

Prof. dr hab. Leszek Tymczyna

Lublin 06.09.2016

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska

Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Krzysztofa Wojtasa

pt. : „Wykorzystanie testu tendencyjności poznawczej w ocenie dobrostanu danio pręgowanego (*Danio rerio*)”.

promotor: prof. dr hab. Roman Kolacz

Światowa produkcja ryb w akwakulturze ulega co roku systematycznemu wzrostowi i bardzo często utrzymywane są w zbiornikach i akwariach stanowiących części architektoniczne wyposażenia wnętrz. Ryby także w ostatnich latach są wykorzystywane jako modelowe zwierzęta laboratoryjne zastępując inne gatunki a głównie gryzonie. Zapewnienie tym zwierzętom dobrostanu tj. stanu w którym zwierzę jest zdrowe i wszystkie procesy fizjologiczne przebiegają prawidłowo, pozwala na uzyskiwanie odpowiednich i miarodajnych wyników hodowli oraz badań. Wiele badań prowadzonych z wykorzystaniem ryb wskazuje na występowanie u nich stanów emocjonalnych które manifestują zmianami behawioralnymi i fizjologicznymi. Subiektywne odczuwanie emocji przez zwierzęta oraz wpływ stanów emocjonalnych na funkcje poznawcze opierają się na badaniach modelowych (zmiany fizjologiczne, funkcje poznawcze i behawioralne). Behawior jest ważnym wskaźnikiem który określa stan emocjonalny zarówno w aspekcie pozytywnym jak i negatywnym. Różnego rodzaju stany emocjonalne uruchamiają autonomiczne i endokrynne reakcje które możemy różnymi metodami badać. Wskaźniki fizjologiczne u większości zwierząt wskazują na stopień pobudzenia emocjonalnego.

Podwyższenie tych parametrów np.: (ciśnienie krwi, rytm serca, poziom ACTH, glukokortykoidów, oksytocyny, wazopresyny) wskazuje na działania czynników niekorzystnych. Stany emocjonalne u ludzi i ich wpływ na procesy poznawcze określane są terminem „tendycyjność poznawcza” i badania z tego zakresu próbuje się przenieść na zwierzęta, które służyć mogą do oceny ich dobrostanu.

Wyniki licznych badań prowadzonych za granicą i nielicznych w Polsce wskazują, że można zastosować wybrane testy do oceny dobrostanu ryb. Weryfikacja pod względem przydatności pozwolić może na ich wdrożenie w warunkach hodowli w akwakulturze.

Dlatego też, praca doktorska mgr inż. Krzysztofa Wojtasa dotyczy ważnego problemu, jakim jest opracowanie skutecznych testów do oceny behawioru i dobrostanu ryb. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zagadnienie to jest wciąż bardzo słabo rozpoznane.

Autor postawił przed sobą następujące cele badawcze: czy przeprowadzone testy (tendycyjności poznawczej, stanu emocjonalnego, nowego zbiornika) i wzbogacanie środowiska życia mogą być zastosowane do oceny dobrostanu u danio przegowanego.

Podjęty przez Doktoranta temat jest w pełni uzasadniony, wnoszący nowe elementy poznawcze i praktyczne.

1. Ocena formalna

Przedłożona mi do oceny praca doktorska, zawiera ogółem 95 stron komputeropisu, w tym 6 tabel, 5 rycin i 8 rysunków. Układ pracy jest następujący: *Spis treści s. 3-4, Wstęp i przegląd piśmiennictwa s. 5- 33, Cel pracy s. 34, Materiał i metody s. 35-42, Wyniki s. 44-52, Dyskusja s. 54-70, Podsumowanie 71-72 i Wnioski s. 73, Bibliografia s. 73-90, Streszczenie w języku polskim s. 91, Abstrakt 94-95.*

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska zawiera treści merytoryczne odpowiednie dla tego typu opracowań, ma charakter naukowo - badawczy, oraz napisana jest naukowym językiem i formalnie odpowiada wymogom zawartym w

Ustawie z dnia 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, póź. 595 z późn. zm.).

2. Ocena szczegółowa

Opracowanie zostało starannie zredagowane przez Autora i napisane poprawną polszczyzną z wykorzystaniem fachowej terminologii. Układ pracy jest zgodny z ogólnymi wymogami stawianymi pracom naukowym. Obejmuje on *Wstęp i Przegląd piśmiennictwa*, w którym Autor opisuje w sposób zwięzły i przejrzysty aktualny stan wiedzy z zakresu oceny dobrostanu ryb i innych gatunków zwierząt. Opisane zostały teorie oceny dobrostanu z aspektu funkcjonalnego, naturalnych potrzeb oraz emocji, zarówno pozytywnych jak i negatywnych. Na początku tego rozdziału Autor szczegółowo wyjaśnia teorie z zakresu psychologii dotyczących reakcji autonomicznych i endokrynologicznych, motywacji zachowań oraz przetwarzania informacji i ocenę poznawczą bodźców. Przytacza za innymi Autorami i opisuje osiem podstawowych emocji i zachowań (ucieczka, atak, utrzymanie lub powtórzenie, nawoływanie, dbanie, eksploracja, zatrzymanie się). Ryby nie są postrzegane jako zwierzęta, które mogłyby doświadczać emocji ale wiąże się to zdaniem Autora z dość ograniczoną wiedzą z tego zakresu.

