

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Parametry kondycji i zagrożenia bakteriologiczne bocianów białych *Ciconia ciconia* i czarnych *Ciconia nigra*, rozwijających się w pld. i zach. Polsce”

2. Czas trwania projektu: od 01. 06. 2018 r. do 31. 07. 2021 r.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): bocian biały, bocian czarny, kondycja, parametry hematologiczne, odporność.

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) „C”.

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

W Europie obserwuje się stałe tendencje zmian, zmniejszania i pogarszania się stanu populacji bocianów, zwłaszcza białych *Ciconia ciconia*, ale także czarnych *Ciconia nigra*. Skutki tych procesów nie są do końca poznane. Niekorzystny wpływ ma zanieczyszczenie środowiska, powodowane działalnością człowieka. Nasza hipotezą jest przypuszczenie, że zmniejszenie liczebności populacji i pogorszenie kondycji bociana białego spowodowane jest spadkiem naturalnej odporności organizmu. Zmiany te prawdopodobnie znajdują odbicie nie tylko w fizjologii, ale przede wszystkim mają podłoże genetyczne. Bociany mniej odporne, są ze środowiska eliminowane, a te, które są silniejsze, przetrwają. Oczekuje się, że także zmiany w materiale genetycznym i frekwencje mutacji DNA zostaną wykryte w planowanych badaniach; można sądzić, że zanieczyszczenie środowiska może wpływać na obniżoną odporność i powstawanie zmian (mutacji i polimorfizmów) w materiale genetycznym bocianów. Badania planujemy przeprowadzić na osobnikach bociana białego *Ciconia ciconia* i czarnego *Ciconia nigra*. Bocian biały *Ciconia ciconia* – to gatunek żyjący na terenach antropogenicznych. Na podstawie obrazu krwi chcemy zbadać parametry kondycji ptaków: aktywność enzymów antyoksydacyjnych, poziom lipoperoksydacji, stężenie metali ciężkich, morfologię i biochemię krwi. Chcemy porównać

wpływ i poznać mechanizmy umożliwiające życie bociana białego w środowisku krajobrazu rolniczego wschodniej Polski. Bocian biały jest gatunkiem, który na zachodzie Europy wręcz żywi się na śmietniskach (w Polsce jest to rzadkość). Szukamy mechanizmów przystosowujących obydwu gatunki bociana do bytowania w środowisku silnie antropogenicznym.

Jednocześnie chcemy zbadać jak wygląda flora bakteryjna przewodu pokarmowego obydwu gatunków. Nasze dotychczasowe badania udokumentowały przenoszenie przez bociana białego bakterii *Clostridium* i *Acinetobacter baumannii*. Chcemy wykonać pełne spektrum bakteriologiczne u obydwu gatunków.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Bocian biały *Ciconia ciconia* (360 osobników).
Bocian czarny *Ciconia nigra* (180 osobników).

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziliśmy istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: Web of Science, Google Scholar, Science Direct, Elsevier, Springer, Pubmed.

Wykorzystaliśmy słowa kluczowe: hematologia ptaków, parametry hematologiczne, *Ciconia ciconia*, *Ciconia nigra*, parametry kondycji.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzamy, że brak jest danych lub są one mało wiarygodne w zakresie parametrów kondycji (układ czerwono-krwinkowy, biało-krwinkowy, lipidogram, morfometria, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, stężenie białek stresowych, lipoperoksydacja, parametry nieenzymatyczne) u obydwu gatunków bociana żyjących w odmiennych środowiskach.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli określić parametry kondycji, m.in. zakres stężenia metali ciężkich, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, poziom lipoperoksydacji, stężenie białek stresowych, u bociana białego, żyjącego w środowisku krajobrazu rolniczego. Ponadto, wyniki badań pozwolą stworzyć model zależności umożliwiających zajmowanie przez bociana coraz bardziej zanieczyszczanych przez człowieka środowisk.

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

W planowanych doświadczeniach zastosowano zasadę ograniczenia liczby bocianów, od których planuje się pobieranie krwi. Z tego względu zredukowano liczbę badanych bocianów do 360 bocianów białych i 180 czarnych. Krew będzie pobierana przyżyciowo, w ilości 6 ml. Do naszego doświadczenia wybierzemy tylko te pisklęta, których masa ciała przekracza 1 kilogram. Objętość krwi krążącej w organizmie stanowi ok. 10% ogólnej masy ciała; w przypadku kilogramowego bociana wynosi ona 100 ml. Według Campbella (1995) pobranie 10% całkowitej objętości krwi ptaka nie powoduje u niego żadnych negatywnych skutków. W ramach zasady ograniczenia zamierzamy pobierać maksymalnie 6 ml, czyli w ilości o połowę mniejszej wobec dopuszczalnej granicy limitu. Dzięki temu mamy pewność, że nie spowodujemy żadnych strat, ani zmian fizjologicznych u piskląt. Nasze dotychczasowe doświadczenia wykazują, że podawanie jakichkolwiek środków uspakajających jest niecelowe (bardziej szkodzą, niż pomagają). Młode bociany są stosunkowo odporne na stres i nie wykazują zachowań lękowych.

