

Szczecin, 28 maja 2021 r.

dr hab. inż. Agata Witczak, prof. ZUT
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
ul. Papieża Pawła VI 3
71-459 Szczecin
Tel.: 91 449 6550
E-mail: awitczak@zut.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Izabeli Hrynko

**pt.: „Optymalizacja metod oznaczania insektycydów w roślinach miododajnych,
pszczółach i produktach pszczelich”**

(Recenzję wykonano na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – PIB w
Poznaniu, na podstawie pisma RN/8/610/21 z dnia 12.04.2021 r.)

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora Pani Prof. dr hab. Bożeny Łozowickiej oraz promotora pomocniczego Pana Dr hab. Piotra Kaczyńskiego, prof. IOR-PIB w Instytucie Ochrony Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym, w Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku.

Na opiniowaną rozprawę składa się cykl 4 oryginalnych prac naukowych obejmujących w jednorodny sposób zagadnienie optymalizacji metod oznaczania insektycydów w roślinach miododajnych, pszczołach i produktach pszczelich. Publikacje ukazały się w latach 2017-2021, wszystkie w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w następującej kolejności:

1. Kaczyński P, **Hrynko I.**, Łozowicka B. 2017. Evolution of novel sorbents for effective clean-up of honeybee matrix in highly toxic insecticide LC/MS/MS analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 124-131, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.033. (szacowany udział Doktorantki - **70%**)
2. **Hrynko I.**, Łozowicka B., Kaczyński P. 2018. Liquid chromatographic MS/MS analysis of a large group of insecticides in honey by modified QuEChERS. *Food Analytical*

Methods, 11, 2307-2319, doi:10.1007/s12161-018-1208-z. (szacowany udział Doktorantki – 75%)

3. **Hrynko I.**, Łozowicka B., Kaczyński P. 2019. Comprehensive analysis of insecticide in melliferous weeds and Agricultural crops using a modified QuEChERS/LC-MS/MS protocol and of their potential risk to honey bees (*Apis mellifera* L.). Science of the Total Environment, 657, 16-27, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.470. (szacowany udział Doktorantki – 80%)
4. **Hrynko I.**, Łozowicka B., Kaczyński P. 2021. Development of precise micro analytical tool to identify potential insecticide hazards to bees in guttation fluid using LC-ESI-MS/MS. Chemosphere, doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128143. (szacowany udział Doktorantki – 75%).

Wszystkie prace zostały przygotowane przez Doktorantkę we współautorstwie z Promotorem i Promotorem pomocniczym. W trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś w jednej pracy drugim. Z dołączonych oświadczeń wynika, że wkład mgr Izabeli Hrynko w ich opracowanie był bardzo znaczący i zawierał się w przedziale 70 – 80%. Wartość punktowa cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe Doktorantki wg klasyfikacji punktowej czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi **360**, a **sumaryczny Impact Factor IF = 18,317**.

Poza publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy Pani mgr Izabeli Hrynko, zamieszczono w niej streszczenie w języku polskim i angielskim, dalej omówienie problematyki badań przedstawionych w załączonych publikacjach w formie krótkich rozdziałów, tj.: Wprowadzenie, obejmujące uzasadnienie wyboru tematu, Cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki badań, Dyskusja, Wnioski i oddzielnie Podsumowanie. Rozprawę zakończono spisem cytowanej literatury, oraz materiałem uzupełniającym, z dwiema bardzo rozbudowanymi tabelami zawierającymi najnowszy przegląd literatury oznaczania pestycydów w próbkach pszczół i produktach pszczelich oraz charakterystykę badanych insektycydów. Całość liczy łącznie 54 strony.

Tytuł rozprawy został sformułowany w sposób zwięzły i jasny.

