

Dr hab. Bartosz Piechowicz, prof. UR  
Katedra Biotechnologii  
Instytut Biologii i Biotechnologii  
Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Rzeszowski  
Werynia 2, 36-100 Kolbuszowa

Kolbuszowa 18.05.2021

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Hrynko pt.:**  
***Optymalizacja metod oznaczania insektycydów w roślinach miododajnych, pszczołach***  
***i produktach pszczelich***

**1. Opinia ogólna**

Pszczoła miodna (*Apis mellifera*), największy globalny polinator, jest obecnie poważnie zagrożona, a przyczyny tego zjawiska nie są dotychczas jednoznacznie ustalone. Paradoksalnie na wielu obszarach naszego kraju obserwujemy zbyt duże zagęszczenie rodzin pszczelich i tam te pożyteczne owady głodują a nawet rabują się nawzajem, transferując do swoich uli nie tylko pokarm, ale zabrane z innych uli pasożyty, patogeny czy substancje czynne środków ochrony roślin. Jest to istotne, bowiem *Apis mellifera*, w odróżnieniu np. od wielu gatunków trzmieli czy pszczół samotniczych, zimuje w roju odżywiając się zebrany latem pożytkiem. Zatem wszystko to, co w tym pożytku się znalazło, będzie miało wpływ na rodzinę pszczelą w okresie zimowli, najtrudniejszym do przetrwania dla całej pszczelej społeczności.

Pani mgr Izabela Hrynko od kilku lat prowadzi badania nad zagrożeniami populacji pszczoły miodnej. W opartej na czterech manuskryptach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych rozprawie doktorskiej zatytułowanej *Optymalizacja metod oznaczania insektycydów w roślinach miododajnych, pszczołach i produktach pszczelich* przedstawiła zwięzły opis swojego dorobku naukowego w tym zakresie. Wynoszący od 2,2 do 6,6 współczynnik wpływu czasopism, w których opublikowano oceniane prace, jest najlepszym dowodem wysokiej jakości i znaczenia praktycznego wykonanych badań. W trzech z przedstawionych publikacji, mgr Izabela Hrynko jest pierwszym autorem, a w czwartej drugim. Oświadczenia współautorów wskazują, że jej udział we wszystkich przedstawionych do oceny publikacjach jest dominujący i wynosi od 70 do 80%.

Publikacje stanowiące podstawę dysertacji zostały starannie wybrane spośród 19 pozycji z listy A MNiSW, w których mgr Izabela Hrynko jest współautorką. Pozycji, w których Autorzy przedstawili rozwiązania metodologiczne dotyczące optymalizacji metod



oznaczania substancji czynnych środków ochrony roślin w różnych matrycach i poszukiwania sposobów zmniejszania poziomów pozostałości tych związków w żywności, a także dokonali także formalno-prawnej oceny poziomu pozostałości substancji czynnych w produktach spożywczych oraz ocenili zagrożenia dla pszczół wynikające ze stosowania chemicznej ochrony upraw roślin owadopylnych.

## 2. Ocena merytoryczna

W recenzji dokonano merytorycznej oceny doboru tematyki badawczej, zasadności i spójności zestawienia artykułów przedstawionych do oceny przez Autorkę oraz samego autoreferatu. Jest to o tyle ułatwione, że wyniki zostały już wcześniej zrecenzowane w pierwszej kolejności przez zespoły redakcyjne czasopism, w których zostały opublikowane, a następnie przez anonimowych recenzentów z całego świata.

**Wybór tematyki badawczej.** *Apis mellifera* jako globalny polinator roślin uprawnych zasługuje na szczególną ochronę. W czasach powszechnej chemizacji upraw badania, które mogą przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa tego gatunku, zwłaszcza jego ochrony przed szkodliwym działaniem środków owadobójczych, zasługują na docenienie. Z tego powodu wybór przez Autorkę tematyki badawczej uważam za bardzo aktualny i ważny.

**Tytuł.** Mam zastrzeżenia dotyczące tytułu rozprawy doktorskiej. Do produktów pszczelich zalicza się miód, воск, propolis, pierzga, obnóża, mleczko pszczele i jad. Mamy też na świecie wiele gatunków pszczół. Autorka spośród wybranych produktów do badań wybrała tylko miód, a spośród pszczół – wyłącznie gatunek *Apis mellifera*. Tytuł: *Optymalizacja metod oznaczania substancji czynnych środków owadobójczych w roślinach miododajnych, pszczole miodnej i miodzie* wydaje się dokładniej charakteryzować przedstawiony do oceny cykl publikacji.

**Wprowadzenie.** Zawarte na niespełna ośmiu stronach dysertacji wprowadzenie jest w dużej części syntezą wstępów z zaprezentowanych publikacji. Autorka omawia w nim zagrożenia dla pszczoły miodnej wynikające z powszechnego stosowania środków ochrony roślin. Wprowadza również czytającego w główny temat swojej pracy, czyli zasady optymalizacji metod i technik analitycznych wykorzystywanych do oznaczania pozostałości substancji czynnych środków owadobójczych. W tym ciekawym rozdziale Autorce nie udało się jednak ustrzec drobnych błędów zarówno merytorycznych, jak i językowych:

1. *Varroa destructor* należy do klasy *Arachnida*, rząd *Acari*. Z tego powodu do ich zwalczania zaleca się raczej stosowanie akarycydów, a nie, jak napisała Autorka (s. 8, w. 7-10), insektycydów.



