

Puławy, dn. 18.02.2024 r.

dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG-PIB

Zakład Mikrobiologii Rolniczej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Matczuk pt.

„Izolacja inhibitorów urolizy z materiału roślinnego i/lub zwierzęcego lub produktów ich przetwarzania”

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Dominiki Matczuk została wykonana w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie. Promotorem rozprawy doktorskiej była dr hab. Anna Siczek oraz mgr Tomasz Martyniuk jako opiekun pomocniczy. Recenzję rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Matczuk przygotowano na prośbę Dyrektora Instytutu Agrofizyki PAN, Pana prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego, czł. koresp. PAN, po wcześniejszym wyborze Rady Naukowej Instytutu (Uchwała nr 96/2023 z dnia 11 września 2023 r.).

1. Uwagi ogólne i znaczenie podjętej tematyki badań.

Problematyka omawianej rozprawy doktorskiej dotyczy bardzo ważnej oraz aktualnej tematyki wynikającej z potrzeb rolnictwa a dotyczącej ograniczenia emisji amoniaku z gleb nawożonych mocznikiem. Zgodnie z Rozporządzeniem NEC – Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2016/2284 z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie redukcji krajowych emisji niektórych rodzajów zanieczyszczeń atmosferycznych nastąpiła zmiana dyrektywy 2003/35/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 26 maja 2003 r. przy jednoczesnym uchyleniu dyrektywy 2001/81/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2001 r., co doprowadziło do ograniczenia możliwości stosowania na terenie Unii Europejskiej zarówno mocznika, jak i nawozów na nim opartych. Ma to oczywiście związek ze zmniejszeniem poziomu emisji towarzyszących stosowaniu wspomnianych nawozów do poziomu akceptowalnego w Rozporządzeniu NEC. Dotyczy to zarówno zastosowania syntetycznych jak i naturalnych inhibitorów ureazy. Z jednej strony

zagadnienie ograniczenia emisji amoniaku do atmosfery jest bardzo ważne ze względu na ochronę środowiska ale stanowi również duży problem dla rolnictwa, gdzie podstawowym nawozem stosowanym uprawie wielu roślin jest właśnie mocznik.

W glebach żyznych, o wysokiej aktywności biologicznej, dużej liczebności i bioróżnorodności mikrobiologicznej procesy biochemiczne powodują przemiany m.in. amoniaku do formy amonowej, a następnie w procesie nitryfikacji jony $N-NH_4^+$ są przekształcane do formy azotynowej i azotanowej ($N-NOx^-$). Aktywność ureazy związana jest z przemianą formy amidowej azotu występującej w moczniku do amoniaku i dwutlenku węgla. Stąd też ważnym jest aby przy ocenie zakresu i przebiegu przemian czystego mocznika oraz mocznika z dodatkiem inhibitorów ureazy wykonywać nie tylko pomiar poziomu ureazy ale także oznaczenia zawartości azotu amonowego i azotanowego zakładając, że stężenie jonów amonowych jest wyznacznikiem przemian mocznika w glebach.

Ważny jest tu oczywiście rodzaj emisji i jej natężenie oraz depozycja w glebie, ale również należy brać pod uwagę sposób użytkowania przestrzeni wraz z jej naturalnymi cechami, takimi jak rodzaj i właściwości gleb, czy też warunki klimatyczne oraz bioróżnorodność mikrobiologiczną środowiska glebowego. Również ocena roślinności wraz z oceną mikrobiomu tych roślin jest niezwykle ważna. Badanie tych procesów powinno mieć charakter interdyscyplinarny. Stąd też problem badawczy podjęty przez Doktorantkę w niniejszej dysertacji uważam za bardzo ważny i aktualny, a zarazem podejmujący próbę rozwiązania bieżących potrzeb rolnictwa.

Wielu autorów badało wpływ interakcji między roślinami a mikroorganizmami po zastosowaniu ekstraktów roślinnych, w oparciu o hipotezę, że ekstrakty te zwiększają populację mikroorganizmów w ryzosferze oraz stymulują wzrost roślin. Interakcje te wiążą się między innymi z pobudzaniem roślin do zwiększenia wydzielin korzeniowych. W przypadku stresu chemicznego w glebie roślina może reagować zwiększeniem lub zmianą ilości wydzielin korzeniowych, co z kolei modyfikuje skład mikrobiomu lub aktywność mikroorganizmów. Reakcja taka może być także obserwowana w przypadku stosowania syntetycznych jak i naturalnych inhibitorów ureazy.

