



Dr hab. inż. Witold Gładkowski, prof. UPWr  
Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 19.12.2024

### Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Mateusza Marczewskiego pt. "*Zastosowanie inhibitorów ureazy do redukcji emisji amoniaku z nawozu RSM®*" powstałej w ramach programu „Doktorat Wdrożeniowy”.

Podstawą formalną opracowania recenzji była uchwała nr 42/02/RDND10/2024-2028.2024.TZZ podjęta przez Radę Naukową Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej w dniu 16.10.2024 roku. Oceny dokonano zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.)

### Znaczenie tematyki pracy

Przedłożona do recenzji praca doktorska mieści się w nurcie chemii zwanym agrochemią, dotyczy bowiem opracowania nowego inhibitora ureazy jako składnika skoncentrowanego płynnego nawozu o nazwie handlowej RSM®. Bezpośrednią inspiracją do podjęcia badań był nałożony od 1 sierpnia 2021 roku w ustawie o nawozach i nawożeniu obowiązek stosowania inhibitorów ureazy jako dodatków do nawozów zawierających mocznik. Zasadniczą wadą mocznika jako nawozu są wysokie straty azotu zawartego w nawozie po jego zetknięciu z glebą, spowodowane jego szybką hydrolizą katalizowaną przez enzymy z grupy ureaz, w wyniku której powstaje kwas węglowy oraz amoniak. Dodanie do nawozu inhibitora ureazy spowalnia hydrolizę mocznika, przez co dostępność azotu dla roślin wzrasta z 6-8 tygodni do ok. 8-16 tygodni. Zwiększa to efektywność ekonomiczną stosowania nawozów mocznikowych i ma korzystny wpływ na środowisko, ograniczając emisję amoniaku i jego negatywne oddziaływanie na wzrost roślin. Badania mające na celu opracowanie nowego inhibitora ureazy wpisują się zatem w szerszy kontekst ochrony środowiska i zrównoważonego rozwoju gospodarki



nawozowej. W tym świetle temat pracy doktorskiej, realizowanej w ramach programu „Doktorat Wdrożeniowy” we współpracy między Politechniką Wrocławską a Grupą Azotową Zakłady Azotowe Kędzierzyn S.A. uważam za w pełni uzasadniony.

### Ocena części formalnej

Recenzowana rozprawa ma formę monograficzną. Składa się ze 193 stron, zawiera 80 tabel i 96 rysunków w formie wykresów, schematów i fotografii. Podzielona została na 6 głównych rozdziałów: 1) Wstęp 2) Cel pracy 3) Wyniki i dyskusja 4) Badania inhibicji ureazy, 5) Podsumowanie oraz 6) Część eksperymentalna. Całość poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim i zakończona spisem cytowanej literatury, choć oba te fragmenty nie zostały ujęte w spisie treści monografii. Rozdział „Badania inhibicji ureazy” należało włączyć do rozdziału „Wyniki i dyskusja”, gdyż stanowi jego integralną część. W pracy zacytowanych zostało 129 pozycji literaturowych, w zdecydowanej większości anglojęzycznych. Praca napisana jest językiem generalnie poprawnym, zawiera jednak wiele błędów stylistycznych, nieprecyzyjności i tzw. „literówek”, co utrudnia jej lekturę. Niektóre literówki zmieniają też znaczenie stosowanych pojęć np. wyrażenie „Chromatograf” zamiast „Chromatogram” w podpisach pod rysunkami 51 i 52 czy „kolorymetr” zamiast „kalorymetr” przy opisie pomiaru temperatury topnienia otrzymanego inhibitora na stronie 121.

