



Wroclaw, 6 lutego 2024 r.

dr hab. inż. Izabela Michalak, prof. uczelni
Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny
Katedra Zaawansowanych Technologii Materiałowych

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Dominiki Matczuk

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

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anny Siczek
oraz Opiekuna pomocniczego Pana Tomasza Martyniuka

Recenzja została przygotowana na podstawie pisma RN-431-1/23 prof. dr. hab. Wiesława Oleszka, czł. koresp. PAN – Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk z dnia 14 grudnia 2023 r.

Rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Matczuk dotyczy oceny możliwości zastosowania ekstraktów otrzymanych z surowców roślinnych łącznie z nawozem mocznikowym w celu obniżenia emisji amoniaku z gleby. Wykorzystanie nawozów mocznikowych do nawożenia pól uprawnych wiąże się z niekorzystnym zjawiskiem emisji amoniaku z gleby do środowiska, które skutkuje nieefektywnym wykorzystaniem dostarczonej roślinom dawki azotu, a co za tym idzie zmniejszeniem efektywności ekonomicznej prowadzonych upraw. Jednym ze sposobów ograniczenia emisji amoniaku jest zastosowanie inhibitorów ureazy. W przypadku aplikacji komercyjnie dostępnych inhibitorów ureazy, dotychczas nie są poznane negatywne skutki wynikające z ich długotrwałego stosowania. Rozprawa doktorska wpisuje się więc w aktualne trendy badań, mające na celu poszukiwanie substancji naturalnych, nieszkodliwych dla środowiska, które mogą spowodować zahamowanie aktywności ureazy. W rozprawie doktorskiej, Doktorantka zaproponowała wykorzystanie ekstraktów roślinnych, zawierających związki aktywne, które mogą działać jako inhibitory urolizy. Owoce borówki, maliny, jeżyny oraz morwy czarnej, bogate w związki polifenolowe zostały wybrane jako surowiec do ekstrakcji. Podjęta tematyka rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej trafna i ma duże znaczenie pod względem naukowym, jak i użytkowym.

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani Dominiki Matczuk została wykonana w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie i była finansowana z budżetu Ministerstwa Edukacji i Nauki w



unite!
University Network for Innovation,
Technology and Engineering



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Evaluated by
IEP INSTITUTIONAL
EVALUATION
PROGRAMME
www.iep-qaq.org

Politechnika Wroclawska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wroclaw

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614

NIP: 896-000-58-51

Nr konta:

37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” (Projektu Nr DWD/3/51/2019). Rozprawa doktorska ma charakter aplikacyjny. Otrzymane ekstrakty roślinne będą mogły być zastosowane razem z mocznikiem produkowanym w Grupie Azoty Zakłady Azotowe „Puławy” S.A., która prowadzi prace nad poszukiwaniem substancji naturalnych, nieszkodliwych dla środowiska, zdolnych do redukcji emisji amoniaku.

Licząca 131 stron rozprawa doktorska posiada klasyczny układ dla tego typu opracowań. Na początku rozprawy doktorskiej zamieszczono streszczenie w języku polskim oraz angielskim, spis treści, a następnie opis poszczególnych rozdziałów: 1. *Wstęp*, 2. *Przegląd literatury*, 3. *Cel pracy i hipoteza badawcza*, 4. *Metodyka badań*, 5. *Wyniki*, 6. *Dyskusja*, 7. *Wnioski*. Na końcu rozprawy doktorskiej zamieszczono spis rysunków i tabel, jak również wykorzystane źródła literaturowe (157 pozycji). Rozprawa jest starannie przygotowana pod względem redakcyjnym i jest napisana poprawnie językowo.

Część 1 to *Wstęp*, który jest krótkim, 2-stronicowym wprowadzeniem do omawianego zagadnienia. W sposób zwięzły omówiono problem badawczy oraz obowiązujące akty prawne w zakresie ograniczania emisji amoniaku (Dyrektywa NEC – Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2016/2284 z dnia 14 grudnia 2016 r.), które wymuszają podjęcie działań mających na celu obniżenie poziomu emisji amoniaku z nawozów na bazie mocznika. Następnie Doktorantka przedstawiła możliwe rozwiązania zdefiniowanego problemu badawczego. Zaproponowała zastosowanie syntetycznych lub też naturalnych (pochodzenia roślinnego) inhibitorów ureazy, aplikowanych podczas nawożenia pól mocznikiem. W tym miejscu chciałbym nadmienić, iż tytuł rozprawy doktorskiej nie jest precyzyjny – w pracy przebadano ekstrakty otrzymane tylko z surowców roślinnych jako potencjalne inhibitory urolizy. Tytuł rozprawy doktorskiej sugeruje, iż w ramach przeprowadzonych badań, inhibitory te mogły być również wytwarzane z surowców pochodzenia zwierzęcego. Jakie surowce pochodzenia zwierzęcego lub produkty ich przetwarzania mogłyby stanowić potencjalne inhibitory urolizy?

