

### Ocena

pracy doktorskiej mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej pt. *„Opracowanie innowacyjnej metodyki oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w glebie”*

Celem pracy doktorskiej Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej było opracowanie metody analitycznej do oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w glebie. Metoda ta powinna spełniać kilka warunków. Powinna być efektywna, dostarczać wiarygodnych wyników oraz być przystosowana do jednoczesnej analizy wielu substancji aktywnych, głównych składników środków ochrony roślin. Ponadto powinna być tania, szybka i przyjazna dla środowiska naturalnego. W literaturze dotyczącej analizy pozostałości środków ochrony roślin znana jest metoda, uznawana za szybką, łatwą, taną, efektywną, niezawodną i bezpieczną, do oznaczania tych pozostałości w owocach i warzywach (metoda QuEChERS). Doktorantka postanowiła na założeniach tej metody zmodyfikować poszczególne jej etapy co miało doprowadzić do opracowania nowej metody oznaczania zawartości pozostałości środków ochrony roślin w nowej matrycy biologicznej, w glebie. Aparaturą pomiarową do oznaczeń miał być chromatograf gazowy sprzężony z detektorem MS-MS.

Tak postawiony cel badań uważam za naukowo ważny, a koncepcję badań za w pełni uzasadnioną. Związki aktywne stosowane do ochrony roślin jak również tworzone z nich metabolity są często związkami chemicznymi, które są szkodliwe dla organizmów żyjących w środowisku naturalnym, w tym również dla człowieka. Ważnym więc aspektem planowanych badań jest śledzenie losów substancji aktywnych stanowiących środki ochrony roślin w tym również ich przekształceń w środowisku naturalnym, głównie w glebie i w wodach. Nowa metoda analityczna miałaby więc dostarczać ważnych informacji o „czystości chemicznej” gleb planowanych pod uprawy poszczególnych roślin oraz czystości wód gruntowych, rzek i jezior. Znajomość zawartości środków ochrony roślin i ich metabolitów wyraźnie poprawiłoby ocenę środowiska naturalnego pod kątem bezpieczeństwa dla organizmów pożytecznych dla tego środowiska, w tym również, jakkolwiek chyba mniej na to zasługuje, człowieka. Trzeba również podkreślić, że planowane badania dobrze wpisują się w prace

polskich służb ochrony środowiska, a szczególnie Państwowego Monitoringu Środowiska, w którego programie jest monitorowanie jakości gleby.

W części literaturowej dysertacji doktorskiej Autorka przedstawiła na początku rys historyczny stosowania środków ochrony roślin od czasów starożytnych po dzień dzisiejszy. Podaje również podziały stosowanych aktualnie pestycydów pod względem rodzaju zwalczanych szkodników, sposobu ich działania, budowy chemicznej, toksyczności i trwałości w środowisku naturalnym. W kolejnych rozdziałach części wstępnej mgr K. Pszczolińska omawia badania procesów biodegradacji środków ochrony roślin w glebie, głównej części środowiska naturalnego, w której się kumulują. Badania szlaków biodegradacji, szybkości tego procesu, sposobów uwalniania się środka i ich metabolitów jak również sposobów ich przemieszczania się w środowisku naturalnym dostarczają informacji na temat miejsca i rodzaju zagrożeń wynikających z ich stosowania. W kolejnym fragmencie części literaturowej Autorka prezentuje budowę strukturalną gleby oraz jej właściwości fizyczne mające wpływ na trwałość pozostałości środków ochrony roślin oraz ich dystrybucję w odpowiednich składnikach gleby. Omawia także procesy wiązania i uwalniania tych środków przez gleby o różnych właściwościach takich jak tekstura, zawartość materii organicznej oraz pH. Duży fragment części literaturowej poświęcony jest procesom chemicznej, fotochemicznej oraz mikrobiologicznej degradacji związków ochrony roślin w środowisku naturalnym, głównie w glebie. Omawiając biodegradację słusznie zwróciła uwagę, że jej efektywność zależy w decydującej mierze od zawartości mikroorganizmów w glebie oraz na przykłady kiedy metabolity związku biologicznie aktywnego są mniej szkodliwe w stosunku do zwalczanego szkodnika, ale często są bardziej toksyczne w stosunku do innych organizmów, często pożytecznych dla środowiska naturalnego. Mam nadzieję, że obecnie przed dopuszczeniem środka ochrony roślin do stosowania badane są również procesy jego biodegradacji w środowisku naturalnym.

