

Dr hab. Grzegorz Borsuk prof. nadzw. UP

Zakład Biologii Środowiskowej i Apidologii  
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej  
Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Yekateriny Zonovej pt.:  
**„TRANSFER PIERWIASTKÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH TOKSYCZNYCH Z  
GLEBY POPRZEZ ROŚLINY DO ORGANIZMU PSZCZOŁY MIODNEJ (*Apis  
mellifera* L.) I MIODU”**

Przedstawiona do recenzji praca została zrealizowana w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu pod kierunkiem naukowym promotora dra hab. inż. Adama Romana prof. nadzw. oraz promotora pomocniczego dr Moniki Kowalskiej-Góralskiej.

Temat rozprawy doktorskiej, jak też jej cele, wpisują się w bardzo aktualny i ciągle potrzebny obszar badań z zakresu obiegu pierwiastków, biomonitoringu środowiska naturalnego oraz zanieczyszczenia produktów pochodzenia zwierzęcego.

Obecnie, z uwagi na dużą możliwość dróg skażenia, znaczenie ma systematyczna kontrola stanu zanieczyszczenia środowiska, co Doktorantka czyni w niniejszej dysertacji, badając glebę, rośliny, pszczoły oraz produkt finalny, miód. Pszczoły miodne stanowią największą grupę owadów zapylających w świecie, a przy tym również są najczulszym oraz najbardziej wszechstronnym bioindykatorem skażenia środowiska. Pszczoła miodna spełnia większość wymogów stawianych dobrym bioindykatorem: powszechnie występuje, posiada wąski zakres tolerancji w stosunku do zmian zanieczyszczeń środowiska, w specyficzny sposób reagujący na działanie danej substancji w środowisku oraz odznacza się widoczną i szybką reakcją na zmiany środowiskowe. Jej kluczową zaletą jest fakt, że występuje na wszystkich kontynentach, na którym trwale egzystuje człowiek, co daje możliwość porównywania wyników. Ponadto rozmieszczenie pasiek w poszczególnych krajach jest znane, co sprawia, że mogą stanowić one sieć punktów monitoringowych, której nie trzeba tworzyć. Doktorantka dobrze to wykorzystwała do własnej dysertacji. Można również odtworzyć stan skażenia środowiska wstecz, gdyż miód jest trwałym produktem, nie jest przetwarzany ani konserwowany i może być dostępny do celów badawczych nawet pobrany kilka lat wstecz.

Dysertacja obejmuje 6 rozdziałów (wstęp, przegląd piśmiennictwa, cel pracy, omówienie wyników, wnioski, piśmiennictwo), pomijając streszczenie w języku polskim

i języku angielskim, zawiera 39 tabel, 15 rycin oraz 313 pozycji piśmiennictwa, które zostało przedstawione na 137 stronach zwartego maszynopisu.

Rozprawa odbiega od przeciętnego stereotypu/schematu współczesnych dysertacji doktorskich, gdyż jej układ jest rzadko spotykany. Uważam, iż rozdziały „Wstęp” powinien zaszyfalizować problem badawczy, a „Przegląd piśmiennictwa” dobrze ugruntować problem osadzając go w piśmiennictwie. Podrozdział „Analiza statystyczna wyników” powinien kończyć część metodyczną dysertacji i powinny w niej znajdować się opisy wszystkich zastosowanych metod. Rozdział „Omówienie wyników” powinien być zatytułowany „Omówienie wyników i dyskusja”, jednak ten nowatorski sposób ułożenia rozdziałów w pracy nie wpływa na jej ocenę.

Wstęp stanowi dokładny opis indykatorów środowiska naturalnego oraz opis pierwiastków, które były badane w pracy. Rzeczowy i merytorycznie dobry przegląd piśmiennictwa wprowadza czytelnika w zależności pomiędzy glebą, rośliną, zwierzętami oraz finalnym produktem pochodzenia zwierzęcego. Czyli wprowadza w problem akumulacji i obieg pierwiastków w środowisku naturalnym.