2. Zamiast „porażenie chorobami” (s.8, w. 21) zalecałbym użycie określenia „porażenie przez patogeny”.
3. Nie jest jasne zdanie „Substancje te posiadają niezwykle szeroki zakres dawki LD<sub>50</sub> (od 0,0015 µg/pszczołę do 0,18 µg/pszczołę” (s. 9, w. 8-9). Czy ten zakres dotyczy deltametryny i chloropiryfosu metylowego, czy też każda wartość odnosi się do innej substancji?

Jednocześnie warto nadmienić, że we wprowadzeniu Autorka skorygowała błąd merytoryczny zawarty w publikacji nr 2, bowiem acetylocholinoesteraza (AChE) jest enzymem rozkładającym acetylocholinę, a nie, jak to napisano w publikacji, neuroprzebieżnikiem.

**Cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze.** Informacje zawarte w tym rozdziale zostały przedstawione w sposób czytelny i zrozumiały.

**Materiały i metody.** W rozdziale tym Autorka scharakteryzowała obiekty badań, wymieniła oznaczane substancje czynne środków ochrony roślin, omówiła metody ich przygotowywania, ekstrakcji i oznaczania, oraz wskazała sposób walidacji procedur analitycznych i metody szacowania narażenia ryzyka dla pszczoł. Jest on zarówno w publikacjach, jak i referacie, napisany w sposób zrozumiały i, co ważniejsze, pozwalający na odtworzenie prowadzonych badań.

Do rozdziału tego mam drobną uwagę. Ani w publikacji 1, ani też w autoreferacie nie znalazłem informacji dotyczących wieku użytych do analiz pszczoł. Zwierzęta te, ze względu na zmienność pełnionych funkcji (karmicielki, woszczarki, porządkowe, zbieraczki) mogą się między sobą istotnie różnić pod względem chemicznym, co może z różnym nasileniem wpływać na analizowane przez Autorkę efekty matrycowe.

**Wyniki.** Głównym tematem prac stanowiących cykl przedłożonych do oceny publikacji jest optymalizacja metod oznaczania substancji czynnych środków owadobójczych w różnych matrycach. Zaprezentowane w formie barwnych wykresów oraz rozbudowanych tabel wyniki pozwalają łatwo i w pełni ocenić ogrom przeprowadzonych przez Autorkę badań. Wszystkie publikacje są pracami o znacznej wartości metodycznej. Prezentują wyniki optymalizacji procedur analitycznych poprzez odpowiedni dobór: wielkości porcji analitycznych (publikacja 1), odpowiedniego rozpuszczalnika (publikacje 1 i 2), czy sorbentów (publikacje 1, 2, 3 i 4). W przedstawionych badaniach wprowadzono też wymrażanie w celu eliminacji tłuszczów z próbek oraz dobrano czas trwania tego procesu (publikacja 1), a także metodę wspomaganą ekstrakcji (publikacja 4). Zaprezentowane w dysertacji wyniki uzyskane zostały w laboratorium akredytowanym, co zwalnia recenzenta przewodu doktorskiego od obowiązku weryfikowania prawidłowości procesu walidacji metody. Na uwagę zasługuje bogata i rzetelna



dokumentacja badań przedstawiona zarówno w samych publikacjach, jak i w dołączonych do każdej z nich suplementach szczegółowo prezentujących parametry analizy chromatograficznej, średnie odzyski, efekty matrycowe czy też walidację metody analitycznej.

Na uwagę zasługuje fakt, że doktorantka dokonała walidacji zaproponowanej przez siebie metody dla 52 substancji czynnych oznaczanych w pszczołach, 132 w miodzie, 142 w kwiatach roślin miododajnych i 142 w wodzie gutacyjnej, a następnie wykorzystując swoje badania jako narzędzie metodyczne zaaplikowała je do badań rutynowych, czyli do oszacowania poziomu pozostałości w próbkach środowiskowych. Jest to, zdaniem recenzenta, najmocniejszy element rozprawy, bowiem zawsze najwartościowszą częścią pracy naukowca jest potwierdzenie w praktyce jego naukowych dokonań.