W drugim spójnym fragmencie części literaturowej Autorka przedstawiła metody stosowane do oznaczania pozostałości po środkach ochrony roślin w środowisku naturalnym, głównie w surowcach do produkcji żywności i wytworzonych produktach żywieniowych. Najwięcej uwagi poświęciła wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości i metabolitów środków ochrony roślin, która jest powszechnie stosowana w analizie tych pozostałości w owocach i warzywach. Prezentowana metoda znalazła szerokie zastosowanie nie tylko do oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w owocach i warzywach ale również w innych produktach żywieniowych (mleko, jogurty, jaja, miód) oraz surowcach do produkcji żywności (zboża, mięso). Prezentując tę metodę omawia najpierw sposoby

przygotowywania próbek do analizy. W metodzie QuEChERS stosowano ekstrakcję cieczy-ciecz oraz dyspersyjną ekstrakcję do fazy stałej. Ta ostatnia metoda składa się z kilku etapów i jest jednocześnie metodą oczyszczania analitów.

Na zakończenie części literaturowej Doktorantka zaprezentowała kilkadziesiąt przykładów zastosowań różnych wariantów tej metody do oznaczania pozostałości pestycydów w glebie. Przeprowadziła również krytyczną analizę porównawczą metody QuEChERS z innymi metodami stosowanymi dotąd w analizie pozostałości środków ochrony roślin. Analiza ta wskazała, że warto pracować nad udoskonaleniem prezentowanej metody. Ostatnie fragmenty części literaturowej poświęcone są metodom identyfikacji substancji czynnych środków ochrony roślin oraz ich ilościowego oznaczania. Omawia różne rodzaje detektorów stosowanych w chromatografii gazowej oraz cieczowej. Koncentruje się na detektorach w których stosuje się spektrometrię mas, prezentując różne techniki jonizacji oraz typy detektorów masowych. Podkreśla szczególną przydatność analizatorów Orbitrap i TOF w wysokorozdzielczej spektrometrii mas do analizy wieloskładnikowych mieszanin związków chemicznych.

Na początku części doświadczalnej przedstawiła odczynniki i wzorce środków ochrony roślin oraz aparaturę i sprzęt laboratoryjny, które stosowała w pracy. Podała listę 299 substancji czynnych dla których zamierzała opracować metodę analizy. Wśród tych związków są również izomery strukturalne, stereoizomery i metabolity związków odpowiedzialnych za określoną aktywność. W tabeli podała ich nazwy, wzory sumaryczne, rodzaj aktywności biologicznej, wartości log współczynnika podziału *n*-oktanol/woda ( $\log K_{ow}$ ) i współczynnika adsorpcji ( $K_{oc}$ ). Szkoda, że Autorka nie podała wzorów strukturalnych związków, które pozwoliłyby na podstawie obecności różnych grup funkcyjnych w ich strukturze wnioskować o ich stabilności w glebie, warunkach pomiaru oraz doborze odpowiednich sorbentów i rozpuszczalników przy rozdziale i oczyszczaniu tych substancji. W końcowej części poświęconej metodom pomiarowym stosowanym w pracy omawia walidację mającą na celu sprawdzenie poprawności i wiarygodności otrzymanych wyników. Zaprezentowała sposoby sprawdzania specyficzności metody w stosunku do substancji czynnych oraz jej liniowość, poprawność, precyzję, granicę oznaczalności a także zakres pomiarowy. Omawia także zasady „zielonej chemii analitycznej”. Przedstawiona w części doświadczalnej metodyka oznaczeń pozostałości po środkach ochrony roślin w glebie nie budzi moich zastrzeżeń.