Wstęp i przegląd piśmiennictwa Doktorantka zawarła na 27 stronach maszynopisu, bardzo dobrze wprowadzając czytelnika w zagadnienie obiegu i wykorzystania pierwiastków w środowisku naturalnym.

Doktorantka wyróżniła trzy cele:

- ocena wpływu stopnia uprzemysłowienia rejonu na zawartość wybranych pierwiastków toksycznych w glebie, częściach zielonych i kwiatach roślin, w ciałach pszczoł i miodzie;
- określenie kierunku transferu pierwiastków o właściwościach toksycznych;
- określenie związku porażenia pszczoły miodnej przez mikrosporydia *Nosema* spp. z poziomem zawartości pierwiastków o właściwościach toksycznych w organizmie pszczoł oraz ze stopniem antropopresji obszaru występowania.

Rozdział „Materiał i metody” obejmuje 15 stron maszynopisu. Badania zostały prawidłowo zaplanowane i obejmowały dwa rejon, w których zbierano próby. Pierwszy rejon wysoko uprzemysłowiony zlokalizowany był w województwie dolnośląskim (powiat legnicki, głogowski i polkowicki) wraz z kompleksem przemysłowym należącym do Legnicko-Głogowskiego Okręgu Miedziowego (LGOM). Drugi rejon stanowił kontrolę w stosunku do pierwszego i był to Park Krajobrazowy „Dolina Baryczy”. W precyzyjny sposób oba rejon zostały scharakteryzowane pod względem geograficznym i ekologicznym. Zebrano imponujący materiał do badań, z 20 pasiek z każdego rejonu, liczba próbek wyniosła 400, po 20 próbek gleby, zielonych części roślin pożytkowych oraz ich kwiatów, pszczoł zbieraczek

i miodu z dwóch badanych rejonów w przeciągu dwóch lat badań (2015/2016). Oznaczanie poziomu kumulacji 6 pierwiastków (srebra, miedzi, cynku, manganu, żelaza i niklu) wykonano w Zakładzie Hydrobiologii i Akwakultury Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, natomiast 2 pierwiastki (kadm i ołów) oznaczono w zewnętrznym laboratorium. Łącznie wykonano 400 próbek, w których oznaczono 6 pierwiastków, co daje 2400 oznaczeń.

Podczas pobierania materiału roślinnego, części zielone i kwiaty tych samych roślin pobierano osobno. Uwzględniono najważniejsze rośliny miododajne, kwitnące w okresie zbioru próbek do badań, m.in. gorczyca biała (*Sinapis alba*), facelia błękitna (*Phacelia tanacetifolia*), gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum*), koniczyna biała (*Trifolium repens*), lipa szerokolistna (*Tilia platyphyllos*), lipa drobnolistna (*Tilia cordata*), nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis*), trojeść amerykańska (*Asclepias syriaca* L.). Natomiast w wynikach Doktorantka podaje części zielone roślin i kwiaty. Rozumiem, że próby z tych roślin zostały połączone w jedną „spulowaną” próbę, gdyż naważka do mineralizacji powinna stanowić co najmniej 500 mg suchego surowca.

W tabeli 3 (strona 41) przedstawiono wyniki weryfikacji jakości oznaczeń, użyto certyfikowanego materiału odniesienia (CRM) - Rye grass ERM-CD281 (IRMM, Geel, Belgia). Najniższy odzysk zanotowano dla Zn 74,9%. Czy nie jest to zbyt niska ilość odzyskanego referencyjnego materiału?

Rozdział „Omówienie wyników” zawiera 64 strony dobrze udokumentowanych wyników z dobrze dobranym i aktualnym piśmiennictwem, co czyni ten rozdział automatycznie omówieniem wyników i dyskusją. Doktorantka w logiczny sposób przedstawia wyniki zaczynając od poziomu kumulacji poszczególnych metali w glebie, częściach zielonych i kwiatach roślin pożytkowych oraz organizmie pszczoły i miodzie.

