

Prof. dr hab. Eugeniusz R. Grela
Instytut Żywienia Zwierząt i Bromatologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

R e c e n z j a

pracy doktorskiej pt. **"Wykrywanie i oznaczanie tetracyklin w paszach technikami chromatograficznymi"**, wykonanej przez panią mgr inż. **Ewelinę Patyrę** w Zakładzie Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.

Po wprowadzeniu zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu (01.01.2006), pozostawiono jednak możliwość profilaktycznego wykorzystania niektórych antybiotyków w paszach leczniczych za zgodą i wskazaniem lekarza weterynarii. Wzrastająca produkcja pasz przemysłowych, w tym i leczniczych, brak wydzielonych linii do wyłącznej produkcji pasz leczniczych oraz czynnik ludzki mogą być przyczyną świadomego bądź przypadkowego wprowadzenia do obrotu niektórych zabronionych stymulatorów wzrostu. Wymaga to prowadzenia odpowiednich działań na etapie produkcji jak i kontroli urzędowej w celu zapewnienia wysokiego poziomu jakości i bezpieczeństwa wytwarzanych środków żywienia zwierząt. Rozwój nowych technik analitycznych pozwala identyfikować i wykrywać różne związki, które mogą być użyte jako antybiotyki paszowe, w tym i tetracykliny. Stąd też uważam za słuszne i w pełni uzasadnione badania nad określeniem możliwości wykrywania i oznaczania wybranych tetracyklin w materiałach paszowych z wykorzystaniem technik chromatograficznych.

Oceniana praca osadzona jest w obrębie nauk weterynaryjnych, dotyczących kontroli bezpieczeństwa pasz, podejmuje problemy istotne tak z punktu naukowego jak i znaczenia utylitarne, jest dobrze umocowana w światowym piśmiennictwie (na 139 pozycji umieszczonych w wykazie piśmiennictwa aż 106 w języku angielskim), przy czym 81 cytowanych prac została opublikowana po roku 2010.

Wstęp (30 stron), a właściwie to przegląd piśmiennictwa z 4 podrozdziałami (pasze w żywieniu zwierząt, charakterystyka tetracyklin, pozostałości tetracyklin w żywności i paszach oraz analiza tetracyklin w paszach) stanowi wprowadzenie w problematykę właściwości tetracyklin i możliwości ich wykrywania w środkach

żywienia ludzi i zwierząt. Autorka w dość klarowny sposób przybliżyła zagadnienia dotyczące charakterystyki tetracyklin i możliwości ich oznaczania różnymi metodami jak biologiczne, immunologiczne i fizyko-chemiczne. To z kolei pozwoliło Autorce na sformułowanie celu i założeń projektowanych i wykonanych badań odnośnie opracowania i walidacji procedur analitycznych czterech tetracyklin: oksytetracykliny, tetracykliny, chlorotetracykliny i doksycykliny. Podjęte przez mgr inż. Ewelinę Patyrę badania, dotyczące w głównym nurcie optymalizacji warunków oznaczania wybranych tetracyklin, uważam więc za celowe i aktualne, legitymujące się też praktycznym aspektem zastosowania tych osiągnięć w analityce laboratoryjnej.

Nieco uwag do tego rozdziału dotyczy systematyki i podziału pasz (str. 11). Jakie kryteria zdecydowały o włączeniu, np. otrąb do pasz objętościowych (90% s.m. i około 9 MJ EM), zaś wywaru gorzelnianego, pulpy ziemniaczanej czy wysłodków buraczanych (około 90% wody, zaś EM poniżej 1 MJ) do pasz treściwych? Proszę też przybliżyć bliżej charakterystykę naukowo-badawczą eksperta od optymalizacji żywienia zwierząt, ukrytego pod pozycją 101, bodajże Zenon Roszkowski.

Rozdział „Materiał i metodyka badań” (14 stronic) dość dobrze opisuje materiał użyty do badań (szkoda, że już tutaj nie podano liczby próbek poddanych analizom) oraz wykonanych procedur analitycznych i pomiarów doświadczalnych. Należy jednocześnie podkreślić, że zastosowane odczynniki, aparatura i sprzęt laboratoryjny oraz kryteria oceny i metody analityczne są odpowiednie i w pełni nowoczesne w tego typu badaniach. Opracowanie statystyczne wyników badań nie budzi zastrzeżeń.