### Ocena części merytorycznej

Zagadnienia omówione w części wstępnej Autor podzielił na kilka części. W pierwszej z nich omówiona została szczegółowo budowa, rola i mechanizm działania ureaz różnego pochodzenia. Autor wykazał się dużą wiedzą w tym zakresie, choć przydałoby się więcej rysunków ilustrujących opisy trójwymiarowych struktur enzymów różnego pochodzenia. Należałoby również podać źródła, z których skorzystano zamieszczając rysunki 1 i 2, ilustrujące budowę przedstawionych na nich ureaz. Tytuł podrozdziału 1.6 „Proces hydrolizy mocznika” jest mylący, ponieważ treść tego fragmentu dotyczy budowy enzymu, a hydroliza mocznika omówiona została w następnym podrozdziale 1.7



Druga część wstępu dotyczy przeglądu znanych w literaturze naukowej związków chemicznych jako inhibitorów ureaz. Jest to bardzo obszerne zestawienie, Autor przedstawia omawiane połączenia w tabelach wraz z podaniem parametrów określających ich aktywność takich jak  $IC_{50}$  czy  $K_i$ , jednak w charakterystyce poszczególnych grup związków wkraść się chaos. Jako przykłady kwasów humusowych Autor podaje związki należące do grupy flawonoli (katechin) będące składnikami ekstraktów z zielonej herbaty, co opisuje cytowana publikacja nr 45. W związku z tym mam pytanie czy faktycznie Autor znalazł w literaturze informacje o inhibicji ureazy przez kwasy humusowe? Omawiając kolejne grupy związków Autor rozdzielił flawonoidy od chalkonów, podczas gdy te ostatnie też należą do flawonoidów. Ponadto w podrozdziale „Inne związki pochodzenia naturalnego” umieścił Tabelę 25 zatytułowaną „Flawonoidy pochodzenia naturalnego jako inhibitory ureazy”. Nie wiąże się ona z treścią podrozdziału, w którym omówiono aktywność kwercetyny (omyłkowo nazwaną kwerecytyną) oraz awikularyny, podczas gdy Tabela 25 zawiera morynę i kwas chloregenowy, zaliczany nawiasem mówiąc nie do flawonoidów, tylko kwasów fenolowych. Autor myli też poszczególne grupy flawonoidów; kwercetyna oraz moryna należy bowiem do flawonoli (a nie flawanoli), więc we wzorze tej drugiej brakuje podwójnego wiązania w pierścieniu C. Trudno też pochodne kumaryny opisane w Tabeli 26 uznać za związki naturalne. Brak jest komentarza dotyczącego związków z tabeli 10, na pewno nie są to „długołańcuchowe pochodne acylotiomocznika”, co sugerowałby fragment tekstu tuż nad tabelą. Z całą pewnością też atenolol nie jest pochodną tiomocznika. Generalnie, szkoda że w pracy nie ma odnośników do poszczególnych tabel i że nie zostało podane wobec jakich ureaz testowane były omawiane inhibitory.

W trzeciej części wstępu omówione zostały różne aspekty związane ze stosowaniem nawozów w rolnictwie, fizjologiczne znaczenie azotu dla roślin, charakterystyka nawozów azotowych oraz przytoczone zostały akty prawne związane ze stosowaniem nawozów azotowych, w tym mocznika. Scharakteryzowano również m.in. nawóz RSM32® będący nawozem płynnym zawierającym w swoim składzie mocznik i azotan(V) amonu czyli saletrę. Zawartość azotu w tym nawozie wynosi 32% przy czym 16% to azot pochodzący z mocznika, a po 8% stanowi azot amonowy oraz azotanowy. Ponadto z lektury tej części wstępu dowiadujemy się, iż jednym ze sposobów ograniczenia emisji amoniaku z nawozów mocznikowych jest



stosowanie jako inhibitorów ureazy związków z grupy fosfortriamidów, przede wszystkim triamidu kwasu *N*-(*n*-butylo)tiofosforowego (NBPT) i jego analogu z łańcuchem propylowym (NPPT). Na rynku znany jest już preparat mocznika w formie granulowanej o nazwie PULREA + INu zawierający dodatek mieszaniny tych dwóch inhibitorów ureazy (NBPT/NPPT). Z uwagi na słabą rozpuszczalność tych związków w roztworach wodnych, problematyczne jest ich komercyjne zastosowanie jako dodatków do płynnego nawozu RSM32N®.

