

### RECENZJA

pracy doktorskiej Pana mgr inż. Mateusza Marczewskiego

p.t.: **Zastosowanie inhibitorów ureazy do redukcji emisji amoniaku z nawozu RSM®**

przygotowanej w ramach programu MNiSW „Doktorat wdrożeniowy”, umowa DWD/3/17/2019

na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej,

pod kierunkiem

prof. dr hab. Łukasza Berlickiego – promotora

dr Ewy Pankalli – promotora pomocniczego

Azot jest kluczowym składnikiem pokarmowym roślin, niezbędnym do uzyskania wysokich i jakościowych plonów. W warunkach glebowo-klimatycznych Polski pierwiastek ten jest czynnikiem w decydującym stopniu determinującym żyzność gleb. Z tego względu systematyczne monitorowanie nawożenia azotem znacząco wpływa na efektywność produkcji roślinnej. Jak wykazują dane statystyczne jednym z najbardziej rozpowszechnionych nawozów w naszym kraju i w świecie jest mocznik. Wraz z dynamicznym wzrostem liczby ludności rośnie zapotrzebowanie na żywność, co przekłada się na zwiększone użycie mocznika. Jednak jego stosowanie wiąże się między innymi z problemem emisji amoniaku. Jednym z możliwych rozwiązań jest zastosowanie inhibitorów ureazy. Dlatego intensywnie prowadzone badania zmierzają w kierunku tworzenia nowych inhibitorów, które mogłyby nie tylko redukować emisję amoniaku, ale także pozytywnie wpływać na plony wydłużając czas dostępności składników pokarmowych dla roślin, ograniczając koszty stosowania nawozów oraz liczbę wykonywanych zabiegów nawożenia.

Dążenie to znalazło praktyczne odzwierciedlenie w sformułowanym przez Pana mgr inż. Mateusza Marczewskiego celu badań stanowiącym podstawę recenzowanej pracy, który scharakteryzował jako opracowanie inhibitora ureazy, który łatwo miesza się z roztworem płynnego nawozu azotowego RSM®. W tym miejscu chciałam zaznaczyć, że praca **Zastosowanie inhibitorów ureazy do redukcji emisji amoniaku z nawozu RSM®** została przygotowana w ramach realizacji programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat Wdrożeniowy” we współpracy z Grupą Azoty Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. Wymagania w ramach realizacji takiego projektu koncentrują się na konieczności przedstawienia aplikacyjnego aspektu badań naukowych w odniesieniu do rozwoju produktów o potencjale rynkowego wdrożenia. W ramach realizacji niniejszej pracy Kandydat do stopnia doktora spełnił wszystkie z wymagań w zakresie otrzymania i prezentacji wyników badań naukowych jak i przedstawienie konkretnego wdrożenia w postaci opracowania



nowego inhibitora ureazy dla płynnego nawozu RSM32N®. Tematyka badawcza zaprezentowana w niniejszym opracowaniu wpisuje się w nurt poszukiwań innowacyjnych rozwiązań, których potrzebuje sektor rolno-spożywczy.

Zgodnie z przyjętymi zasadami przedstawiona do oceny dysertacja została przygotowana w postaci klasycznego układu obejmującego sto dziewięćdziesiąt trzy (193) ponumerowane strony, wliczając stronę tytułową i strony zawierające zwyczajowe w tego typu opracowaniach podziękowania. Praca składa się z sześciu zasadniczych części zatytułowanych: 1) Wstęp (64 strony), 2) Cel pracy (2 strony), 3) Wyniki i dyskusja (12 stron), 4) Badanie inhibicji ureazy (56 stron), 5) Podsumowanie (4 strony), 6) Część eksperymentalna (29 stron) oraz niezawarty w spisie treści wykaz cytowanej literatury. Literatura cytowana obejmuje 129 odnośników bezpośrednio związanych z tematyką dysertacji - ta część rozprawy została przygotowana bardzo starannie i zawiera jedynie nieliczne błędy edytorskie.