Przystępując do opracowania metody analizy 299 składnikowej mieszaniny substancji czynnych środków ochrony roślin Doktorantka musiała najpierw ustalić warunki pracy poszczególnych aparatów: spektrometru mas, chromatografu gazowego oraz zoptymalizować

warunki procesu ekstrakcji tych składników z gleby i ich przygotowania do analizy za pomocą chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem MS-MS. Koniecznym więc było określenie warunków pracy chromatografu gazowego i wyznaczenia czasów retencji wzorcowych substancji oraz warunków ich rozdziału i identyfikacji zarówno jonów macierzystych jak i niektórych jonów po ich fragmentacji. Autorka uporządkowała badane substancje, według czasów retencji, w 32 segmenty jonów macierzystych i fragmentacyjnych, które zapewniały czas całkowitej fragmentacji jonów macierzystych. Dobór warunków analizy chromatograficznej rozpoczęła od wyboru kolumny chromatograficznej oraz ustalenia zakresu temperaturowego pracy tej kolumny. Ustaliła, że początkowa temperatura analizy będzie wynosiła 70°C a końcowa 280°C. Końcowa temperatura była jednocześnie temperaturą płukania zwrotnego kolumny ze związków wysokowrzących. Ustaliła również optymalną temperaturę dozownika na 280°C oraz temperaturę pracy źródła jonów również na 280°C.

Interesującym fragmentem badań było dobranie odpowiedniego zakresu ciśnienia gazu nośnego na czole kolumny w celu blokowania czasu retencji danego związku w trakcie wielokrotnej analizy mieszanin związków. Kolejny fragment opisu badań własnych przynosi wyniki optymalizacji procesu ekstrakcji próbek z gleby. Przystosowując metodę wieloskładnikowej analizy środków ochrony roślin stosowaną w warzywach i owocach do analizy tych pozostałości w glebie badała wpływ masy próbki, dodatku wody i rodzaju rozpuszczalnika oraz techniki ekstrakcji na odzysk substancji czynnych czyli efektywność ekstrakcji. Po przeprowadzeniu wstępnych badań do ekstrakcji substancji aktywnych z gleby wybrała acetonitryl i zastosowała mieszany system ekstrakcji poprzez wytrząsanie ręczne (1 min.) i mechanicznie (1500 obrotów/min., 5 min.). Oczyszczanie ekstraktów poprzez usuwanie niepotrzebnych interferentów z gleby dokonywała za pomocą dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej bądź poprzez wytrząsanie sorbenta z ekstraktem w probówce bądź w pipecie. (metoda DPX). Próby wskazały, że największy odzysk ekstraktu uzyskano kiedy nie prowadzono procesu oczyszczania. Po przeprowadzeniu dodatkowych oznaczeń za pomocą chromatografii gazowej stwierdzono, że substancje zawarte w glebie nie powodowały obniżania sygnałów analizowanych środków ochrony roślin. Wynik ten zadecydował o tym, że w końcowej wersji opracowanej metody analizy pozostałości środków ochrony roślin nie prowadzono procesów oczyszczania ekstraktów.

Po opracowaniu wszystkich etapów metody, która miała być stosowana do oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w glebie mgr Pszczolińska sprawdziła czy spełnia ona wymogi stawiane tego typu oznaczeniom, a tak naprawdę to czy wyniki uzyskane tą metodą są wiarygodne. Przeprowadziła walidację metody co do jej specyficzności, liniowości,

poprawności, precyzji, powtarzalności, granicy oznaczalności, zakresu stosowania i na koniec niepewności. Badania walidacyjne poszczególnych wymogów wskazały, że opracowana metoda może być stosowana do oznaczania zawartości środków ochrony roślin w glebie. Również ocena tej metody pod kątem wymogów ochrony środowiska, a więc wymogów tzw. „zielonej metody analitycznej” również wypadła pozytywnie, gdyż uzyskała 76 pkt. a więc znacznie więcej niż dotąd stosowana (62 pkt.).

