

Wrocław, dn. 15.05.2025r.

Dr hab. inż. Paweł Migdał, prof. uczelni
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Instytut Hodowli Zwierząt
Zakład Hodowli Pszczół
Ul. Chełmońskiego 38C
51-630 Wrocław

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Magdaleny Chęć

pt. „Wpływ zanieczyszczenia węzy pszczelej stearyną oraz parafiną na rozwój i wybrane parametry fizjologiczne pszczoły miodnej *Apis mellifera*”,

przygotowanej pod kierunkiem Promotora – prof. dr hab. Mariusza Gagosia.

Podstawę formalno–prawną przygotowania recenzji stanowi pismo z dnia 27.03.2025 r. Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych Pana dr hab. Grzegorza Janusza, prof. UMCS wskazujące, że w dniu 19.03.2025 roku zostałem powołany przez Radę Naukową Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie na recenzenta. Otrzymałem również egzemplarz rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Chęć.

Celem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Chęć jest przetestowanie wpływu zanieczyszczenia węzy pszczelej stearyną oraz parafiną na rozwój osobniczy oraz wybrane parametry humoralnej odporności w hemolimfie robotnic pszczoły miodnej. Przedstawiona praca do recenzji jest monografią, chociaż opracowanie mogłoby mieć charakter hybrydowy, ponieważ część wyników zawarta jest w przedstawionej monografii, natomiast część została opublikowana w trzech czasopismach z listy JCR. Prace te są ściśle powiązane z tematyką badań przedstawionych w niniejszej dysertacji, co zostało wskazane w rozdziale 7, na stronie 151.

1. Chęć, M.; Olszewski, K.; Dziechciarz, P.; Skowronek, P.; Pietrow, M.; Borsuk, G.; Bednarczyk, M.; Jasina, G.; Jasina, J.; Gagoś, M. Effect of stearin and parafin adulteration of beeswax on brood survival. *Apidologie*. 2021, 52, 432–446 (IF= 2,4, pkt MNiSW = 140).
2. Wójcik, Ł.; Chęć, M.; Skowronek, P.; Grabowski, M.; Persona, K.; Strachecka, A. Do the different life history strategies of ants and honeybees determine fat body morphology? *Arthropod. Struct. Dev.* 2022, 69, 101186 (IF= 1,7, pkt MNiSW = 70).
3. Strachecka, A.; Chęć, M.; Olszewski, K.; Staniszevska, P.; Dziechciarz, P.; Gagoś, M. How does adulteration of wax foundation affect phenoloxidase and lysozyme activities as selected parameters of immunity in *Apis mellifera*? *J. Vet. Res.* 2024, 68, 395–400 (IF= 1,3, pkt MNiSW = 140).

Brakuje jednak wyraźnego wskazania w pracy doktorskiej, które badania stanowią części publikacji, a które są rozwinięciem zawartym w niniejszej monografii. Tworzy to wrażenie, że wszystkie wyniki znajdują się jedynie w monografii. Sumaryczny współczynnik IF przedstawionych publikacji wynosi 5,4, natomiast liczba pkt MNiSW 350. Osiągnięcia publikacyjne wskazują na aktualność podjętej tematyki badań przez doktorantkę. Podejmowanie tematyki badań dotyczącej wpływu zafałszowania wosku pszczelego dodatkiem stearyny i parafiny w stosunku 10, 30 i 50% stanowi ważne uzupełnienie luki w wiedzy na temat czynników oddziałujących na rodzinę pszczelą i pojedyncze osobniki. Przedstawiona do recenzji praca doktorska zajmuje 180 stron i podzielona jest na 11 rozdziałów głównych, posiada ona typowy układ dla tego typu prac. Rozpoczyna się od strony tytułowej, wykazu skrótów stosowanych w pracy na 2 stronach, następnie znajduje się streszczenia w języku polskim i angielskim zajmujące po 2 strony i zakończone wykazem słów kluczowych. Rozdział wprowadzający czyli wstęp posiada 4 główne podrozdziały, które są rozwijane w kolejne podrozdziały, ta część pracy zajmuje 41 stron, cel pracy znajduje się na 1 stronie i jest rozwinięty w 7 szczegółowych celów. Rozdział materiały i metody badawcze stosowane w doświadczeniu został opisany na 24 stronach. W kolejnych rozdziałach przedstawiono wyniki, które zajmują 54 strony oraz przeprowadzono ich dyskusję na 16 stronach. Część badawcza została podsumowana w 10 wnioskach zajmujących 2 strony. Następnie umieszczono rozdział odwołujący się do publikacji powiązanych z rozprawą dokorską, rozdział ten zajmuje 2 strony. Elementy te tworzą spójną całość zawierającą odwołania do 303 pozycji literaturowych, które ułożone są alfabetycznie w rozdziale bibliografia na 13 stronach. W 9 rozdziale znajduje się spis tabel, w rozdziale 10 wykazano spis rycin, natomiast ostatni 11 rozdział stanowi aneks w postaci życiorysu naukowego mgr inż. Magdaleny Chęć.