Ocena wartości merytorycznej

Środki ochrony roślin (ś.o.r.) pozwalają na zwiększenie wysokości plonów roślin. Skuteczność i dostępność pestycydów przyczyniła się do ich powszechnego użycia, co przynosi istotne korzyści nie tylko w produkcji roślinnej ale także w leśnictwie, praktyce weterynaryjnej, czy

utrzymaniu drożności dróg. Jedynie ułamek substancji aktywnej stosowanych pestycydów bezpośrednio trafia do organizmów szkodników, natomiast ponad 99% przemieszcza się w ekosystemach wodnych i lądowych, trafiając na sąsiednie tereny uprawne, przenikając do gleby i wody i stanowiąc zagrożenie dla organizmów niebędących przedmiotem zwalczania, np. owadów zapylających. Stwierdza się, m.in. spadek liczby rodzin pszczelich, a przyczyn upatruje się w zatruciach pestycydami.

Podjęta przez Panią mgr Izabelę Hrynko problematyka badawcza rozprawy doktorskiej związana jest ściśle z powyższym problemem. Mając na względzie zdrowotność pszczół, jednoczesne występowanie wielu substancji aktywnych ś.o.r. zarówno w ciele pszczół jak i wytwarzanych przez nie produktach, jednak często na bardzo niskich, śladowych poziomach, istotne jest doskonalenie narzędzi pozwalających na jednoczesną identyfikację i ilościowe oznaczanie dużej grupy związków. Biorąc pod uwagę zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne badanych insektycydów (145 związków) oraz skomplikowaną i trudną do analizy matrycę, którą jest np. miód, rzetelne przygotowanie próbek stanowi duże wyzwanie. Efektywność ekstrakcji z pszczół, ich produktów, roślin miododajnych zależy nie tylko od właściwości ekstrahowanych związków, ale również od mechanizmu ich działania, trwałości w środowisku, a także parametrów samej analizy takich jak wielkość analizowanej próbki, polarności rozpuszczalnika ekstrahującego i właściwości sorbentu użytego do oczyszczania.

Szczególną uwagę poświęcono związkom najbardziej toksycznym dla pszczół, np. chloropiryfos metylowy, deltametryna, imidachlopyryd czy tiametoksam.

Doktorantka postawiła dwie hipotezy badawcze:

- właściwe dobranie warunków przygotowania próbki umożliwi opracowanie dobrze zwalidowanych metod oznaczania insektycydów,
- opracowanie precyzyjnych narzędzi analitycznych pozwoli na wielopozostałościową analizę w jednym toku analitycznym, przy niskich wartościach LOD i LOQ badanych związków.

Weryfikacji hipotez dokonała wytyczając sobie dwa istotne cele badawcze: naukowy i aplikacyjny. Celem naukowym było opracowanie precyzyjnych narzędzi analitycznych pozwalających na wielopozostałościową analizę insektycydów w modelowych matrycach o zróżnicowanej zawartości wosku pszczelego, cukrów, lipidów, białek, flawonoidów, z zastosowaniem nowoczesnej techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS).

Istotną wartością rozprawy jest zrealizowanie celu aplikacyjnego polegającego na szybkim

wdrożeniu zoptymalizowanych procedur do badań rutynowych Instytutu, a także oszacowaniu poziomu zatruc pszczoł, zanieczyszczenia miodów i innych produktów pszczelich. Główne cele realizowano poprzez zadania cząstkowe, np. przyporządkowanie podgrup insektycydów do pozyskanych, unikalnych matryc (pszczoły produkty pszczele, rośliny miododajne, ciecz gutacyjna), optymalizację kluczowych etapów procedury analitycznej, studium efektów matrycowych, walidację własnych procedur analitycznych a także badania aplikacyjne i wdrożeniowe dotyczące ekotoksykologicznej oceny narażenia pszczoł na insektycydy.

Biorąc pod uwagę naukową i aplikacyjną wartość badań, należy podkreślić, że cele postawione w rozprawie doktorskiej są trafne i odpowiadają na aktualny problem wymierania rodzin pszczelich, najprawdopodobniej jako uboczny skutek stosowania insektycydów. Opracowanie zoptymalizowanych procedur analiz istotnie przyczynia się do poznania przyczyn tego niepokojącego zjawiska. Pozwala również na oszacowanie stopnia zanieczyszczenia insektycydami miodów i innych produktów pszczelich oraz roślin miododajnych.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Hrynko ukazały się w recenzowanych, cenionych i wysoko punktowanych czasopismach naukowych z IF, tym samym zostały już wcześniej ocenione przez specjalistów z danej dziedziny.

