

Puławy, 26 maja 2017 r.

Dr hab. Teresa Szczęsna, prof. nadzw.
Instytut Ogrodnictwa, Zakład Pszczelnictwa
24-100 Puławy, ul. Kazimierska 2

Recenzja pracy doktorskiej mgr Tomasza Kiljanka

"Wieloskładnikowa metoda oznaczania pestycydów w diagnostyce zatruc pszczół"

wykonanej w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, pod kierunkiem naukowym promotora - dr hab. Alicji Niewiadomskiej, prof. nadzw. i promotora pomocniczego - dr hab. Piotra Jedziniaka, prof. nadzw.

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjęta w dniu 26 czerwca 2013 r. powołująca moją osobę w skład Komisji ds. przeprowadzenia postępowania w przewodzie doktorskim mgr Tomasza Kiljanka i powierzająca mi funkcję recenzenta.

Prowadzone w ostatnich latach badania potwierdzają, że jedną z wielu przyczyn zwiększonych upadków rodzin pszczelich, określanych często jako tzw. syndrom masowego ginięcia rodzin pszczelich (CCD, ang. Colony Collapse Disorder) w czasie sezonu pszczelarskiego, są zatrucia pszczół na skutek masowego w ostatnim czasie stosowania w rolnictwie chemicznych środków ochrony roślin. Zatrucia te występują zazwyczaj na wiosnę i latem, kiedy prowadzone są wzmożone zabiegi agrotechniczne. Najczęściej do zatrucia pszczół dochodzi poprzez niewłaściwe użycie środków ochrony roślin i w czasie stosowania na uprawach, gdzie znajduje się większa ilość kwitnących chwastów oblatywanych przez pszczoły. Ogromne zagrożenie dla pszczół upatruje się w środkach ochrony roślin najnowszej generacji, należących do insektycydów działających układowo, szczególnie z grupy neonikotynoidów. Długotrwałego oddziaływania dawek subletalnych tych związków na pszczoły może być głównym bądź dodatkowym czynnikiem zwiększonej śmiertelności rodzin pszczelich. Środki ochrony roślin mogą powodować nie tylko tragiczne w skutkach zatrucia pszczół, ale również przedostawać się do produktów pszczelich. Wybór tematu rozprawy doktorskiej przedłożonej do recenzji uważam zatem za trafny i niezwykle istotny. Mieści się on w głównym nurcie badań środków ochrony roślin w kontekście ich szkodliwości dla owadów zapylających i oceny ryzyka ich stosowania dla pszczół, jak również w celu ochrony zdrowia konsumentów miodu i innych produktów pszczelich.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech opublikowanych w latach 2016-2017 prac naukowych, na który składają się: jedna praca przeglądowa oraz dwie prace oryginalne (wykaz poniżej), poprzedzone obszernym opracowaniem wprowadzającym.

Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską:

1. Kiljanek T., Niewiadomska A., Posyniak A., 2016, Pesticide poisoning of honeybee: a review of symptoms, incident classification, and cause of poisoning. *Journal of Apicultural Science*, 60(2), 5-24. DOI: 10.1515/JAS-2016-0024 - praca przeglądowa (20 pkt. MNiSW; IF=0,571)
2. Kiljanek T., Niewiadomska A., Semeniuk S., Gawęł M., Borzęcka M., Posyniak A., 2016, Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry – honeybee poisoning incidents, *Journal of Chromatography A* 1435, 100-114. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.01.045 - praca doświadczalna (40 pkt. MNiSW; IF=3,926).
3. Kiljanek T., Niewiadomska A., Gawęł M., Semeniuk S., Borzęcka M., Posyniak A., Pohorecka K., 2017, Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – preliminary exposure assessment. *Chemosphere* 175, 36-44. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.028 - praca doświadczalna (35 pkt. MNiSW; IF=3,698).

