mięśniowej, co jest bardzo korzystne z punktu widzenia człowieka, jako konsumenta mięsa rybiego.

Eliminacja metali z badanych tkanek była również zależna od ich funkcji oraz od dawki wcześniejszej ekspozycji. Szybką i efektywną eliminację wcześniej zakumulowanego ołowiu zaobserwowano w mięśniach i jelicie, podczas gdy inne tkanki przez długi czas prezentowały jeszcze podwyższone poziomy tego metalu. Najbardziej odporne na puryfikację okazały się tkanki twarde: kość i łuski. W grupie ryb eksponowanych na najwyższą z dawek ołowiu 49 mg/kg obserwowano dalszą akumulację ołowiu w kości mimo zakończenia ekspozycji.

Wyniki badania akumulacji i eliminacji wykazują, że prosta analiza koncentracji ołowiu w różnych tkankach ryby może wykazać czy znajduje się ona podczas aktualnej ekspozycji na ten metal w swoim środowisku, czy też była wcześniej narażona na takie skażenie, lecz obecnie ono nie występuje. Wysokie stężenia ołowiu w tkankach miękkich takich jak wątroba, nerka, skrzela czy mięśnie mogą świadczyć o aktualnym skażeniu ołowiem środowiska, z którego pochodzi ryba, natomiast niskie stężenia w tkankach miękkich, a jednocześnie wysokie w kości i łuskach mogą dowodzić, że w kilkumiesięcznej przeszłości ryba znajdowała się pod wpływem ekspozycji na ołów, lecz obecnie jej środowisko jest wolne od tego metalu. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano też użyteczność łuski jako doskonałego wskaźnika bioindykacji ołowiu w środowisku, na podstawie którego można wykazać występowanie skażenia tym metalem nawet po 12 miesiącach od jego ustania. Dodatkowo przyżyciowa możliwość poboru

łusek pozwala na przeprowadzenie takiej analizy na szerszym materiale bez konieczności zabijania ryb.

Praca pkt 4 b 2. Łuszczek-Trojnar E., Drag-Kozak E., Szczerbik P., Socha M., Popek W. 2014. Effect of long-term dietary lead exposure on some maturation and reproductive parameters of a female Prussian carp (*Carassius gibelio* B.). Environmental Science and Pollution Research 21: 2465-2478

Celem tej pracy było zbadanie wpływu ołowiu zakumulowanego w tkankach samic karasia srebrzystego podczas 12 lub 24 miesięcznej ekspozycji na rozmiar i dojrzewanie oocytów, rozwój gonad oraz spontaniczną i stymulowaną sekrecję LH. Te same efekty badano też po zakończeniu 12 miesięcznej puryfikacji po uprzedniej 12 miesięcznej ekspozycji na różne dawki ołowiu. Rezultaty wykazały istotny wpływ na dojrzewanie oocytów jak również na sekrecję LH wskazując, że ołów nawet w niskich dawkach chronicznej ekspozycji oddziałuje jako „endocrine disruptor”. Szczegółowa analiza wyników wykazała, że już najniższa z zastosowanych dawek ołowiu 8 mg/kg wystarczyła by zaobserwować jego wpływ na dojrzewanie oocytów oraz na ich rozmiar. We wszystkich eksponowanych grupach ryb po 6 miesiącach, a jeszcze wyraźniej po 12 miesiącach ekspozycji wykazano wyższy udział (od 8 do 30%) oocytów znajdujących się w bardziej zaawansowanych stadiach dojrzewania, oraz większej średnicy niż u kontroli. Po 6 miesiącach ekspozycji odnotowano też statystycznie wysoce istotne korelacje dodatnie pomiędzy rozmiarem oocytów, a koncentracją ołowiu w jajniku. Jednak podczas trwania ekspozycji efekty obserwowane po 6 miesiącach zaczynały ustępować i już po 12 miesiącach ekspozycji nie odnotowano istotnych korelacji, mimo wciąż obserwowanych różnic w rozmiarze oocytów oraz ich dojrzałości.

Mimo większej średnicy oocytów i bardziej zaawansowanych stadiów dojrzałości oocytów obserwowanych w grupach eksponowanych na ołów wskaźniki GSI u tych ryb po 12 miesiącach były istotnie niższe niż u kontroli, wskazując na występowanie zaburzeń w rozwoju gonad. Obserwacje te potwierdziły negatywne korelacje pomiędzy GSI oraz koncentracją ołowiu w jajnikach. Analiza jajników wykazała ich tendencję do szybkiej akumulacji ołowiu, gdzie koncentracja osiągała 0,8 mg Pb/kg tkanki, pięciokrotnie przewyższając poziomy tego metalu w gonadzie grupy kontrolnej (0,15 mg/kg), lecz po zaprzestaniu ekspozycji tkanka szybko uległa oczyszczeniu.

Analiza sekrecji LH wykonana po 12 miesiącach ekspozycji wykazała wpływ ołowiu na spadek sekrecji spontanicznej lecz tylko u grupy ryb eksponowanej na najniższą z dawek 8 mg Pb/kg, oraz na wzrost sekrecji LH stymulowanej kombinacją analogu LHRH oraz pimozydu, lecz tylko w grupach poddanych ekspozycji na najwyższe dawki ołowiu 24 i 49 mg/kg. To potwierdza hipotezę, że odpowiedź organizmu na niskie dawki ekspozycji może być regulowana przez inne mechanizmy kontrolne niż reakcja na wysokie dawki metali. Wszystkie efekty obserwowane po 12 miesiącach ekspozycji (jak obniżone GSI, zwiększone rozmiary oocytów, wyższe sekrecje LH) nie wystąpiły po 24 miesiącach trwającego doświadczenia, zarówno u grup ryb poddanych w drugim roku puryfikacji jak i grup, u których wciąż trwała ekspozycja na ołów.

Rezultaty powyższej pracy wykazały, że ołów w ekspozycji chronicznej może być uznany za endocrine disruptor, ponieważ wpływa na rozwój jajników, co może zaburzać steroidogenezę, gametogenezę i owulację, co z kolei może mieć negatywny wpływ na rozrodcze zdolności populacji ryb prowadząc do spadku ich liczebności. Efekty pracy wykazały też, że karaś srebrzysty wraz z wiekiem staje się coraz bardziej odporny na ołów podczas chronicznej ekspozycji i jego organizm dostosowuje się do warunków skażenia osiągając stan homeostazy.

Praca pkt 4 b 3. Łuszczek-Trojnar E., Drąg-Kozak E., Socha M., Szczerbik P., Poppek W. 2015. Influence of long-term exposure to lead on its accumulation and elimination from tissues and on selected reproductive parameters in the Prussian carp (*Carassius gibelio* B.) in pond environment. Czech Journal of Animal Science, 60 (10): 459-472

Celem badań prowadzonych w tej pracy było zbadanie akumulacji i eliminacji ołowiu w tkankach samic karasia srebrzystego podczas ich chronicznej ekspozycji na ołów podawany w paszy w warunkach stawowych. W pracy opisano zaobserwowane efekty ekspozycji ryb na różne dawki ołowiu na wybrane parametry rozrodcze, i porównano je do rezultatów analogicznych badań prezentowanych w [pracy pkt 4 b 2](#). Celem tych badań było więc wykazanie różnic w chronicznej ekspozycji na ołów w zależności od sposobu ekspozycji – w akwariach (warunki sztuczne) lub w stawach (warunki naturalne). Ryby umieszczone w stawach zostały poddane wpływowi naturalnego cyklu pogodowego, obecności pokarmu naturalnego w dnie, oddziaływaniu pór roku i związanym z tym okresem obniżonego poziomu metabolizmu w sezonie zimowym, kiedy ryby karpioвате przestają pobierać pokarm naturalny i paszę skażoną poddają się naturalnej puryfikacji.