Część 2 to *Przegląd literatury* opisany na 19 stronach, który jest zwięzłym wprowadzeniem do omawianej tematyki badawczej. W oparciu o odpowiednie źródła literaturowe, Doktorantka przedstawiła najważniejsze informacje dotyczące źródeł azotu w przyrodzie i jego przemian (cykl biogeochemiczny). Następnie opisała czynniki warunkujące emisję amoniaku z gleby, charakterystykę enzymu ureaza oraz dostępne inhibitory tego enzymu, zarówno syntetyczne, jak i naturalne, pochodzące z surowców roślinnych (np.: czosnek, cebula, rumianek, kora akacji, kwasy humusowe, etc.). Interesującym podrozdziałem jest opis ekstraktów



University Network for Innovation,
Technology and Engineering



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspińskiego 27
50-370 Wrocław
www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



roślinnych, bogatych w związki aktywne, które mogą wykazywać nie tylko zdolność do hamowania aktywności ureazy w glebie, ale również stymulować wzrost roślin oraz wpływać pozytywnie na właściwości fizyko-chemiczne gleby i mikroorganizmy w niej występujące. Przedstawiając aktualny stan wiedzy, należy skupić się na najnowszej literaturze, zazwyczaj z ostatniej dekady, maksymalnie z dwóch dekad. W rozprawie doktorskiej znalazło się wiele cytowań literaturowych, starszych niż dwie dekady (nawet z 1976 roku). W tej części rozprawy doktorskiej zabrakło mi również krótkiego podsumowania przeglądu literaturowego wskazującego na luki badawcze oraz precyzyjnego określenia nowości tej pracy.

W następnej części – **3. Cel pracy i hipoteza badawcza**, Doktorantka przedstawiła cel główny badań, cele szczegółowe oraz hipotezę badawczą. Celem głównym badań była ocena możliwości zastosowania ekstraktów otrzymanych z surowców roślinnych wyselekcjonowanych na podstawie przeglądu literatury naukowej, które zaaplikowane łącznie z nawozem mocznikowym spowodują obniżenie emisji amoniaku z gleby. Nasuwa się tutaj pytanie, jakie kryterium zastosowano przy wyborze borówki, maliny, jeżyny oraz morwy czarnej jako surowców do wytwarzania ekstraktów roślinnych? W przeglądzie literaturowym nie odniesiono się do tych surowców, ich charakterystyki, zawartości związków z grupy polifenoli, które mogą odpowiadać za inhibicję aktywności ureazy.

W tej części pracy, Doktorantka zdefiniowała także cele szczegółowe, które obejmowały:

1. Wybór surowców roślinnych oraz weryfikacja ich skuteczności jako inhibitorów ureazy
2. Określenie wpływu mocznika z dodatkiem otrzymanych ekstraktów roślinnych na emisję amoniaku, aktywność ureazy a także zawartość form azotu (N ogólny, formy amonowa i azotanowa) w glebie w doświadczeniu inkubacyjnym
3. Zbadanie wpływu mocznika z dodatkiem otrzymanych substancji pochodzenia roślinnego na emisję amoniaku, aktywność ureazy oraz zawartość form azotu w glebie w doświadczeniu wazonowym z pszenicą jarą
4. Ocenę wpływu nawożenia mocznikiem z dodatkiem ekstraktów z roślin na wzrost roślin pszenicy (biomasa, zawartość makroskładników i chlorofilu, tempo fotosyntezy)
5. Ocenę wpływu mocznika z dodatkiem wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych na mikroorganizmy glebowe (liczebność oraz skład taksonomiczny bakterii i grzybów)