Wszystkie prace wchodzących w skład przedłożonej rozprawy ukazały się w języku angielskim w renomowanych czasopismach z listy Journal Citation Reports (*Journal of Apicultural Science*, *Journal of Chromatography A* i *Chemosphere*). Na podkreślenie zasługują ilościowe wskaźniki charakteryzujące publikacje wchodzące w skład monotematycznego cyklu. Łączny Impact Factor (IF) wg. Journal Citation Reports edycja z 2015 r. wymienionych prac wynosi 8,195, a suma punktów zgodnie z wykazem MNiSW z 2016 roku - 95.

Zaprezentowane w pracy doktorskiej badania stanowią wyodrębnioną i samodzielną część prowadzonych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii w latach 2014 – 2015 badań. Do pracy dołączono stosowne oświadczenia współautorów publikacji, które jednoznacznie wskazują na dominujący udział Doktoranta w zebraniu piśmiennictwa i przygotowaniu publikacji przeglądowej (wkład własny doktoranta stanowi 85%) oraz w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu uzyskanych wyników badań, w tym metody analitycznej i przedstawieniu w formie 2 publikacji doświadczalnych (wkład własny doktoranta stanowi odpowiednio 70 i 65%). We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a zarazem autorem korespondencyjnym, co potwierdza jego kluczową rolę w opracowaniu naukowym tych prac.

Do cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy Doktorant dołączył **opracowanie wprowadzające** przedstawione w formie 32-stronicowego maszynopisu, poprzedzone listą wchodzących w zakres dysertacji publikacji oraz wykazem zastosowanych w pracy skrótów. Opracowanie to składa się ze wstępu, w którym Doktorant przedstawił zasadność podjętej tematyki badawczej, zwięźle sprecyzowanego celu i zakresu pracy oraz opisu materiału badawczego i metodyki, w tym opisu poszczególnych etapów opracowanej metody analitycznej, a także syntetycznego omówienia uzyskanych wyników oraz wniosków końcowych. Opracowanie zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię zawierającą wykaz 42 pozycji literaturowych zacytowanych w tekście opracowania.

Cel pracy (**Rozdział 2 opracowania**) został sformułowany przez Doktoranta poprawnie, jest jasny i nie budzi zastrzeżeń. Było nim „...opracowanie kompleksowej wielopozostałościowej metody oznaczania pestycydów w pszczołach, która obejmowałaby możliwie najszerszy zakres substancji aktywnych środków ochrony roślin oraz leków warroabójczych

stosowanych obecnie w Polsce. Ponadto celem pracy była ocena narażenia rodzin pszczelich hodowanych w krajowych pasiekach na pestycydy oraz analiza zagrożeń wynikających z tego narażenia". W sformułowaniu drugiego postawionego przez Doktoranta celu mam jedynie drobną uwagę. Bardziej poprawnym sformułowaniem „hodowanych w krajowych pasiekach” użytym przez Doktoranta w odniesieniu do rodzin pszczelich, byłoby sformułowanie „utrzymywanych w krajowych pasiekach”.

Zakres pracy jest bardzo szeroki i obejmuje wiele aspektów dotyczących zatruc pszczoł pestycydami (**praca 1**), w tym możliwości wykrywania pozostałości pestycydów w pszczołach z uwzględnieniem stosowanych metod analitycznych oraz opracowanie metody oznaczania substancji aktywnych środków ochrony roślin w pszczołach (**praca 2**), a także wykorzystania wyników analiz szerokiego materiału badawczego (około 400 próbek pszczoł zatrutych środkami ochrony roślin oraz próbek pszczoł żywych z badań monitoringowych) w ocenie narażenia pszczoł na pestycydy (**praca 2 i 3**).