Opracowaną, zwalidowaną i opisaną w pracy metodę mgr K. Pszczolińska zastosowała do oznaczania pozostałości po środkach ochrony roślin w 12 próbkach gleby z lat 2018 i 2019, przy czym 10 próbek poddano analizie wielopozostałościowej. Autorka we wnioskach tych badań zwróciła uwagę, że pomimo nie stosowania DDT w ochronie roślin nadal on i jego metabolity są obecne w glebie. Pozytywna informacja z tych badań jest taka, że zawartość tych związków w glebie jest niższa od dopuszczalnej.

Podsumowując dokonania mgr K. Pszczolińskiej trzeba stwierdzić, że wykonała postawione przed nią zadanie. Opracowała bowiem metodę do oznaczania wieloskładnikowych pozostałości środków ochrony roślin w glebie. Ktoś mógłby powiedzieć, że tylko dostosowała znaną metodę oznaczania tych pozostałości w owocach i warzywach do oznaczania ich w glebie. W mojej ocenie modyfikacje tej znanej metody na każdym etapie są tak zasadnicze, że z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Doktorantka opracowała nową metodę. Zwraca uwagę ogromna liczba oznaczeń które musiała wykonać Doktorantka przy tych modyfikacjach. Tylko Tabela 25 zawierająca wyniki procesów walidacji metody ma 25 stron co przekłada się na 750 oznaczeń. Parametry uzyskane w walidacji wskazują, że metoda ta dostarcza wiarygodnych wyników oznaczeń. Metoda ta jak potwierdziła analizami pozostałości pestycydów w rzeczywistych próbkach gleby będzie miała szerokie zastosowanie w praktyce.

Oceniając wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy stwierdzam, że wnoszą one wiele wartościowych informacji do chemii analitycznej związków biologicznie aktywnych w matrycach naturalnych. W załączonym dorobku Doktorantki znalazłem tylko 1 publikację i 4 prezentacje konferencyjne traktujące o zastosowaniu opracowanej metody do oznaczania pozostałości pestycydów w glebie. Mam nadzieję, że wraz z przybywaniem nowych wyników oznaczeń środków ochrony roślin w glebach różnego typu przybędzie również nowych oryginalnych publikacji.

Oceniając edytorską stronę dysertacji doktorskiej mgr K. Pszczolińskiej stwierdzam, że jest ona napisana dobrym polskim językiem. Z dostrzeżonych niefortunnych określeń i sformułowań chciałbym zwrócić uwagę, że: „przerwanie wiązania wodorowego” (str. 33)

nie jest procesem hydrolizy, a raczej procesem fizycznym, zamiast „rozbicia wiązań chemicznych” lepiej pisać „rozerwanie wiązań chemicznych” oraz zamiast „największej ilości związków” (str. 115) pisać o „największej liczbie związków”. Proszę o wyjaśnienie czym różniły się próbki gleb 3 i 4 oraz 5 i 6 (Tabela 22). Ponadto wolę „izolowanie” od „izolacji”.

Podsumowując moją ocenę pracy doktorskiej mg inż. Klaudii Pszczolińskiej pt. „*Opracowanie innowacyjnej metodyki oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w glebie*” stwierdzam, że wyniki uzyskane w trakcie jej realizacji mają dużą wartość naukową dla chemii analitycznej a opracowana metoda oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w glebie może znaleźć zastosowanie w praktyce. Moja ocena opracowania wyników dysertacji jest również pozytywna. W świetle tego stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym. Proponuję więc Radzie Naukowej Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wawrzyn G.