Autor za cel pracy przyjął zatem opracowanie nowego inhibitora ureazy, dobrze rozpuszczalnego w wyżej wymienionym nawozie i spełniającego wymogi ustawowe stawiane inhibitorom ureaz, w szczególności utrzymywanie przez 14 dni aktywności inhibującej na poziomie 20% spadku szybkości hydrolizy mocznika w stosunku do próby kontrolnej bez dodatku inhibitora. Poza tym opracowany związek nie powinien oddziaływać niekorzystnie na wzrost i rozwój roślin, a jego produkcja powinna być ekonomicznie opłacalna.

Realizacja celu pracy opisana została w kolejnych rozdziałach, łącznie z częścią eksperymentalną. Ocenę przydatności testowanych związków i formulacji jako inhibitorów ureazy autor przeprowadził w sposób pośredni, poprzez pomiar ilości amoniaku wydzielanego z próbki gleby z dodatkiem nawozu płynnego RSM32N® oraz testowanego związku, z zastosowaniem skonstruowanego przez siebie układu pomiarowego składającego się z komponentów pomiarowych: rotametrów, pomp laboratoryjnych oraz płuczek. Wydzielony amoniak adsorbowany był w 0,5 molowym roztworze kwasu siarkowego (VI). Ilość wydzielonego nawozu amoniaku mierzono poprzez oznaczenie jonu amonowego, początkowo za pomocą spektrofotometryczną, a następnie za pomocą analizatora amoniaku J-TASTAR™ 5000 z zastosowaniem wszykowej analizy przepływowej. Aktywność badanego związku jako inhibitora ureazy skutkowałą obniżoną w stosunku do próby kontrolnej bez dodatku tego związku ilością wydzielonego amoniaku. Wynik podano w % w stosunku do ilości amoniaku wydzielonego w próbie kontrolnej.

Skonstruowany zestaw pomiarowy przetestowano z użyciem komercyjnie dostępnego inhibitora ureazy czyli NBPT, a następnie przystąpiono do właściwych badań. Ich pierwszy etap polegał na ocenie aktywności szeregu związków o potwierdzonych w literaturze właściwościach hamowania ureazy lub stosowanych jako pestycydy lub herbicydy. Były to sole metali ciężkich



(cynku i miedzi), inne sole nieorganiczne (fluorek sodu, nadmanganian potasu, tiosiarczan amonu, siarczan sodu, chlorek wapnia, siarczan glinu, wodorofosforan i diwodorofosforan potasu oraz niespodziewany w tej grupie kwas borowy) oraz szereg związków organicznych (acetylenodikarboksylan dipotasu, hydrochinon, kwas acetohydroksamowy,  $\beta$ -merkaptioetanol, tiomocznik i szereg innych, w sumie 15 związków). Autor testował również trzy formuacje

pracowane w Centrum Badań i Rozwoju Grupy Azoty Chorzów, oparte na roztworach komercyjnego inhibitora ureazy NBPI w rozpuszczalnikach organicznych, najczęściej pochodnych glikolu.

Z różnych powodów testowane związki okazały się nieodpowiednie do zastosowania jako składniki nawozu RSM32N®. W obecności niektórych z nich w zastosowanych warunkach obserwowano zwiększone wydzielanie się amoniaku. Inne wykazywały inhibicję enzymu jedynie w początkowych dwóch dniach eksperymentu. Kolejna grupa wykazała niestabilność aktywności inhibującej, która w czasie 8 dni prowadzenia eksperymentów podlegała dużym wahaniom w zależności od zastosowanego stężenia. Z kolei w przypadku mieszaniny polifosforanu amonu i tiosiarczanu amonu inhibicja ureazy zachodzi jedynie przy dużych stężeniach tych związków, co wyklucza ich opłacalność w produkcji przemysłowej.