Pracę rozpoczyna streszczenie w języku polskim i języku angielskim, po których następuje spis treści oraz część literaturowa stanowiąca szczegółowy opis stanu wiedzy obejmujący charakterystykę ureazy, tzn. jej struktury, miejsca aktywnego, mechanizmu aktywności ureolitycznej, a także rolę tego enzymu w środowisku naturalnym. W kolejnych podrozdziałach, stanowiących najobszerniejszą część opracowania literaturowego, Autor szczegółowo przedstawił znane inhibitory ureazy. Znalazły się wśród nich zarówno związki wiążące się bezpośrednio z centrum aktywnym lub na zasadzie podobieństwa do substratu lub stanu przejściowego reakcji enzymatycznej, substancje nieposiadające podobieństwa do substratu i wiążące się z nim w sposób odmienny, jak również inhibitory, które otrzymano w wyniku testów przesiewowych dużej liczby substancji, głównie pochodzenia naturalnego. Ten fragment rozprawy został przygotowany w bardzo czytelny sposób i zawiera wiele cennych informacji, jednakże w relację wkładły się pewne nieścisłości, które przedstawiam poniżej i proszę Pana mgr inż. Mateusza Marczewskiego o zabranie głosu w dyskusji:

- **Str. 44, rozdział 1.10.14 Kwasy humusowe;** w moim przekonaniu, w Tabeli 16 podano przykłady pochodnych katechiny - związki polifenolowe – flawanole (flawan-3-ole), należące do rodziny flawonoidów i w moim przekonaniu powinny zostać włączone do rozdziału 1.10.18 Flawonoidy. Kwasy humusowe (huminowe i fulwowe) zasadniczo stanowią organiczną frakcję gleby, torfu i węgla, posiadają nieco odmienne struktury – proszę o weryfikację;
- **Str. 52, rozdział 1.10.20 Inne związki pochodzenia naturalnego;** w rozdziale tym Autor opisuje „kwercetynę” (poprawnie powinno być – kwercetynę), awikularynę, morynę (w Tabeli 25) – te substancje również należą do flawonoidów. Dlaczego zostały ujęte w odrębnym podrozdziale?

Kolejne podrozdziały przeglądu literatury Pan mgr inż. Mateusz Marczewski poświęcił na bardzo przejrzysty opis produkcyjnych i środowiskowych aspektów nawożenia azotem. Krótco scharakteryzował mocznik, trójskładnikowe płynne nawozy azotowe, nawozowe mieszaniny płynów oraz wysokoskoncentrowany nawóz azotowy RSM32N®, stosowany przez Niego w doświadczalnej części niniejszego opracowania. Część literaturową wieńczy rozdział, w którym Autor zawarł wymagania prawne dotyczące produkcji i zasad stosowania nawozów sztucznych oraz szeroko pojętych



aspektów środowiskowych z tym związanych. Stosowanie mocznika z inhibitorem ureazy realizuje wymagania określone w przepisach unijnej dyrektywy w sprawie redukcji emisji niektórych rodzajów zanieczyszczeń atmosferycznych oraz wspiera realizację dyrektywy azotanowej. Przedsiębiorstwa produkujące nawozy wprowadzają do swojej oferty nawozy dostosowane do określonych wymogów, lecz dodatkowe obciążenie przekłada się na wzrost cen nawozów azotowych. Zagadnienia, które porusza Pan mgr inż. Mateusz Marczewski w interesujący sposób obrazują te istotne, praktyczne problemy, z którymi mierzą się producenci nawozów i dodatkowo podkreślają zasadność wyboru tematyki niniejszej rozprawy.

Badania własne otwiera rozdział definiujący cel pracy oraz szczegółowe problemy badawcze, których rozwiązanie stanowi zakres dysertacji Pana mgr inż. Marczewskiego. Kolejna część pracy obejmuje dwa zasadnicze fragmenty poświęcone głównym wątkom badawczym stanowiącym podstawę dysertacji.

Pierwszym zadaniem, z którym zmierzył się Doktorant, w moim przekonaniu jednych z kluczowych, było zaprojektowanie i konstrukcja układu pomiarowego oraz ustalenie warunków prowadzenia eksperymentu, a także walidacja pomiaru amoniaku wydzielanego z badanych próbek. Badania te zwieńczone zostały zleceniem wykonania sześciokomorowego układu badawczego, który używany był w kolejnych etapach realizacji projektu. Następnie Pan mgr inż. Marczewski zoptymalizował możliwość oznaczenia NBPT (triamid kwasu N-(n-butyl)tiolofoforowego) stosując początkowo chromatografię jonową, docelowo zaś analizator oznaczania amoniaku z wstrzykiwaną analizą przepływową (FIA).

Używając opracowanego zestawu badawczego, kolejne etapy działań Pan mgr inż. Mateusz Marczewski skoncentrował na testowaniu dużej liczby substancji (35) należących do zróżnicowanych strukturalnie grup chemicznych, opisanych w literaturze jako inhibitory ureazy. Badania te realizował w odniesieniu do próby ślepej oraz roztworu NBPT. Wśród testowanych substancji znalazły się m. in.: związki organiczne, nieorganiczne, sole metali ciężkich oraz formułacje zawierające NBPT komponowane dla GAZAK S.A. Prowadząc testy o tym charakterze Doktorant zwracał szczególną uwagę na ocenę efektu inhibicji, a także aspekty ekonomiczne przekładające się na użyteczność sprawdzanych substancji.