Jednocześnie mam kilka wątpliwości i pytań dotyczących tego rozdziału, a mianowicie:

- co Pani miała na uwadze, wykazując w tab. 6, str. 44 w składzie mieszanki pełnoporcjowej udział otrąb rzepakowych i otrąb słonecznikowych?, co to są za pasze?
- dlaczego nie podano udziału poszczególnych komponentów paszowych w mieszankach dla kur niosek i tuczników (tab. 6), co uniemożliwia ocenę oznaczonych czy też skalkulowanych składników pokarmowych i witamin?
- dlaczego zainteresowano się tylko miedzią, pomijając inne ważne składniki mineralne mieszanek (tab. 6)?

Wyniki badań opisano na 55 stronach znormalizowanego komputeropisu, dokumentując je w 22 tabelach 39 rycinach. Rozdział ten bardzo wnikliwie i z detalami informuje o uzyskanych wynikach badań własnych. Dotyczyły one ustalenia warunków analizy i optymalizacji metod wykrywania oraz oznaczania tetracyklin w paszach, a także opracowania i walidacji procesów badawczych. W ramach tych badań prace doświadczalne koncentrowały się na właściwym doborze warunków detekcji, rozdziału chromatograficznego, sposobu ekstrakcji analitów z matrycy oraz doborze warunków oczyszczania ekstraktów.

Zarówno Autorka pracy, a także Jej Promotor są wybitnymi specjalistami w zakresie znajomości i technik oznaczeń substancji biologicznie czynnych w paszach, w tym głównie antybiotyków, więc do tabel i wyników tej części pracy nie wnoszę specjalnych uwag.

Najważniejszym, obok właściwych hipotez badawczych i celu pracy, rozdziałem dysertacji doktorskiej jest umiejętność dyskusji uzyskanych wyników z dostępnym piśmiennictwem. Autorka na 17 stronach bardzo zręcznie dokonała omówienia wyników badań własnych na tle dokonań innych autorów prac opublikowanych z rozważanej w rozprawie problematyki badawczej. Uwagę zwraca też aktualność cytowanego piśmiennictwa, gdyż większość prac została opublikowana po roku 2000, w tym 18 prac po 2010 roku. Z przedstawionej dyskusji wynika przesłanie, że rodzaj mieszanki paszowej nie ma wpływu na wynik badania. Natomiast zastosowanie tej samej metody ekstrakcji tetracyklin z pasz leczniczych dla dwóch różnych technik detekcji ma istotny wpływ na końcowy wynik analizy. Opracowano więc nową metodę ekstrakcji TCs z próbek pasz leczniczych, umożliwiającą uzyskanie wyższych odzysków substancji czynnych z zastosowaniem chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Opracowane procedury zostały w pełni zwalidowane zgodnie z wymaganiami określonymi w Decyzji Komisji 2002/657/EC, spełniają kryteria analityczne i umożliwiają oznaczenie tetracyklin w paszach leczniczych oraz innych rodzajach pasz.

Układ pracy jest konwencjonalny i nie budzi zastrzeżeń.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 146 stron znormalizowanego tekstu, w którym zawarto wg zestawionego przez Autorkę wykazu piśmiennictwa aż

139 pozycji piśmiennictwa, w tym 2 pozycje z internetu. Spotkać jednak można drobne usterki, dotyczące wykazu cytowanych czasopism – albo należało przyjąć skróty (jak w większości prac) albo pełne nazwy czasopism, poz. 12, 32, 53, 57, 113, 116, przy czym w poz. 123 podano pełną nazwę czasopisma, a w poz. 124 już skrót tego samego czasopisma. W poz. 128 i 129 zabrakło dziennika ustaw (nr, poz.), w pozycji 114 roku publikacji, w pozycji 67 zabrakło strony końcowej pracy (powinno być 301-305), zaś w poz. 135 i 136 są tylko adresy stron internetowych i nie wiadomo czego one dotyczą. Ponadto przy zacytowaniu pozycji książkowej autorstwa prof. D. Jamroz (2013), zbędne jest już przywoływanie podręcznika z 1983 autorstwa prof. Z. Ruszczyca.

Podkreślając trafność sformułowania założeń i celu badań, zauważyć należy rzeczowe, bardzo staranne i wykonane z dużym nakładem pracy i osobistego zaangażowania badania analityczne. Zarówno szeroki profil badań jaki i duża liczba oznaczeń pozwoliły Autorce rozprawy na uchwycenie istotnych zależności dotyczących oznaczania tetracyklin w paszach. Tak duża ilość oznaczeń laboratoryjnych mogła być wykonana przez doktorantkę jedynie dzięki Jej pilności, zaangażowaniu i pracowitości oraz zapobiegliwości i staraniom Promotora oraz koleżeńskiej atmosferze pracy w Zakładzie Higieny Pasz tutejszego Instytutu.