Tematyka poszczególnych publikacji w pełni odpowiada założonym celom rozprawy. W poszczególnych pracach poddano analizie próbki: pszczoł (P1), miodu (P2), roślin miododajnych (P3) i cieczy gutacyjnej (P4). Warto podkreślić, że dotychczas, według dostępnej literatury, brakowało metody identyfikacji insektycydów w kwiatostanach roślin miododajnych oraz w cieczy gutacyjnej. Opracowanie takich metod stanowi wartość dodaną rozprawy.

Do każdego rodzaju materiału zastosowano 4-etapową procedurę badawczą. Przygotowanie próbek analitycznych oparto na metodzie QuEChERS (określanej jako szybka, tania, wydajna, efektywna i bezpieczna), dla której sprawdzono różne modyfikacje. Przy opracowywaniu optymalizacji metod badawczych uwzględniono parametry mające największy wpływ na uzyskiwany wynik analiz, czyli masę naważki analitycznej, polarność rozpuszczalnika ekstrahującego, warunki ekstrakcji oraz właściwości sorpcyjne sorbentów stosowanych do oczyszczania próbek. Do ekstrakcji, którą realizowano poprzez mechaniczne

wytrząsanie próbek w matrycy cieczy gutacyjnej ze wspomaganiem ultradźwiękowym, użyto rozpuszczalnika acetonitrylu z modyfikatorami w postaci kwasu octowego i/lub mrówkowego, gdzie najbardziej optymalny okazał się dodatek kwasów o stężeniu 1%.

Aby usunąć związki interferujące sprawdzono wydajność 16 sorbentów (niektóre z nich były unikalne), o różnej polarności i specyfice, (tlenku glinu, chitosanu, chityny, tlenku grafenu, Florisilu, żelu krzemionkowego, C8, C18, MgSO₄ PSA, GCB, ENVI-Carb i in.) w zastosowaniu do badanych matryc, uzyskując dobre wyniki.

Poprawność zaproponowanych przez autorkę metod potwierdziły procedury walidacyjne, obejmujące takie parametry jak: liniowość, powtarzalność, dokładność, selektywność oraz granicę wykrywalności i oznaczalności jako elementy precyzji metody.

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy stwierdzam, że publikacje stanowiące rozprawę doktorską Pani mgr Izabeli Hrynko są tematycznie jednorodne, dobrze zaplanowane i cechuje je wysoki profesjonalizm. Podkreślić należy bardzo dobry warsztat badawczy Doktorantki, poczynając od postawienia hipotez, wytyczenia celów, po umiejętność doboru i opanowania szeregu różnorodnych i specjalistycznych metod badawczych oraz weryfikacji uzyskanych wyników. Z pewnością przyczyniła się do tego możliwość pracy w akredytowanym laboratorium badawczym, kontrolującym rutynowo produkty pochodzenia roślinnego.

zagadnienia do dyskusji w czasie obrony

- czy wg Pani, z punktu widzenia toksykologicznego, istotnym jest dążenie do oznaczania wszelkich grup pestycydów jednocześnie;
- proszę o podanie przykładów zastosowania alternatywnych do metody QuEChERS metod stosowanych do przygotowania próbek i ocenę ich użyteczności w rutynowej analizie pestycydów.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Izabeli Hrynko stanowi oryginalny dorobek naukowy, wnoszący

istotny wkład do nauki. Pani Magister dowiodła, że jest dociekliwym i doświadczonym badaczem, posiadającym szeroką i dogłębną wiedzę teoretyczną oraz umiejętności planowania, organizacji i wykonywania badań w zakresie analityki pestycydów. Cel postawiony w rozprawie doktorskiej został w pełni osiągnięty, a jej wyniki wniosły do nauki element poznawczy i aplikacyjny. Na podstawie oceny indywidualnego wkładu Pani mgr Izabeli Hrynko w przygotowanie czterech publikacji uważam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami).

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Izabeli Hrynko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoką wartość naukową rozprawy oraz jej ważny aspekt wdrożeniowy, wnioskuję do Rady Naukowej IOR - PIB o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