Znaczenie podjętego problemu badawczego

Problem podjęty przez mgr inż. Magdalenę Chęć w niniejszej rozprawie doktorskiej jest bardzo ważny i aktualny. Szczególnie, że węża pszczela jest jednym z kluczowych elementów prowadzenia znormalizowanej gospodarki pasiecznej. Tematyka ta nabiera jeszcze większego znaczenia gdy zdamy sobie sprawę, że całe życie rodziny pszczelej odbywa się w bezpośrednim kontakcie z węzą i woskiem. W odbudowanych plastrach rozwijają się kolejne pokolenia robotnic, trutni oraz matek pszczelich. Ponadto jest w nich składowany nektar, z którego pszczoły produkują miód oraz pyłek, z którego wytwarzają pierzgę. Wszystko, to powoduje, że niska jakość węży lub jej niewłaściwy skład może wpływać wieloaspektowo na rodzinę pszczelą. Początki produkcji pierwotnego wzorca współczesnej węży sięgają 1857 roku, wtedy produkowana była ona głównie z wosku pszczelego pozyskanego w trakcie likwidacji wyeksploatowanych plastrów, zasklepów z miodu czy dzikiej zabudowy. Proces produkcji węży stawał się coraz bardziej precyzyjny i zautomatyzowany. Dziś, ta pierwotnie czysta węża o wysokiej jakości traci swoje cechy i parametry poprzez zanieczyszczanie jej różnymi pozostałościami np. substancji warrobojących, mieszaninami wosków czy kwasów tłuszczowych. Przyczyn tego precedensu można doszukiwać się w rosnącym zapotrzebowaniu na węzę i wosk pszczeli, przy jednocześnie malejącej lub ograniczonej podaży surowca z pasiek. Zjawisko to powoduje, że producenci do wosku pszczelego dodają inne woski i kwasy tłuszczowe, aby zwiększyć wydajność procesu produkcji. Niestety, działania te nie pozostają obojętne dla właściwości fizykochemicznych węży pszczelej oraz samej rodziny pszczelej.

Nieznane są dokładnie oddziaływania pomiędzy zanieczyszczoną węzą a funkcjonowaniem rodziny pszczelej oraz pojedynczych osobników. Wobec powyższego podjęta tematyka badawcza w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Chęć stanowi ważny element rozwoju wiedzy w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy doktorskiej jest adekwatny do treści pracy i wskazuje na jej kierunek. Streszczenie w sposób syntetyczny opisuje elementy rozprawy doktorskiej, zawiera skrócony opis metodyczny, najważniejsze wyniki oraz podsumowanie, jakie płyną wnioski z przeprowadzonych badań. Wstęp zawiera wiadomości ogólne na temat pszczoły miodnej i charakteryzuje wybrane aspekty odporności pszczoły miodnej, uwzględniając induktory mechanizmów odporności, rolę kutikuli i hemolimfy w tym procesie, w ostatnim podrozdziale Doktorantka opisuje mleczko pszczele i jego rolę w odporności pszczoły miodnej. Ważnym elementem opisu są biochemiczne mechanizmy sterujące tymi procesami, uwzględniające kluczowe układy i substancje związane z reagowaniem organizmu pszczoły miodnej na różne czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Wstęp kończy się opisem znaczenia węży pszczelej w gospodarce pasiecznej i rodzinie pszczelej.