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską układają się w logiczną całość, co zostało odzwierciedlone w opracowaniu wprowadzającym. We wstępie tego opracowania Doktorant uzasadnił celowość podjętych badań opisując zjawisko masowego ginięcia rodzin pszczelich (CCD, ang. Colony Collapse Disorder) oraz przeprowadzając szeroką analizę problemu zatruc pszczoł środkami ochrony roślin, jako jednego z głównych czynników wpływających na osłabienie stanu zdrowia rodzin pszczelich, zwłaszcza w okresie wiosenno-letnim.

Zagadnienia zatruc pszczoł pestycydami przedstawione w **pracy przeglądowej 1 (Rozdział 1.1 opracowania)**, uwzględniają mechanizmy działania głównych grup insektycydów na owady oraz objawy i klasyfikację zatruc, opisują także stosowane obecnie systemy monitoringu zatruc pszczoł oraz dotychczasowe sposoby interpretacji uzyskanych wyników badań pozostałości pestycydów w zatrutych owadach. W pracy Doktorant zwrócił uwagę na problem toksyczności mieszanin różnych grup pestycydów, wskazując na możliwy ich synergizm w oddziaływaniu na pszczoły. Podkreślił również ogromną rolę badań pozostałości środków ochrony roślin w pszczołach w monitoringu zatruc pszczoł, jako istotnego elementu strategii ochrony zapylaczy. Wskazał także na brak jednoznacznych kryteriów, które pozwalałyby ocenić, czy wyniki badań diagnostycznych mogą wskazywać na wystąpienie toksyczności ostrej u narażonych pszczoł. Tym samym Doktorant potwierdził znajomość tematu i celowość wykonanych w pracy badań.

Przegląd metod oznaczania pestycydów w pszczołach został przedstawiony w **pracy doświadczalnej 2 (Rozdział 1.2 opracowania)**. W pracy tej Doktorant zwrócił m.in. uwagę, że stosowane w ostatnim czasie metody analityczne wykorzystujące techniki chromatografii gazowej i chromatografii cieczowej sprzężone z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS, LC-MS/MS) dają co prawda możliwości oznaczania szerokiego zakresu pestycydów w pszczołach oraz w produktach pszczelich (miodzie, pyłku), nie są jednak w stanie oznaczyć możliwie szerokiego zakresu pestycydów, zatwierdzonych obecnie do stosowania w Unii Europejskiej. Takie możliwości daje jedynie połączenie tych dwóch technik chromatograficznych, co było podstawą do opracowania przez Doktoranta nowej wieloskładnikowej metody oznaczania pestycydów w pszczołach.

Wstęp opracowania wprowadzającego został uzupełniony o dane dotyczące dotychczas publikowanych wyników badań próbek zatrutych pszczoł, przede wszystkim związkami owadobójczymi oraz w niewielkim stopniu grzybobójczymi i chwastobójczymi (**Rozdział 1.3 opracowania, praca 1**).

W części metodycznej opracowania (**Rozdział 3 opracowania, praca 2 i 3**) Doktorant opisał materiał na którym wykonał badania oraz sposób postępowania analitycznego na etapie opracowywania metody analitycznej, łącznie z jej walidacją. Przeprowadził również badania pozostałości pestycydów na szerokim materiale badawczym, który stanowiły próbki martwych (74) i żywych pszczoł (343) pozyskane w latach 2014-2015 w ramach realizacji zadania pt. „Monitorowanie stanu zdrowotnego i strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach”, będącego częścią Programu Wieloletniego PIWet-PIB 2014-2018 pt. „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego”. Wyniki badań pestycydów w próbkach martwych pszczoł zostały opublikowane w pracy 2. Posłużyły one Doktorantowi do przeprowadzenia w pracy 3 analizy toksykologicznej pozostałości pestycydów w martwych i żywych pszczołach. Uważam, że w pracy 3 należało jedynie powołać się na pracę 2 w części dotyczącej materiału badawczego, a nie powtarzać się, jak to uczynił Doktorant. Poproszę zatem o wyjaśnienie takiego ujęcia redakcyjnego.