Podobnie jak w doświadczeniu prowadzonym w akwariach nie zaobserwowano istotnego wpływu chronicznej ekspozycji na przeżywalność oraz wzrost ryb. To potwierdziło uzyskane już wcześniej wnioski, że parametry te nie są dobrym wskaźnikiem skażenia środowiska ołowiem.

W porównaniu do ryb ekspozowanych na ołów w warunkach akwariowych, karasie w stawach szybciej osiągały maksymalne poziomy koncentracji ołowiu w badanych tkankach, bo już po 3 miesiącach ekspozycji. Jednocześnie zaobserwowano, że te maksymalne poziomy koncentracji badanego metalu są niższe dla analogicznych tkanek, niż podczas ekspozycji w akwariach.

Mimo, iż ryby przebywające w warunkach naturalnych, mogły uzupełniać dietę bezkręgowcami bentosowymi obecnymi w dnie stawów, oraz mimo faktu występowania dodatkowych naturalnych okresów puryfikacji (sezon zimowy) pomiędzy właściwymi okresami wegetacyjnymi, poziom ołowiu w ich mięśniach przekroczył maksymalne stężenia dozwolone w mięsie ryb (0,3 mg/kg), co potwierdza wystąpienie ryzyka skażenia ołowiem dla człowieka – jako konsumenta.

Wysokie poziomy akumulacji ołowiu w wątrobie, nerkach, kości oraz łuskach potwierdziły konkluzje wcześniejszej pracy, że tkanki te są dobrymi wskaźnikami odzwierciedlającymi aktualne skażenie środowiska wodnego ołowiem. Dodatkowo potwierdzono, że opóźniona puryfikacja ołowiu z tkanek twardych, takich jak kość i łuska pozwala uznać te tkanki za wskaźniki skażenia ołowiem występującego w przeszłości, nawet przed 12 miesiącami. To odkrycie jest szczególnie istotne z punktu widzenia badań środowiskowych, bo może pozwolić na wykorzystanie łusek, które można pobrać od ryb przyżyciowo i na tej podstawie stwierdzić czy w przeszłości ryby były narażone na chroniczne skażenie ołowiem.

Ryby ekspozowane na ołów w środowisku stawowym okazały się o wiele mniej wrażliwe na akumulację ołowiu w gonadach, gdyż w tych badaniach nie zaobserwowano wpływu na GSI zarówno po 12 i 24 miesiącach ekspozycji. Natomiast negatywny wpływ ołowiu ujawnił się we wzroście spontanicznej sekrecji LH przy najwyższych dawkach ekspozycji 24 i 49 mg Pb/kg oraz wzroście sekrecji LH po stymulacji analogiem LH oraz pimozydem. Podobnie jak w doświadczeniu przeprowadzonym w warunkach akwariowych efekty rozrodcze obserwowane po 12 miesiącach ekspozycji nie powtórzyły się po 24 miesiącach ekspozycji, jak też po 12 miesiącach puryfikacji po uprzednim

okresie ekspozycji. Co potwierdza wniosek, że karaś srebrzysty wraz z wiekiem staje się bardziej odporny na ołów, lepiej radząc sobie z jego toksycznym oddziaływaniem, mimo nieustannie trwającej ekspozycji.

Reasumując, wyniki wyżej zaprezentowanych prac wskazują, że:

1. Śmiertelność oraz przyrosty masy ciała karasi nie są dobrym bioindykatorem chronicznej ekspozycji na ołów w pokarmie.
2. Akumulacja ołowiu w tkankach samic karasia srebrzystego jest zależna od dawki, czasu ekspozycji oraz od rodzaju tkanki.
3. Akumulacja ołowiu w mięśniach badanych ryb następowała bardzo szybko - już po 3 miesiącach ekspozycji w warunkach sztucznych, a po 12 miesiącach w warunkach stawowych koncentracje ołowiu w mięśniach ryb przekraczały maksymalne poziomy dozwolone dla ołowiu (0,3 mg/kg) w Rozporządzeniu Komisji WE nr 1881/2006.
4. Już najniższa z badanych dawek ołowiu (8 mg/kg) paszy podawana w paszy podczas ekspozycji w akwariach przez okres 3 miesięcy wystarczyła, by poziom tego metalu w mięśniach ryb przekroczył maksymalny dozwolony ustawą limit, podczas gdy ryby kontrolne otrzymujące w paszy 0,1 mg Pb/kg nie wykazywały wzrostu koncentracji tego metalu w mięśniach.
5. Podczas ekspozycji ryb w warunkach stawowych limit koncentracji ołowiu w mięśniach określony Rozporządzeniem został przekroczony dopiero po 12 miesiącach ekspozycji ryb na dawki 24 oraz 49 mgPb/kg, natomiast niższe dawki powodowały istotny wzrost koncentracji tego metalu w mięśniach, lecz w granicach stężeń bezpiecznych dla konsumentów.
6. Eliminacja wcześniej zakumulowanego ołowiu z tkanek miękkich następuje szybko i już po 3 miesiącach większość tkanek pozbywa się ołowiu. Tkanki związane z detoksykacją organizmu, jak wątroba czy nerki oraz tkanka kostna – będąca głównym miejscem magazynowania ołowiu podczas długotrwałej ekspozycji są dłużej narażone na podwyższone stężenia tego metalu gdyż wtórnie akumulują ołów z krwi, już uwolniony z innych tkanek
7. Po rozpoczęciu puryfikacji mięśnie ryb bardzo szybko oczyszczają się z ołowiu i już po 3 miesiącach nie wykazują stężeń przewyższających limity dozwolone ustawą
8. Wysokie koncentracje ołowiu w łuskach badanych ryb potwierdzają ich przydatność jako bioindykatora skażenia środowiska tym metalem. Dodatkowo opóźniony proces eliminacji ołowiu z łusek, podobnie jak z tkanki kostnej pozwala na wykorzystanie tej tkanki jako bioindykatora skażenia środowiska ołowiem nawet po 12 miesiącach od ustąpienia takiej ekspozycji. To w połączeniu z możliwością przyżyciowego poboru łusek do analiz daje możliwość uzyskania idealnego bioindykatora. Dodatkowe zbadanie tkanki wewnętrznej – np. w postaci biopsji wątroby, lub próbki krwi może pozwolić na określenie, czy ewentualne skażenie ołowiem wykryte w łusce występuje aktualnie w środowisku, czy było obecne tylko w przeszłości.
9. Chroniczna ekspozycja na ołów wpływa na dojrzewanie oocytów ryb, zaburzając witellogenezę, co objawia się zmiennością wielkości oraz dojrzałości oocytów w pierwszych 12 miesiącach ekspozycji podczas przygotowywania się ryb do pierwszego tarła.
10. Negatywny wpływ ołowiu na parametry rozrodcze potwierdzają istotnie niższe współczynniki GSI występujące po 12 miesiącach ekspozycji u karasi srebrzystych utrzymywanych w akwariach.
11. Efekty chronicznej ekspozycji na ołów obserwowano też w zwiększonej spontanicznej i stymulowanej sekrecji LH po 12 miesiącach doświadczenia, co potwierdza wpływ

tego metalu na ośrodki hormonalnej kontroli procesów rozrodczych i działania ołowiu jako endocrine disruptor.

- Przeprowadzenie doświadczenia w dwóch różnych układach doświadczalnych, a mianowicie - w warunkach akwariowych oraz w stawach, gdzie ryby przebywały w warunkach naturalnych pozwoliło na zaobserwowanie pewnych różnic w badanych parametrach (maksymalne koncentracje ołowiu w tkankach, krótszy czas eliminacji ołowiu z tkanek, odmienny wpływ na GSI) i na potwierdzenie niektórych efektów odnotowanych w warunkach ściśle kontrolowanej ekspozycji (zależność akumulacji od dawki ołowiu, wpływ na sekrecję LH, opóźniona eliminacja ołowiu z kości i łuski).