Podsumowując rozdział ten jest napisany poprawnie, wprowadza niezbędne informacje powiązane z badaniami oraz wskazuje na istotność tematu badań. Chociaż można byłoby go rozwinąć o elementy mocniej uzasadniające celowość podjętej tematyki badań. Rozwinęłam ten wątek w części recenzji dotyczącej uwag krytycznych.

W rozdziale materiały i metody mgr inż. Magdalena Chęć opisy rozpoczęła od charakterystyki odczynników chemicznych buforów, aparatury i sprzętu wykorzystanego w prowadzonych badaniach. Następnie opisano procedurę przygotowywania węży pszczelej do badań. Na szczególną uwagę zasługuje fakt wykorzystania do produkcji węży wosku pszczelego, pozyskanego z pasieki w której od ponad 50 lat nie stosowano zewnętrznych jego źródeł. Opisano stearynę i parafinę, które zostały wykorzystane do fałszowania wosku pszczelego na cele doświadczalne. Przeprowadzono również analizę GC-MS wybranych do badań wosków, co uważam za bardzo zasadne działanie, ponieważ daje to pewność z jakimi surowcami mamy do czynienia i pozwala precyzyjniej opracować kolejne etapy doświadczenia.

Następnie przygotowane węży umieszczono w rodzinach pszczelich, aby przeprowadzić badania przesiewowe na rodzinach rasy kraińskiej. Pojawia się tutaj drobna nieścisłość, ponieważ wskazano, że każdy arkusz węży umieszczono w innej rodzinie pszczelej i w tej części brało udział 6 rodzin pszczelich, natomiast przygotowano 7 różnych węży (3 x stearyna, 3 x parafina i 1 x kontrola = 7). Następnie przeprowadzono badania właściwe w latach 2019 – 2021 wykorzystując rodziny pszczele Buckfast. Pozyskiwanie robotnic do doświadczenia prowadzono z rodzin pszczelich zasiedlających ule typu Mini-Plus. Odbudowane ramki przenoszono do rodzin pszczelich celem zaczerwienienia. Następnie w 20 dniu rozwoju czerwii plastry te przenoszono do inkubatora, aby uzyskać robotnice w warunkach laboratoryjnych. Dobrze byłoby tutaj opisać warunki panujące w inkubatorze, wskazując temperaturę oraz wilgotność. Robotnice zgodnie z podziałem na 7 grup oznakowano innym kolorem i umieszczono w rodzinach pszczelich. Na szczególną uwagę zasługuje fakt pracochłonności tego etapu badań i liczba wykorzystanych robotnic. Niewątpliwie wymagało