Zatrważające wyniki zawartości Cu w glebie z obszaru uprzemysłowionego, gdzie norma była ośmiokrotnie wyższa, mimo to odpowiadała aktualnie obowiązującym kryteriom oceny zawartości zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi wg Rozporządzenia Ministra Środowiska z dn. 9 września 2002 r. Natomiast zawartość Zn była trzykrotnie zwiększona w glebie obszaru uprzemysłowionego. Podobne przekroczenie dopuszczalnych norm zawartości ołowiu w glebie, Doktorantka stwierdziła w obszarze Legnicko-Głogowskiego Okręgu Miedziowego.

Wyniki badań pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, że zanieczyszczenia emitowane przez przemysł miedziowy wpływają na zwiększenie koncentracji ołowiu i miedzi w częściach zielonych roślin pożytkowych dla pszczoły miodnej.

Bardzo ważna z punktu widzenia konsumentów jest zawartość pierwiastków toksycznych Cu, Cd, Pb, Zn w miodach, które nie były przekroczone w dwóch badanych środowiskach, co może świadczyć o bardzo dobrym oczyszczaniu miodu przez pszczoły.

Kolejny podrozdział dotyczy transferu pierwiastków o właściwościach toksycznych przedostających się z gleby poprzez rośliny do organizmu pszczoły miodnej i miodu. Brak zanieczyszczenia pozyskanych produktów pszczelich pierwiastkami toksycznymi (tj. kadmem, ołowiem, manganem, srebrem i niklem), których generalnie najmniej znaleziono w ciele pszczół, a także w miodzie, w obu badanych środowiskach (obszaru ekologicznego „Dolina Baryczy” i uprzemysłowionego LGOM), z punktu widzenia biologii pszczół świadczy o tym, iż prawdopodobnie pszczoły radzą sobie w nieznanym dotąd sposób z tymi toksycznymi pierwiastkami. Wyniki wskazują na ich wydalanie z organizmu pszczoły. Dlatego Doktorantka słusznie wytycza nowy kierunek badań, aby sprawdzić ciało pszczół zanieczyszczonych pierwiastkami toksycznymi i ich kał.

W pracy kilkakrotnie potwierdzona została możliwość oczyszczania miodu pszczelego w trakcie jego wytwarzania przez pszczoły miodne. Jednocześnie Doktorantka wyjaśnia biologiczne zapotrzebowanie pszczół miodnych na żelazo, które jest niezbędne pszczołom do prawidłowego funkcjonowania i wchodzi w metabolizm przemian ciała białkowo tłuszczowego oraz mięśni znajdujących się w tułowiu, które pełnią funkcje lokomotoryczną pszczół oraz są „piecem” w rodzinie pszczelej. Interesującym wydaje się zbadanie zawartości żelaza w hemolimfie pszczół. Podobny transfer można przedstawić dla miedzi i cynku.

Ostatni podrozdział omówienia wyników poświęcony jest porażeniu pszczół przez spory *Nosema* spp. W tym podrozdziale Doktorantka potwierdza, iż pszczoły pobrane z rejonu Legnicko-Głogowskiego Okręgu Miedziowego (LGOM) były bardziej porażone. Dlatego zanieczyszczenie środowiska metalami toksycznymi wpłynęło znacząco na zwiększenie enzymatycznego wydatku organizmu na pozbycie się toksyn, co prawdopodobnie wpłynęło na obniżenie odporności pszczół, a to z kolei zwiększyło porażenie pszczół mikrosporydiami.

Wnioski wydają się być powtórzonymi wynikami. Proponuję przeredagować 1-3 wnioszek zgodnie z podsumowaniem wyników znajdującym się na stronach 53, 62, 67. Wniosek 9 proponuję przeredagować, aby był zgodny z wynikami zawartymi w tabeli 46. Proponuję również dodać jeden wniosek: wyniki badań wytyczają nowy kierunek badań nad transferem toksycznych pierwiastków w ciele pszczoły.