Kolejnym krokiem badań, które zamierzam kontynuować jest próba wykorzystania łusek ryb w monitoringu środowiska naturalnego. Po pozytywnych efektach uzyskanych w badaniach laboratoryjnych, a następnie w kontrolowanych warunkach hodowli stawowej zamierzam podjąć próbę oceny łusek jako bioindykatora środowiska naturalnego. Podjęłam już pierwsze badania polegające na wykazaniu różnic w akumulacji metali ciężkich w kolejnych pierścieniach przyrostów rocznych łusek ryb. Uzyskane wyniki wskazują, że koncentracja metali w kolejnych sklerytach łusek jest zależna od narażenia ryb na te metale w poszczególnych latach życia. Po potwierdzeniu i opublikowaniu tych efektów w kolejnych doświadczeniach zamierzam kontynuować temat wykorzystując łuski ryb pobierane podczas standardowych badań monitoringowych w celu określania stopnia skażenia metalami ciężkimi środowiska ich życia.

Literatura

- Authman MMN., Zaki MS, Khallaf EA, Abbas HH. 2015. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Aquaculture Research & Development*, 6: 328. doi:10.4172/2155-9546.1000328
- Boroń A, Szlachciak J, Juchno D, Grabowska A, Jagusztyn B, Porycka K. 2011. Karyotype, morphology, and reproduction ability of the Prussian carp, *Carassius gibelio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae), from unisexual and bisexual populations in Poland. *Acta Ichthyol Piscat* 41(1):19–28
- Duphy C, Gallant C, Pichereau V, Sanchez W, Riso R i in. 2014. Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar Pollut Bull* 95(2):634-45
- EbrahimiM, Taherianfard M. 2011. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River. *Iran J Fish Sci* 10(1):13–24 ,
- Hudson PV, Blunt BR, Spy DJ. 1978. Chronic toxicity of water-borne and dietary lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Lake Ontario water. *Water Res*, 12: 869-878
- Katti SR, Sathyanesan AG. 1983. Lead nitrate induced changes in lipid and cholesterol levels in the freshwater fish *Clarias batrachus*. *Toxicol. Lett.* 19: 93-96.
- Khan IA. 2000. Lead and Aroclor 1254 disrupt reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. *Mar Environ Res* 50:119-123
- Kime DE. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev Fish Biol Fish* 5(1):52–96
- Krishnani KK, Azad IS, Kailasam M, Thirunavukkarasu AR, Gupta BP, i in. 2003. Acute toxicity of some heavy metals to *Lates calcarifer* fry with a note on its histopathological manifestations. *J Environ Sci Health A* 38: 645-655,
- Olojo EAA, Olurin KB, Mbaka G, Oluwemimo AD. 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish, *Clarias gariepinus* exposed to lead. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 117-122.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 22 października 2014 r. w sprawie sposobu klasyfikacji stanu jednolitych części wód powierzchniowych oraz środowiskowych norm jakości dla substancji priorytetowych. *Dziennik Ustaw poz.* 1482, 2014.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 16 kwietnia 2002 r. w sprawie rodzajów oraz stężeń substancji, które powodują, że urobek jest zanieczyszczony. *Dziennik Ustaw nr* 55 poz. 498, 2002.
- Ruby SM, Jaroslawski P, Hull R. 1993. Lead and cyanide toxicity in sexually maturing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* during spermatogenesis. *Aquat Toxicol* 26:225–238
- Sfakianakis DG, Renieri E, Kentouri M, Tsatsakis AM. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. *Enviro. Res.*, 137: 246–255.
- Thomas P. 1988. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Mar Environ Res* 24:179–183

- Weber DN. 1993. Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive behavior patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicol* 14(2-3): 347-358.
- Woodward DF, Brumbaugh WG, DeLonay AJ, Little EE, Smith CE. 1994. Effects on rainbow trout fry of metals-contaminated diet of benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana. *Trans. Am Fish Soc* 123: 51-62

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Opisane powyżej publikacje z lat 2013-2015 zakwalifikowałam jako moje główne osiągnięcie naukowe po obronie doktoratu. Jednakże początek mojej działalności badawczej przypada na rok 1996, kiedy rozpoczęłam pierwsze prowadzone przeze mnie badania w Katedrze Ichtobiologii i Rybactwa UR w Krakowie. Moja praca naukowa skupiała się w zakresie pięciu tematów, które realizowałam w podejmowanych badaniach:

1. Określenie wpływu dżdżownicy *Eisenia fetida* podanej jako karma uzupełniająca w diecie ryb na ich wzrost, dojrzewanie i rozród.
2. Udział szyszynki i melatoniny w rozrodcie karpia.
3. Wpływ metali ciężkich na ryby.
4. Ilościowe i jakościowe badania ichtiofaunistyczne, wykonywane na zbiornikach i ciekach Polski południowej.
5. Efekty oddziaływania niektórych ksenobiotyków na wybrane parametry ryb.

Badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Określenie wpływu dżdżownicy *Eisenia fetida* podanej jako karma uzupełniająca w diecie ryb na ich wzrost, dojrzewanie i rozród.

Badania wykonano w ramach grantu **KBN nr 6 P046 016 08**. Podczas doświadczeń prowadzonych z wykorzystaniem karasia odmiany czarny teleskop *Carassius auratus auratus*, a także karpia *Cyprinus carpio* wykazano, że dżdżownica kalifornijska podana jako substytut planktonu w pierwszych dniach wylęgu ryb nie uruchomiła enzymatycznej aktywności układu trawienia ryb, wobec czego nie nadaje się do wykorzystania jako pierwszy pokarm w pierwszych dniach życia ryb. Zaobserwowano też, że żywienie karasi paszą standardową wzbogaconą 10% uzupełnieniem dżdżownicami spowodowało prawie dwukrotne zwiększenie przyrostów masy ciała w stosunku do przyrostów ryb kontrolnych, co świadczy o dużych możliwościach zastosowania dżdżownic jako pokarmu uzupełniającego dla innych, cennych gospodarczo gatunków ryb. Ponadto wykazano, że żywienie karasi paszą standardową z 10% uzupełnieniem pokarmem z dżdżownic spowodowało szybsze osiągnięcie dojrzałości płciowej i szybsze przystąpienie do tarła samic karasi. Wymienione efekty zaprezentowano na konferencjach oraz opublikowano w 1996 roku (*załącznik 3, C 1-2, E 1-3*). Pozostając w tematyce wykorzystania dżdżownicy kalifornijskiej jako dodatku paszowego, po pozytywnych efektach obserwowanych w badaniach prowadzonych na rybach akwariowych podjęto podobne badania z wykorzystaniem karpia. Wyniki tych doświadczeń wykazały, że 10% substytut dżdżownic podany dojrzewającym karpom przed okresem tarłowym istotnie wpływa na wzrost dojrzałości gonad pozwalając na osiągnięcie szybszej gotowości do tarła (*załącznik 3, B 7-8, 12, E 20*).