Gleba jest siedliskiem życia różnych organizmów i nie powinna stwarzać zagrożenia dla zdrowia ludzi oraz stanu środowiska (bioróżnorodności). Stąd też wszelkie próby

podjęcia badań dotyczących ochrony gleb, w tym ograniczenia emisji amoniaku uwzględnić za bardzo cenne i potrzebne w dzisiejszym świecie. W ten nurt wpisuje się tematyka pracy doktorskiej mgr Dominiki Matczuk. Należy również dodać, że pomimo licznych publikacji na powyższy temat, metody badań dotyczące zastosowania wybranych ekstraktów roślinnych jako stymulatorów wzrostu roślin oraz inhibitorów ureazy wydają się być ciągle niedostatecznie i słabo poznane, szczególnie w warunkach *in situ* tj. upraw polowych. W powyższym kontekście problematyka ocenianej pracy doktorskiej **ma bardzo duże znaczenie praktyczne** ze względu na możliwości wdrażania osiągniętych wyników badań bezpośrednio do praktyki.

Recenzowana rozprawa doktorska opiera się zarówno na klasycznych, laboratoryjnych metodach podstawowych jak i metodykach doświadczalnych z udziałem roślin. Warte podkreślenia są zarówno badania inkubacyjne, jak i badania wazonowe z wybranymi ekstraktami roślinnymi.

2. Ocena formalna i merytoryczna rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska ma postać monotematycznej dysertacji liczącej 131 stron, na których znajduje się: 9 tabel oraz 38 rysunków. Dodatkowo na wstępie pracy dołączono streszczenie w języku polski i angielskim. Rozprawa zakończona jest spisem literatury (157 pozycji literaturowych, głównie anglojęzycznych). Dysertacja składa się z klasycznych rozdziałów zgodnych ze schematem prac badawczych.

Zbudowana jest z 7 rozdziałów zasadniczych, do których Doktorantka zaliczyła: dwustronicowy „**Wstęp**”, „**Przegląd literatury**” z pięcioma podrozdziałami a następnie „**Cel pracy i hipoteza badawcza**”. Kolejny rozdział „**Metodyka badań**” z pięcioma podrozdziałami oraz rozdział „**Wyniki**”, w którym Doktorantka omawia otrzymane w toku realizacji badań rezultaty. W rozdziale szóstym zatytułowanym „**Dyskusja**” Doktorantka precyzyjnie omawia i dyskutuje otrzymane wyniki badań własnych z danymi opisanymi w literaturze. Rozprawa zakończona jest dwoma kolejnymi rozdziałami zatytułowanymi „**Wnioski**” i „**Literatura**”. Rozprawa zakończona jest spisem rysunków oraz tabel.

W „**Przeglądzie literatury**” Doktorantka szczegółowo i precyzyjnie omawia główne zagadnienia stanowiące merytoryczną podstawę dysertacji. Charakteryzuje zarówno źródła azotu w glebie oraz czynniki warunkujące emisję amoniaku do atmosfery. Ponadto

przedstawia charakterystykę enzymu oraz syntetycznych i naturalnych inhibitorów ureazy. Szczegółowo omawia także wpływ ekstraktów roślinnych na wzrost roślin i zasiedlających ją mikroorganizmów glebowych. Przy opisie poszczególnych zagadnień poprawnie powołuje się na dane literaturowe.

W rozdziale „**Metodyka badań**” na trzynastu stronach Doktorantka przedstawia skrupulatnie warsztat swojej pracy z uwzględnieniem zarówno opisu poszczególnych metod analitycznych jak również opisu doświadczeń (inkubacyjnego i wazonowego). Na podkreślenie zasługuje także poprawnie i szeroko zastosowane do opisu wyników metody statystyczne, dzięki którym Doktorantka dokładnie omawia otrzymane wyniki badań. Opis wyników badań został przedstawiony i prawidłowo zilustrowany na 46 stronach dysertacji. Doktorantka szczegółowo omawia wyniki poszczególnych analiz i przedstawia kolejne parametry w oparciu o prawidłowo zastosowane metody statystyczne i bioinformatyczne.

Na podkreślenie zasługują także badania dotyczące mikrobiomu i mykobiomu badanych gleb. Ta część badań znacząco wzbogaca całość pracy o dodatkowy parametr naukowy istotnie związany z oceną bioróżnorodności gleb w kontekście jej ochrony oraz poznania zależności pomiędzy rośliną, glebą a zasiedlającymi ją mikroorganizmami. Na końcu dysertacji Doktorantka w rozdziale „**Wnioski**” poprawnie formułuje osiem punktów przedstawiających najważniejsze osiągnięcia uzyskane w toku realizacji rozprawy.

Układ omawianej pracy jest poprawny i niebudzący zastrzeżeń. Ponadto poszczególne rozdziały i podrozdziały są ze sobą logicznie powiązane, stanowią całość, co ułatwia merytoryczną ocenę uzyskanych wyników. Recenzowana rozprawa doktorska jest napisana językiem poprawnym stylistycznie.

