

**Ocena
pracy doktorskiej mgr Tomasza Kiljanka pt.: Wieloskładnikowa metoda
oznaczania pestycydów w diagnostyce zatruc pszczoł**

Przegląd piśmiennictwa dotyczącego badania przyczyn zespołu masowego ginięcia pszczoły miodnej wskazuje na co najmniej trzy prawdopodobne powody tego zjawiska, przybierającego charakter epidemii o zasięgu globalnym. Są nimi: obniżenie odporności pszczoł, choroby inwazyjne (np. warroza i infekcje wirusowe) oraz zatrucie pestycydami. Ostatnio wydaje się przeważać pogląd, że za zjawisko masowego ginięcia pszczoł może być odpowiedzialne łączne oddziaływanie tych trzech czynników. Potencjalne skutki wymierania kolonii pszczelich (i innych owadów zapylaczy) dla biosfery i produkcji żywności stanowią wiedzę powszechną na tyle, że Doktorant słusznie pominął ich opis we wstępie do rozprawy, przechodząc od razu do rzeczy. Recenzent ma zamiar postąpić tak samo.

Rozprawa została przedstawiona wg nowego trybu, to jest w postaci klasycznego ale zwięzłego opisu, któremu towarzyszą publikacje, których wyniki stanowią wkład merytoryczny rozprawy. Mgr Tomasz Kiljanek jest pierwszym autorem we wszystkich trzech publikacjach, a oświadczenia pozostałych współautorów wskazują na jego dominującą rolę jako inicjatora badań i głównego ich wykonawcę. Publikacje stanowiące podstawę doktoratu zostały dobrane starannie z myślą o udokumentowaniu wiedzy teoretycznej Doktoranta, niezbędnej do zagłębienia się w tematykę późniejszych prac. Mam tu na myśli artykuł przeglądowy, w którym opisał prawdopodobne drogi narażenia pszczoł na pestycydy, omówił prawodawstwo unijne w zakresie monitoringu jako jednego z narzędzi umożliwiających ocenę narażenia pszczoły miodnej na pestycydy, zwłaszcza należące do grupy neonikotynoidów. Obszerną część poświęcił dotychczasowym badaniom zawartości pestycydów w organizmach padłych pszczoł i interpretacji rezultatów w odniesieniu do skutków toksycznych. Szczególne miejsce w tych

ostatnich analizach zajęły neonikotynoidy, związki fosforoorganiczne i pyretroidy, z których każda grupa wykazuje inny mechanizm działania neurotoksycznego.

W klasycznym, „starym” systemie przeprowadzania przewodów doktorskich zawartość tego artykułu z powodzeniem mogłaby pełnić rolę wstępu, który nie tylko dokumentuje wiedzę doktoranta i umiejętność jej prezentacji, ale – co ważniejsze – umiejętność konkludowania i dojrzałej oceny problematyki masowego ginięcia pszczół nie ograniczającej się do tylko jednej przyczyny, jaką miałyby być pestycydy (*Journal of Apicultural Science*, $IF= 0,571$). Ta dobrze udokumentowana wiedza Doktoranta dała wystarczające podstawy do sformułowania podstawowego celu pracy, jakim była porównawcza ocena narażenia pszczół na pestycydy na podstawie analizy ich zawartości w pszczołach zatrutych i żywych oraz celu pomocniczego, to jest opracowania metody oznaczania pozostałości pestycydów w pszczołach jako narzędzia do osiągnięcia celu zasadniczego.