Mimo, iż przeprowadzenie pracochłonnych testów za pomocą komór układu badawczego, a następnie analiza otrzymanych rezultatów nie pozwoliły na wyselekcjonowanie z testowanej grupy związków optymalnego inhibitora ureazy, to zbiór otrzymanych danych stanowi istotne naukowo źródło informacji, a ich precyzyjna interpretacja w pełni uzasadnia wybór przez Autora kolejnego etapu eksperymentu - syntezę fosforoamidów. Zaprojektowanie syntezy tej grupy związków, to kolejne, istotne zadanie, kamień milowy, którego podjął się Doktorant, a które po wielu próbach zwieńczone zostało otrzymaniem zestawu siedmiu nowych związków z grupy fosforoamidów (oznaczonych symbolami a-g). Ta część prac wymagała od mgr inż. Mateusza Marczewskiego dużego nakładu pracy. Wszystkie otrzymane na drodze syntezy produkty poddane zostały w pierwszej kolejności analizie spektroskopii mas (MS), a następnie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), której wyniki wskazały na konieczność przeprowadzenia wieloetapowej procedury oczyszczania weryfikowanej każdorazowo poprzez ponowną analizę HPLC. Pan mgr inż. Marczewski opracował protokół oczyszczania pozyskiwanych produktów. Otrzymane na drodze syntezy związki (a-g) o różnej czystości



poddano ocenie w komorach układu badawczego wobec próby ślepej, którą stanowił czysty nawóz RSM32N® i w obecności tego samego nawozu z dodatkiem trzech różnych stężeń NBPT. W konsekwencji analiza otrzymanych wyników wykazała ograniczenia w zastosowaniu większości otrzymanych substancji jako potencjalnych inhibitorów ureazy. Na jej podstawie Doktorant do finalnych testów wytypował związek oznaczony symbolem **c - triamid N-(3,4-dichlorofenyl)fosforowy**, który spełnił wymagania prawne stawiane inhibitorom ureazy. W trakcie kolejnych badań Pan mgr inż. Mateusz Marczewski sprawdził rozpad nowego inhibitora w roztworze nawozu azotowego RSM32N® zarówno bez, jak i w obecności gleby. Wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że nowo zsyntezowany związek c - nowy inhibitor ureazy łatwiej rozpuszcza się w roztworze nawozu RSM32N®, a także wolniej ulega rozpadowi niż standardowo stosowany inhibitor NBPT.

Ostatnią i niezwykle istotną ze względów użytkowych częścią badań realizowanych w ramach doktoratu było sprawdzenie wpływu dodatku związku c jako inhibitora ureazy w roztworze nawozu azotowego RSM32N® na kondycję roślin uprawnych: marchwi, pietruszki i rzodkiewki. Doktorant przeprowadził zarówno testy oceny siły wigoru kiełkowania (w krystalizatorach) oraz testy rozwoju roślin w komorze fitotronowej, uprawa roślin w glebie. Otrzymane rezultaty nie wykazały negatywnego wpływu na rozwój roślin testowych. Zaobserwowano natomiast zwiększenie wzrostu części nadziemnej i biomasy systemu korzeniowego tych roślin. Zastosowanie nowego inhibitora wpłynęło zatem stymulująco na wzrost i rozwój użytych w testach roślin.

Naturalną kontynuacją testów laboratoryjnych była ocena użyteczności nowo otrzymanego inhibitora w warunkach polowych, którą przeprowadzono z podmiotem zewnętrznym. Próby wykonane dla pszenicy jarej i kukurydzy również nie wykazały negatywnego wpływu zastosowanego nowego inhibitora ureazy jako dodatku do roztworu płynnego nawozu.

Tę część rozprawy doktorskiej kończy zwięzłe *Podsumowanie* potwierdzające osiągnięcia uzyskane podczas realizacji kolejnych zadań pracy doktorskiej.

