

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr inż. Joanny Stegient-Nowickiej zatytułowanej:
Izomery kwasu N,N' -di(2-hydroksylobenzylo)-etylenodiamino- N,N' -dioctowego i aplikacja
ich chelatów w nawożeniu doglebowym

Podstawa opracowania recenzji: *pismo L.dz. WCH/417/MC/2021 prof. dr. hab. Macieja Kubickiego Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 22 października 2021 roku*

Mikroelementy to pierwiastki niezbędne w rozwoju roślin. Uczestniczą w procesie fotosyntezy, przemianach związków azotu i tworzeniu białek, są aktywatorami enzymów w reakcjach biochemicznych, podnoszą odporność roślin na patogeny. Ich brak lub niedobór wpływa negatywnie na plonowanie i jakość plonów. Odgrywają one również istotną rolę w środowisku glebowym, wpływając na równowagę jonową. Niewystarczająca ilość mikroelementów może oddziaływać niekorzystnie na wykorzystanie innych składników pokarmowych. Do grupy tych pierwiastków należy żelazo (Fe). Jego obecność jest konieczna dla procesu fotosyntezy i oddychania, odpowiada on także m.in. za tworzenie się chlorofilu w roślinach. Najbardziej typowym symptomem braku tego pierwiastka w roślinie jest chloroza spowodowana rozpadem chlorofilu w roślinie, a najbardziej podatne na jego niedobór są rośliny kwasolubne, rosnące w glebie o odczynie obojętnym/alkalicznym z wysoką zawartością węglanów oraz niewielką zawartością materii organicznej. Znaczenie żelaza w uprawie roślin jest niewątpliwe, niestety odpowiednie nawożenie utrudnia fakt, iż ten mikroelement nie należy do łatwo przyswajalnych. Istnieje kilka sposobów, aby spotęgować jego udział w odżywieniu roślin. Jednym z nich jest zastosowanie kompleksów kwasu N,N' -di(2-hydroksylobenzylo)-etylenodiamino- N,N' -dioctowego (HBED) z żelazem do stosowania doglebowego. Autorka recenzowanej pracy doktorskiej wpisuje się w wyżej przedstawiony nurt badań naukowych. Mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka zajmuje się tematyką badawczą, istotną zarówno pod kątem poznawczym, jak i pozwalającą na praktyczne wykorzystanie rezultatów badań do modyfikacji obecnie istniejących technologii wytwarzania chelatów Fe do stosowania doglebowego. Praktyczny aspekt ocenianej pracy doktorskiej jest bardzo istotny.

Praca doktorska - o charakterze doktoratu wdrożeniowego - została wykonana w Zakładzie Chemii Koordynacyjnej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr. hab. Romualdy Bregier-Jarzębowskiej, prof. UAM oraz dr inż. Magdaleny Matyniak, opiekuna pracy z ramienia Przedsiębiorstwa Produkcyjno-Consultingowego ADOB Sp. z o.o. Sp. Jawna.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Stegient-Nowickiej liczy 207 stron, zilustrowana jest 84 rysunkami i 60 tabelami. Napisana jest w układzie z podziałem na następujące rozdziały:

- spis stosowanych skrótów (2 strony);
- streszczenie / summary (5 stron);
- wstęp i część teoretyczna (23 strony);
- cel pracy (2 strony);
- część doświadczalna (15 stron);
- wyniki i dyskusja wyników (128 stron);
- podsumowanie i możliwość implementacji badań (10 stron).

Dysertacja kończy się bibliografią (182 pozycje), spisem rysunków i tabel, aneksem (20 stron) oraz wykazem dorobku naukowego Kandydatki (2 publikacje naukowe, w tym jedna opublikowana w czasopiśmie z listy JCR, 4 recenzowane publikacje w materiałach pokonferencyjnych o obiegu krajowym oraz 21 doniesień konferencyjnych (18 krajowych i 3 międzynarodowe), co wskazuje, że wybrane zagadnienia/tezy rozprawy zostały już opublikowane. Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka jest też współautorką jednego patentu i dwóch zgłoszeń patentowych (poświadczenia patentowe i publikacje zostały zamieszczone na końcu dysertacji).