Druga publikacja z przedstawionego cyklu została poświęcona metodzie typu 'multi-residue', która dała Doktorantowi potężne narzędzie umożliwiające oznaczenie w pszczołach ponad 200 substancji czynnych środków ochrony roślin i ich metabolitów, a także leków przeciwko warrozie. Zmodyfikowana przez Doktoranta technika QuEChERS umożliwiła włączenie do palety oznaczanych związków również fungicydów triazolowych, które jak podkreśla mgr Kiljanek, mogą wykazywać synergizm z toksycznym działaniem niektórych insektycydów. Zaproponowane dwa szlaki analizy instrumentalnej (GC-MS/MS i LC-MS/MS) uniezależniły proces analityczny od polarności analitu umożliwiając oznaczenie praktycznie wszystkich substancji czynnych stosowanych w kraju chemicznych środków ochrony roślin. Praca ta została opublikowana w *Journal of Chromatography A*, ($IF=3,926$) czasopiśmie znanym z uważnych i bardzo wymagających recenzentów, co w pewnym stopniu uwalnia Recenzenta przewodu doktorskiego z wnikania w zawiłości technik analitycznych i prawidłowości procesu walidacji metody, kluczowego dla wiarygodności wyników. Uwagę zwraca bogata i rzetelna dokumentacja otrzymanych wyników przedstawiona w suplementach towarzyszących właściwej publikacji. Warto tu podkreślić, że Doktorant dokonał walidacji zaproponowanej przez siebie metody w odniesieniu do 226 pestycydów w miodzie i następnie zweryfikował tę metodę w międzynarodowych badaniach biegłości uzyskując sumaryczny Z-score równy 0,15, co jak każdy analityk z pewnością wie, jest wynikiem bardzo dobrym.

Zgodnie z logiką postępowania w tego typu dysertacjach praca ta posłużyła jako narzędzie metodyczne wykorzystane we właściwych badaniach, których celem było zbadanie występowania pestycydów w pszczołach.

Dysponując zwalidowaną metodą typu *multi-residue* Doktorant mógł poświęcić się dalszym badaniom, których wyniki mogłyby stanowić wkład do rozważań o udziale chemicznej ochrony roślin w zjawisku masowego wymierania rodzin pszczelich. Oczywiście w recenzji nie ma miejsca na streszczenie pracy, jednak w tym przypadku warto podkreślić, że Doktorant nie ograniczył się do analizy stężeń pestycydów w martwych pszczołach pozyskiwanych ze środowiska lecz analizował również te owady, które nie wykazywały objawów zatrucia tworząc w ten sposób swoistą grupę odniesienia dla pszczoł martwych. Wyniki, jakie uzyskał stosując metodę pozwalającą oznaczyć ponad 200 indywidualów chemicznych stanowiły poważne wyzwanie interpretacyjne, z którym Doktorant poradził sobie znakomicie. Przykładem jest tabela 2 systematyzująca rezultaty z uwzględnieniem mechanizmów działania toksycznego na owady w odniesieniu do stężeń stwierdzanych w pszczołach żywych i martwych. Pozwoliło to na wykazanie najczęściej stwierdzanych insektycydów w martwych pszczołach tj. chlorpiryfosu i dimetoatu należących do inhibitorów esterazy acetylocholinowej i klotianidyny – neonikotynoidu, którego mechanizm działania polega na inhibicji nikotynowych receptorów acetylocholinyl. Bardziej dogłębna analiza stężeń w pszczołach padłych i żywych pozwoliła mgr Kiljankowi zasugerować możliwość udziału łącznego narażenia na insektycydy i fungicydy w padnięciach pszczoł. Przekonanie to oparł na obserwacji, że w organizmach padłych pszczoł, u których stwierdzono wysokie stężenia fungicydów zawartości insektycydów fosforoorganicznych, najprawdopodobniej odpowiedzialnych za ostateczny efekt toksyczny, były niższe. Ten pasjonujący temat kazał Recenzentowi zgłębić tabelę nr 2, w której jednak napotkał na pewne trudności przy interpretacji niektórych danych. Mianowicie, w kolumnach 2 i 3, w których podawane są zakresy stężeń badanych pestycydów w nawiasach podany jest odsetek pszczoł z pozostałościami. Recenzent rozumiał, że jeżeli w nawiasie podano, że skoro np. w przypadku chlorpiryfosu w odsetek pszczoł z pozostałościami tego związku wynosi 51,4%, to oznacza, że w 48,6% owadów nie stwierdzono obecności tego związku powyżej LOQ, a wobec tego zakres stwierdzanych stężeń

chlorku piryfosu powinien być <LOQ – 3290 ng/g, a nie 1,5 – 3290 ng/g. Ta sama uwaga odnosi się do pozostałych danych w tej tabeli.