W syntetycznym omówieniu wyników (**Rozdział 4.1 opracowania, praca 2**) Doktorant przedstawił opracowaną w swoich badaniach metodę oznaczania pestycydów oraz ich metabolitów w próbkach pszczoł. Modyfikacja i zoptymalizowanie techniki QuEChERS na etapie przygotowania próbki do analiz była jednym z najistotniejszych elementów na etapie opracowania metody. Równoległe wykorzystanie techniki GC-MS/MS i LC-MS/MS umożliwia oznaczenie możliwie szerokiego spektrum - 200 związków, z których 195 jest aktualnie zatwierdzonych do stosowania w UE jako substancje aktywne środków ochrony roślin oraz ich metabolitów z grupy insektycydów m.in. z grupy fungicydów, herbicydów, regulatorów wzrostu, akarycydów i innych. Opracowaną procedurę badawczą poddano walidacji zgodnie z wytycznymi przewodnika SANCXO/12571/2013 oraz, jak pisze Doktorant w opracowaniu wprowadzającym, po dodatkowej walidacji przeprowadzonej dla 226 pestycydów w miodzie, weryfikacji w międzynarodowych badaniach biegłości, co pozwoliło na jej akredytację przez Polskie Centrum Akredytacji w odniesieniu do wymagań normy PN-EN ISO/IEC 17025. W tym miejscu nasuwa się pewna wątpliwość, która wymaga wyjaśnienia, czy akredytacja metody dotyczyła oznaczania pestycydów w miodzie, czy w pszczołach, ponieważ nie jest to dla mnie do końca jednoznaczne.

Wykryte opracowaną metodą pozostałości pestycydów w próbkach martwych i żywych pszczoł (**Rozdział 4.2 opracowania, praca 2 i 3**) wskazują na obecność łącznie 81 różnych związków, które wykazują 30 różnych mechanizmów działania. Jest to jak dotąd najbardziej wszechstronny obraz narażenia pszczoł na pestycydy zaobserwowany po raz pierwszy w pasiekach naszego kraju, co niewątpliwie potwierdza ogromne znaczenie podjętych przez Doktoranta badań w wyjaśnieniu przyczyn spadków rodzin pszczelich w krajowych pasiekach.

W ocenie narażenia pszczoł na pestycydy (**Rozdział 4.3 opracowania, praca 2 i 3**), Doktorant wykazał, że martwe pszczoły były narażone łącznie na 57 pestycydów oraz metabolitów, w tym 21 insektycydów i ich metabolitów, 20 fungicydów, 12 herbicydów, 2 akarycydy oraz 2 metabolity leków warroabójczych. Z kolei żywe pszczoły były narażone łącznie na 48 pestycydów, w tym 9 insektycydów i ich metabolitów, 27 fungicydów, 4 herbicydy, 2 akarycydy oraz 6 leków warroabójczych i ich metabolitów. Substancjami najczęściej powodującymi zatrucie pszczoł w Polsce były trzy substancje: chloropiryfos, dimetoat i klotianidyna. W analizie zagrożeń narażenia pszczoł na pestycydy wykonanej na podstawie wyników badań ich pozostałości w martwych oraz żywych pszczołach Doktorant potwierdził synergistyczny wpływ systemicznych fungicydów na wzrost toksyczności insektycydów.