Jak wspomniano, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter doktoratu wdrożeniowego, który powstał w ścisłej współpracy z firmą PPC ADOB. Firma ta opatentowała metodę otrzymywania HBED w formie izomeru *orto-*, *orto-* (*o,o*-HBED) jako czynnika chelatującego żelazo oraz sposób wytwarzania chelatu Fe(III)-HBED. Zgłosiła ponadto kolejny patent dotyczący odmiennej metody syntezy HBED, podczas której otrzymuje się trzy izomery kwasu HBED: *o,o*-HBED, *orto-*, *para-* (*o,p*-HBED) i *para-*, *para-* (*p,p*-HBED). O ile, budowa, właściwości chemiczne oraz możliwości wykorzystania kwasu *o,o*-HBED do tworzenia chelatu żelaza do nawożenia roślin zostały szeroko opisane w literaturze, analogiczne informacje dla kwasów *o,p*-HBED i *p,p*-HBED nie były dostępne. Celem pracy doktorskiej było przeprowadzenie syntezy izomerów *o,p*-HBED i *p,p*-HBED oraz zbadanie ich właściwości pod kątem zastosowania ich jako potencjalnych czynników chelatujących mikroelementy o znaczeniu agronomicznym.

Część doświadczalną pracy Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka poprzedziła przeglądem literatury, w którym przedstawiła znaczenie żelaza w diecie, jego obecność w glebie, wpływ warunków glebowych na dostępność żelaza oraz mechanizm przyswajania tego pierwiastka przez rośliny. Następnie omówiła najważniejsze zagadnienia związane z czynnikami chelatującymi i ich zastosowaniem w rolnictwie. Uwagi dotyczące tego rozdziału, jak i kolejnych części dysertacji, przedstawię nieco później.

Część doświadczalna zawiera opis zastosowanej aparatury, odczynników, metod analitycznych oraz szczegółowe informacje na temat procedur badawczych wykorzystanych w pracach eksperymentalnych. Opisy stosowanych procedur są zawarte także w rozdziale „Wyniki i dyskusja wyników” (np. na stronie 57 przedstawiona jest synteza izomeru *o,o*-HBED bazująca

na reakcji Mannicha). Taki układ dysertacji początkowo może nieco zaskakiwać, niemniej po przeczytaniu całości jest uzasadniony.

Rozdział „Wyniki i dyskusja wyników” został podzielony na czternaście podrozdziałów. W pierwszym Autorka omówiła syntezę kwasu *N,N'*-di(2-hydroksylobenzylo)-etylenodiamino-*N,N'*-dioctowego opartą na reakcji Mannicha; w drugim skoncentrowała się na prezentacji wyników badań dotyczących otrzymywania izomerów *o,p*-HBED i *p,p*-HBED; w trzecim zaprezentowała wyniki spektrofotometrycznego oznaczania czystości izomerów HBED. Kolejny rozdział poświęciła wynikom analizy elementarnej składu izomerów HBED, następny rezultatom wyznaczania stałych protonowania izomerów HBED, zarówno przy użyciu metody potencjometrycznej, jak i spektrofotometrycznej. W rozdziale szóstym porównała wyznaczone wartości stałych K_1 i K_2 uzyskane przy użyciu metody miareczkowania potencjometrycznego i spektrofotometrycznego. W następnym omówiła wyniki badań wyznaczania wartości stałych trwałości chelatów izomerów HBED z wybranymi jonami metali o znaczeniu argonomicznym (cynk(II), magnez(II), mangan(II), miedź(II), wapń(II), żelazo(II), żelazo(III)). Rozdział ósmy poświęciła właściwościom chelatów wynikającym ze stałych trwałości, kolejny komputerowemu modelowaniu stabilności chelatów izomerów HBED. Wyniki badań spektroskopowych chelatów miedzi(II) i żelaza(III) izomerów HBED zostały opisane w rozdziale dziesiątym, struktury chelatów izomerów HBED z metalami w rozdziale dziesiątym. Rezultaty badań oznaczania chelatów żelaza(III) izomerów HBED z zastosowaniem techniki HPLC omówione zostały w rozdziale dwunastym, a badanie stabilności chelatów Ca(II), Cu(II), Mg(II), Mn(II), Fe(II) i Fe(III) z izomerami HBED w rozdziale trzynastym. W ostatnim w tej części dysertacji rozdziale, Autorka zaprezentowała wyniki doświadczeń biologicznych przeprowadzonych z wykorzystaniem soi warzywnej (*Glycine max* (L.) Merrill), odmiana Obelix, i różnych podłoży (doświadczenia w glebie i w warunkach hydroponiki). Do doświadczeń glebowym wykorzystwała dwa rodzaje gleb o wysokim pH, tj glebę z Hiszpanii (region Walencja) oraz glebę z Polski (okolice Bronisław – Wisła). Doświadczenia w układzie hydroponicznym prowadziła utrzymując korzenie soi w roztworze pożywki zawierającej różne stężenia żelaza(III) i prowadząc eksperyment przez 23 dni. Uzyskane wyniki badań porównała z danymi otrzymanymi dla chelatów Fe(III) tworzonymi z izomerem *o,o*-HBED oraz kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) i kwasem etylenodiamino-*N,N'*-di[orto-hydroksyfenylooctowym] (EDDHA).

