



Opole 30 stycznia 2020

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

OCENA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej

pt. „*Opracowanie innowacyjnej metodyki oznaczania pozostałości
środków ochrony roślin w glebie*”

zrealizowanej w Laboratorium Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin,

Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytut Badawczego

Oddział Sońnicowice,

pod kierunkiem dr hab. Moniki Michel, prof. IOR – PIB,

z udziałem promotor pomocniczej dr Urszuli Rzeszutko

Imponujący wielkością, roczny tonaż form handlowych środków ochrony roślin wykorzystywanych w uprawach sprawia, że preparaty te mylnie uważa się za czynniki plonotwórcze. Takiemu poglądowi sprzyja wielokrotne, wymienne stosowanie substancji aktywnych o różnym przeznaczeniu i odmiennym spektrum działania, w tej samej uprawie, w czasie jednego sezonu wegetacyjnego. Chociaż nie wszystkie uprawy wymagają tak intensywnej ochrony, wieloletni okres stosowania zróżnicowanych chemicznie substancji aktywnych sprawił, że narastający problem pozostałości środków ochrony roślin w agrocenozach, szczególnie w glebach, stał się rzeczywistością. Ze względu na charakter substancji aktywnych, specjalnie tych, które ze względu na przeznaczenie są toksynami poszczególnych grup organizmów, kontrola poziomu pozostałości tych związków oraz ich metabolitów stała się ważnym społecznie zagadnieniem.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej, poświęcona tej problematyce w kontekście wykorzystania metodologii QuEChERS w oznaczaniu możliwie szerokiego spektrum pozostałości środków ochrony roślin w próbkach gleby, dobrze wpisuje się w tę sferę zagadnień. Autorka prezentuje kompleksowe podejście do rozwiązania problemu; poczynając od odpowiedniego przygotowania próbek, poprzez zastosowanie wciąż rozwijanych narzędzi i technik analitycznych, głównie chromatografii gazowej sprzężonej z potrójnym kwadropolowym detektorem mas (GC-MS/MS), po ujednoczoną analizę wyników prowadzonych oznaczeń. Cel badań - odpowiadający temu

metodologicznemu podejściu, uważam za atrakcyjny poznawczo i co ważne stwarzający realną możliwość wzbogacenia zestawu procedur oznaczeń wielopozostałościowych.

Rozprawa przedstawiona mi do oceny, została przygotowana w klasycznym układzie dysertacji doktorskich i obejmuje łącznie dwieście czterdzieści osiem (248) wydrukowanych stron, włączając w tę liczbę także załączniki, informację o dorobku naukowym Autorki, stosowne oświadczenia, a także wykaz cytowanej literatury - złożony z dwustu trzydziestu trzech (233) pozycji. Zgodnie z numeracją, w pracy znajduje się trzydzieści osiem (38) rysunków – w większości chromatogramów albo wykresów korelacji zależności danych, i dwadzieścia pięć (25) tabel – zawierających wyniki doświadczeń, bądź informacje literaturowe. Analizując strukturę niniejszej rozprawy można zauważyć, iż opis dotyczący przygotowania i przeprowadzenia eksperymentów oraz omówienie ich wyników zajmuje blisko sto dziesięć (110) stron. Nieco ponad sześćdziesiąt (60) stron poświęcono prezentacji idei opisanych badań i przedstawieniu aktualnego stanu wiedzy oraz specyfiki aparatury analitycznej, o kluczowym znaczeniu dla prezentowanego toku badań. Pracy towarzyszą dobrze skomponowany wykaz stosowanych skrótów, obszernie podsumowanie, streszczenia w językach: polskim i angielskim oraz załączniki zawierające dane dotyczące oznaczanych substancji i sposobu raportowania wyników wybranych doświadczeń. Takie proporcje działów i układ ocenianej dysertacji, odzwierciedlają zdecydowanie eksperymentalny charakter toku badań przeprowadzonych przez Panią mgr inż. Klaudię Pszczolińską.