2. Udział szyszynki i melatoniny w rozrodcie karpia.

Po obronie pracy magisterskiej moje zainteresowania tematyką sterowania i stymulowania dojrzałości i rozrodu ryb uległy rozwojowi i zajęłam się zagadnieniami związanymi z wpływem melatoniny na funkcje rozrodcze karpia. Ta problematyka stała się później tematem mojej pracy doktorskiej. Jeszcze przed obroną doktoratu we współpracy z prof. dr hab. Włodzimierzem Popkiem i prof. dr hab. Piotrem Eplerem byłam współwykonawcą doświadczeń prowadzonych w ramach **grantu KBN nr 6 P06D 019 12**,

mających na celu zbadanie wpływu melatoniny na funkcje rozrodcze karpia. W doświadczeniach *in vitro* polegających na peryfuzji przysadek mózgowych w obecności szyszynek, bądź w obecności syntetycznej melatoniny wykazano brak bezpośredniego wpływu tego hormonu na sekrecję gonadotropiny LH z przysadki mózgowej (załącznik 3, C 3, E 8). Później w ramach pracy doktorskiej prowadziłam serię badań mających na celu poszukiwanie mechanizmu oddziaływania melatoniny na kontrolę procesów rozrodczych. Omawiane badania były finansowane z projektów KBN nr 5 P06D 019 12 oraz nr 6 P 06D 03921. Po obronie doktoratu opublikowałam wyniki badań dowodzące, że melatonina wpływa na funkcje rozrodcze, nie oddziałując bezpośrednio na przysadkę mózgową, lecz na podwzgórze, za pośrednictwem układu dopaminergicznego. W doświadczeniach prowadzonych w systemie *in vitro*, a następnie *in vivo* wykazano, że melatonina ma zdolność hamowania uwalniania dopaminy z syntetyzujących ją komórek w jądrach nerwowych podwzgórza u dojrzałych samic karpia. Efekt ten obserwowano tylko w okresie letnim, co wskazuje na szczególną wrażliwość układu dopaminergicznego na melatoninę w okresie tarłowym. Wykorzystując hamujący wpływ melatoniny na dopaminę, która jest naturalnym blokerem uwalniania LH, można wykazać stymulujący wpływ melatoniny na uwalnianie LH w okresie tarłowym, kiedy system dopaminergiczny jest najbardziej wrażliwy na działanie melatoniny (załącznik 3, B 6, 18, 22, C 4, D 2, 7-8, E 4-14, 17, 24).

Badania prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora:

Badając efekty melatoniny analizowano też różne inne sposoby jej oddziaływania na rozród ryb. Szyszynka – gruczoł produkujący melatoninę, u ryb jest położona daleko poza międzymózgowiem, wysunięta pod kości czaszki, dzięki czemu jest zdolna odbierać bezpośrednio zmiany natężenia światła w środowisku. Dobowy cykl świetlny wpływa na produkcję melatoniny, która jest swoistym wyznacznikiem czasu dla organizmu i regulatorem dobowego i sezonowego cyklu uwalniania różnych hormonów. Biorąc pod uwagę te właściwości melatoniny badano dobowe zmiany w oddziaływaniu hormonów na dojrzewanie oocytów karpia *in vitro*, w celu wykazania czy dobowym zmianom poziomu kortyzolu i gonadotropiny LH w krwi towarzyszy odpowiadająca im rytmiczność wrażliwości oocytów na te hormony. Otrzymane wyniki wykazały, że wrażliwość oocytów karpia na działanie hormonów w okresie tarłowym zmienia się w ciągu doby, a zmiany te mają charakter rytmu (załącznik 3, B 1). Badając wpływ różnych czynników środowiskowych na poziom melatoniny zwrócono uwagę na przejrzystość wody, która zmniejszając się na skutek postępującego zmętnienia może blokować dostęp światła do szyszynki i zaburzać uwalnianie melatoniny, co w konsekwencji może zaburzać naturalne rytmy sekrecji LH (załącznik 3, B 2).

3. Wpływ metali ciężkich na ryby.

Wpływ metali ciężkich na aktywność układu dopaminergicznego, sekrecję LH, oraz inne wybrane parametry rozrodcze, u dojrzałych samic karpia.

Wśród różnych czynników mogących zaburzać kontrolę procesów rozrodczych znajdują się również metale ciężkie. Ich wpływ na różne parametry rozrodcze, a także na aktywność układu dopaminergicznego u dojrzałych samic karpia oceniano podczas badań prowadzonych w ramach projektu nr PBZ-KBN nr 084/P06/2002. Podczas współpracy w tym grancie brałam udział w badaniach, w których wykazano istotną akumulację metali ciężkich w podwzgórze ryb. W ciągu trzyletniej ekspozycji ryb na ołów podany w paszy, w stężeniu 68 mg/kg, co pięciokrotnie przekraczało jego poziom w paszy kontrolnej wykazano

istotny wzrost koncentracji tego metalu w podwzgórzu ryb po każdym kolejnym sezonie wegetacyjnym tak, że po trzech latach ekspozycji średni poziom tego metalu w tkance nerwowej osiągnął wartość 1,4 mg/kg tkanki, co ponad stukrotnie przekraczało średnie wartości koncentracji tego metalu w mózgu ryb kontrolnych. Uzyskane wyniki potwierdzają zdolność ołowiu do przenikania bariery krew-mózg potwierdziły też istnienie prawdopodobieństwa bezpośredniego wpływu tego metalu na znajdujące się w podwzgórzu ośrodki nerwowe, także te kontrolujące procesy rozrodcze. Między innymi zaobserwowano istotne obniżenie koncentracji dopaminy w podwzgórzu samic karpia, u których stwierdzono wysokie stężenia ołowiu w mózgu. Dopamina jest istotnym neuroprzekaźnikiem zdolnym hamować uwalnianie LH z przysadki mózgowej. Ołów wpływając na zmiany poziomu dopaminy, może pośrednio zaburzać uwalnianie hormonów z przysadki mózgowej, oddziałując w ten sposób na hormonalną kontrolę rozrodu ryb. Tę hipotezę potwierdzono badając koncentrację LH w plazmie eksponowanych na ołów samic karpia w okresie okołotarłowym. Wyniki eksperymentu wykazały istotne obniżenie sekrecji gonadotropiny LH u ryb o wysokiej akumulacji ołowiu w podwzgórzu i niskim poziomie dopaminy. W dalszej części badań u ryb eksponowanych na ołów przez 2 i przez 3 kolejne sezony wegetacyjne odnotowano też obniżone wartości GSI, słabszy wzrost oocytów podczas procesu witelogenyzy, opóźnienie owulacji, obniżenie płodności, istotnie słabszą odpowiedź na hormonalną stymulację tarła, jak również dużo niższą przeżywalność zarodków podczas inkubacji (*załącznik 3, B 5, 9, 20, 31, D 4-5, E 16, 18-19, 21*).

Wszystkie efekty obserwowane u samic karpia eksponowanych na ołów zawarty w paszy odnotowano także u samic eksponowanych na kadm, podawany w koncentracji 1,6 mg/kg, pięciokrotnie przekraczającej jego poziom stężenia w paszy kontrolnej. Kadm, podobnie jak ołów akumuluje się w podwzgórzu ryb, zwiększając swoją koncentrację w każdym kolejnym roku podawania skażonej paszy. Po trzech latach ekspozycji wartości koncentracji tego metalu w mózgu ryb były ponad dziesięciokrotnie wyższe, niż u ryb kontrolnych. Wysoki poziom kadmu w mózgu samic karpia był ujemnie skorelowany z koncentracją dopaminy w podwzgórzu w okresie okołotarłowym. Zaobserwowano też obniżenie poziomu spontanicznej sekrecji LH w tym samym okresie. Zaburzenia hormonalnej kontroli funkcji rozrodczych organizmu badanych ryb objawiały się w obniżonych wartościach GSI, opóźnieniu witelogenezy, owulacji, obniżeniu płodności i słabszej reakcji na hormonalną stymulację tarła (*załącznik 3, B 5, 20, D 4-5, E 16, 18*).