Drobne uwagi szczegółowe:

Strona 18 „przepuszcza się” powinno być przypuszcza się,

Strona 26 „Literatur wskazuje...” raczej powinno być dane z literatury wskazują...,

Strona 36 „rośną” powinno być rosną,

Strona 39 dopełnienie do kreski – jest to potoczne określenie i w tym miejscu zbędne,

Strona 45 gleby lub ziemi – jakie są różnice,

Strona 54 Tabela 8. Cytowanie powinno znajdować się za tytułem tabeli.

Strona 56 „...było uwarunkowane dmiennym składem...” powinno być odmiennym,

Strona 57 „...mogło to być spowodowane...” powinno być mogło to być spowodowane.

Brak jest poniższych pozycji piśmiennictwa w treści pracy, są one w spisie piśmiennictwa:

103. Kalisinska E., Lanocha-Arendarczyk N., Kosik-Bogacka D., Budis H., Pilarczyk B., Tomza-Marciniak A., Podlasinska J., Cieslik L., Popiolek M., Pirog A., Jedrzejewska E. 2017. Muscle mercury and selenium in fishes and semiaquatic mammals from a selenium-deficient area. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 24-30.

221. Rajmund A., Bożym M. 2017. Zmiany zawartości żelaza i manganu w glebie lekkiej nawożonej osadami ściekowymi i kompostami w czasie 6-letniego doświadczenia lizymetrycznego. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, 17, 101-113.

Pozycje 43-44; 60-62; 78-79; 124-125; 151-152; 179-180; 189-191; 204-206; 227-232; 249-250; 264-265; 300-304; 311-312 wymagają chronologicznego usystematyzowania, czyli od najstarszego do najnowszego.

W spisie piśmiennictwa nie znalazłem pozycji cytowanych prac w treści maszynopisu: Kalisińska i in. 2017 strona 33; 2x Lubimov i in. 2015 strona 53.

Tabela 22 źle oznaczono różnice statystyczne, kolejność liter powinna być zgodna wraz z wzrastającymi lub malejącymi wartościami średnimi.

Numeracja tabel i rysunków powinna być rozdzielona.

Rysunek 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 mam wątpliwości co do przedstawianego transferu

.....kwiat > miód > pszczoła; czy nie powinno być .....kwiat > nektar > pszczoła?

Należy podkreślić, iż praca jest napisana prostym i zrozumiałym językiem. Nieliczne drobne potknięcia językowe wynikają z tego, iż język polski nie jest ojczystym językiem Doktorantki. Na uwagę zasługuje fakt, iż w pracy osiągnięto wszystkie zakładane cele rozprawy doktorskiej.

### **Wnioski końcowe:**

1. Doktorantka w swojej dysertacji podjęła ważny problem badawczy o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym.
2. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością technik analitycznych, w szczególności chemicznych.
3. Z pracy można wnioskować, iż Doktorantka posiada obszerną wiedzę na temat pierwiastków w środowisku jednocześnie potrafi powiązać ich oddziaływanie w żywym organizmie jakim jest pszczoła *Apis mellifera*.
4. Uważam, iż wszelkie moje wątpliwości i wskazane uchybienia Doktorantka rozwiąże w trakcie obrony. Jestem przekonany, że w żaden sposób nie umniejszają one wartości pracy lecz pomogą w przygotowaniu wyników do opublikowania. Jednocześnie sugeruję, aby Doktorantka opublikowała jedną pracę autorską z przypisem: „wyniki pochodzą z rozprawy doktorskiej”.

**Reasumując stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Yekateriny Zonovej pt.: „TRANSFER PIERWIASTKÓW O WŁAŚCIWOŚCIACH TOKSYCZNYCH Z GLEBY POPRZEZ ROŚLINY DO ORGANIZMU PSZCZOŁY MIODNEJ (*Apis mellifera* L.) I Miodu” spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. 2003r. nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Yekateriny Zonovej do procedowania dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą, a także ze względu na bardzo dużą pracowitość, jaką wykazała się Doktorantka podczas prowadzonych badań, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy stosowną nagrodą.**

Lublin, dnia 03.12.2018r.

*Gregorz Borsuk*