Każdy rozdział tej części dysertacji kończy się krótkim podsumowaniem uzyskanych wyników, co znacząco ułatwia podążanie za tokiem rozumowania i pozwala na systematyczne porządkowanie danych. Należy podkreślić niezwykłą staranność Autorki w dokumentowaniu rezultatów badań. Zostały one zobrazowane na rysunkach i przedstawione w tabelach, umieszczonych zarówno w tej części rozprawy doktorskiej, jak i w aneksie.

Zaprezentowane wyniki badań dowodzą, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty. Synteza kwasu *N,N'*-di(2-hydroksylobenzylo)-etylenodiamino-*N,N'*-dioctowego oparta na reakcji Mannicha prowadzi do uzyskania trzech izomerów tego związku, przy czym dominującym izomerem jest

izomer *o,p*-HBED. Zaproponowany, nowy sposób syntezy izomeru *o,p*-HBED i *p,p*-HEBD pozwala uzyskać je z wydajnością odpowiednio 51% i 55%, a czystość tych związków kształtuje się na poziomie 85,9% (*o,p*-HBED) i 93,4% (*p,p*-HEBD). Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka wyznaczyła stałe protonowania izomerów HBED i dowiodła, że mają one zdolność do tworzenia chelatów z jonami Ca(II), Cu(II), Fe(II) i Fe(III), Mg(II), Mn(II) i Zn(II) oraz określiła ich stałe trwałości. Wykorzystując techniki spektroskopowe zaproponowała możliwe sposoby koordynacji tworzących się chelatów w układach M(II) / izomer HBED oraz M(III) / izomer HBED. Udowodniła m.in. że w roztworach wodnych zawierających dużą ilość jonów Ca(II) w zakresie pH od 2 do 13 najwyższą stabilnością charakteryzuje się chelat F(III)-*o,o*-HBED, najniższą chelaty Fe(III)-*p,p*-HBED i Fe(II)-*p,p*-HBED w roztworach o pH 7-9. Potwierdziła także, że chelaty Mg(II), Zn(II) i Cu(II) z izomerami HBED mają wyższą stabilność niż komercyjnie dostępne z EDTA. Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka wykazała ponadto, że chelaty Fe(III) z izomerami *o,o*- i *o,p*-HBED mogą być z powodzeniem stosowane w roztworach przeznaczonych do hydroponiki, natomiast chelat Fe(III)-*p,p*-HBED nie jest zalecany z uwagi na niską stabilność. Badania stabilności chelatów Fe(III) w warunkach glebowych dowiodły m.in. najwyższą stabilność chelatu F(III)-*o,o*-HBED (80% - 85%), podczas gdy izomer *p,p*-HBED wykazywał najniższe powinowactwo do żelaza występującego w naturalnych glebach. Jednocześnie izomer ten tworzył stabilne chelaty z Cu(II), Mn(II) i Zn(II). Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka nie zauważyła wpływu zastosowania różnych dawek żelaza na wartość współczynnika zazielenienia (SPAD indeks) liści soi rosnącej na testowanych glebach, natomiast zaobserwowała wpływ chelatu Fe(III)-EDTA na rozwój roślin. Autorka dysertacji wykazała brak istotnych różnic w zawartości chlorofilu podczas stosowania zróżnicowanych dawek żelaza. Pomiar wielkości roślin wskazywał natomiast, że wprowadzenie chelatu Fe(III)-EDTA do gleb alkalicznych skutkuje zahamowaniem wzrostu roślin. Analogiczny wynik Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka odnotowała podczas eksperymentów prowadzonych z użyciem gleby Wisła i chelatu Fe(III)-*o,o*-EDDHA. Z kolei najwyższy wzrost soi zaobserwowała podczas wprowadzania chelatów Fe(III)-*o,o*-HBED i Fe(III)-*o,p*-HBED do gleby Hiszpania oraz chelatu Fe(III)-*o,o*-HBED do gleby Wisła. To potwierdziło, że do niwelowania niedoborów żelaza w glebach alkalicznych najlepiej nadaje się chelat Fe(III)-*o,o*-HBED, podczas gdy właściwości chelatu Fe(III)-*o,p*-HBED są porównywalne do komercyjnie dostępnego Fe(III)-*o,o*-EDDHA. Ponadto, wykazała brak skuteczności działania chelatu Fe(III)-*p,p*-HBED, który dodatkowo może zwiększać stężenie manganu do poziomu uznawanego za fitotoksyczny. Udowodniła również, że nie należy stosować chelatu Fe(III)-EDTA do gleb alkalicznych z wysoką zawartością węglanów. Badania biologiczne prowadzone w układzie hydroponicznym wykazały, że użycie jako nawozu chelatu Fe(III)-*p,p*-HBED prowadzi do spadku zazielenienia liści. Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka dowiodła ponadto, że najlepsze rezultaty w układzie hydroponicznym osiąga się stosując chelat Fe(III)-*o,o*-HBED, natomiast zastosowanie Fe(III)-*o,p*-HBED nie wpływa negatywnie na rozwój roślin. Wyniki analizy elementarnej potwierdziły, że zawartość C, H, N i S w badanych roślinach jest stabilna i niezależna od nawożenia chelatem żelaza(III).