Prowadząc podobne badania z wykorzystaniem miedzi wykazano, że ekspozycja dojrzewających samic karpia na pięciokrotnie wyższe (153 mg/kg paszy) niż w paszy kontrolnej koncentracje tego metalu wpłynęła na zwiększenie jej koncentracji w mózgu, lecz nieporównywalnie niższe niż w przypadku ołowiu i kadmu. Ryby eksponowane na miedź wykazały spadek poziomu dopaminy w podwzgórzu, oraz poziomu LH w plazmie krwi, a także zaburzenia w dojrzewaniu oocytów i efektywności tarła, lecz wszystkie te efekty nie wystąpiły już po trzecim roku ekspozycji na miedź (*załącznik 3, B 5, 20, 29, D 4-5, E 16*).

Podczas trzyletniej ekspozycji samic karpia na cynk akumulacja tego metalu w podwzgórzu ryb była statystycznie istotnie wyższa niż u kontroli, choć nie przekraczała poziomu kontroli wielokrotnie jak akumulacja ołowiu i kadmu. Cynk obecny w podwzgórzu wpłynął na obniżenie poziomu dopaminy w tej samej tkance, co prawdopodobnie przyczyniło się do obserwowanego obniżenia sekrecji LH oraz mniejszych rozmiarów oocytów podczas witelogenezy. Efekty te nie wpłynęły jednak na GSI, dojrzewanie oocytów, płodność czy efektywność tarła po stymulacji hormonalnej wskazując znacznie mniejszy niż innych metali wpływ cynku na efekty rozrodcze (*załącznik 3, B 5, 9, 20, 31, D 4-5, E 16, 21*).

Akumulacja metali ciężkich w tkankach dojrzałych samic karpia

Oprócz analizy parametrów rozrodczych podjęłam badania nad akumulacją w różnych tkankach ryb metali, na które eksponowano dojrzałe samice karpia. W badaniach tych wykazano, że akumulacja jest zależna od metalu, tkanki i czasu ekspozycji. Najwyższe koncentracje kadmu obserwowano w nerkach i wątrobie ryb, gdzie średni poziom tego metalu zwiększając koncentrację w kolejnych sezonach, po trzech latach ponad 200-krotnie przekraczał poziomy obserwowane w tych samych tkankach ryb kontrolnych.

Akumulacja ołowiu także zwiększała się w kolejnych sezonach. Maksymalne koncentracje obserwowano w nerce i skrzelach, gdzie przekraczały niemal 10-krotnie wartości stężeń notowane u ryb kontrolnych. Największy wzrost akumulacji ołowiu w stosunku do ryb kontrolnych wykazano w tkance nerwowej, gdzie koncentracja ołowiu po 3 latach ekspozycji ponad 100-krotnie przekraczała poziom metalu odnotowany w mózgu ryb kontrolnych.

W przypadku ekspozycji na kadm i ołów w paszy podane w koncentracjach pięciokrotnie wyższych niż poziomy tych metali obecne w paszy kontrolnej wykazano, że wzrost akumulacji metali w mięśniach ryb przekracza maksymalne dopuszczalne rozporządzeniem o skażeniu żywności poziomy tych metali (0,05 mg Cd/kg tkanki oraz 0,3 mg Pb/kg tkanki). Uzyskane wyniki potwierdzają, że taka ekspozycja ryb może być ryzykowna dla człowieka, jako konsumenta karpia.

Największą akumulację miedzi wykazano w wątrobie ryb eksponowanych, gdzie jej koncentracja przekroczyła 200 mg/kg tkanki. Istotną akumulację, zwiększającą się w kolejnych sezonach ekspozycji odnotowano też w mięśniach, skrzelach, mózgu, jajnikach i nerce.

Najwyższą koncentrację cynku u eksponowanych ryb wykazano w nerkach i skrzelach, jak również w wątrobie, co potwierdza, że te tkanki są dobrymi bioindykatorami skażenia metalami ciężkimi, jako narządy związane z usuwaniem szkodliwych dla organizmu substancji, dostających się w ilościach przekraczających zapotrzebowanie fizjologiczne. Efekty tych badań publikowałam we współautorstwie w różnych czasopismach naukowych oraz prezentowałam na konferencjach (*załącznik 3, B 5, 9, 29, D 4-5, E 16, 18, 21, 25, 37, 40*), a zainteresowanie tematyką metali ciężkich w rybach kontynuowałam przez cały okres mojej pracy naukowej.

Badania koncentracji metali ciężkich w różnych tkankach ryb pochodzących z hodowli stawowych, z odłowów środowiskowych, lub przeznaczonych do konsumpcji

Badając koncentrację cynku, miedzi, kadmu i ołowiu w mięśniach pstrągów pochodzących z hodowli stawowej zlokalizowanej w podgórskiej miejscowości Łopuszna w południowej Polsce, w zależności od sezonu wykazano, że w okresie zimowym stężenia cynku i miedzi są istotnie wyższe niż w okresie letnim. W tych samych badaniach wykazano, że koncentracja ołowiu i kadmu w sezonie letnim jest istotnie wyższa, ponad dwukrotnie przekraczając stężenie tych metali w mięśniach obecne w sezonie zimowym (*załącznik 3, B 4, E 15*).

Inne badania, w których analizowano koncentrację tych samych metali ciężkich u pstrągów hodowanych w cieplejszym klimatycznie podkrakowskim gospodarstwie rybackim zasilanym wodami rzeki Rudawa, w zależności od wieku ryb i od sezonu roku, wykazano, że najwyższe koncentracje miedzi, zwiększające się z wiekiem ryb, niezależnie od pory roku występują w wątrobie, gdzie osiągają wartości przekraczające 70 mg/kg tkanki. Najwyższe koncentracje cynku występowały w tkankach jelita, wyrostków pylorycznych i żołądka pstrągów, gdzie niezależnie od pory roku zwiększały się wraz z wiekiem ryb, osiągając

koncentrację niemal 400 mg/kg tkanki jelita. Najwyższe koncentracje ołowiu obserwowano w śledzionie ryb, jelicie i innych tkankach przewodu pokarmowego. Odnotowano też fakt, że w pierwszym roku życia ryb wartości koncentracji tego metalu w tkankach przewodu pokarmowego były istotnie wyższe niż u ryb dwuletnich. Najwyższe koncentracje kadmu odnotowano w śledzionie, jelicie, wyrostkach pylorycznych i nerce pstrągów tęczy. Tkanki te prezentowały wysokie koncentracje kadmu, osiągające nawet 1,6 mg/kg, podczas gdy w mięśniach ryb wartości koncentracji nie przekroczyły dozwolonych rozporządzeniem o skażeniu żywności maksymalnych koncentracji Cd 0,05 mg/kg mięśni. Wyniki tych badań nie potwierdziły zależności koncentracji badanych metali od pory roku, co wcześniej wykazano w badaniach przeprowadzonych z udziałem pstrągów pochodzących z gospodarstwa podgórskiego (załącznik 3, B 26, E 28, 36).

Badając koncentrację metali ciężkich w tkankach karpia, pochodzącego z podkrakowskiej hodowli, w zależności od wieku ryb oraz od sezonu roku wykazano, że najwyższa koncentracja miedzi występuje w wątrobie, osiągając najwyższe wartości u 1-letnich kroczków. Najwyższa koncentracja cynku była obserwowana w nerkach, również u kroczków w okresie jesiennym. Najwyższe stężenia ołowiu prezentowały skrzela jednorocznych i dwuletnich karpia, podczas gdy karpie trzyletnie najwyższy poziom ołowiu wykazały w nerkach. Najwyższe koncentracje kadmu odnotowano w wątrobie kroczków, podczas ich drugiego roku życia, oraz w skrzelach ryb w trzecim roku życia (załącznik 3, B 25, E 25).

