



Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Ochrony Powietrza

Dr hab. inż.

Wioletta Przysaś Prof. PŚ

Gliwice, 4.01.2024 r.

RECENZJA rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Misiołek

pt. „Proces biocementacji gruntów z wykorzystaniem bakterii ureolitycznych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Pawła Popielskiego, prof. PW i
promotor pomocniczej dr Katarzyny Affek

Formalna podstawa pracy

Niniejsza recenzja została opracowana na podstawie pisma Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Warszawskiej, Pana Prof. dr hab. inż. Tomasza Wiśniewskiego (z dnia 28.11.2023), o powołaniu mnie decyzją Rady Dyscypliny z dnia 21 listopada 2023 r. (Uchwała 110/II/2023), na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr inż. Katarzyny Misiołek.

Celowość podjęcia tematu

Tematyka przedstawiona w rozprawie dotyczy poprawy właściwości fizykochemicznych gleb lekkich (piaszczystych) dzięki wykorzystaniu bakterii ureolitycznych pozyskanych lokalnie z różnych matryc środowiskowych. Wciąż rosnące zapotrzebowanie na materiały wykorzystane podczas różnych etapów budowy, a także konieczność wykorzystania różnorodnych terenów, wiąże się z ich odpowiednim przygotowaniem, co stanowi narastający problem i ma ogromne konsekwencje dla środowiska. Jednym z podstawowych problemów jest odpowiednia stabilizacja podłoża pod budownictwo, czyli zmiana właściwości wytrzymałościowych gruntów. Jest to podstawą do stałego poszukiwania efektywnych i tanich metod poprawiających właściwości gruntów bez nadmiernego użycia chociażby cementu.

Politechnika Śląska
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Ochrony Powietrza
ul. Konarskiego 22 B, pok. 306, 44-100 Gliwice
+48 32 237 29 31
wioletta.przystas@polsl.pl

NIP 631 020 07 36
ING Bank Śląski S.A. o/Gliwice 60 1050 1230 1000 0002 0211 3056



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Katedra Ochrony
Powietrza

Biocementacja, która jest tematem rozprawy doktorskiej przedstawionej przez Panią mgr inż. Katarzynę Misiołek, wpisuje się zatem dobrze w tematykę geotechniki. Biorąc pod uwagę fakt wykorzystania naturalnych zdolności mikroorganizmów do stabilizacji gruntów piaszczystych, praca ta dobrze wpisuje się w trendy badawcze w zakresie inżynierii środowiska, w szczególności w ostatnich latach. Tematyka podjęta przez badaczkę w pracy jest jak najbardziej aktualna, a wyniki pracy mogą zostać w przyszłości wykorzystane w opracowaniu mało inwazyjnych metod poprawy jakości gruntów.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 196 stron maszynopisu, w tym 16 tabel w części głównej pracy, 36 rysunków, 42 fotografie i 3 obszerne załączniki, w których zaprezentowano wyniki analiz granulometrycznych, wyniki badań wytrzymałości na ścinanie i badań składu fazowego XRD. W dobry sposób ilustrują one uzyskane osiągnięcia. Do pracy załączono również zdjęcia z mikroskopu SEM.

Bibliografia obejmuje w rzeczywistości 77 pozycji (jedna pozycja została nie w pełni zapisana w spisie bibliografii – pozycja 59 łączy w sobie dwie). Spośród nich 3 to wykorzystane w badaniach normy, 6 stanowią strony internetowe.

W ramach pozostałych 68 pozycji znajdują się monografie (w tym jedna zagraniczna i 8 książek/skryptów polskich), pozostałe publikacje to artykuły w tym 62 to pozycje wydane po roku 2000 (prawie 60% stanowią pozycje wydane w roku 2015 i później). Jedną z publikacji to publikacja własna autorki. Wśród pozycji literaturowych znalazła się również jedna pozycja z lat 50-tych (pozycja 41) i jedna z roku 1973 (pozycja 44). Biorąc pod uwagę aktualność stosowanych obecnie metod oznaczania aktywności ureazy czy też wykorzystania tego typu organizmów wydaje się, że należałoby, szczególnie w przypadku pozycji 44, odnieść się również do nowszych źródeł. Należy jednak podkreślić, że mimo tych dwóch powołań, dobór pozycji wskazuje, że badaczka na bieżąco śledzi literaturę naukową w zakresie omawianej tematyki.