to dużych umiejętności praktycznych i cierpliwości od Doktorantki. Ponadto uważam, że zasadne umieszczanie robotnic w rodzinach pszczelich, ponieważ zapewnia to rzeczywiste warunki ich życia. Przeprowadzono również analizę przeżywalności czerwiu i larw matecznych w miseczkach wykonanych z czystego wosku, wosku z dodatkiem 10, 30, 50% stearyny lub parafiny. W kolejnych etapach przeprowadzono ocenę aktywności gruczołów gardzielowych oraz charakterystykę mleczka pszczelego pod względem pH i z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni (FTIR). Ponadto przygotowano i zrealizowano rozbudowany panel biochemiczny hemolimfy pszczół w 3 punktach czasowych 1, 7 i 14 dniu życia robotnic. Uwzględniono ocenę stężenia białka ogólnego, aktywność systemu proteolitycznego charakteryzowanego przez aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych oraz aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych. Oceniano również aktywność oksydazy fenolowej, aktywność lizozymu, aktywność systemu antyoksydacyjnego, poprzez analizę poziomu całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAC), aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), aktywność katalazy (CAT), aktywność peroksydazy glutationowej (GPx), aktywność S-transferazy glutationowej (GST). Badano również poziom witellogeniny (Vg), stężenie biomarkerów nieenzymatycznych takich jak stężenie glukozy i poziom glikogenu. Wszystkie aktywności enzymów przeliczono na 1 mg białka zgodnie z przyjętą metodyką i formą podawania tego typu wyników. Jest to bardzo mocna część rozprawy doktorskiej wskazująca na rozbudowane umiejętności laboratoryjne mgr inż. Magdaleny Chęć. W metodyce opisującej technikę skaningowej mikroskopii elektronowej zabrakło danych dotyczących napięcia przyspieszającego, odległości roboczej oraz stosowanych powiększeń. Rozdział materiały i metody kończy się opisem analizy statystycznej w którym zawarto charakterystykę wykorzystanych metod statystycznych oraz oprogramowania.

W pracy zaprezentowano kompleksowe podejście do prowadzonych badań uwzględniając praktyczne możliwości wykorzystania zmodyfikowanej węzy oraz jej wpływ na różne aspekty rodziny pszczelej. Podejście takie ma odzwierciedlenie w zaprezentowanych wynikach badań, które to opatrzone są zdjęciami i rycinami ułatwiającymi zwizualizowanie otrzymanych wartości dla poszczególnych parametrów. Wyniki zachowują chronologiczny układ względem rozdziału materiały i metody. Doktoranta jednoznacznie wskazała, że w odniesieniu do wszystkich badanych parametrów biochemicznych w hemolimfie robotnic wyższy spadek w aktywnościach/stężeniach zaobserwowano w grupach z dodatkiem stearyny niż parafiny. Jest to widoczne w niższym stężeniu białka ogólnego hemolimfy, w niższej aktywności proteaz i inhibitorów proteaz, niższej aktywności oksydazy fenolowej, wyższej aktywności lizozymu, niższej aktywności wszystkich enzymów antyoksydacyjnych, niższym stężeniu witellogeniny oraz niższym stężeniu biomarkerów nieenzymatycznych. Prawie w każdej grupie były to różnice istotne statystycznie. Ponadto przeprowadzone doświadczenia terenowe wskazały na niższą przeżywalność czerwiu na plastrach z dodatkiem stearyny lub parafiny względem grupy kontrolnej. Ponadto w grupach tych stwierdzono niższą przeżywalność larw matecznych, gorzej wykształcone gruczoły gardzielowe oraz zmiany we właściwościach fizyko-chemicznych mleczka pszczelego. Obserwacje te są istotne z punktu widzenia praktyki pszczelarskiej, ponieważ w sposób bezpośredni wpływają na rozwój rodziny pszczelej oraz jej skład biologiczny. Dlatego też warto byłoby je poszerzyć o analizy wydajnościowe rodzin pszczelich.

W rozdziale dyskusja Doktorantka zawarła uzasadnienie dlaczego ważne jest badanie węzy i wskazała przyczyny zanieczyszczania wosku pszczelego i spadku jego jakości. W dalszej części opisała znaczenie gospodarcze pszczoły miodnej i czynniki wpływające na jej organizm. Następnie przechodzi do charakterystyki badań własnych w świetle dostępnej literatury. Wskazuje, że większość badań skupia się na badaniach fizykochemicznych zmian w węzie po zafalszowaniu różnymi woskami, wskazując, że niewiele z nich skupia się na badaniu wskaźników fizjologicznych organizmu pszczoły miodnej. Doktoranta wyraźnie zaznacza różnice jakie występują w prezentowanych wynikach badań różnych Autorów i objaśnia jakie mogą być tego potencjalne przyczyny. Wyniki badań własnych odnosi do innych związków chemicznych, np. pestycydów czy stosowanych preparatów w pszczelarstwie. Doktorantka kończy ten rozdział konkluzją stwierdzającą, że przeprowadzone badania wskazują na negatywny wpływ stearyny i parafiny na organizm pszczoły miodnej, co wskazuje na brak możliwości praktycznego wykorzystania tych substancji w produkcji węzy pszczelej. Słusznie stwierdza, że powodują one szereg nieodwracalnych i niekorzystnych skutków. Myślę, że warto byłoby dodać w podsumowaniu dyskusji informację na temat tego, że wyniki badań stanowią podstawę do rozważenia konieczności wprowadzenia przepisów prawnych kontrolujących jakość węzy pszczelej. Podkreśliłoby to aplikacyjny charakter prowadzonych badań.