Badając koncentracje wybranych metali ciężkich w filetach ryb dostępnych w sprzedaży detalicznej wykazano, że wyższe stężenia kadmu występują w tkance pangia *Pangasius pangasius* i tilapii nilowej *Oreochromis niloticus* sprowadzanych do Polski z dalekowschodnich hodowli. Najwyższe poziomy cynku, manganu i niklu odnotowano w filetach mintaja, co potwierdza pogląd, że ryby morskie są cennym źródłem mikroelementów w diecie człowieka. Najkorzystniejsze proporcje badanych metali wykazano w filetach pstrąga pochodzącego z chowu w polskim gospodarstwie. U tego gatunku odnotowano najniższe koncentracje kadmu i niklu, a jednocześnie wysokie, istotnie wyższe niż u pangia i tilapii koncentracje manganu i cynku (załącznik 3, B 30).

Artykuły prezentujące wyniki tych i podobnych badań pozostaną cennym źródłem informacji dotyczącej skażenia ryb metalami ciężkimi w poszczególnych latach, dla przyszłych badań monitoringowych, porównawczych czy kontrolnych (załącznik 3, B 3, 4, 25-26, 30, E 15, 28, 36, 38).

Wpływ akumulacji metali ciężkich na wzrost ryb oraz parametry hematologiczne

Dodatkowo oprócz samej akumulacji metali ciężkich w organizmach ryb badałam też ich wpływ na inne parametry ichtiologiczne, jak masę ciała, czy zmiany w morfologii krwi jako efekty ekspozycji na te metale. Podczas ekspozycji karasi srebrzystych na różne dawki ołowiu (10-50 mgPb/kg paszy) w paszy wykazano brak wpływu na przyrosty masy ciała i długości ciała ryb, jak również na kondycję ryb. Słabsze przyrosty masy i długości ciała obserwowane u ryb podczas 12-miesięcznego oraz 18-miesięcznego okresu ekspozycji są rekompensowane w okresie eliminacji, lub w kolejnym roku życia ryb mimo trwającej ekspozycji, co sugeruje, że ryby wraz z wiekiem nabierają większej odporności i lepiej radzą sobie w utrzymujących się warunkach chronicznego skażenia ołowiem (załącznik 3, B 20).

Podczas trzyletniej ekspozycji dojrzałych samic karpia na Cd, Pb, Cu lub Zn podanych w paszy uzupełniającej w koncentracji pięciokrotnie przekraczającej stężenie tych metali w paszy kontrolnej (68 mg Pb/kg, 1,6 mg Cd/kg, 153 mg Cu/kg, 450 mg Zn/kg) wykazano jedynie wpływ miedzi na przyrosty masy ciała ryb. W każdym z trzech sezonów badawczych ryby eksponowane na miedź wykazywały masę ciała istotnie niższą od ryb kontrolnych,

mimo braku zmian w przeżywalności. Ryby eksponowane na ołów i eksponowane na kadm wykazały niższe przyrosty masy ciała w pierwszym sezonie, lecz po drugim sezonie skażenia ich przyrosty masy ciała były wyższe i do końca doświadczenia przyrastały równomiernie tak, że pod koniec trwania trzech sezonów ekspozycji nie obserwowano różnic w masie ciała w stosunku do kontroli. Obserwowane efekty potwierdzają już wcześniej stawianą hipotezę, że starsze ryby lepiej radzą sobie z negatywnymi skutkami chronicznego skażenia ([załącznik 3, 27, 29, D 4-5](#)).

Jako efekt chronicznej ekspozycji na ołów badano także poziom glukozy we krwi. Porównano poziom tego parametru pomiędzy karasiami srebrzystymi po 6 miesiącach od zakończenia 12 miesięcznej ekspozycji na ołów podawany w koncentracji 49 mg/kg paszy oraz rybami kontrolnymi. Nie wykazano różnicy w poziomie glukozy w krwi pomiędzy grupami ryb przy pierwszym poborze krwi, wykonanym podczas odłowów ryb ze stawów i umieszczaniu ich w akwariach, jednak po podniesieniu temperatury wody, symulującym zbliżanie się okresu tarłowego wykazano istotnie wyższy poziom glukozy w krwi ryb wcześniej eksponowanych na ołów. Uzyskane wyniki wskazują, że nawet po 6 miesiącach od ustania ekspozycji na ołów, ten metal wciąż obecny w organizmie nadal może wpływać na organizm zaburzając przebieg procesów fizjologicznych ([załącznik 3, D 27](#)).

Zważywszy, że miedź jako mikroelement niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, jako jedyny z badanych metali spowodowała trwałe efekty w przyrostach biomasy eksponowanych na nią karpie przeprowadzono badania mające na celu określenie eliminacji miedzi z tkanek, oraz zbadania jej efektów na wybrane parametry krwi po krótkotrwałej ekspozycji na jej subletalne stężenia w wodzie. Wykazano, że po 2,5 godzinnej, jak i po 5-godzinnej ekspozycji na 2 mg Cu/L najwyższa akumulacja miedzi następuje w skrzelach, gdzie osiąga wartość 7 mg/kg tkanki, niemal sześciokrotnie przewyższając wartości koncentracji odnotowane u ryb kontrolnych. Po 2,5 godzinach od zakończenia ekspozycji poziom miedzi w skrzelach istotnie obniżył się. Po 5 godzinach od ustania skażenia koncentracja Cu w skrzelach wyrównała się do poziomu grupy kontrolnej, co zakończyło efektywną puryfikację tej tkanki. Mimo, że w skrzelach poziom miedzi obniżył się inne, dobrze ukrwione tkanki jak mięśnie i wątroba prezentowały podniesioną koncentrację miedzi do końca okresu obserwacji – przez 14 dni. Poziom miedzi w nerce ryb eksponowanych obniżył się po 48 godzinach, nie różniąc się już istotnie od grupy kontrolnej. Po zakończeniu ekspozycji na miedź wykazano spadek poziomu żelaza i wzrost koncentracji cynku w badanych tkankach, co świadczy o wystąpieniu zaburzeń w równowadze mikroelementów, które nastąpiły jako skutek nagłej ekspozycji i próby powrotu organizmu do stanu wcześniejszej równowagi. Od momentu zakończenia ekspozycji na miedź obserwowano też utrzymujący się spadek liczby erytrocytów i jednocześnie wzrost wartości hematokrytu. Natomiast w ilości leukocytów odnotowano istotny spadek, który utrzymywał się do 5 godzin po zakończeniu ekspozycji, a następnie istotny wzrost, by po okresie około 1 tygodnia parametry leukocytów wyrównały się w stosunku do kontroli ([załącznik 3, E 43, 46](#)).

Akumulacja i eliminacja kadmu u rurecznika mułowego

Dostępna literatura naukowa wskazuje, że główną drogą wnikania metali ciężkich do organizmu zwierząt jest droga pokarmowa. Biorąc pod uwagę, że źródłem pożywienia większości ryb karpiowatych są bezkręgowce bentosowe podjęłam badania polegające na określeniu akumulacji metali w bentosie i innych elementach ekosystemu wodnego, które potwierdziły, że obecność metali ciężkich w różnych elementach ekosystemu może stanowić źródło tych pierwiastków w skażeniu ryb ([załącznik 3, B 10-11, E 22-23, 26](#)).