Badania próbek środowiskowych pozwoliły m.in. na wskazanie najczęściej znajdowanych (powyżej Dolnej Granicy Oznaczalności) substancji czynnych w 12 próbkach pszczół dostarczonych przez pszczelarzy z Podlasia (były to dimetoat, ometoat i chloropiryfos, wszystkie z grupy insektycydów fosfoorganicznych) i 41 próbkach roślin miododajnych (były to należąca do pyretroidów deltametryna oraz dimetoat i ometoat). Na podstawie tych wyników oszacowano ryzyko narażenia pszczół na badane substancje czynne, dzięki któremu Doktorantka mogła stwierdzić, sumując wartości  $LD_{50}$  dla substancji o podobnym mechanizmie działania, w przypadku dwóch próbek, występowanie dużego narażenia pszczół na wykryte w ich ciałach substancje ( $\%LD_{50} > 100$ ). Analogicznie, badając potencjalne narażenie pszczół wykryto w przypadku dwóch próbek (po jednej próbce mniszka lekarskiego i facelii błękitnej) w przypadku dawki doustnej i czterech (w jednej próbce rzepaku ozimego, jednej - chabra bławatka, oraz w dwóch - mniszka lekarskiego) w przypadku dawki kontaktowej, wysoki iloraz zagrożenia pszczół na skutek obecności w roślinach substancji czynnych insektycydów. Badania tego typu pozwalają na praktyczną ocenę stanu środowiska oraz mogą potencjalnie ułatwiać pszczelarzom podjęcie decyzji o przyszłej lokacji pasiek.

Wszystkie wchodzące w skład cyklu publikacje to prace metodyczne, których celem było opracowanie precyzyjnych narzędzi analitycznych pozwalających na optymalizację oznaczania szerokiej gamy substancji czynnych środków owadobójczych o różnej budowie chemicznej i odmiennych mechanizmach działania w czterech typach matryc: pszczołach, miodzie, kwiatach roślin zapylanych przez pszczoły i wodzie gutacyjnej. Doktorantka doskonale poradziła sobie z tym problemem. Jedyne zastrzeżenie dotyczące nie tyle samych publikacji, co omówienia zaprezentowanych w nich wyników, dotyczy zbyt dużego wkładu części metodycznej w rozdział Wyniki. Wspominanie w tym rozdziale o takich etapach, jak dodatek wody do próbek w trakcie ich przygotowywania, czy też dodatek soli





i odwirowywanie, etapach, które nie podlegały przez Autorkę modyfikacjom mającym na celu optymalizację metody, uważam za zbędne.

**Dyskusja, Wnioski i Literatura.** Nie mam istotnych uwag do rozdziałów 'Dyskusja' oraz 'Wnioski'. Zostały one napisane w sposób wzorcowy, a odwołania bibliograficzne były dobrane w sposób całkowicie przemyślany.

Jedyna uwaga dotyczy niewielkich, aczkolwiek dość licznych błędów w cytowaniu literatury (nr zeszytu są zamieszczone wyłącznie przy pojedynczych pozycjach, w pozycji 4 brakuje nr tomu, nr stron raz są przedstawiane w całości, np. 5157-5166, a innym razem w wersji skróconej, np. 210-22 itp.).

### **3. Informacje dodatkowe**

Mgr Izabela Hrynko legitymuje się bardzo dobrym dorobkiem publikacyjnym (43 publikacje, w tym 19 z listy A i 24 z listy B MNiSW) nie tylko osiągającym ponadprzeciętny jak na magistra współczynnik wpływu (65,401), ale też zawierający znaczące dokonania naukowe.

Najnowsze wskaźniki cytowalności publikacji mgr Izabeli Hrynko (wg bazy Web of Science) dają sumę 321 (bez autocytowań: 299) i indeks Hirscha równy 10, przy czym spośród 20 publikacji, siedem dotyczy ostatniego pięciolecia.

Mgr Izabela Hrynko zaprezentowała swój dotychczasowy dorobek naukowy również w 2 rozdziałach monografii naukowych, 5 recenzowanych wydawnictwach z konferencji i sympozjów naukowych, a także w 47 publikacjach w materiałach z konferencji krajowych i międzynarodowych, 12 referatach konferencyjnych, 7 publikacjach popularnonaukowych i na 37 posterach konferencyjnych.

### **4. Podsumowanie i wnioski końcowe**

Reasumując uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja mgr Izabeli Hrynko wnosi istotny wkład naukowy w proces optymalizacji metod oznaczania substancji czynnych środków ochrony roślin w materiale biologicznym. Doktorantka dowiodła, że potrafi w sposób znacznie więcej niż tylko zadowolający zaplanować i przeprowadzić badania metodyczne ze swojej dziedziny, a także zaprezentować je w recenzowanych czasopismach naukowych o światowej renomie, takich jak Science of the Total Environment czy Chemosphere. Wykorzystany przez nią warsztat naukowo-badawczy jest w pełni wystarczający, by uzyskane wyniki umożliwiły osiągnięcie zakładanych na wstępie celów pracy. Sama praca nie budzi istotnych zastrzeżeń pod względem formalnym i merytorycznym.



W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska mgr Izabeli Hrynko zatytułowana „*Optymalizacja metod oznaczania insektycydów w roślinach miododajnych, pszczołach i produktach pszczelich*” spełnia wymagania stawiane pracom na stopień doktora (art. 13. Ust.1), w rozumieniu Ustawy „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi zmianami, w tym Dz.U. 2017r. poz. 1789) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Izabeli Hrynko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wskazane w tej recenzji walory pracy, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin, Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o wyróżnienie rozprawy autorstwa mgr Izabeli Hrynko.

Kolbuszowa, dnia 18.05.2021

dr hab. Bartosz Piechowicz, prof. UR