Recenzowana rozprawa ma charakter doświadczalny i w tym zakresie ma właściwą konstrukcję. Struktura pracy jest logiczna i zwięzła.

Po krótkim wprowadzeniu badaczka zaprezentowała przegląd aktualnego piśmiennictwa stanowiący odpowiednie uzasadnienie podejmowanej problematyki badawczej. W kolejności omówiono podstawowe zasady procesu biocementacji, w tym reakcje jakie zachodzą w środowisku pod wpływem działania bakterii ureolitycznych, a także znaczenie tego procesu we

wzmacnianiu gruntu oraz materiałów konstrukcyjnych. Rozdział ten kończy przegląd literatury dotyczący możliwych sposobów identyfikacji mikroorganizmów aktywnych w procesie biocementacji, które zostały przez autorkę zastosowane. Zawarte w tej części pracy informacje w zwięzły sposób wskazują na znajomość tematyki i warsztatu, jaki badaczka wykorzystała w trakcie prowadzonych analiz.

W rozdziale 2 przedstawiono tezę pracy i związany z nią cel główny jakim było określenie przydatności bakterii ureolitycznych pozyskanych ze środowiska naturalnego, a dokładniej na terenie województwa mazowieckiego, do efektywnej stabilizacji gruntu. W dalszej części rozdziału opisano zakres badań mikrobiologicznych i geotechnicznych.

Rozdział trzeci dotyczy metodyki badawczej i został podzielony na kilka części tematycznych. W pierwszej części opisano metodykę badań mikrobiologicznych, w tym sposób izolacji mikroorganizmów ureolitycznych ze środowisk – ujęto tutaj m.in. źródła pochodzenia szczepów środowiskowych, sposób izolacji, a dokładniej procedurę i stosowane w jej trakcie podłoża hodowlane, przyjęte wytyczne służące selekcji szczepów wykorzystanych do dalszych badań, a także metody identyfikacji bakterii w oparciu o badania mikroskopowe, biochemiczne i techniki molekularne. W tej części opisano również metodykę określania aktywności enzymatycznej dotyczącej enzymu ureaza, w tym również w odniesieniu do wykorzystanego w badaniach szczepu referencyjnego *Sporosarcina pasteurii*. Drugi podrozdział opisywał metodykę badawczą z zakresu geotechniki. Określono w nim jaki rodzaj gruntu wybrano i dlaczego, jakie metody stosowano w celu określenia składu granulometrycznego i parametrów fizykochemicznych, takich jak wskaźnik porowatości czy stopnia zagęszczenia. Następnie opisano podłoża stosowane do biocementacji i sposób ich aplikacji oraz pomiar parametrów wytrzymałościowych zbiocementowanego gruntu (spójność i kąt tarcia wewnętrznego). Na uwagę zasługuje tu w szczególności stworzenie systemu pozwalającego na szybszą analizę parametrów dzięki stworzeniu skrzynki drukowanej w 3D, za pomocą której można uzyskać wyniki podobne do skrzynek oryginalnie stosowanych w aparatach bezpośredniego ścinania, co pozwoliło badaczce uniknąć zmian struktury próbek badawczych jednocześnie rzetelnie ocenić zmiany analizowanych parametrów w próbkach inokulowanych mikroorganizmami. W ramach tej części pracy znalazł się również opis analizy struktury zbiocementowania piasku z wykorzystaniem dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), mikroskopu świetlnego czy wreszcie skaningowego mikroskopu świetlnego.