Część 4 rozprawy doktorskiej to **Metodyka badań**, która została opisana na 14 stronach. Doktorantka opisała sposób wytwarzania ekstraktów roślinnych oraz ich



właściwości – zdolność do hamowania aktywności ureazy oraz całkowitą zawartość związków polifenolowych. Kolejny opis dotyczył przeprowadzonych doświadczeń inkubacyjnych i wazonowych, z użyciem dwóch typów gleby – gleba płowa i bielnicowa, do których zaaplikowano granulowany mocznik oraz wytworzone ekstrakty roślinne. Następnie dokonano pomiaru emisji amoniaku z gleby, aktywności ureazy w glebie, zawartości azotu ogólnego i przyswajalnych form azotu w glebie. Przeprowadzone przez Doktorantkę testy wazonowe na pszenicy polegały na oznaczaniu zawartości chlorofilu, pomiarze intensywności fotosyntezy, określeniu plonu świeżej masy części nadziemnych roślin oraz oznaczeniu zawartości makroskładników w materiale roślinnym. Finalnie oceniono wpływ mocznika z dodatkiem wyselekcjonowanych ekstraktów roślinnych na mikroorganizmy glebowe. Pani Dominika Matczuk przeprowadziła również analizę statystyczną otrzymanych wyników badań z wykorzystaniem odpowiednich testów statystycznych. Do tej części rozprawy doktorskiej mam kilka uwag oraz komentarzy.

1. Brak podrozdziału *Aparatura i odczynniki*, który byłby przydatny do odtworzenia opisanych badań, co jest jednym z kryteriów przy ocenie tego rozdziału
2. Niektóre rozdziały, jak np.: 4.3.3. – Analiza zawartości azotu w glebie; 4.4.1. – Analiza gleby; 4.4.3. – Oznaczenie zawartości makroskładników w materiale roślinnym, zostały opisane bardzo ogólnie (brak podanych odważek, objętości, stężeń użytych odczynników, użytej aparatury itp.). Proszę o informację, czy Doktorantka wykonywała te oznaczenia osobiście/we współpracy, czy były to badania zlecone
3. Brak opisu metodyki badawczej użytej do scharakteryzowania gleby płowej i bielnicowej – str. 37
4. Poddając surowce pochodzenia roślinnego procesowi ekstrakcji, warto podać ich charakterystykę – w jakim miesiącu owoce zostały zebrane, jaki był dokładnie ich gatunek, etc. Ilość i rodzaj związków aktywnych w surowcu roślinnym (w tym polifenoli) zależy od wielu czynników, takich jak gatunek i rodzaj rośliny, warunki wzrostu, zbioru i przechowywania, warunki środowiskowe i klimatyczne oraz wiele innych
5. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego zastosowano tak wysoką temperaturę suszenia owoców – pierwszy etap obejmował suszenie w temperaturze 80 °C, drugi w temperaturze 100 °C (oba etapy trwały 24 godziny) – str. 35. Suszenie surowców roślinnych w wysokich temperaturach może prowadzić do zmniejszenia ich aktywności przeciwutleniającej – zawartości polifenoli, a to im przypisuje się zdolność do hamowania aktywności ureazy



University Network for Innovation,
Technology and Engineering



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
www.pwr.edu.pl

REGON: 00001614
NIP: 896-000-58-51
Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



6. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego zdecydowano się na użycie metanolu jako rozpuszczalnika w procesie ekstrakcji. Metanol jest klasycznym rozpuszczalnikiem stosowanym do ekstrakcji związków aktywnych z biomasy. Jednakże biorąc pod uwagę zastosowanie otrzymanych ekstraktów w rolnictwie, dogłębowo, należy uwzględnić toksyczność tego rozpuszczalnika. Czy w ramach przeprowadzonych badań odparowano metanol na wyparce rotacyjnej? Rekomenduję uwzględnienie innych „zielonych rozpuszczalników” do ekstrakcji związków aktywnych z surowców roślinnych
7. Proszę o wyjaśnienie, czym jest odczynnik A i w jaki sposób wyznaczono stężenie jonów amonowych w próbce na podstawie zmierzonej absorbancji? – str. 36
8. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego spośród wielu dostępnych komercyjnych inhibitorów ureazy (wymienione w Tabeli 1 na str. 25), w doświadczeniu inkubacyjnym zdecydowano się na zastosowanie triamidu kwasu N-(n-butylo) tiofosforowego (NBPT) do otoczkowania mocznika – str. 38
9. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w doświadczeniu wazonowym z użyciem pszenicy jarej, nie zastosowano triamidu kwasu N-(n-butylo) tiofosforowego (NBPT) jako kontroli pozytywnej, tym bardziej, że ten inhibitor ureazy był stosowany we wcześniejszym doświadczeniu inkubacyjnym? – str. 43
10. Proszę o informację, gdzie były prowadzone badanie inkubacyjne – str. 39 oraz wazonowe – str. 41? W fitotronie/szklarni?

Część 5 w rozprawie doktorskiej to **Wyniki**, które zostały opisane na 52 stronach. Otrzymane wyniki badań zaprezentowano w tabelach oraz na rysunkach w sposób logiczny i bardzo staranny. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń. Na podstawie wyników otrzymanych w pierwszym etapie badań, Doktorantka wybrała stężenia ekstraktów (spośród badanych 5, 10, 25 i 100%) z owoców maliny, borówki, jeżyny, oraz morwy czarnej, które wykazywały największą zdolność do hamowania aktywności ureazy. Na podstawie tych wyników, do kolejnego etapu badań wytypowano ekstrakty otrzymane z owoców maliny, borówki i morwy czarnej o stężeniach 5, 10 i 25%, dla których przeprowadzono oznaczenie całkowitej zawartości związków polifenolowych. Następnie Doktorantka opisała wyniki badań dotyczące emisji amoniaku z gleby płowej oraz bielicowej, przeprowadzone zarówno w doświadczeniu inkubacyjnym, jak również wazonowym. W doświadczeniu wazonowym zastosowano 25% ekstrakt z borówki oraz 10% ekstrakt z morwy czarnej, które zostały wyselekcjonowane po przeanalizowaniu wyników uzyskanych w toku przeprowadzonego doświadczenia inkubacyjnego. Wyniki końcowe dla badanych obiektów zestawiono w sposób bardzo czytelny w tabelach jako skumulowana emisja NH_3 [$\text{mg NH}_3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$]. Następnie Doktorantka przeanalizowała





wpływ wybranych ekstraktów roślinnych na aktywność ureazy w glebie płowej oraz biellicowej, zawartość azotu ogółem oraz azotu w formie azotanowej i amonowej. Po zakończeniu doświadczeń wazonowych, Doktorantka przeanalizowała również wyniki dotyczące uzyskanego plonu biomasy pszenicy, jak również zawartości chlorofilu oraz makroskładników (N, P, K, Ca, Mg) w biomacie oraz intensywności fotosyntezy. Interesujące wyniki przedstawiono w ostatniej części tego rozdziału, które dotyczyły wpływu ekstraktów roślinnych (25% ekstraktu z borówki i 10% z morwy czarnej) na mikrobiom gleby płowej oraz biellicowej – liczebność i struktura zbiorowisk bakterii i grzybów w glebie, zróżnicowanie gatunków bakterii i grzybów oraz bioróżnorodność mikroorganizmów, wyznaczona z użyciem 5 wskaźników. Doktorantka wykazała, że zastosowanie ekstraktów roślinnych na glebie płowej wpłynęło na wzrost bioróżnorodności bakterii w odniesieniu do gleby bez ekstraktów.

Odnosząc się do tej części rozprawy doktorskiej, proszę o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

1. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego nie wykonano rozcieńczeń 100% ekstraktów roślinnych w celu oznaczenia całkowitej zawartości związków polifenolowych? Jak wskazano na Rysunku 7, 100% ekstrakty roślinne w największym stopniu obniżyły stężenie jonów amonowych w badanych próbkach – str. 51
2. W opisie wyników dotyczących emisji amoniaku z gleby w doświadczeniu inkubacyjnych nie uwzględniono ostatniego, 13 dnia. Dodatkowo proszę o wyjaśnienie, z czego może wynikać negatywny wpływ 25% ekstraktu z maliny na ograniczenie emisji amoniaku z gleby płowej? Ekstrakt ten zwiększał emisję amoniaku. Odwrotne wyniki uzyskano dla gleby biellicowej – ekstrakt ten zmniejszał emisję amoniaku z gleby – str. 53
3. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego zawartość makroelementów w roślinach została wyrażona w g/wazon? Moim zdaniem zawartość makroelementów w roślinach powinna być wyrażona w mg/kg suchej masy rośliny – str. 78
4. Proszę o wyjaśnienie, co oznacza słowo „suszy” na Rysunku 32 – str. 88

Część 6 – *Dyskusja* została opisana na 10 stronach w sposób rzeczowy i merytoryczny. Doktorantka odniosła otrzymane wyniki badań do danych literaturowych i prawidłowo je zinterpretowała.