Zastosowane formuacje komercyjnego inhibitora ureazy NBPI w rozpuszczalnikach organicznych z uwagi na ich słabą rozpuszczalność w nawozie powodowały tworzenie się dwóch niemieszających się warstw.

Do tej części badań mam następujące pytania i uwagi:

1. Dlaczego zdaniem Autora pod wpływem wielu przebadanych związków następuje wyraźny wzrost wydzielania amoniaku w porównaniu z próbą kontrolną?
2. Dlaczego w ogóle Autor testował takie związki jak benzochinon, guanylotiomocznik, ditiotreitrol czy dazomet, skoro sam określił je jako szkodliwe dla środowiska i bardzo toksyczne dla organizmów żywych?
3. Skąd wg Autora pochodził kation sodowy, którego obecność na chromatogramie HPLC zakłóciła pomiar stężenia jonów amonowych?



4. W podrozdziale 6.3 Autor tytułuje tabele 59 i 60 jako krzywe kalibracyjne; chciałbym też zauważyć, że bufor fosforanowy nie mógł składać się tylko z diwodorofosforanu sodu, a jon amonowy ma wzór  $\text{NH}_4^+$  a nie  $\text{NH}_4$ .
5. Jakie było kryterium doboru stężeń testowanych związków? Były to różne zakresy dla różnych związków.
6. Przy charakterystyce urotropiny Autor wspomina o migdalanie metenaminy, jaki to ma związek z testowanym związkiem?
7. Nie spotkałem się wcześniej z umieszczaniem wyników tabelarycznych w rozdziale „Część eksperymentalna” i omawianiem tylko wycinków tych tabel w rozdziale „Wyniki i dyskusja”. W znacznym stopniu utrudnia to ich interpretację.

W kolejnej części pracy Autor postanowił otrzymać w wyniku syntezy chemicznej inhibitor ureazy, który spełniałby wymagania konieczne do zastosowania jako składnik płynnego nawozu azotowego. Wybór padł na związki z grupy fosforoamidów, a więc tą, do której należą dotychczas stosowane komercyjnie inhibitory ureaz. Synteza obejmowała reakcję chlorku fosforylu z odpowiednią aniliną podstawioną przy pierścieniu aromatycznym atomem\atomami chloru lub jodu (a w przypadku związku **b** chloramina), a następnie uzyskanie końcowego fosfortriamidu w reakcji uzyskanego produktu pośredniego z amoniakiem. W wyniku dwuetapowej syntezy Autor otrzymał 7 związków o bardzo różnym stopniu czystości, od 66,9% do 97,2% z wydajnością od 11,8% do 31,4%. ~~W większą aktywność utrzymującą się przez 14~~

~~eksperymentu wykazał związek c czyli triamid N-(3,4-dichlorofenyl)fosforowy o czystości~~

~~W~~ Lektura tej części pracy nasuwa następujące pytania:

1. Czy uzyskane związki o wysokiej czystości (związki **c** i **d**) zostały poddane analizie spektroskopowej w zakresie NMR? Wspomniano, że oznaczono ich masy cząsteczkowe metodą spektroskopii masowej, ale oprócz jednego chromatogramu masowego z mieszaniny reakcyjnej brak jest wyników tych analiz.
2. Nie widzę uzasadnienia zamieszczenia w tekście rozprawy mało czytelnych chromatogramów HPLC dla surowych mieszanin reakcyjnych, o bardzo niskim stopniu czystości.