W kolejnym podrozdziale, dosyć szczegółowo opisane zostały anatomia i funkcje mózgu, reakcje fizjologiczne i behawioralne oraz zdolności kognitywne ryb. Przedstawiono teorie twierdzące, że ponieważ ryby nie posiadają kory nowej (neocortex), nie mogą doświadczać emocji. Inne badania wykazały, że struktury w kresomózgowiu, są homologiczne dla ciała migdałowatego i hipokampu u ssaków. Ryby którym uszkodzono te obszary wykazywały zmiany w reakcjach strachu, uczenia się i pamięci przestrzennej.

W kolejnym podrozdziale, dosyć szczegółowo zostały opisane sposoby pomiaru emocji. Wiele uwagi poświęcił Autor wskaźnikom do diagnozowania stanów emocjonalnych, pomiarom osi HPA (poziomu ACTH, glukokortykoidów, testom stymulacji ACTH i CRH. Doktorant przedstawia, że innym wykorzystywanym

sposobem oceny emocji u zwierząt jest obserwacja behawioralna, jedną z metod nazywa się tendencyjność poznawcza. W tym dosyć obszernym podrozdziale zostały szczegółowo opisane, terminologia i badanie wpływu emocji na funkcje poznawcze. W ostatnim z podrozdziałów przedstawił gatunek danio pręgowane jako zwierze modelowe do badań. Autor opisał biologię rozrodu, środowisko życia i warunki życia w niewoli.

Podsumowując, przedstawiony przegląd piśmiennictwa oceniam jako dobry.

3. Cel pracy

Zgodnie z przedstawionym i omówionym w poprzednim rozdziale piśmiennictwem, w sposób jasny i czytelny sformułowano cel pracy który Autor ujął (opisał) w pięciu punktach. Celem niniejszej pracy było uzyskanie odpowiedzi czy zastosowany test tendencyjności poznawczej bazujący na analizie oceny bodźców niejednoznacznych może być wykorzystany do oceny dobrostanu ryb. Ponadto zbadanie czy stan emocjonalny, wzbogacenie strukturalne wpływa na zachowanie, dobrostan i poziom kortyzolu u danio pręgowanego.

4. Materiał i metody

Układ doświadczenia jest poprawny i nie budzi zastrzeżeń. Doświadczenie zostało przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu w katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt. Obiekt badawczy oraz przeprowadzone kolejne testy zostały opisane w sposób precyzyjny. Jedynie na początku tego rozdziału Autor podaje, że w zbiornikach używanych do testów codziennie kontrolowano parametry wody pod kątem temperatury, pH, zawartości NO_3 , NO_2 , twardości ogólnej (GH) i twardości węglanowej (KH), nie podając zupełnie nawet skróconej metodyki badań. Wydaje się, że na str. 37 (8 wiersz od

góry) przy opisie przestrzennego położenia zbiornika testowego i jego podziału na strefy Autor cytuje (rysunek 3) a powinno być (rysunek 3 i 4). Ponadto mam uwagi i proszę o wyjaśnienie dotyczące podziału zbiorników testowych (BT oraz ET) na cztery pionowe strefy pod kątem preferencji oraz dystrybucji ryb. Rozumiem, że podział na strefy A, B, C, D był wirtualny i występuje jedynie w nagraniu komputerowym. Moje pytanie dotyczy czym kierował się doktorant przy podziale zbiornika wzbogaconego (ET) i wyjaśnienie czym między sobą różniły się strefy A, C i D, a szczególnie strefa A i C ?.

Przyjęte przez Doktoranta metody obliczeń statystycznych są prawidłowe i wystarczające do oceny przeprowadzonych testów.

5. Wyniki badań

Uzyskane wyniki badań zostały umieszczone w tabelach i na rycinach, rysunkach a także szczegółowo opisany w tekście. Pierwsza moja uwaga dotyczy braku wyników dotyczących parametrów wody. Autor tylko lakonicznie w rozdziale materiał i metody (str. 36) podaje, że wartości temperatury wynosiły 25,5°C, pH- 7,5, NO₃ <10, NO₂ <0,1, nie podając nawet dla NO₃ i NO₂ jednostek i poziomów twardości ogólnej i węglanowej. Jeśli badania kontrolne parametrów fizyko-chemicznych wody przeprowadzono należałoby ująć je w formie tabeli. Zachowanie ryb ocenione zostało metodą próbkowania czasowego, gdzie w każdej próbie liczono liczbę ryb znajdujących się w każdej ze stref w zależności od przeprowadzonego testu. Doktorant uzyskał wyniki, które łatwo można logicznie wytłumaczyć, ale również dość zaskakujące w poszczególnych testach. W teście tendencyjności poznawczej ryby ze zbiornika bez elementów wzbogacających (BT) najczęściej przebywały w strefie utożsamianym z bodźcem pozytywnym (pokarm). Natomiast ryby ze zbiornika (ET) zupełnie inaczej. To zachowanie jest w moim przekonaniu nie do końca wyjaśnione. Użyty przez Autora zbiornik testowy nie był dotychczas stosowany w badaniach ryb lecz gryzoni (szczury), dlatego trudno wyjaśniać i

porównywać wyniki z innymi doniesieniami u innych gatunków zwierząt.