Już lektura „Wstępu” pozwala na zorientowanie się, jaki był kierunek prowadzonych badań i jaki zakres zagadnień realizowany był przez Doktorantkę. Zakres ten, rozwinięty i doprecyzowany w kolejnym rozdziale p.t. „Część literaturowa”, wydaje się być rezultatem braku stosownych norm i procedur spełniających współczesne standardy oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w agrocenozach, a szczególnie w glebie. Poza klasycznym omówieniem zagadnień związanych z dynamiką obecności środków ochrony roślin w ekosystemach, Autorka wskazuje na dysproporcję pomiędzy ramami proceduralnymi nielicznymi, obowiązującymi norm, a możliwościami dostępnymi, współczesnymi metod i technik analitycznych. W ten sposób dobrze sankcjonuje kierunek podjętych przez siebie działań, jako zapobiegających zmniejszaniu się liczby w pełni zweryfikowanych procedur oznaczeń wielopozostałościowych, które stają obowiązującym trendem analiz środowiskowych. W tak zaprezentowany tok działań bardzo dobrze wpisuje się wybrana przez Panią mgr inż. Klaudię Pszczolińską, metodologia QuEChERS – przez niektórych autorów i praktyków określana mianem filozofii postępowania. Rozwinięcie tego anglojęzycznego akronimu, stanowi bowiem wykaz cech sposobu prowadzenia analiz środowiskowych i badań jakości żywności; począwszy od poboru materiału i przygotowania próbki laboratoryjnej, aż po uzyskanie próbki analitycznej – gotowej do oznaczeń

aparaturowych. Warto zwrócić uwagę, że pod kątem tej właśnie metodologii postępowania, Doktorantka omówiła szereg zagadnień związanych z przygotowaniem próbek, doбором metody oznaczeń i optymalizacją procesu, wyraźnie lokując własne działania. Zapewne różnorodność i zakres zagadnień omawianych w tej części pracy sprawiły, że nie wszystkie poruszane kwestie wybrzmiewają równie klarownie. Będę zatem wdzięczny za wyjaśnienie kwestii związanych z:

str.15 - poprawnością pochodzenia terminu „pestycydy”, bowiem Autorka stosuje niepoprawną formę językową (*cedeo*), łacińskiego słowa "*caedo*" oznaczającego zadawanie śmierci. Ta niepoprawna forma pojawiła się m.in. w publikacji: „Pozostałości pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego”, Problemy Ekologii, vol. 11, nr 4, lipiec-sierpień 2007, i nieszczęśliwie powielana jest po dzień dzisiejszy;

str.25 – wyróżnieniem „*mobilności w glebie*” jako czynnika wpływającego na los substancji aktywnych, jednak niezależnego od „*adsorpcji i desorpcji w glebie*”, na co wskazuje sposób przekazania tej informacji. Czy możliwe jest traktowanie obu wspomnianych kwestii jako rozłącznych, w pełni niezależnych?

str. 27 – Tabela 2 - podane informacje byłyby bardziej klarowne, gdyby Autorka zechciała określić, czy dopuszczalne zawartości pestycydów dotyczą gleby mokrej, czy np. powietrznie suchej, co istotnie zmienia znaczenie tego parametru;

str.30 – znaczeniem zdania „*Szybkość degradacji, parowania i fotolizy pestycydów jest bezpośrednio zależna od procesu sorpcji, ponieważ ostatecznie określa stężenie środków ochrony roślin w glebie.*”, o którego rozwinięcie merytoryczne bardzo proszę;

str. 31 – wyjaśnieniem, czy to możliwe by ten sam - jeden współczynnik, w tym przypadku współczynnik adsorpcji (podziału) K_{oc} , jak twierdzi Autorka w zdaniu: „*W związku z tym do oceny mobilności pestycydów oraz ich adsorpcji można zastosować współczynnik adsorpcji (podziału) K_{oc} .*”, mógł równie poprawnie charakteryzować dwa procesy: mobilność oraz adsorpcję pestycydów w glebie. Proszę bardzo, by Doktorantka zechciała powiązać wspomniany współczynnik z właściwym procesem, i wracając do kwestii dotyczącej str. 25 (patrz wyżej), by wyjaśniła ewentualne zależności pomiędzy mobilnością i sorpcją pestycydów w glebie;