W badaniach efektów kontrolowanej ekspozycji rureczników mułowych na różne dawki kadmu wykazano, że w zależności od sposobu ekspozycji rureczniki są bardziej

wrażliwe na akumulację kadmu bezpośrednio z wody niż ze skażonych osadów dennych. Ekspozując rureczniki na 0,9 lub na 2,5 mg Cd/kg osadów dennych wykazano przeżywalność bezkręgowców po 10 dniach ekspozycji na poziomie odpowiednio 60% i 30%, podczas gdy ekspozycja na takie same stężenia kadmu w wodzie spowodowała śmiertelność 100% liczebności grupy eksponowanej na wyższą z dawek już po 3 dniach ekspozycji oraz na niższą z dawek po 5 dniach ekspozycji. Jednocześnie współczynniki akumulacji kadmu w ciałach bezkręgowców eksponowanych na ten metal w osadach dennych wynosiły, zależnie od dawki 0,44 i 0,77, podczas gdy u zwierząt eksponowanych na te same koncentracje metalu w wodzie wartości współczynników akumulacji wynosiły odpowiednio 16 i 60, co było równoznaczne z koncentracją 150 mg/kg. Zaprzeszanie ekspozycji rureczników na kadm spowodowało ich szybką puryfikację co objawiło się obniżeniem koncentracji kadmu w ich organizmach. Jako dodatkowe efekty ekspozycji tubifeksów zaobserwowano nadmierne wydzielanie śluzu oraz autoamputacje tylnych odcinków ciała, co jest w literaturze tłumaczone jako jedna z metod detoksykacji bezkręgowców. Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność rureczników do szybkiej akumulacji kadmu ze środowiska i możliwość stanowienia drogi skażenia tym metalem ryb. Jednocześnie wykazały, że efektywna puryfikacja tych bezkręgowców po zakończeniu ekspozycji pozwala na szybkie oczyszczenie ich organizmów z toksycznego metalu i zwiększa bezpieczeństwo ryb przy ewentualnym wykorzystaniu rureczników pochodzących ze skażonego środowiska w karmieniu ryb (*załącznik 3, B 28, E 39*).

Akumulacja metali ciężkich w różnych elementach ekosystemu wód

Doświadczenia polegające na ekspozycji ryb na metale ciężkie w paszy niosą ryzyko wtórnego skażenia środowiska, co może być szczególnie niebezpieczne w przypadku prowadzenia badań w warunkach stawowych. Dlatego podczas każdej prowadzonej ekspozycji wykonywano ocenę koncentracji metali ciężkich w różnych elementach ekosystemu wodnego, w celu analizy ryzyka skażenia środowiska, a jednocześnie by ocenić ewentualne ryzyko wtórnego skażenia ryb podczas trwających badań, lub po ich zakończeniu. Rezultaty omawianych badań wykazały, że zarówno podczas ekspozycji w akwariach, jak i podczas doświadczeń prowadzonych w stawach w nie obserwuje się skażenia wody. Poziom ołowiu w wodzie akwaryjnej po 14 dniach ekspozycji ryb na ten metal podany w paszy, nadal jest tak niski, że jego koncentracja znajduje się poza skalą czułości spektrometru (0,001 mg Pb/L). Badanie koncentracji metali ciężkich w osadach dennych zbierających się po 14 dniach ekspozycji na dnie akwarium, lub w dnie stawów po zakończeniu sezonu wegetacyjnego wykazują, że metale z niepobranej paszy oraz te pochodzące z odchodów ryb osadzają się na dnie zbiornika, nie zanieczyszczając wody. Analiza stężenia metali w bezkręgowcach dennych znajdujących się w osadach stawów doświadczalnych, gdzie prowadzono ekspozycje ryb na ołów i miedź wykazała istotną różnicę w koncentracji tych metali pomiędzy stawami doświadczalnymi i kontrolnymi. Analiza różnic koncentracji w kolejnych sezonach trwania ekspozycji wykazała, że poziom miedzi podniósł się istotnie po drugim sezonie i do końca trzeciego sezonu badań pozostał stały. Natomiast koncentracja ołowiu w bentosie stawu doświadczalnego wzrosła istotnie po pierwszym sezonie skażenia i nie zmieniała się już do końca ekspozycji. Koncentracja obu badanych metali w osadach dennych stawów doświadczalnych była istotnie wyższa niż w stawie kontrolnym, lecz nie zwiększała się po już w kolejnych sezonach mimo trwającej ekspozycji. Uzyskane wyniki potwierdzają prawdopodobieństwo skażenia środowiska podczas prowadzenia badań z wykorzystaniem metali ciężkich. Ich akumulacja w różnych elementach ekosystemu, lecz nie w wodzie, potwierdza hipotezę, że sama analiza wody w badaniach środowiskowych może być niewystarczająca by wykryć skażenie środowiska, dlatego pobór próbki dna lub

bezkęgowców dennych jako bioindykatorów jest doskonałą alternatywą dla badania jakości wody. Akumulacja metali w osadach dennych, bezkręgowcach i roślinach podnosi też prawdopodobieństwo wystąpienia dodatkowej ekspozycji na metale ryb utrzymywanych w stawie, poddawanych doświadczalnemu skażeniu, bądź znajdujących się w okresie puryfikacji. Jednak skażenie występujące w środowisku naturalnym też nie może zniknąć natychmiast po zaprzestaniu wprowadzania zanieczyszczonych ścieków, a metale przez wiele lat obecne będą w osadach, oraz zależnych od nich elementach ekosystemu. Dlatego eksperymenty prowadzone w warunkach stawowych lepiej odzwierciedlają warunki naturalne i ich efekty są bliższe ewentualnym skutkom zanieczyszczenia środowiska naturalnego wód powierzchniowych (*załącznik 3, A 1, B 10-11, 29, E 22-23, 26, 39*)

4. Badania ichtiofaunistyczne wybranych rzek południowej Polski

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora uczestniczyłam w badaniach ichtiofaunistycznych wybranych rzek Polski południowej. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na określenie ilościowego i jakościowego rybostanu oraz pomogły ustalić gatunki dominujące i zagrożone (*załącznik 3, B 13-14, 16-21, D 1*).

Badano też stan dojrzałości gonad ryb odławianych z wybranych zbiorników powierzchniowych, co pozwoliło określić tempo dojrzewania, przygotowanie do tarła i wykazać różnice w czasie przystępowania do tarła różnych populacji wybranych gatunków ryb w zależności od lokalizacji akwenu (*załącznik 3, B 13-17, 19, 21, 24, D 1*).

Ocena dojrzałości gonad czterech kolejnych roczników certy utrzymywanej w warunkach stawowych

We współpracy z ośrodkiem zarybieniowym Polskiego Związku Wędkarskiego w Szczodrem przeprowadziłam ocenę dojrzałości gonad czterech kolejnych roczników certy utrzymywanej w warunkach stawowych. Ryby doświadczalne pochodziły ze sztucznego tarła przeprowadzonego z użyciem tarlaków pozyskanych z populacji dzikiej certy wędrownej z rzeki Baryczy. Przez cztery kolejne lata wylęg uzyskiwany ze sztucznego tarła był obsadzany na stawach typu karpiego w Ośrodku Zarybieniowym PZW w Szczodrem. Po czterech latach odłowiono losowo po 20 sztuk samic i samców pochodzących z czterech kolejnych roczników certy utrzymywanych w stawach i po dekapitacji pobrano ich gonady, utrwalono a następnie wykonano preparaty histologiczne w celu zbadania dojrzałości. Dodatkowo u samic badano średnice oocytów wchodzących w stadium wzrostu trofoplazmatycznego. Analiza histologiczna wykazała, że wszystkie samice z rocznika 3 i 4-latków oraz połowa ilości samic 2-letnich posiadały gonady w stadium IV rozwoju wg Sakun-Buckiej. U najmłodszych samic wykazano I stadium rozwoju gonad. Dodatkowo wykazano, że rozmiar oocytów wchodzących we wzrost trofoplazmatyczny zależy od wieku ryb, i u ryb starszych większy jest udział oocytów o większej średnicy. Gonady samców roczników 2-3 znajdowały się w III stadium rozwoju. Jądra samców w pierwszym roku życia znajdowały się w II stadium rozwoju, z widocznymi spermatogoniami wchodzącymi w podziały mejotyczne. Uzyskane rezultaty wykazały, że przy utrzymaniu ryb w warunkach stawowych certy dojrzewają szybciej niż w naturalnej populacji anadromicznej i już dwuletnie samce i trzyletnie samice są zdolne przystąpić do pierwszego tarła (*załącznik 3, B 23*).