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Stegient-Nowickiej zaliczam:

- 1) Zaproponowanie efektywnego sposobu syntezy izomeru *o,p*-HBED i *p,p*-HEBD;
- 2) Wyznaczenie wszystkich sześciu stałych protonowania każdego z izomerów HBED za pomocą metody potencjometrycznej i udowodnienie, że uzyskane wartości w porównaniu z danymi wyznaczonymi przy użyciu metody spektrofotometrycznej nie różnią się w sposób statystycznie istotny;
- 3) Wyznaczenie stałych trwałości chelatów jonów Ca(II), Cu(II), Mg(II), Mn(II), Fe(II) i Fe(III) i Zn(II) z izomerami HBED, które mają mieć potencjalne znaczenie agronomiczne;
- 4) Wyznaczenie potencjałów redoks dla układów Fe(III)/Fe(II) z ligandami;
- 5) Wyznaczenie dla chelatów ML izomerów HBED warunkowych stałych trwałości w zależności od pH;
- 6) Przeprowadzenie komputerowych symulacji zachowania się chelatów w roztworach wodnych przy użyciu odpowiedniego oprogramowania;
- 7) Całokształt badań biologicznych.

Uwagi, które nasunęły mi się podczas studiowania niniejszej rozprawy doktorskiej są następujące:

- Skróty zaprezentowane w wykazie nie są podane w porządku alfabetycznym, co utrudnia znalezienie poszukiwanego akronimu. Często też nie ma podanej anglojęzycznej nazwy. Dlaczego Autorka zdecydowała się na taką formułę?
- Streszczenie / Summary. Ta część rozprawy doktorskiej powinna być zwartym podsumowaniem uzyskanych wyników. W rzeczywistości obrazuje bardziej zakres wykonanych prac niż prezentację wyników/wniosków.
- Tekst jest napisany ładnym, merytorycznie poprawnym językiem, choć czasami zdarzają się niepoprawne sformułowania, błędy stylistyczne czy błędy edytorskie. Jako przykład podam sformułowanie na stronie 10: zamiast „...aby uzyskać jak najlepsze rozdziały dla sygnałów...”, powinno być „...aby uzyskać jak najlepsze rozdzielanie sygnałów...”; nie „amorficzny wodorotlenek żelaza(III)”, tylko „amorficzny wodorotlenek żelaza(III)”; często stosowane sformułowanie (np. na stronie 46) „...analizy...przeprowadzone były na jednostce HPLC...” zamiast „...analizy...przeprowadzone zostały przy użyciu/pomocy/zastosowaniu jednostki HPLC...”; strona 70 „wykwazanie z użyciem kwasu solnego” zamiast „zakwaszanie z użyciem kwasu solnego”; sformułowanie na stronie 148 „Glebę Hiszpania i Wisła osiano przez sito laboratoryjne...” nie jest zbyt fortunne.
- W rozprawie doktorskiej Autorka często prezentuje najpierw skrót/akronim danego związku, później w nawiasie pełną jego nazwę. W mojej ocenie powinno być odwrotnie.
- W części teoretycznej brakuje rozdziału poświęconego strukturze, właściwościom chemicznym oraz możliwościom wykorzystania kwasu *o,o*-HBED do tworzenia chelatu żelaza

stosowanego do nawożenia roślin, gdyż jest to układ odniesienia dla izomerów *o,p*- i *p,p*-HBED. Prezentacja dostępnych danych literaturowych ułatwiłaby interpretację badań dla pozostałych izomerów.