Oryginalne osiągnięcia rozprawy zaprezentowano w rozdziale 4. Doktorantka przedstawiła w nim wyniki badań w podziale jaki zastosowano podczas prezentacji metodyki, zatem obejmujące

wpierw ilość wyizolowanych szczepów, a następnie wyselekcjonowanie 4 najbardziej aktywnych ureolitycznie oraz ich identyfikację za pomocą testów API i z zastosowaniem metod molekularnych. Wyraźnie wskazano na dominację wśród wyizolowanych mikroorganizmów szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*. Następnie dokonano porównania aktywności wyizolowanych szczepów ze szczepem referencyjnym. Druga część tego rozdziału przedstawiała wyniki badań z zakresu geotechniki, w tym skład granulometryczny gruntu, gęstość objętościową, wskaźnik porowatości gruntu i stopień zagęszczenia przed wprowadzeniem inokulum i podłoża. W podrozdziale 4.2.4 przedstawiono wspomniane powyżej parametry (bez porowatości), dla próbek poddanych biocementacji obserwowane po 10, 20 i 40 dniach prowadzenia procesu. Ta część pracy obejmuje również porównanie wytrzymałości na ścinanie próbek w ramach obu zastosowanych do analiz skrzynek (oryginalnej i drukowanej). Rozdziały 4.2.6 i 4.2.7 dotyczą porównania wyników ścinania gruntów odpowiednio przed i po cementacji. W kolejnym rozdziale (4.7.8) przedstawiono wyniki badań próbek z wykorzystaniem dyfraktometrii rentgenowskiej oraz badań mikroskopowych.

W rozdziale 5 pracy, zatytułowanym dyskusja wyników, w zwarty sposób porównano wyniki analiz mikrobiologicznych uzyskane różnymi metodami, opisano również na podstawie literatury możliwe znaczenie różnych gatunków bakterii w procesie biocementacji. Zestawiono również wyniki badań geotechnicznych z wynikami aktywności ureazy. Zestawiono wyniki badań wytrzymałościowych uzyskane z lokalnie wyizolowanymi szczepami z wynikami dla szczepu referencyjnego, o najwyższej aktywności ureolitycznej spośród wszystkich analizowanych. Wyniki analiz porównano z otrzymanymi przez innych badaczy wskazując, że odbiegają one znacząco od doniesień literaturowych, bowiem wszystkie zacytowane przez Autorkę prace wskazują na wzrost zarówno kąta tarcia wewnętrznego jak i spójności gruntu, natomiast przy zastosowaniu wyizolowanych z terenu woj. mazowieckiego szczepów obserwowano jedynie wzrost drugiego z parametrów.

Część badawczą rozprawy kończy rozdział podsumowujący osiągnięcia pracy, przedstawiony w postaci 11 wniosków, w ramach których Doktorantka podkreśliła m.in. że:

- istnieje możliwość pozyskania szczepów ureolitycznych z terenów zurbanizowanych, przy czym dominującą grupę stanowią tutaj szczepy zaliczane do bakterii z rodzaju *Bacillus*;
- zastosowana procedura pozwoliła zwiększyć wartość spójności gleby, szczególnie w przypadku piasku drobnego;

- wartości wytrzymałości na ścinanie oraz nośności gruntu mogą ulegać wahaniom (w tym znaczącym spadkom), w gruntach poddanych biocementacji mimo potwierdzonej zarówno badaniami składu fazowego XRD jak i SEM obecności kalcytu między ziarnami.

W tej części pracy badaczka stwierdziła, że teza przez nią zakładana była słuszna, jednak badania należy kontynuować, ponieważ na chwilę obecną uzyskane wyniki nie pozwalają na zastąpienie konwencjonalnych metod wzmacniania gruntu metodą zaprezentowaną w pracy.

Powyższe rozdziały są poprzedzone wstępem i streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Merytoryczna ocena rozprawy wraz z uwagami i zagadnieniami do dyskusji

Pracę, jako całość, oceniam pozytywnie. Analiza stanu wiedzy, poparta badaniami własnymi Doktorantki, stanowi dobrą podstawę do podjęcia dalszych wyzwań naukowych. Tematyka podjętych badań jest aktualna, a uzyskane rezultaty dostarczają cennych informacji dotyczących potencjalnego wykorzystania lokalnych szczepów mikroorganizmów w biocementacji gruntów. Na szczególną uwagę zasługuje:

- udowodnienie, że w procesie biocementacji można wykorzystać mikroorganizmy o lokalnym pochodzeniu, które w odpowiednich warunkach mogą sprzyjać tworzeniu kalcytu cementującego grunt,
- wykazanie, że dzięki zastosowaniu bakterii można zwiększyć spójność gruntów, szczególnie w przypadku piasków drobnych,
- stworzenie systemu opartego o druk 3D, który pozwala na szybką i dokładną analizę wytrzymałości na ścinanie szeregu próbek w sposób wiernie odzwierciedlający wyniki uzyskane za pomocą oryginalnych skrzynek.