str. 33 - intencjami Autorki w związku ze sformułowaniem „*Za najważniejsze reakcje redukcji w przemianach środków ochrony roślin należy uznać przede wszystkim odszczepienie atomu chloru lub innego fluorowca (dechlorowanie, dehalogenacja) ...*” – czy naprawdę tak opisane reakcje dehalogenacji są procesami redukcji? Bardzo proszę o wyjaśnienie takiego punktu widzenia, w oparciu o omówienie dowolnej reakcji odpowiadającej opisowi podanemu przez Autorkę;

str. 36 - precyzyjnym wyjaśnieniem zagadnień poruszonych w akapicie „*Substancje czynne, które pozostają na powierzchni gleby przez dłuższy czas będą bardziej podatne na spływ, ponieważ są silnie zaadsorbowane oraz odporne na degradację i parowanie.*”, jako że moim zdaniem Autorka formułuje przeciwstawne logicznie tezy;

str. 37 – wskazaniem podstawowych powodów, skądinąd słusznego także w moim przekonaniu podejścia metodologicznego, do którego odnosi się sformułowanie „*W związku z czym, niezwykle istotne jest stosowanie metod analitycznych pozwalających na wyekstrahowanie szerokiego zakresu substancji czynnych z próbek gleby, a więc metod określanych jako wielopozostałościwe.*” Wątki poprzedzające to stwierdzenie nie zawierają wskazań słuszności tej tezy;

str. 54 – objaśnieniem chemicznej natury substancji wymienionej jako „*sekwiwodny wodorocytrynianu disodu*”.

W „Części literaturowej” znajduje się także tabela 6, zawierająca bogaty zestaw danych, które chociaż ulokowane w tym samym wierszu, wyraźnie różnią się stopniem szczegółowości. Obok ogólnej informacji wskazującej jedynie na przynależność do odpowiedniej grupy ŚOR, znajdują się szczegółowe dane proceduralne odnoszące się do metodologii QuEChERS. Sądzę, że bez podania przynajmniej charakteru chemicznego substancji, takie zestawienie nie spełnia swojej roli chyba, że intencja Autorki była zdecydowanie odmienna, w takim razie bardzo proszę o wyjaśnienie. Podobny niedosyt towarzyszy czytelnikowi pierwszego akapitu ze strony 67, w którym podane przez Autorkę walory doboru odpowiedniej naważki gleby oraz rozpuszczalnika do ekstrakcji, trudno zweryfikować bez odniesienia do charakteru chemicznego analitów.

Dobrze zredagowany cel pracy, zawierający wyodrębnione, konkretne działania wiodące stopniowo do stworzenia kompletnej, zwalidowanej procedury oznaczeń, ma wyraźny kontekst aplikacyjny, co traktuję jako wyraźny, pozytywny walor toku badań Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej.

Klasyczny rozdział poświęcony zagadnieniom metodologicznym, w niniejszej pracy zyskał tytuł „Część doświadczalna” i ma standardowy układ. Od standardów odbiega jednak prezentacja zestawów ekstrakcyjnych w podrozdziale 4.1. „Odczynniki i wzorce”. Sądzę, że ze względu na istotną rolę w opracowaniu docelowej procedury, materiały te zasługują na odrębne omówienie. Chociaż kompozycja tej części pracy jest klarowna, do opisu kilku, spośród stosowanych przez Autorkę procedur badawczych, mam pewne uwagi. Zasadniczą jest nadmierny stopień ogólności w przypadku omawiania niektórych eksperymentów np.:

- str. 95 – podrozdział 4.4.1.: co oznacza zapis „...*odważono nie mniej niż 10 mg wzorca danej substancji czynnej z dokładnością do pięciu miejsc po przecinku ...*”, w którym nie

podaje się precyzyjnej masy substancji, natomiast dokładność naważenia określono z tak niezwykłą precyzją?;

- str. 95 – podrozdział 4.4.2.: podana informacja nie pozwala na zorientowanie się czy zakres stężeń dotyczy poszczególnych substancji, czy też jest to stężenie finalne mieszaniny tych związków;

- str. 97 – podrozdział 4.6: w akapicie poświęconemu temu zagadnieniu brak sformułowanych kryteriów doboru kolumny chromatograficznej oraz kryteriów doboru temperatury termostatu. Nie znalazłem również informacji, czy podane stężenie 0,200 µg/ml dotyczy każdego ze składników, czy jest to stężenie finalne (łączne) wszystkich składników;

- str. 98 – podrozdział 4.7: analogiczna kwestia dotycząca stężenia mieszaniny substancji którą wzbogacano próbki gleby. Podając wartość 0,100 mg/kg, Autorka nie wyjaśnia czy to stężenie każdej ze 148 substancji wzorcowych, czy też stężenie mieszaniny tych związków.