Ostatnią częścią przedłożonej do recenzji dysertacji jest obszerny i szczegółowy opis metodologii zastosowanej podczas każdego etapu pracy, w której na uwagę zasługuje przemyślana i logiczna sekwencja działań. Kompozycja rozdziału *Część eksperymentalna*, zawierająca wyniki wszystkich pomiarów, jest klarownym uzupełnieniem rezultatów zaprezentowanych w poprzednich rozdziałach i spina w całość tok badań. Pomocne w śledzeniu dużego zbioru różnorodnych wyników okazały się odpowiednie schematy i tabele. Jednakże chciałabym zwrócić uwagę na kilka elementów metodyki, które moim zdaniem wymagają korekty lub wyjaśnienia i proszę Pana mgr inż. Mateusza Marczewskiego o komentarz:

- **Str. 151, podrozdział 6.2 Badanie uwalniania amoniaku**, Autor podaje szczegółową procedurę pomiaru uwalnianego z próby nawozu azotowego amoniaku. W pierwszym kroku opisuje „dokładne uśrednienie gleby”. Proszę o wyjaśnienie, jak przeprowadzono dokładne uśrednienie, czy stosowano np. sita glebowe? Czy sprawdzano właściwości gleby: strukturę, zawartość substancji organicznej, kationową pojemności wymienną, zawartość wody, pH) Jakiego typu gleby używano w tej części badań?



- **Str. 174-175, podrozdział 6.8.1 Badanie siły wigoru kiełkowania**, wigor nasion oceniano w oparciu o test wzrostowy siewek (długość kielka, długość korzenia) i suchą masę. Proszę o podanie informacji jaka liczba nasion/kryształizator została wysiana (jedynie z fotografii mogę wnioskować, że wysiewano 16 nasion/kryształizator?); jaka była liczba powtórzeń?
- **Czy dokonano analizy statystycznej otrzymanych rezultatów? Jeśli tak, jakie testy zastosowano? Takich informacji nie znalazłam.**

Ponieważ do obowiązków Recenzenta należy także ocena rozprawy pod kątem spójności i jakości edycji treści, podsumowując chciałam dodać, że dysertacja została napisana dość poprawnym językiem. W trakcie edycji tekstu, Autor nie uniknął błędów językowych (literówek) i gramatycznych. Poniżej wymieniam kilka tego rodzaju nieznaczących uchybień, które zwróciły moją uwagę:

- „*Allicyna [...] występuje u cebuli, czosnku i niektórych innych roślin.*” (str. 43) – wołałabym – w tkankach cebuli, czosnku itd.;
- Str. 84, w komentarzu wkradł się błąd w numeracji wykresów;
- Zdecydowanie proszę o używanie zwrotu *spektroskopia mas*, zamiast „*spektroskopia masowa*” (np. str. 106, 107); *masowy* (słownik języka polskiego pod red. W. Doroszewskiego) – «obejmujący dużą liczbę ludzi, zwierząt lub rzeczy» «przeznaczony dla dużej liczby ludzi»;
- „*otrzymane związki potwierdzano za pomocą analizy [...]*”, rekomenduję używanie zwrotu *struktury otrzymanych związków potwierdzano za pomocą itd.*;
- Na końcu zdania numer przypisu w nawiasie kwadratowym umieszcza zawsze się przed kropką kończącą zdanie.

Pragnę zaznaczyć, że błędy te nie wpływają **na moją jednoznacznie pozytywną ocenę** rozprawy, a zawarte w recenzji uwagi mają charakter formalny lub polemiczny.

**Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Autor zrealizował zaplanowane etapy badań naukowych oraz uzyskał rezultaty, dzięki którym osiągnął postawione sobie cele badawcze.** Recenzowaną rozprawę wyróżnia ważna, użyteczna, ciekawa i spójna tematyka badawcza, a uzyskane przez Doktoranta wyniki są oryginalne i wartościowe.

W przypadku doktoratu wdrożeniowego miarą aplikacyjną wartości przedstawionej do recenzji pracy jest fakt, że rezultaty badań przeprowadzone w jej ramach zostały wdrożone na rynek. Podkreślić należy, że Pan mgr inż. Mateusz Marczewski jest współautorem wniosku o ochronę patentową, który został złożony do Urzędu Patentowego RP w dniu 20 sierpnia 2024 roku.

Dodatkowo, jak wynika z przeprowadzonej przeze mnie analizy Dorobku naukowego PWR zdeponowanego w bazie DONA, Pan mgr inż. Mateusz Marczewski jest współautorem artykułu naukowego w czasopiśmie *Przemysł Chemiczny* oraz dwóch streszczeń i dwóch monografii pokonferencyjnych.

Uznając walory merytoryczne ocenianej dysertacji, jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim oraz dorobek wdrożeniowy stwierdzam, że w moim



przekonaniu niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 187 ust.1-2 z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2023r. poz. 742 z późn. zm.) Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej, o dopuszczenie Pana mgr inż. Mateusza Marczewskiego do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

*Krzysztof Jmiec-Miński*