Doktorant podjął się również (**Rozdział 4.4 opracowania, praca 3**) toksykologicznej interpretacji wyników badań pozostałości pestycydów w próbkach martwych pszczoł pozyskanych w ramach diagnostyki zatruc oraz w próbkach żywych pszczoł z badań monitoringowych. Interpretacja uzyskanych danych została przeprowadzona na podstawie tzw. współczynnika zagrożenia (HQ, ang. Hazard Quotient) wykorzystywanego do oceny ryzyka stosowania środka ochrony roślin na etapie jego rejestracji. Współczynnik ten umożliwia ocenę sumy pozostałości wykrytych w pszczołach, nie uwzględniając jednak - ze względu na brak wystarczających badań - ich synergistycznego działania. Wartość HQ 50 wyliczona przez Doktoranta dla grupy pszczoł żywych i martwych, przy założeniu naturalnej śmiertelności przyjętej przez EFSA na poziomie 5,3%, może być przyjęta jako wartość graniczna równoznaczna z zatruciem pszczoł. Doktorant tym samym potwierdził przydatność współczynnika zagrożenia HQ w diagnostyce zatruc pszczoł środkami ochrony roślin, który może stanowić wstępne kryterium w ocenie wyników badań diagnostycznych.

Na podstawie wyników części doświadczalnej pracy doktorskiej Doktorant wysnuł właściwe wnioski (**Rozdział 5 opracowania, praca 2 i 3**), które potwierdzają, że cel pracy został z powodzeniem osiągnięty. Niewątpliwie ważnym dokonaniem badawczym Doktoranta jest opracowanie metody analitycznej oznaczania pozostałości dwustu pestycydów i ich metabolitów w pszczołach z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej i gazowej sprzężonymi z tandemową spektrometrią mas. Opracowanie metody oznaczania pestycydów w pszczołach i jej wdrożenie do praktyki laboratoryjnej może stanowić doskonałe narzędzie w diagnostyce zatruc pszczoł oraz w kompleksowym monitorowaniu narażenia pszczoł na stosowane w kraju pestycydy. Wykrycie i oznaczenie w próbkach pszczoł tak szerokiego spektrum różnego rodzaju toksycznych substancji wskazuje na ogromne skażenie środowiska naturalnego, wynikające ze stosowania w rolnictwie środków ochrony roślin. Należy zatem podjąć szybkie i skuteczne działania w celu ochrony owadów zapylających i przeciwdziałaniu ograniczaniu ich bioróżnorodności. Potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań w skutecznej ochronie roślin mających na celu zmniejszenie użycia pestycydów pozwoli również na ograniczenie skażenia płodów rolnych szkodliwymi substancjami w ilościach zagrażających zdrowiu konsumentów.

Przeprowadzona powyżej szczegółowa analiza poszczególnych aspektów pracy doktorskiej świadczy o jej wysokiej jakości i bardzo dobrym warsztacie badawczym. Stanowi ona oryginalne rozwiązanie tematu naukowego. Doktorant trafnie dostrzegł i zmierzył się z problemem negatywnego wpływu stosowanych w ochronie roślin szkodliwych substancji chemicznych i ich metabolitów na pszczoły. Wykazał się dobrą znajomością literatury przedmiotu, umiejętnością stawiania i rozwiązywania problemów naukowych i samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnością właściwego opracowania wyników badań i ich interpretacji. Rozprawę cechuje logiczna kolejność poszczególnych etapów pracy badawczej, a zaplanowany zakres części eksperymentalnej jest właściwy i istotny dla sformułowanego celu.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi nie umniejszają w żaden sposób jej wartości merytorycznej i poznawczej. Wszystkie prace były recenzowane i zdobyły uznanie, o czym świadczy ich opublikowanie w renomowanych czasopiśmie naukowych z wysokim

współczynnikami IF. Rola recenzenta w tego rodzaju dysertacjach polega na ocenie formalnej.

Podsumowując, przedłożona do zaopiniowania praca odpowiada warunkom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz.U. z 2003r., nr 65, poz. 595 ze zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Tomasza Kiljanka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na ogromną rangę rozwiązywanego w pracy problemu i jej wysoki poziom merytoryczny, a także szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach naukowych znajdujących się na liście JCR i posiadających wysokie wskaźniki bibliometryczne - wnioskuje o wyróżnienie rozprawy.



Dr hab. Teresa Szczęśna, prof. nadzw.

Puławy, 26 maja 2017 r.