- Strona 28. Wzór 11. Brakuje wyjaśnienia symbolu β .
- Strona 47. Rozdział 4.3.4. Czy na pewno było to analiza elementarna C, H, H, S?
- Strona 50. Rysunek 10. Kształt zaprezentowanej krzywej zależności powierzchni sygnału od stężenia jonów Cl^- wskazuje, iż powstała na bazie łączenia punktów. Czy jest to prawidłowe podejście?
- Analiza widm ^1H i ^{13}C NMR. Widma NMR zamieszczone w aneksie - zarówno protonowe jak i węglowe - potwierdzają strukturę opisywanych związków, niemniej ich interpretacja (przyporządkowanie sygnałów do odpowiednich grup protonów/atomów węgla, opis ich multipletowości, sposób całkowania/integrowania sygnałów) budzi pewne zastrzeżenia. Dziwi na przykład dlaczego 9 protonom pochodzącym z trzech grup metylowych przyporządkowano podczas całkowania wartość 1 (np. Rys. A7). Oczywiście można tak zrobić, ale zdecydowanie utrudnia to analizę ilościową pozostałych sygnałów na widmie. Sygnał odpowiadający protonom pochodzącym z grup metylowych opisywany jest raz jako multiplet (Rys. A7), raz jako singlet (Rys. A10). Dlaczego? Przyporządkowanie sygnału przy 130.15 ppm atomowi węgla G też nie jest zrozumiałe, gdyż jego intensywność jest zbyt wysoka jak na jeden tzw. czwartorzędowy atom węgla (Rys. A8). Na Rysunku A11 brakuje przyporządkowania sygnału atomowi węgla pochodzącemu z grupy CH_2 . Rysunek A16 przedstawia widmo ^1H NMR, natomiast Rys. A17 widmo ^{13}C NMR tego samego związku. Dlaczego sposób prezentacji tej struktury przez Autorkę dysertacji nie jest konsekwentny (*o,p*- na Rys. A16 i *p,o*- na Rys. A17)? Proszę wyjaśnić, dlaczego uznała Pani, że przyporządkowanie tych samych symboli atomom węgla i protonom pochodzącym z układu *orto* i *para* jest właściwe (Rysunek A16 i A17). Integracja niepoprawnie „sfazowanych” sygnałów (Rys. A20) nie może być wykorzystywana do analiz ilościowych.
- Strona 117. Rysunek 44. Dlaczego wartości pH prezentowane na rysunku w częściach: A, B i C różnią się między sobą?
- Strona 125. Czy wniosek „.....stwierdzono, że zmniejszenie ilości acetonitrylu jako rozpuszczalnika polarnego powoduje wydłużenie czasu retencji [144].” na pewno jest właściwy?
- Strona 143. Rysunek 56 i dalsze. Byłoby właściwe, aby Autorka stosowała te same kolory oznaczeń czynników chelatujących w całej pracy.

Pomimo powyższych uwag wysoko oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską, a wspomniane drobne uchybienia nie obniżają jakości prezentowanych wyników. Należy podkreślić, że badania zostały bardzo starannie zaplanowane i zrealizowane, zaś zastosowany warsztat analityczny nie budzi zastrzeżeń merytorycznych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Stegient-Nowickiej w pełni odpowiada wymogom i warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowym i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.). Jak wspomniałam, przedstawione uwagi nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej. Praca charakteryzuje się znaczącą wartością aplikacyjną opracowanych w rozprawie doktorskiej rozwiązań i zawiera szereg elementów nowości naukowej. Przedstawione wyniki badań świadczą o umiejętności rozwiązywania przez Autorkę problemów metodologicznych i doświadczalnych, a także potwierdzają, że Pani mgr inż. Joanna Stegient-Nowicka posiada wiedzę i umiejętności wymagane do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Wobec powyższego wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Jolanta Kumirska, prof. UG