5. Efekty oddziaływania niektórych ksenobiotyków na wybrane parametry ryb

Wpływ wybranych pestycydów na sekrecję gonadotropiny karasia srebrzystego

Środowisko wód powierzchniowych jest szczególnie narażone na zanieczyszczenia dostające się tam nie tylko wprost ze ściekami, lecz także jest odbiornikiem spływów powierzchniowych z pól uprawnych, zbierając zanieczyszczenia pochodzące z działalności rolniczej. Wiele z pestycydów wykorzystywanych w celu poprawy efektów uprawy roślin dostaje się do wód, gdzie mogą wywołać zaburzenia w bioróżnorodności oddziałując między innymi na rozród ryb. Badając wpływ pestycydów na wybrane parametry ryb wykazano, że popularny insektycyd „Metiokarb” powodując istotny wzrost sekrecji LH u karasia srebrzystego może zaburzać jego uwalnianie wpływając w ten sposób na zdolności reprodukcyjne ryb. Inny z szeroko rozpowszechnionych herbicydów ROUNDUP podany w różnych dawkach podczas inkubacji przysadek mózgowych karasia srebrzystego obniżał sekrecję LH, co również może wywołać negatywne efekty rozrodcze w naturalnie występujących populacjach ryb wód powierzchniowych (załącznik 3, E 42, 49-50).

Wpływ Arochloru 1254 oraz syntetycznych detergentów na wybrane parametry rozrodcze ryb

Polichlorowane bifenylole (PCB) są syntetycznymi mieszaninami izomerów i kongenerów o różnej liczbie atomów chloru i ich rozmieszczeniu w cząsteczce bifenylole. PCB znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle, co na przestrzeni lat zaowocowało trwałym skażeniem środowiska tymi związkami. Przedostają się do wody głównie w miejscach odprowadzania ścieków przemysłowych i komunalnych do rzek, jezior i wód przybrzeżnych. Badania prowadzone u ludzi wykazały szereg toksycznych efektów PCB co znacznie ograniczyło ich użycie. Badając wpływ należącego do grupy polichlorowanych bifenyli Arochloru 1254, na jajniki karasia wykazano, że spowodował on spadek sekrecji 17,20 beta – progesteronu w medium podczas inkubacji, czego efektem było opóźnienie finalnych etapów dojrzewania oocytów oraz owulacji u karpia.

Natomiast w badaniach wpływu syntetycznych detergentów na przebieg inkubacji i procesu wykluwania larw karasia srebrzystego wykazano obniżenie przeżywalności zarodków podczas inkubacji, zależne od zastosowanych dawek detergentu 100 i 1000 µg/L. Uzyskane wyniki potwierdzają negatywne oddziaływanie PCB oraz syntetycznych detergentów na rozród ryb, czym mogą przyczynić się do powolnego zaniku populacji. Zaobserwowane efekty zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych (załącznik 3, E 41, 45).

Wpływ symwastatyny na aktywność enzymatyczną w tkance mięśniowej i wątrobowej soli senegalskiej

Tematyka badania efektów oddziaływania ksenobiotyków u ryb morskich jest zagadnieniem studiowanym przez dr Monserrate Sole z Instytutu Biologii Morza w Barcelonie. Dr Sole bada ich wpływ na zaburzenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w różnych tkankach ryb pochodzących z Morza Śródziemnego. Zainteresowana metodami analitycznymi stosowanymi przez dr Monserrate Sole w 2015 roku odbyłam jednodniową wizytę naukową w Instytucie Biologii Morza w Barcelonie, a następnie na jej zaproszenie ponownie przyjechałam do Instytutu by w ciągu dwutygodniowego stażu naukowego (11-25 września 2015) praktycznie poznać metody oznaczania aktywności cholinesteraz, peroksydazy lipidowej, katalazy, karboksyesteraz, procedury przygotowania tkanek oraz parametrów, których znajomość jest niezbędna do przygotowania odczynników, zaprogramowania aparatury, wykonania oznaczeń i interpretacji otrzymanych wyników. Podczas stażu

naukowego wzięłam udział w badaniach nad wpływem symwastatyny na aktywność badanych enzymów u soli senegalskiej. Osobniki soli senegalskiej odłowione z Morza Śródziemnego w okolicach wybrzeża Walencji zainiektowano symwastatyną, która jako popularny lek obniżający poziom cholesterolu, wraz z innymi statynami wchodzi w skład zanieczyszczeń wykrytych w dnie Morza Śródziemnego. Ze względu na jej obecność w naturalnym środowisku życia ryb płastugowatych przeprowadzono badania mające na celu wykazanie, czy symwastatyna zmienia aktywność enzymów antyoksydacyjnych wywołując stres oksydacyjny w tkankach ryb. Po 20, 26 a następnie po 44 godzinach od wykonania iniekcji ryby uśmiercono, a pobrane tkanki wątroby i fragmenty mięśni przetransportowano do laboratorium Instytutu Biologii Morza w Barcelonie. Tam wykonano analizę aktywności cholinesteraz, peroksydazy lipidowej, katalazy, karboksyesteraz w tkankach. Rezultaty wykazały brak wpływu symwastatyny na badane parametry. Część tkanek pobranych od zainiektowanych ryb przekazano laboratorium Instytutu Akwakultury w Castellón gdzie dr. Inmaculada Varó wraz ze swoim zespołem badawczym przeprowadzili dodatkowe analizy cholesterolu, trójglicerydów, glukozy, mleczanów i amoniaku. Część uzyskanych wyników tych prac zostanie zaprezentowana na konferencji naukowej w Barcelonie we wrześniu 2016 roku jako referat pt. „Does simvastatin administration disrupt plasma metabolite homeostasis and liver biotransformation activities in *Solea senegalensis*?” we współautorstwie z Amparo González-Mira, Elena Bote i Amparo Torreblanca z Departamento Biología Funcional y Antropología Física, Universitat de València, Montserrat Solé z Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC) oraz Inmaculada Varó z Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS-CSIC). W przyszłej pracy badawczej zamierzam wykorzystać nowo zdobyte umiejętności by wzbogacić swój warsztat badawczy i w szerszym ujęciu badać efekty oddziaływania metali u ryb słodkowodnych.

Mój łączny dorobek naukowy obejmuje 93 pozycje, w tym 38 oryginalnych prac naukowych (34 po doktoracie), 5 rozdziałów w monografiach, 3 artykuły popularno-naukowe i 50 doniesień na Zjazdy i Konferencje Naukowe (39 po doktoracie). Z 38 oryginalnych prac 26 opublikowanych jest w języku angielskim, w następujących czasopismach: Environmental Science and Pollution Research, Czech Journal of Animal Science, Aquaculture Research, Journal of Applied Ichthyology, Acta Ichthyologica et Piscatoria, Archives of Polish Fisheries, Reproductive Biology, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Acta Scientiarum Polonorum Piscaria, i inne.

Informacje bibliometryczne

Liczba punktów MNiSW wg aktualnej punktacji czasopism (23 grudzień 2015)

Osiągnięcie naukowe	90
Pozostałe prace opublikowane po doktoracie	271
Prace przed doktoratem	7
Razem	368

Liczba cytowań publikacji (wg Web of Science)

Osiągnięcie naukowe	10
Pozostałe publikacje po doktoracie	44
Prace przed doktoratem	0
Razem	54

IH(wg WoS)

IH(wg Scopus)

Ewa Łuszczek-Trojnar