Mocną częścią pracy jest analiza zagrożeń, podstawą której jest praca nr 3 opublikowana w czasopiśmie *Chemosphere* w 2017 roku. W publikacji tej wskazano nie tylko na możliwy udział fungicydów w ogólnej toksyczności tego koktajlu pestycydowego, na który narażone są pszczoły w środowisku agrarnym, ale na wyraźny związek między liczbą pestycydów, na które narażone są pszczoły, a wystąpieniem u nich efektów ostrego zatrucia. W dyskusji Doktorant jednak słusznie unika przypisywania zatruć ostrych wśród pszczół wyłącznie narażeniu na pestycydy podkreślając, że skutek ich działania może mieć charakter pośredni, wynikający na przykład z osłabienia układu immunologicznego sprzyjając rozwojowi patologii oportunistycznych.

Dysponując tak dużą pulą wyników zawartości różnych pestycydów w organizmach pszczół mgr Tomasz Kiljanek podjął się oceny ich rzeczywistego znaczenia dla oceny zagrożenia, a następnie ryzyka wystąpienia niepożądanego skutku zdrowotnego, co w przeciwieństwie do oceny narażenia jest przedsięwzięciem daleko trudniejszym i obarczonym znacznie większym ryzykiem błędu. Doktorant posłużył się w tym celu do oszacowania wartości *Hazard Quotients*, nieprawidłowo tłumaczonych jako „współczynniki zagrożenia”, ponieważ powinno się używać terminu „ilorazy zagrożenia” biorąc pod uwagę, że wartość ta określa ile razy stwierdzone stężenie jest większe/mniejsze od dawki powodującej mierzalny efekt toksyczny (w tym przypadku LD₅₀). Doktorant jest świadomy ograniczeń tej metody, wiedząc, że zakłada ona, że stężenie w pszczole jest identyczne jak stężenie środowiskowe, na które owad ten był narażony, co niekoniecznie musi odpowiadać stanowi faktycznemu. W każdym razie otrzymane wyniki wskazują, że ilorazy zagrożenia u pszczół zatrutych były nieporównanie wyższe niż u pszczół zdrowych, co więcej, mediany ilorazów zagrożenia wskazują, że pszczoły zdrowe przebywały w środowisku znacznie mniej narażonym na pestycydy niż pszczoły padłe. Oczywiście recenzent nie ma wątpliwości, że Doktorant doskonale sobie zdawał sprawę, że ilorazy zagrożenia odnoszą się do mechanizmów działania (MoA), co w konsekwencji powinno skutkować obliczaniem sumarycznego HQ u każdej pszczoły, u której stwierdzono obecność więcej niż jednego pestycydu o tym samym MoA. Wyniki wskazują też, że dwa najczęściej występujące pestycydy u pszczół padłych to

związki fosforoorganiczne mimo, że w opinii publicznej to raczej neonikotynoidy stanowią największe zagrożenie dla zapylaczy.

Powyższe uwagi zostały sformułowane raczej z myślą, że w nowym systemie przewodów doktorskich szczególną uwagę należy poświęcić sposobowi opisanie swoich dokonań ponieważ w razie uwag Doktorant nie może obronić się dotychczas stosowaną formułką, że poprawi je w procesie przygotowywania pracy do druku. Ponieważ praca(e) już są wydrukowane.

Jestem przekonany, że praca zaprezentowana przez mgr Kijanka stanowi wartościowy wkład do rozwiązania arcyważnego problemu, jakim jest wymieranie rodzin pszczelich. Wnioski z pracy są prawidłowe i nie wychodzą poza zakres badań, a wniosek ostateczny, mimo oczywistych zastrzeżeń co do ograniczeń wynikających ze stosowania ilorazów zagrożenia dla owadów jest słuszny i potwierdza celowość stosowania tego kryterium do wstępnej oceny zagrożenia dla pszczół przeprowadzanej *post factum*.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny zawartości merytorycznej cyklu prac przedstawionych jako zasadnicza część rozprawy doktorskiej. Uważam, że założone cele pracy zostały osiągnięte.

Poza wymienionymi wyżej uwagami, mającymi raczej charakter porządkujący, nie dostrzegłem poważniejszych uchybień, które mogłyby wpłynąć na moją pozytywną ocenę pracy.

Podsumowując, z satysfakcją wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Tomasza Kijanka pt.: Wieloskładnikowa metoda oznaczania pestycydów w diagnostyce zatruc pszczół spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – PIB wniosek o dopuszczenie mgr Tomasza Kijanka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 02 czerwiec 2017 r.

.....
Prof. dr hab. Jan Krzysztof Ludwicki