3. Jaka jest budowa i jak powstaje dimer fosforoamidu **c**, o którym wspomina Autor w procedurze jego syntezy na str. 169?
4. Proszę o weryfikację, czy na pewno prawidłowy jest wzór powstałego związku **f** – jeżeli tak, to dlaczego w tym przypadku nie uzyskano fosfortriamidu?
5. Nie rozumiem, dlaczego Autor testował związek **d** o czystości 82%, a nie ten sam o czystości 97,2%? Z kolei związek **c** testowany był trzykrotnie, za każdym razem Autor badał związek o innym stopniu czystości. W tabeli 78 znalazł się związek **h** o czystości 51%, nie znalazłem jego wzoru ani nazwy w żadnym innym miejscu opracowania.
6. W tabeli 47 powielono wyniki dla stężenia związku **c** 12mM z Tabeli 46. Ponadto w Tabeli 47 wyniki dla związku **d** nie zgadzają się z tymi zawartymi w Tabeli 74.
7. Autor niepotrzebnie duplikuje część wyników, podając je w dwóch Tabelach (w części wynikowej oraz eksperymentalnej).

Wg Recenzenta bardzo dyskusyjne jest testowanie na aktywność biologiczną związków o niskiej czystości, zwłaszcza, gdy nie jest dokładnie znany skład tych zanieczyszczeń. Zresztą Autor sam przyznaje, że właśnie te związki spośród otrzymanych w trakcie syntezy, które miały najniższą czystość, zachowywały się niestabilnie podczas prowadzonych testów.

Autor ubiega się o stopień naukowy doktora nauk chemicznych, w związku z tym konieczna jest korekta opisu syntezy a zwłaszcza oczyszczania fosforoamidów. Podrozdział 4.7.1.2 „Proces oczyszczania fosforoamidów” jest w istocie napisanym mało zrozumiałym językiem opisem wydzielenia produktu z mieszaniny poreakcyjnej metodą ekstrakcji. Proszę o skorygowanie tego opisu, najlepiej z wykorzystaniem schematu blokowego pokazującego, w której fazie na każdym etapie znajdował się oczyszczany produkt, a w której zanieczyszczenia oraz jakie dokładnie rozpuszczalniki zostały zastosowane w tym procesie. Za właściwą metodę oczyszczenia uznać należy przepłukiwanie roztworu produktu gazowym amoniakiem w płuczce Drechslera. Proszę o wyjaśnienie, jaka jest idea tej metody i dlaczego procedura ta przyniosła efekt tylko w dwóch przypadkach syntez? Znacznie lepszy opis syntezy znajduje się w części eksperymentalnej w pkt 6.4, jednak stwierdzenie Autora, że „stosunek molowy reagentów to 1 mol chlorku fosforylu na 4 mole wybranej aminy dla sumarycznej objętości reagentów wynoszącej 100 ml acetonitrylu” jest nie do obrony.



Ostatecznie do dalszych badań Autor wybrał wspomniany wcześniej fosfortriamid **c**, o czystości 95%, temperaturze topnienia 200,4 °C i rozpuszczalności w wodzie na poziomie 8,3 g/l. W kolejnym etapie Autor porównał stabilność uzyskanego związku w odniesieniu do stabilności komercyjnego inhibitora NBPT. Badanie porównawcze stabilności obu związków zarówno w roztworze nawozu RSM32N®, jak i w roztworze tego nawozu z dodatkiem gleby wykazały, że proponowany jako nowy inhibitor fosforoamid **c** wykazuje większą stabilność, a jego zawartość po 8 dniach eksperymentu maleje odpowiednio o 1,2% i 10,4%, przy wartościach 5,6% i 12,5% obserwowanych dla związku NBPT.