W przypadku planowanych badań nie ma możliwości zastosowania zasady zastąpienia, jednakże nasze wyniki pozwolą na określenie parametrów kondycji (stanu zdrowia), które w przyszłości umożliwią bardzo skuteczne określenie kondycji i stanu zdrowia bocianów, co umożliwi zastosowanie ew. profilaktyki immunologicznej (wzmacniającej kondycję piskląt), przez zastosowania środków zapobiegających niekorzystnym zmianom (nieinwazyjną ingerencję immunologiczną, np. poprzez zastosowanie immunoglobulin, zwłaszcza IgG i limfocytów T). Dzięki temu pisklęta po wylocie mogłyby być potencjalnie gotowe do długiego i wyczerpującego lotu na tereny ich zimowania (Afryka pld., M. Czarne) i nie padałyby tak masowo po drodze z wyczerpania, będącego wynikiem ich złej kondycji fizycznej.

W ramach zasady udoskonalenia wszystkie analizy próbek krwi wykonywane będą na nowoczesnym i specjalistycznym sprzęcie laboratoryjnym, dzięki czemu unikniemy błędów technicznych. Wszystkie osoby biorące udział w doświadczeniu ukończyły szkolenie organizowane przez PolLASA oraz posiadają doświadczenie w pracy ze zwierzętami.

Wykonanie zamierzonych badań pozwoli na określenie szczegółowych zależności pomiędzy pierwiastkami fizjologicznymi, mikroelementami i metalami toksycznymi, i odpowiedzią ekofizjologiczną bocianów w poszczególnych populacjach badanych środowisk. Dalsze prace w tym kierunku umożliwią wyjaśnienie, w jakim stopniu procesy bioakumulacyjne są zdeterminowane wpływem etapów wzrostu piskląt i czynników środowiskowych. Ostatecznym zamierzeniem badań jest jednak znalezienie przyczyn zmniejszania się i zmian stanu populacji bociana białego w Polsce i Europie zachodniej i podjęcie odpowiednich środków zaradczych.

Ważnym zagadnieniem w badaniach genetycznych jest poznanie struktury genetycznej populacji bociana białego w Polsce i jej dynamiki; dotychczas nie prowadzono podobnych badań, dlatego nie ma dostępnych informacji na temat zróżnicowania genetycznego bociana białego w Polsce. Można znaleźć nieliczne prace omawiające zastosowanie markerów genetycznych do badania zróżnicowania genetycznego populacji bocianów występujących na terenach USA, Brazylii i Chin. Spośród wielu dostępnych markerów wykorzystano do oceny zróżnicowania genetycznego np. 1) sekwencje mikrosatelitarne, w przypadku dławigada amerykańskiego *Mycteria americana* w USA i Brazylii (Van de Bussche et al. 1999, Tomasulo-Seccomandi et al. 2003), 2) mitochondrialne DNA, w przypadku *Mycteria americana* w Brazylii (Lopes et al. 2006), *Ciconia boyciana* w Chinach (Zan et al. 2008), 3) allozymy. Nie znaleziono prac wykorzystujących technikę RAPD-PCR do badania zróżnicowania genetycznego *C. ciconia*, stąd planowane badania są nowatorskie i pozwolą na ocenę przydatności metodyki. Ponadto zastosowanie techniki RAPD-PCR ma na celu ocenę podobieństwa lub zróżnicowania genetycznego populacji i ma pozwolić na znalezienie różnic w genomie osobników pochodzących ze środowisk zanieczyszczonych i czystych. Podejście to jest również nowatorskim rozwiązaniem. W literaturze nie znaleziono podobnych badań prowadzonych w obrębie gatunku *C.*

ciconia. Technika RAPD-PCR polega na zastosowaniu 10. nukleotydowych primerów, które losowo przylaczają się w genomie, amplifikując jego fragmenty. Wynikiem jest układ prążków na żelu, natomiast różnice w układzie prążkowym wskazują na różnice w materiale genetycznym badanych osobników lub grup. Metoda ta była już z powodzeniem stosowana w badaniach genetycznych kur, kaczek, roślin czy zwierząt wolno żyjących, których genom jest słabo poznany. Zastosowanie tej metody pozwoliło np. na znalezienie różnic pomiędzy genomem samic i samców i stało się podstawą do stworzenia testów DNA, pozwalających określić płeć bocianów białych. Z tego względu w planowanym doświadczeniu oczekujemy również znalezienia markerów RAPD różnicujących grupy ptaków ze środowisk o różnym stopniu zanieczyszczenia. Tylko przeprowadzenie testów DNA na odpowiednio dobranym materiale zwierzęcym (bociany zasilające środowiska czyste i zanieczyszczone) daje możliwość wykrycia ewentualnych różnic na poziomie molekularnym przy zastosowaniu techniki RAPD-PCR. Takie odkrycie mogłoby być pierwszym krokiem w kierunku odnalezienia regionów DNA, odpowiadających za odporność bocianów na stres środowiskowy. Ponadto mogłoby pomóc w określeniu przyczyny zmian i zmniejszenia się liczebności populacji bociana białego w Polsce i Europie i stworzyć szanse zastosowania zabiegów nieinwazyjnych o działaniu immunologicznym, zapobiegających niekorzystnym zmianom (np. poprzez podawanie pisklątom immunoglobulin typu IgG, limfocytów T, etc.; por. cele projektu).

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.