Najbardziej istotny rozdział pracy: „Wyniki badań i ich omówienie” rozpoczyna się nieco zaskakująco od przypomnienia zasad identyfikacji substancji za pomocą spektrometru masowego. Mimo użyteczności tych informacji, sposób ich podania wskazuje, że bardziej odpowiednim miejscem byłby rozdział poświęcony metodom prowadzonych badań. Podobne wrażenie można odnieść zagłębiając się w lekturę kolejnych podrozdziałów poświęconych opracowaniu warunków rozdzielania chromatograficznego analitów, począwszy od doboru trybu pracy i temperatury dozownika, poprzez dobór kolumny chromatograficznej i temperatury termostatu, po określenie warunków pracy tandemowego spektrometru mas. Niemniej ta nietypowa konwencja, w przypadku niniejszej pracy sprawiła, że rozdział ten czyta się wyjątkowo dobrze, gdyż każdy kolejny etap badań znajduje swoje racjonalne uzasadnienie i związek z poprzednim etapem. Niewielki dysonans poznawczy wprowadzają, na szczęście nieliczne, niejasne sformułowania w rodzaju: „*potencjał energii kolizyjnej*”, „*...początkowej substancji czynnej...*” (str.110), czy też „nieliniowe dopasowanie” linii trendu obrazującego zależność czasu retencji chloropiryfosu od ciśnienia gazu nośnego (str. 126). Ponieważ niniejsza praca ma charakter „analityczny”, nieco zaskakuje brak wartości odchyień, bądź błędów standardowych, które zwyczajowo w formie „słupków” obrazujących zakres rozbieżności od wartości średnich, umieszcza się „na wykresach”. Brak ten utrudnia zorientowanie się, czy widoczne różnice wartości pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczeń są, czy nie są istotne, co ogranicza wiarygodność przekazu proponowanego przez Doktorantkę. Na szczęście część wymaganych w tym względzie informacji, można odnaleźć wśród danych prezentowanych w tabelach, w rozdziale „Załączniki”, niemniej zmusza to czytelnika do częstego wertowania pokaznego gabarytowo dzieła i zaburza śledzenie narracji. Być może te same powody sprawiły, że Autorka nie zgłębiła dwóch interesujących kwestii determinujących wartość odzysku; objętości 4 ml wody i

trzyminutowego wytrząsania próbek z prędkością 1500 obr./min. Ani w tym rozdziale, ani w innych częściach pracy nie znalazłem informacji, które pozwalałyby na wyjaśnienie tych zależności parametrów, promujących wysokie wartości odzysku. Zachęcam Panią Doktorantkę do podjęcia prób wyjaśnienia tych zależności, być może bardziej ogólnych w przyjętej przez Nią procedurze badań. Wyrażone uwagi, odnoszące się do tego rozdziału w niewielkim stopniu wpływają na moją wysoką ocenę relacji właściwego toku badań, który przygotowano i przeprowadzono z prawdziwą znajomością zagadnień. Na szczególne uznanie zasługuje racjonalność postępowania w toku optymalizacji procedury, kiedy każdy z czynników zasadniczo wpływających na rezultaty oznaczeń był weryfikowany odrębnie. Dowodzi to odpowiedniego przygotowania Doktorantki do badań prowadzonych zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną i gwarantuje poprawność walidacji opracowanej przez nią procedury. Chciałbym podkreślić, iż wartość tej procedury została pozytywnie zweryfikowana przez Autorkę także praktycznie, w toku analiz dwunastu (12) rzeczywistych próbek dostarczonych do LBPSOR w Sośnicowicach.