Do najważniejszych wyników otrzymanych przez Doktorantkę zaliczam:

- wybór ekstraktów roślinnych różniących się między sobą zdolnością do hamowania aktywności ureazy w zależności od użytego do ekstrakcji materiału i stężenia ekstraktu w przeprowadzonych badaniach w roztworze wodnym;
- uzyskanie znaczącej redukcji emisji amoniaku z gleby nawożonej mocznikiem z dodatkiem większości otrzymanych ekstraktów roślinnych w porównaniu do gleby nawożonej samym mocznikiem. Dotyczy to zarówno 25% ekstraktu z borówki zastosowanego na glebie płowej oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej na glebie

bielicowej w doświadczeniu inkubacyjnym, jak również w doświadczeniu wazonowym;

- ograniczenie strat azotu w postaci emisji amoniaku z gleby po aplikacji ekstraktów roślinnych z mocznikiem było porównywalne lub mniejsze (zależnie od użytego ekstraktu i typu gleby) niż po zastosowaniu komercyjnego inhibitora ureazy NBPT w doświadczeniu inkubacyjnym;
- stwierdzenie, iż wielkość emisji amoniaku uzależniona była od typu gleby. W doświadczeniu inkubacyjnym na glebie bielicowej (o odczynie zasadowym) zaobserwowano istotnie większą emisję amoniaku niż na glebie płowej (o odczynie kwaśnym);
- zmniejszenie stężenia jonów azotanowych w obu badanych warstwach gleby płowej w przypadku zastosowania ekstraktów roślinnych łącznie z mocznikiem. Ponadto zaobserwowano wzrost stężenia jonów amonowych w górnej warstwie gleby płowej po zastosowaniu 25% ekstraktów z borówki i maliny oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej;
- stwierdzenie, iż nawożenie mocznikiem oraz ekstraktem z morwy miało korzystny wpływ na zawartość potasu i wapnia w roślinach pszenicy rosnącej na glebie bielicowej;
- określenie, iż głównym czynnikiem warunkującym mikrobiom gleby był typ gleby a nie rodzaj użytego ekstraktu roślinnego;
- stwierdzenie, iż badane ekstrakty roślinne w większym stopniu oddziaływały na zbiorowisko bakterii niż grzybów w glebie. Zastosowanie ekstraktów roślinnych na glebie płowej wpłynęło na wzrost bioróżnorodności bakterii w odniesieniu do gleby bez ekstraktów.

Poniżej przedstawiam moje uwagi i pytania dotyczące niniejszej rozprawy doktorskiej:

- proszę o odpowiedź na pytanie: który z badanych przez Panią ekstraktów roślinnych poleciłaby Pani do wdrożenia, lub kontynuowania badań i dlaczego? Proszę o uwzględnienie w odpowiedzi także opłacalność tej metody. Czy dodatek do nawozu inhibitora ureazy otrzymanego z naturalnych ekstraktów roślinnych byłby bardziej opłacalny niż produkcja syntetycznych inhibitorów?

- proszę o odpowiedź czy skuteczność zastosowania mocznika z inhibitorem ureazy może zależeć nie tylko od typu gleby ale także od rodzaju uprawianej rośliny i zasiedlającego ją mikrobiomu oraz mykobiomu?
- w rozprawie doktorskiej przedstawiła Pani całkowitą zawartość związków polifenolowych, ale czy jest Pani w stanie określić, który ze związków polifenolowych był dominujący w poszczególnych ekstraktach? Czy poszczególne ekstrakty różniły się znacząco składem poszczególnych związków polifenolowych? Czy takie badania były wykonywane?

3. Wniosek końcowy

Podsumowując recenzowana rozprawa doktorska stanowi ciekawe rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje dużą wiedzę teoretyczną mgr Marty Dominiki Matczuk. Doktorantka dowiodła, iż posiada wiedzę w powyższej tematyce, jak również potrafi przeprowadzić badania metodyczne związane z powyższą tematyką. Moim zdaniem sformułowany problem badawczy został w pełni osiągnięty a zaplanowany zakres badań zrealizowany. Wykorzystany przez Doktorantkę warsztat naukowo-badawczy jest wystarczający, a uzyskane wyniki umożliwiły osiągnięcie zakładanych na wstępie założeń pracy. Dysertacja nie budzi większych zastrzeżeń pod względem formalnym i merytorycznym. Na szczególne podkreślenie zasługuje aspekt praktyczny niniejszych badań i dążenie do realnego wdrożenia otrzymanych wyników do zastosowań w rolnictwie.

W świetle powyższej recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z obowiązującą podstawą prawną. Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Matczuk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę istotność zagadnienia podjętego przez Doktorantkę, szeroki wachlarz badawczy oraz bardzo duże znaczenie praktyczne ze względu na możliwości wdrażania osiągniętych wyników badań bezpośrednio do praktyki zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie niniejszej rozprawy stosowną nagrodą.



Instytut Uprawy
Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy



Anna Gałazka
dr hab. Anna Gałazka, prof. IUNG-PIB

Jednostka organizacyjna IUNG-PIB Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Osoba do kontaktu: dr hab. Anna Gałazka, prof. IUNG-PIB
Telefon: 814786950
Adres e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl