



UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie

WYDZIAŁ BIOLOGII i BIOTECHNOLOGII

10-719 Olsztyn, ul. M. Oczapowskiego 1A
tel. (89) 523-44-48, fax (89) 523-44-68

Prof. dr hab. inż. Lesław B. Lahuta
Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
10-718 Olsztyn

Olsztyn, 15.12.2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Dawida Skrzypczaka

pt.: „*Otrzymywanie biokompozytów do kontrolowanego transportu mikroelementów nawozowych*”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Witek-Krowiak, prof. uczelni i dr inż. Anny Dawiec-Liśniewskiej (promotora pomocniczego) w Katedrze Zaawansowanych Technologii Materiałowych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej

Recenzja została wykonana na podstawie pisma z dnia 9 października 2020 r. Prof. dr hab. inż. Grażyny Gryglewicz, Przewodniczącej Komisji ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Inżynieria Chemiczna w Politechnice Wrocławskiej, informującego o powierzeniu mi przez Komisję pełnienia obowiązków recenzenta w/w rozprawy doktorskiej, zgodnie z wymaganiami art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789)

Formalna strona pracy

Rozprawa została przygotowana w formie opracowania monograficznego, zawierającego jednostronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 11 rozdziałów: *Wstęp* (2 strony), *Przegląd piśmiennictwa* (34 strony), *Cel pracy* (2 strony), *Materiał i metody* (11 stron), *Wyniki i dyskusja* (66 stron), *Podsumowanie* (6 stron), *Wnioski* (2 strony), *Bibliografia* (17 stron, z 235 pozycjami), *Spis skrótów i symboli* (2 strony), *Spis rysunków i tabel* (4 strony), *Dorobek naukowy* (3 strony). Taki układ pracy spełnia wymagania ustawowe, choć ostatni rozdział traktuję jako dodatkowy. Wprawdzie zawarte w nim informacje pozwalają na zapoznanie się z sylwetką naukową Kandydata, jednak nie mogą podlegać ocenie, gdyż ta dotyczy pracy zrealizowanej przez samego Doktoranta. Za niewłaściwe uważam zamieszczenie ryciny nr 10 (pt. „*Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej*”,

zestawiającej poszczególne badania z analizowanymi w nich kompozytami) w rozdziale *Cel pracy*. Odpowiednim miejscem dla takich informacji jest rozdział *Materiał i metody*.

Ocena merytoryczna rozprawy

Tematyka ocenianej pracy doktorskiej wpisuje się w ideę zrównoważonego rolnictwa, wdrażaną i upowszechnianą m.in. przez precyzyjne rolnictwo, którego jednym z ważniejszych elementów jest optymalizacja środków produkcji. Szczególnego znaczenia nabiera zarówno zwiększenie efektywności nawożenia roślin, poprzez stosowanie nawozów o optymalnym składzie, formie i w dawkach zabezpieczających zapotrzebowanie roślin w składniki pokarmowe podczas całego okresu ich wegetacji, jak też ochronę środowiska przed nadmiernym nawożeniem, powodującym m.in. zasolenie gleb, eutrofizację wód powierzchniowych. Innowacyjne podejście Doktoranta do tego tematu polegało na ocenie przydatności niektórych odpadów z przetwarzania biomasy roślinnej (pozostałości z różnego materiału roślinnego po ekstrakcji di-tlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym) i przemysłu spożywczego (tu - skorupki jaj) do wytwarzania nowych nawozów o kontrolowanym uwalnianiu wybranych mikroelementów (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}). Precyzyjne określenie szczegółowych celów badawczych, ich konsekwentna realizacja z wykorzystaniem odpowiednich metod analitycznych oraz modelowanie matematyczne procesu biosorpcji (wraz z eksperymentalną weryfikacją wyników), umożliwiło osiągnięcie głównego celu – opracowania nowej technologii otrzymywania kompozytowych kapsułek hydrożelowych (z alginianu sodu i karboksymetylocelulozy) z biosorbentem (rozdrobnionymi skorupkami jaj), wzbogaconych o jony miedzi, manganu lub cynku, wykazujących pożądaną cechę - kontrolowane uwalnianie składników odżywczych. Autor sugeruje, że uzyskany preparat, w postaci mieszaniny granulek kompozytowych, może być wykorzystywany do nawożenia roślin (szczególnie w uprawie doniczkowej), zabezpieczając ich zapotrzebowanie na mikroelementy przez kilka miesięcy wegetacji. Jednak na poparcie tej konstatacji brakuje wyników w prezentowanej pracy – analizy *in vivo* przeprowadzono tylko na nasionach ogórka kiełkujących przez 10 dni, choć wzmiankę o dłuższym działaniu można odnaleźć w ofercie technologicznej wykorzystania preparatu nawozowego, zamieszczonej na str. 120. Niemniej, opracowana technologia może być stosowana do immobilizacji badanych hydrożeli również inną biomasą roślinną, na co wskazują zaprezentowane wyniki sorpcji i uwalniania mikroelementów z hydrożeli wzbogaconych o pozostałości z pestek czarnej porzeczki po ekstrakcji di-tlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym.

Najważniejszym osiągnięciem aplikacyjnym ocenianej pracy jest niewątpliwie opracowanie technologii i wytworzenie nowego mikroskładnikowego hydrożelowego nawozu o kontrolowanym uwalnianiu mikroelementów (Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+}), składającego się z mieszaniny alginianu (ALG), karboksymetylocelulozy (CMC) i sproszkowanych skorupek jaj.

Pod względem naukowym, za najważniejsze uważam wykazanie:

1. szybkiej sorpcji jonów metalu przez matryce hybrydowe z ALG oraz mieszaniny ALG z CMC (Ryc. 24);
2. istotnego wpływu włączenia CMC w strukturę matrycy hydrożelowej na wzrost zdolności sorpcyjnej kapsułek o ok. 40% w stosunku do samego ALG (Ryc. 25A i B);
3. wysokiej sorpcji jonów Cu^{2+} (ok. 80%) zarówno dla kapsułek zbudowanych z samych polimerów – ALG i CMC jak też wzbogaconych o zmielone skorupki jaj;
4. istotnego wpływu dodania do hydrożeli zmielonych skorupek jaj oraz poekstrakcyjnych pozostałości z pestek porzeczki czarnej na odpowiednio 3- i prawie 2-krotne podwyższenie maksymalnej pojemności sorpcyjnej kapsułek (Ryc. 25C i D) oraz wykazanie braku takiego oddziaływania po immobilizacji hydrożeli pozostałościami z nasion rzepaku, nawłoci i lucerny;
5. korzystnego działania chityny, wykorzystanej do powlekania hydrożeli, polegającego na spowalnianiu (dwukrotnym) uwalniania jonów metali do otoczenia;
6. związku pomiędzy grubością powłoki chitynowej oraz zwartością jej powierzchni (na którą może wpływać wiązanie jonów Cu^{2+} sorbowanych z roztworu podczas wzbogacania kapsułek w mikroelementy) a uwalnianiem jonów metali;
7. istotnego wpływu odczynu środowiska na szybkość uwalniania jonów – szybciej są uwalniane przy odczynie silnie kwaśnym;
8. korzystnego wpływu CMC jak i biomasy odpadowej (wprowadzonej do matrycy) na podwyższenie wytrzymałości mechanicznej kapsułek i ich porowatość, co może mieć znaczenie dla utrzymania ich funkcjonalności podczas odwadniania i uwadniania kapsułek;
9. całkowitej bio-degradowalności kapsułek w środowisku;
10. konieczności zachowania optymalnych dawek preparatu z nowymi kompozytami, dla uniknięcia przenawożenia roślin mikroelementami, na co wskazują wyniki testów przeprowadzonych na kiełkujących nasionach ogórka.

Na tle rosnącego zapotrzebowania na nowoczesne nawozy o kontrolowanym lub spowolnionym uwalnianiu składników pokarmowych, jako alternatywne dla tradycyjnie stosowanych nawozów mineralnych (zawierających łatwo rozpuszczalne sole mineralne) Autor rozprawy zwrócił uwagę na wysoki potencjał aplikacyjny nawozów opartych na materiałach hydrożelowych. Jednocześnie zaproponował optymalizację ich właściwości biosorpcyjnych poprzez wprowadzenie w ich strukturę biomasy odpadowej z przetwórstwa rolno-spożywczego oraz polimerów pochodzenia naturalnego. Takie biokompozyty, wzbogacone w wybrane mikroelementy, powinny wykazywać cechy nawozu o kontrolowanym uwalnianiu składników odżywczych. Dostrzegam tu dążenie do połączenia zwiększenia efektywności nawożenia roślin z ograniczaniem szkodliwości dla środowiska nadmiernego stosowania tradycyjnych nawozów mineralnych. Powyższe podejście wpisuje się w ideę zrównoważonego rozwoju i precyzyjnego rolnictwa.

W rozdziale „*Przegląd literatury*”, zawierającym cytowania 168 pozycji literaturowych (z 250 cytowanych w rozprawie), Doktorant w logicznej kolejności wprowadza odbiorcę w tematykę poruszanych zagadnień. Informacje tu zawarte dotyczą m.in. fizjologicznej roli mikroelementów w roślinach, przyczyn ich niedoboru w glebie (biodostępności), rodzajach stosowanych nawozów (nieorganicznych, organicznych, chelatowych i mikroelementowych), w tym nawozów o kontrolowanym lub spowolnionym uwalnianiu składników odżywczych (nawozów o obniżonej rozpuszczalności, otoczkowanych, nanonawozów i na bazie biomasy), charakteryzuje nawozy hydrożelowe i podaje liczne przykłady ich rolniczego wykorzystania.

Korzyści ze stosowania hydrożeli w produkcji roślinnej wynikają głównie z poprawą struktury gleby i podwyższenia retencji wody, co znajduje szersze zastosowanie m.in. w regionach świata o glebach podlegających pustynnieniu (ze względu na brak, lub znaczne wahania w nierównomierności opadów). Autor zwraca jednak uwagę na potrzebę zastąpienia syntetycznych super-absorbentów, zbudowanych z polimerów poliwinylowych i poliakrylamidowych, które nie podlegają biodegradacji i zanieczyszczają środowisko, polimerami pochodzenia naturalnego - nietoksycznymi i biodegradowalnymi.

Spośród naturalnych surowców do wytwarzania hydrożeli najpowszechniej wykorzystywane są anionowe polimery - alginian (pozyskiwany z alg morskich - brunatnic) i modyfikowana celuloza oraz kationowy chitozan (pozyskiwany z pancerzy skorupiaków), ale też (choć w znacznie mniejszej skali) skrobia czy naturalny kauczuk. O ile obecnie hydrożele znajdują bardzo szerokie i wciąż rosnące zastosowanie w medycynie i różnych gałęziach przemysłu, to w rolnictwie/ogrodnictwie stosowane są przede wszystkim jako materiały

zwiększające retencję wody, zabezpieczając rośliny przed jej niedoborem w warunkach suszy oraz jako nośniki makroelementów (NPK), o stopniowym ich uwalnianiu. Zagadnieniem wciąż aktualnym i słabo poznanym jest potencjał hydrożeli pochodzenia organicznego do absorpcji i kontrolowanego uwalnianiu mikroelementów. Opisane przez Doktoranta przykłady stosowania w rolnictwie różnych hydrożeli świadczą o Jego dobrym rozeznaniu w tematyce badawczej i odpowiednim przygotowaniu do realizacji pracy naukowej. Pewien niedosyt w tej części pracy budzi tylko brak uzasadnienia, dlaczego te, a nie inne materiały odpadowe z produkcji rolno-spożywczej zostały wybrane do immobilizacji hydrożeli? Nie do końca też sprecyzowano przesłanki dla wyboru jonów Cu^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} ?

Cel główny pracy i cele szczegółowe zostały sformułowane jasno, w logicznej kolejności. W tej części pracy niepotrzebnie, moim zdaniem, zostało zamieszczone streszczenie o przeprowadzonych badaniach i rycina 10, o czym już wspomniałem wcześniej, przy ocenie formalnej strony pracy.

W rozdziale „**Material i metody**” mgr Skrzypczak na początku zamieścił tabelaryczny wykaz i pochodzenie stosowanych odczynników i aparatury badawczej, co uważam za właściwe, po czym przedstawił postępowanie związane z: przygotowaniem kompozytów, badaniem ich właściwości fizykochemicznych, optymalizacją parametrów procesowych (badaniami kinetyki i równowagi procesu; wzbogacania kompozytów w jony Cu^{2+} , powlekania kapsulek powłoką z chitozanu; kinetyką uwalniania jonów Cu^{2+}), wzbogacaniem kapsulek w jony Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+} oraz testy *in vitro* (ekstrakcyjne) i *in vivo* (testy kiełkowania). Opis nie budzi zastrzeżeń. Również prawidłowo zostały dobrano metody analityczne (metoda ICP-OES do analiz składu pierwiastkowego materiałów biologicznych) i oprogramowanie do analizy wyników (*Matlab*), modelowania matematycznego (*Origin*), analiz statystycznych (*Statistica*) i przedstawienia równowagi chemicznej (*Medusa – Hydra*).