Zgromadzone wyniki badań, omówione na tle dokonań innych autorów pozwoliły mgr inż. Ewelinie Patyrze na sformułowanie 8 uogólnień, wnoszących nowe i istotne informacje do aktualnego stanu wiedzy o wykrywaniu i oznaczaniu wybranych tetracyklin. Niektóre z nich zapewne zostaną przeredagowane, a nawet połączone (np. wnioski 1 i 2) przy przygotowywaniu publikacji w czasopismach naukowych. Wnioskiem sumującym badania jest stwierdzenie, że opracowana i zoptymalizowana metoda chromatograficzna z wykorzystaniem techniki LC-MS pozwala na wykrywanie i oznaczanie niskich stężeń tetracyklin w paszach innych niż pasze lecznicze.

Przedstawiona do oceny praca, obok szeregu oryginalnych i istotnych dla nauki i praktyki rezultatów, zaowocowała opracowaniem trzech projektów procedur badawczych do zastosowania w wykrywaniu tetracyklin w paszach, wykazanych w ocenianej dysertacji jako załączniki.

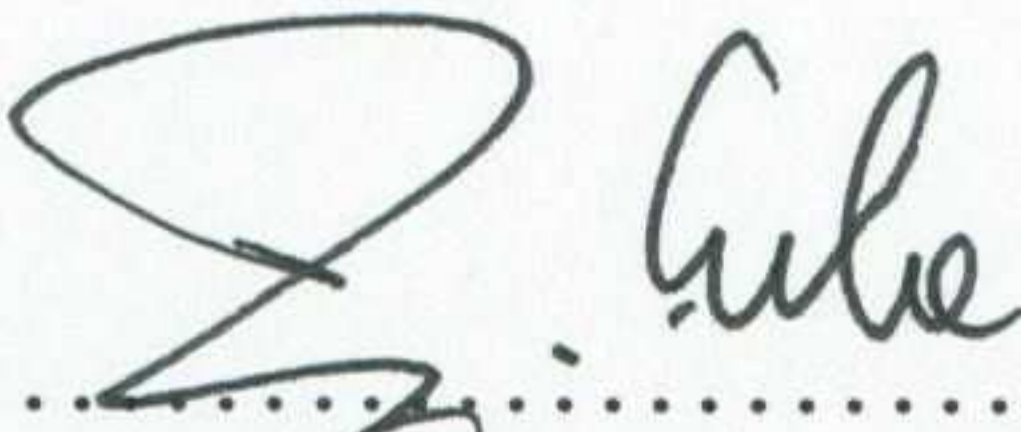
Z wielką satysfakcją pragnę też podkreślić, że treść pracy napisana jest dość starannie, zwarcie i utrzymana w logicznej sekwencji. Styl sformułowań poprawny, a tekst komunikatywny. Zauważyć też należy staranne opracowanie tabel i rycin oraz interesującą interpretację uzyskanych wyników badań własnych z danymi piśmiennictwa. Praca cechuje się aktualnością i aplikacyjnością podjętej problematyki badawczej, a dotyczy opracowania szybkiej i dokładnej metody oznaczania tetracyklin w materiałach i środkach żywienia zwierząt.

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr inż. Ewelinę Patyrę rozprawa, z uwagi na zaprezentowany poziom naukowy, aktualność problematyki i wartości poznawcze uzyskanych w badaniach wyników, ujęcie metodyczne i właściwy dobór metod analitycznych oraz oparcie wysuniętych wniosków na dość obszernym materiale eksperymentalnym, odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (ustawa z dnia 14.03.2003 o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki - Dz. U. nr 65, poz. 595, ze zmianami w Dz. U. z 2005 roku nr 164, poz. 1365).

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Eweliny Patyry do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy nagrodą dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach. Swoją propozycję uzasadniam oryginalnym opracowaniem trzech ważnych dla kontroli urzędowej procedur badawczych dotyczących oznaczania zawartości tetracyklin w paszach leczniczych techniką chromatografii cieczowej z detektorem diodowym, oznaczania zawartości tetracyklin w paszach leczniczych techniką chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas oraz wykrywania i oznaczania tetracyklin w paszach innych niż lecznicze techniką chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas.

Lublin, 27.02.2015 r.


.....
/Eugeniusz R. Grela/