Omówienie wyników zamyka rozdział „Podsumowanie i wnioski”, w którym Pani mgr inż. Klaudia Pszczolińska odniosła się do konkretnych działań, wykazując, że w pełni zrealizowała cel swoich naukowych dociekań.

Jak w każdej dysertacji, również w pracy Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej znaleźć można błędy redakcyjne; najczęściej o charakterze interpunkcyjnym, czy tzw. „literówki”. Obecność tych ostatnich utwierdza mnie w przekonaniu, że praca ta jest osiągnięciem autorskim a ponadto, że Doktorantka rzadko używała opcji edycyjnej „kopiuj-wklej”, co traktuję jako pozytywny walor ocenianej dysertacji. Uważam jednak, że nieco większą troskę Autorki powinna wzbudzać kwestia relatywnie licznych zwrotów żargonowych, które jak sądzę wynikają z Jej codziennej praktyki laboratoryjnej i bezpośredniego zaangażowania w tok badań. Przykładami takich sformułowań są:

- „*Gleby mokre mają tendencję do adsorpcji mniejszej ilości pestycydów niż gleby suche*”
- „*Najczęstszymi reakcjami hydrolizy substancji czynnych jest rozszczepienie estrów karboksylowego i fosfoorganicznego, przerwanie wiązania wodorowego ...*”
- „*W związkach jonowych łatwiej ulegają degradacji połączenia anionowe, natomiast połączenia aromatyczne są trwalsze od alkalicznych ...*”
- „*Jeśli na przykład, stopień degradacji jest wystarczająco gwałtowny w porównaniu z szybkością wymywania ...*”;
- tytuł załącznika 2 brzmiący „*Parametry pracy spektrometru mas w trybie monitorowania wielu reakcji*”, nie przystaje do prezentowanego tam zestawu informacji, wśród których dominują te, dotyczące sposobu monitorowania pozyskiwanych danych.

Stosunkowo licznie w tekście pracy występują przypadki wymiennego zastosowania terminów: „ilość” oraz „liczba”, mimo różnego ich znaczenia. Pewnym wskazaniem poprawnego używania tych zwrotów jest niepoliczalny, bądź policzalny charakter rzeczowników, których mnogość opisują. Nieodpowiednie zastosowanie któregoś z tych zwrotów nie deprecjonuje wartości merytorycznej wypowiedzi Doktorantki, sprawia jednak, że niektóre kwestie tracą w pełni klarowny charakter.

Sformułowana wcześniej uwaga dotycząca zwrotów żargonowych, potwierdza wspomniane, wyraźnie aplikacyjny charakter toku badań Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej. Zdecydowanie przychylnie postrzegam sytuację, w której wyniki pracy doktorskiej mogą być zaimplementowane do codziennych, dobrze pojętych rutyn laboratoryjnych, przekładając się na wyższą jakość stosowanych procedur.

Podsumowując niniejszą ocenę dysertacji doktorskiej chciałbym stwierdzić, że opracowanie to zawiera wiele nowych, dobrze zweryfikowanych informacji o charakterze naukowym i aplikacyjnym. Ważnym założeniem prowadzonych badań była dbałość o to, aby opracowana procedura, będąca bardzo dobrym przykładem zastosowania metodologii QuEChERS, umożliwiała oznaczenie możliwie szerokiego spektrum związków, dzięki czemu może być zaliczona w poczet metod wielopozostałościowych. Wyniki przedstawione w pracy sugerują, że wprowadzenie tej procedury do praktyki laboratoryjnej może przynieść wymierne oszczędności finansowe i co równie ważne – zwiększyć bezpieczeństwo środowiskowe. Uważam, że opracowanie i wszechstronna walidacja wspomnianej procedury jest niezbywalnym osiągnięciem Pani mgr inż. Klaudii Pszczolińskiej, które może przynieść korzyści Jej macierzystemu laboratorium i Instytutowi.

Biorąc pod uwagę powyższe, pozytywnie oceniam samą dysertację, jak również wartość aplikacyjną wyników zaprezentowanych przez Panią mgr inż. Klaudię Pszczolińską. Uważam też, iż niniejsza rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, wymienione w odpowiednich, obowiązujących aktach prawnych i kieruję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu wniosek, o dopuszczenie Autorki do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