Podobnie, uzyskał dość ciekawe ale i kontrowersyjne wyniki badań poziomu kortyzolu mierzone w ciele ryb. Ten wskaźnik powszechnie używany w badaniach określających poziom stresu sugerować może, że ryby żyjące w zbiorniku ze wzbogaceniem zapewniony mają większy komfort a uzyskane wyniki jakby temu zaprzeczają. Ponieważ badania kortyzolu u większych ryb wykonuje się na podstawie analizy krwi pobranej z żyły ogonowej, u mniejszych taka metoda nie jest możliwa. Czy zatem prezentowana w doświadczeniu metoda badania poziomu kortyzolu w ciele ryb na podstawie pracy Canavello i inn. (2011) jest uznana i miarodajna.

6. Dyskusja

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały omówione w sposób bardzo szczegółowy. Ta część pracy jest obszerna i dobrze przygotowana w której dokonano w oparciu o badania innych Autorów analizy wyników uzyskanych w poszczególnych testach. Doktorant podejmuje próbę wyjaśnienia wyników uzyskanych w teście tendencyjności poznawczej, w którym ryby utrzymywane w warunkach wzbogaconego środowiska (ET) eksplorowały korytarz testowy znacznie bardziej aktywnie i aż 55% aktywności przypadało na ramiona reprezentujące bodźce niejednoznaczne. Strefą w której ryby spędziły najwięcej czasu, była strefa D2 posiadająca aż 75% cech bodźca negatywnego. Podobnie bardzo dokładnie przedstawiono i starano się wyjaśnić wyniki poziomu kortyzolu. Autor w sposób bardzo umiejętny cytuje doniesienia innych badaczy którzy uzyskali podobne rezultaty w testach prowadzonych na ludziach i szczurach.

7. Wnioski

Na zakończenie Autor przedstawia sześć wniosków które potwierdzają najważniejsze osiągnięcia przeprowadzonych doświadczeń. Wydaje się, że wniosek

4. dotyczący poziomu kortyzolu u ryb jest zbyt ogólny i daleko posunięty.

8. Piśmiennictwo

Autor cytuje 228 pozycji piśmiennictwa głównie anglojęzycznego. Tylko jedna praca jest wydana w języku polskim. Literatura jest dobrze dobrana, prawidłowa wykorzystana i bardzo ważne w zdecydowanej większości bardzo aktualna, co świadczy o aktualności problemu. Można byłoby jedynie zrezygnować z kilku prac moim zdaniem archiwalnych i popularno-naukowych. Korekty i uzupełnieniu wymaga kilka pozycji piśmiennictwa. Na str. 18 Autor cytuje prace (Szafir i inni, 2008) a brak tej pozycji w bibliografii. Natomiast w bibliografii pod nr 113, 120 i 195 są pozycje które nie są cytowane w tekście pracy.

9. Podsumowanie.

W moim przekonaniu praca jako całość jest wartościowa z uwagi na jej aspekt zarówno naukowy jak i użytkowy. W ostatnich latach badania dobrostanu zwierząt opierają się na określaniu stanu emocjonalnego i zdolności odczuwania w oparciu o testy psychologiczne człowieka. W licznych pracach wykorzystuje się urządzenia audiowizualne i skomputeryzowane testy. Trudno jednak jest uzyskać jednoznaczną odpowiedź na pytanie, czy zastosowany test jest miarodajny do oceny stanu emocjonalnego danego gatunku zwierząt. Przedstawiona praca doktorska jest próbą zastosowania wybranych testów do określania dobrostanu ryb.

Wymienione z obowiązku recenzenta uwagi powinny być wyjaśnione i wzięte pod uwagę przy przygotowaniu pracy do publikacji. Nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, którą generalnie oceniam wysoko. Rozprawa wnosi nowe elementy naukowe i rozszerza obszar interdyscyplinarnej wiedzy. Doktorant wykazał się dobrym przygotowaniem teoretycznym, praktycznym, organizacją warsztatu badawczego i samego eksperymentu. Podkreślić należy oryginalność eksperymentów oraz możliwość wykorzystania przedstawionych testów do badań

nad tym gatunkiem zwierząt.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca spełnia kryteria dla dysertacji doktorskich określone w Ustawie *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65. póź. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr inż. Krzysztofa Wojtasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.