Rozprawę doktorską kończy Część 7 – *Wnioski*, w której Doktorantka przedstawiła najważniejsze efekty zrealizowanych badań w postaci 8 wniosków. W części tej zabrakło mi zweryfikowania przez Doktorantkę postawionej w Części 3 rozprawy doktorskiej hipotezy badawczej.

Jednakże, wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły skuteczność badanych ekstraktów roślinnych w redukcji emisji NH_3 do środowiska (zmniejszenie



University Network for Innovation,
Technology and Engineering



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Politechnika Wroclawska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614

NIP: 896-000-58-51

Nr konta:

37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



skumulowanej emisji amoniaku o 31% i 40% w stosunku do kontroli przy aplikacji odpowiednio 25% ekstraktu z borówki oraz 10% ekstraktu z morwy czarnej) w przypadku gleby biellicowej. Warto nadmienić, iż wpływ ekstraktów na emisję amoniaku z gleby w doświadczeniu wazonowym uzależniony był od typu gleby.

Dokonując oceny rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne drobne uwagi i spostrzeżenia:

1. Str. 16 – proszę stosować właściwe nazewnictwo: powinno być jon azotanowy (III) dla NO_2^- oraz jon azotanowy (V) dla NO_3^-
2. Str. 35 – niekompletne nazwy łacińskie surowców roślinnych użytych do wytwarzania ekstraktów roślinnych – malina (*Rubus* L.), borówka (*Vaccinium* L.), jeżyna (*Rubus* L.). Należało wskazać pełne nazwy użytych gatunków roślin
3. Str. 38 – ppm nie jest jednostką w układzie SI, proszę stosować mg/l lub mg/kg
4. Str. 50 – powinno być μg zamiast μg
5. Str. 89 – sekcja „5.4.3. Zróżnicowanie gatunków bakterii i grzybów” powinna mieć numer 5.4.2. (również w Spisie treści)
6. W przypadku stosowanych skrótów w języku angielskich, np.: „CEC” – str. 20; „ATS” – str. 25; „HQ” – str. 27; „CFA” – str. 41; „NGS” – str. 83 powinny być również podawane pełne wyjaśnienia tych skrótów w tym języku
7. Przygotowany spis literatury nie jest jednolity. W niektórych pozycjach stosowane są skróty tytułów czasopism naukowych, a w niektórych pełne nazwy; numer DOI w pozycji [5] powinien być w pozycji [4]; [16] – niekompletne cytowanie, brak nazwy czasopisma; pełne nazwy łacińskie powinny być pisane kursywą [27], [41], [137]; cytowanie [56] i [57] jest takie samo, analogicznie cytowanie [69] i [70] oraz [119] i [120].

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem polskim, jednakże można w niej znaleźć drobne uchybienia. Z obowiązku recenzenta chciałabym przetoczyć niektóre z nich:

1. str. 53 – powinno być „borówka 25” nie „borówka 2%”;
2. str. 60 – na wykresie powinno być „ $\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ”
3. Błędy stylistyczne: str. 37 – „Pierwszy, gleba...”; str. 39 – „jaki i...”; str. 42 – „dla gleby płowa...”; str. 51 – wykres „zawartość” nie „zawartość”;

Pomimo powyższych uwag, pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską, a wspomniane uchybienia nie obniżają jakości prezentowanych wyników. Uważam, że tematyka podjęta w ocenianej rozprawie doktorskiej jest bardzo ważna i może być inspiracją do dalszych badań zmierzających do opracowania skutecznych i bezpiecznych dla środowiska naturalnego inhibitorów



ureazy. Prowadzone badania mają charakter aplikacyjny i wpisują się działania podejmowane przez producentów nawozów mineralnych, takich jak mocznik.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Dominiki Matczuk pt.: „Izolacja inhibitorów urolizy z materiału roślinnego i/lub zwierzęcego lub produktów ich przetwarzania” spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym. Wobec powyższego, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Dominiki Matczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo*.

Michał Kubele



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