Rozdział wnioski zawiera 10 prawidłowo sformułowanych obserwacji będących efektem przeprowadzonych badań. Korespondują one z informacjami zawartymi w pracy i są ułożone chronologicznie względem poprzednich części pracy.

Uwagi krytyczne

Jednym z obowiązków recenzenta jest również zwrócenie uwagi na kwestie wymagające uzupełnienia, poprawienia lub doprecyzowania. Wobec powyższego poniżej znajdują się moje uwagi do pracy:

1. We wstępie należałoby wskazać elementy wiążące opisane zanieczyszczenia wosku pszczelego z mechanizmami organizmu pszczoły miodnej, tak aby jasny był układ przyczynowo-skutkowy zachodzący w ich organizmie. Ponadto w rozdziale tym zabrakło informacji na temat uzasadnienia wybranych poziomów zanieczyszczeń stearyną i parafiną wosku pszczelego. Dlatego też myślę, że wartościowe byłoby dodanie rozdziału dotyczącego przeglądu literatury, aby uwzględnić aktualny stan wiedzy na temat wpływu zanieczyszczeń wosku pszczelego różnymi substancjami. Stanowiłoby to solidną podstawę do uzasadnienia doboru analizowanych poziomów zanieczyszczeń. Wobec powyższego proszę o doprecyzowanie dlaczego wybrano 10, 30 i 50% dodatek stearyny lub parafiny do wosku pszczelego?
2. Na początku pracy lub w rozdziale opisującym cel dobrze byłoby umieścić 2- 3 hipotezy badawcze. Jest to powszechna praktyka w tego typu pracach.
3. W części dotyczącej metodyki brakuje uzasadnienia, dlaczego badania przesiewowe przeprowadzono na rodzinach pszczelich rasy kraińskiej, natomiast badania właściwe już na pszczole Buckfast. Prosiłbym o wyjaśnienie tego. Ponadto w rozdziale tym w niektórych miejscach nie umieszczono odniesień do literatury, wobec czego ciężko było stwierdzić czy dana metodyka jest zaczerpnięta z literatury, a może jest zmodyfikowana przez Doktorantkę, np. przy analizie pH mleczka pszczelego, analizie FTIR, oznaczaniu

aktywności oksydazy fenolowej, ocenie powierzchni czerwiu w skaningowej mikroskopii elektronowej.