Zabrakło tu kilku informacji:

- czy pozostałości z nasion rzepaku, nawłoci i lucerny oraz pestek porzeczki czarnej powstały w wyniku ekstrakcji tylko związków niepolarnych (za pomocą CO_2 w stanie nadkrytycznym)?
- dlaczego testy *in vivo* przeprowadzano tylko na nasionach ogórka? i tylko przez 10 dni, skoro w ofercie technologicznej (str. 120) zawarto informację, że preparat może zabezpieczać zapotrzebowanie na mikroelementy przez 3 miesiące?
- dlaczego nie wykonano kontrolnego kiełkowania nasion bez dodatku jakiegokolwiek nawozu? – nasiona ogórka są zdolne do kiełkowania i wzrostu przez 10 dni bez „pomocy nawozowej”...

Pomniejsze uwagi są natury redakcyjnej - na rycinie 11 (str. 48) kolejność fotografii kapsulek hydrożelowych przed i po sorpcji Cu^{2+} nie jest taka sama jak ich kolejność w tabeli powyżej (Tab. 5), co wprowadza niepotrzebne zamieszanie; z kolei na stronie 52 (w drugim wierszu od góry) przy ogórku, jako obiekcie do testów *in vivo*, w nawiasie zawarto nazwę nie odmiany (powinno być '*Cornichon de Paris*' - co wynika z opisu testów kiełkowania wymieniona na stronie 53) tylko firmy, skąd pochodziły nasiona - 'W. Legutko' największego w Polsce przedsiębiorstwa hodowlano-nasiennego. Błąd ten powtórzył się na stronie 98.

W rozdziale „**Wyniki i dyskusja**” uzyskane wyniki zaprezentowano w 25 tabelach, na 24 rycinach, 2 tablicach ze zdjęciami mikroskopowymi otoczki chitozanowej (Ryc. 26) i powierzchni biokompozytów (Ryc. 27, mikroskopia SEM). Na trzech rycinach przedstawiono modele obrazujące wpływ pH na współczynnik pęcznienia hydrożeli (Ryc. 17), mechanizm wiązania jonów Cu^{2+} w kompozytach hydrożeli z immobilizowaną biomasą (Ryc. 23) oraz wykres Sankey'a wytwarzania 100 kg nawozu z mikroelementami Cu, Mn oraz Zn (Ryc. 34). Większość wyników poddano wyczerpującej dyskusji. W tej części opracowania, starannie napisanej i zobrazowanej czytelnymi wykresami/tabelami/zdjęciami pojawił się błąd, polegający na powtórzeniu tych samych wyników w kilku tabelach i na rycinach - uwaga dotyczy tabeli 21 i ryc. 30a, tabeli 22 i ryc. 30b (str. 99-101) oraz tabeli 30 i ryc. 33 (str. 110-111). Należy tego unikać. Sądzę, że ryciny lepiej by zobrazowały wpływ dawek nawozowych na wzrost siewek niż tabele. W tej części opisu zabrakło też doprecyzowania (w tabelach), że „świeża masa siewek” (trafniejsze określenie niż „plon”, w przypadku 10-dniowych kiełków), dotyczyła 50 kiełków.

W rozdziale „**Podsumowanie wyników**” Autor zebrał najważniejsze osiągnięcia badań. Mam jednak wątpliwości do sformułowanych wniosków - mają one charakter wyłącznie informacyjny - co zrobiono, wykazano, opracowano... Nie jestem też przekonany do końcowych sugestii w rozdziale „**Wyniki dyskusja**” i we wniosku nr 6, opartych na wysokiej początkowej przyswajalności mikroelementów - czy zawartość mikroelementów pobranych podczas 10 dni kiełkowania nasion może być wskaźnikiem biofortyfikacji roślin? Biorąc pod uwagę brak dyskusji tej części wyników, spodziewam się przybliżenia uzasadnienia dla powyższej sugestii podczas obrony. Nie mogę też pominąć dostrzeżonej w rozdziale „**Bibliografia**” znacznej niestaranności Doktoranta, tym bardziej, że nie było jej w poprzednich rozdziałach. W tytułach wielu artykułów (32) wszystkie wyrazy napisane zostały z dużej litery, często nazwy łacińskie gatunków zostały napisane czcionką regularną zamiast kursywą (13 przypadków), a w 6 cytowanych pracach zabrakło podania źródła ich pochodzenia (czasopisma czy strony internetowej).

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr Dawida Skrzypczaka zwracam uwagę na duże znaczenie aplikacyjne opracowanej technologii i wysoko oceniam wartość naukową samej rozprawy, natomiast zamieszczone uwagi i pytania traktuję jako przyczynek do dyskusji. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia ustawowe wymagania dla prac doktorskich, zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii o dopuszczenie mgr Dawida Skrzypczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lesław Lalenta