Ostatni etap badań w ramach recenzowanej pracy obejmował określenie oddziaływania inhibitora na rośliny uprawne. Zbadana została siła wigoru nasion, rozwój roślin w warunkach kontrolowanych z zastosowaniem fitotronu, przeprowadzono również badania polowe. Wyniki wszystkich tych badań potwierdziły bezpieczeństwo stosowania otrzymanego związku względem roślin uprawnych. W badaniach siły wigoru stwierdzono znaczący wzrost długości kielków i korzeni pietruszki, marchwi oraz rzodkiewki hodowanych w obecności inhibitora. Podobnie w badaniach w komorze fitotronu zaobserwowano stymulujący wpływ otrzymanego inhibitora ureazy na rozwój roślin, objawiający się wzrostem suchej masy bulwy rzodkiewki, korzenia marchwi i korzenia pietruszki w porównaniu z próbami kontrolnymi. W badaniach polowych przeprowadzonych bez okresu plonowania dla pszenicy jarej i kukurydzy badano wigor wschodu, suchą masę siewek, wskaźniki wegetacyjne a także zawartość chlorofilu i parametry jego fluorescencji. W badaniach tych nie wykazano negatywnego wpływu inhibitora na rozwój rośliny. Szkoda, że Autor nie zdefiniował poszczególnych parametrów w Tabelach 51-54 i 57-58. Nie zostało też podane, w jakich jednostkach oznaczono zawartość chlorofilu.

W wyniku przeprowadzonych w ramach doktoratu wdrożeniowego badań Autor otrzymał nowy inhibitor ureazy utrzymujący pożądaną aktywność przez 14 dni, o prawie dwukrotnie większej rozpuszczalności w wodzie niż komercyjnie stosowany NBPT i bardzo dobrej rozpuszczalności w roztworze nawozu RSM32N®. Działanie inhibitujące preparatu zostało potwierdzone dla wymaganego przez Ustawodawcę poziomu inhibicji przy stężeniu 12 mM. Nie wykazano również negatywnego wpływu na rozwój roślin uprawnych, a w niektórych przypadkach stwierdzono wręcz efekt stymulujący. Za cenne osiągnięcie Doktoranta uważam też





skonstruowanie układu pomiarowego pozwalającego na określenie stopnia wydzielania amoniaku z roztworu mocznika a tym samym ocenę aktywności badanych związków jako inhibitorów ureaz.

Doktorat wdrożeniowy, jak sama nazwa wskazuje, ma na celu wdrożenie do praktyki przemysłowej opracowanego rozwiązania problemu naukowego. Szkoda, że Autor nie podał numeru i tytułu zgłoszenia patentowego z 20 sierpnia 2024 rok dotyczącego ochrony prawnej otrzymanego związku. W związku z tą informacją a także wzmianką o wdrożeniu zamieszczoną na str. 149 chciałbym się zapytać, jak blisko (lub daleko) zdaniem Autora jesteśmy od pełnego wdrożenia tego związku do produkcji. Pod uwagę należy bowiem wziąć:

1. Toksyczność uzyskanego związku względem człowieka – czy były przeprowadzone jakiegokolwiek testy?
2. Dopuszczalny przez ustawodawcę dodatek inhibitora do nawozu płynnego.
3. Opłacalność produkcji wielkotonażowej w kontekście uzyskanej wydajności syntezy (niespełna 30%).
4. Zapotrzebowanie zakładu na opracowany inhibitor ureazy w skali np. rocznej - czy Doktorant przeprowadził syntezę w większej skali?
5. Inne kwestie, które Doktorant uważa za istotne w kontekście planowanego wdrożenia.

### Podsumowanie

Stwierdzam, że praca mgr inż. Mateusza Marczewskiego pt. „Zastosowanie inhibitorów ureazy do redukcji emisji amoniaku z nawozu RSM®” prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki chemiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stanowi również oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania w przemyśle nawozów sztucznych wyników własnych badań nad otrzymywaniem inhibitorów ureazy. Pomimo zauważonych podczas lektury pracy błędów i wszelkich uwag krytycznych spełnia ona zatem podstawowe wymogi określone w art. 187 ustawy z 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i może być podstawą do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk chemicznych. W związku z tym wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie będącej