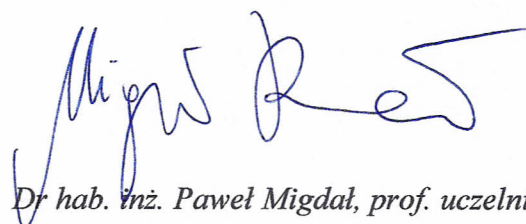
4. W części metodycznej nie podano przy badaniach wstępnych linii pszczoł krajńskich oraz wieku matek pszczelich.
5. Niejasne jest również dlaczego odbudowę plastrów prowadzono w jednych rodzinach pszczelich, natomiast w celu ich zaczerwienia umieszczano je w innych rodzinach. Myślę, że warto wyjaśnić ten element, aby rozwiąć wszelkie wątpliwości.
6. W pracy Doktorantka odwołuje się do pozostałości środków ochrony roślin i leków weterynaryjnych w wosku pszczelim. Dzieje się to we wstępie oraz w dyskusji wyników. Ważne byłoby dodanie analizy pozostałości pestycydów w badanym wosku, aby mieć pewność, że nie stanowią one czynnika wpływającego na otrzymywane wyniki badań.
7. W pracy zabrakło informacji na temat warunków atmosferycznych panujących w trakcie umieszczania węży w rodzinach pszczelich, ponieważ jak wskazano we wstępie i dyskusji nie tylko dostępność pożytku ma wpływ na odbudowanie węży ale również warunki atmosferyczne.
8. W rozdziale opisującym statystykę brakuje wskazania czy stosowano poprawki do testów statystycznych.
9. W dyskusji zabrakło objaśnienia jakie mechanizmy stoją za obserwowanymi zmianami np. w hemolimfie pszczoł. Dobrze zostało to opisane w przypadku zmiany pH mleczka i tego jakie mogą zachodzić reakcje. W taki sposób powinny być opisane również pozostałe mechanizmy.
10. Praca napisana jest poprawnym językiem, chociaż zdarzają się niefortunne określenia czy skróty myślowe np. na str. 20 napisano "środowiskowe (antropologiczne)...." domyślam się, że chodziło o antropogeniczne; str. 21".... pasożytnicze roztocza, np. Varroa destructor, Varroa jacobsoni, Nosema spp.." do grupy roztoczy zakwalifikowano sporowca Nosema spp.; str. 22 „...związków chemicznych i trucizn...” trucizny również są związkami chemicznymi; str. 24 opisując hemolimfę użyto stwierdzenia „Uczestniczy w procesach krzepnięcia krwi.....”; str. 44 opisując znaczenie węży użyto skrótu myślowego pisząc, że „...ułatwia pszczelarzom prowadzenie wszelkich prac...”, nie sama węża na to wpływa; str. 45 „Nieprawidłowo dobrana węża może prowadzić do wadliwej odbudowy...”, myślę, że chodziło tutaj o jakość węży; str. 56 w nazwie rozdziału użyto określenia „Bufory i odczynniki”, należałoby doprecyzować o jakie odczynniki chodzi, ponieważ poprzedni rozdział nazywa się „odczynniki chemiczne”; str. 63 „W pasiece wybrano sześć kolonii pszczelich o podobnej wytrzymałości i strukturze...”, niejasne jest pojęcie wytrzymałość rodziny pszczelej; str. 69 ... umieszczony..., powinno być umieszczony; str. 79 opis ryciny „Obraz rozproszonego.....”, bardziej zasadne byłoby użycie sformułowania “rozstrzelonego”.

Podsumowanie recenzji i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca mgr inż. Magdaleny Chęć stanowi ważny wkład w rozwój nauki i uzupełnia lukę dotyczącą wpływu zanieczyszczenia węży pszczelej stearyną oraz parafiną na rozwój i wybrane parametry fizjologiczne pszczoły miodnej *Apis mellifera* L.. Praca ta łączy w sobie badania terenowe i laboratoryjne co wskazuje na rozbudowane

umiejętności praktyczne i samodzielność Doktorantki. Wobec czego mogę bez wątpienia stwierdzić, że Doktorantka włożyła dużo trudu w opracowanie wyników i przeprowadzenie analiz, a przedstawione opisy w rozprawie doktorskiej świadczą o jej dojrzałości naukowej. Opisy w pracy mimo drobnych braków są dobrze przedstawione pod względem formalnym. Podjęta tematyka jest bardzo istotna nie tylko ze względu na jej znaczenie poznawcze, ale również praktyczne.

Badania i nauka leżą u podstaw każdego postępu, który ułatwia zrozumienie otaczającego nas świata, z całym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona praca mgr inż. Magdaleny Chęć, przyczyni się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących wewnątrz rodziny pszczelej. Wobec czego uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) zgłaszam, zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie o uznanie rozprawy Pani mgr inż. Magdaleny Chęć za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Migdał P', with a stylized flourish at the end.

Dr hab. inż. Paweł Migdał, prof. uczelni