Zastosowana w pracy metodyka jest jak najbardziej aktualna i została dobrze opracowana, w logicznej sekwencji planowanych doświadczeń, potwierdzając dobre przygotowanie Pani mgr inż. Katarzyny Misiólek do realizacji badań naukowych.

W pracy dostrzeżono nieliczne przypadki błędów redakcyjnych, interpunkcyjnych i pojedyncze niewłaściwe sformułowania, jednak nie umniejszają one wartości pracy. Niektóre z nich przytoczono poniżej.

Uwagi, w tym o charakterze dyskusyjnym:

- Na stronie 7 pracy przedstawiono podsumowanie w języku angielskim. Cel jaki podano w wersji angielskojęzycznej nie jest tożsamy z celem przedstawionym w wersji polskiej streszczenia, co należałoby poprawić.
- W tej samej części pracy wymieniono grupę bakterii „uratolytic”. W przypadku późniejszej publikacji wyników nazewnictwo dotyczące bakterii należałoby zweryfikować.
- Na stronie 12 (2 akapit od dołu) pojawia się stwierdzenie, że proces tworzenia się węglanu wapnia zależy od dostępności miejsca zarodkowania. Proszę o przybliżenie dokładniej zjawiska i jego znaczenia.
- Str. 13 - opis podany w akapicie pierwszym nie zgadza się z zacytowaną poniżej reakcją oznaczoną numerem 3. Jak zatem wygląda prawidłowy etap procesu?
- Na stronie 15 być może warto rozważyć inny zapis wzoru 8 – może być on nieco mylący dla osób nie zajmujących się tą tematyką,
- Na str. 21 przy opisie fotografii brak opisu co oznacza symbol \pm .
- W pracy zastosowano jako szczep referencyjny *Sporosarcina pasteurii* – należałoby rozważyć podanie kolekcji i symboli przypisanych w kolekcji już w ramach rozdziału 3.1, kiedy opisuje się wykorzystane mikroorganizmy. Obecnie znajduje się on dopiero 5 stron dalej, czyli na stronie 30, zamiast na 25.
- Proszę o wyjaśnienie, dlaczego próbki do izolacji mikroorganizmów pochodziły z głębokości 1-2 m i dlaczego próbki pobrano właśnie z wykopów, a nie powierzchni ziemi? Co decydowało o miejscach poboru? Wśród próbek znalazły się też dwie próbki wody. Proszę o przybliżenie metod poboru próbek, w szczególności w przypadku próbek wody.
- Na stronie 28 fotografia 9 miała na celu pokazać bakterie o aktywności ureolitycznej. Być może dobrym wyjściem, obrazującym zmiany zachodzące w podłożu, byłoby pokazanie równocześnie płytek kontrolnych.
- Na str. 30 wymieniono posiew głębinowy – powinno być wgłębnny, albo też metodą płytek tartych.
- Przy podawaniu skrótów podłoży (np. TSB i TSA wymienione na str. 30) należałoby skróty rozwinąć i podać skład podłoży, bądź też ich producenta.
- Str. 31 – Jak powinien być przedstawiony zapis dotyczący pomiarów absorbancji? Czy rzeczywiście pomiar absorbancji wykonano w rozdzielnoci 690 nm?
- Str. 32 w przypadku aktywności enzymatycznej nie stosujemy pojęcia ilości. Należy również zweryfikować opisy symboli w ramach wzoru 9 – nie są to próbki, a absorbancje wykazywane przez odpowiednie próbki.

- Na str. 33 pojawia się dość niefortunne sformułowanie, że piasek jest szeroko opisywany w literaturze jako odpowiedni materiał do obserwacji procesu biocementacji – powołano się jedynie na dwie pozycje.
- W pracy pojawia się niewłaściwa odmiana stosowana w przypadku podłoży mikrobiologicznych. W zapisach m.in. na stronie 38 w tytule podrozdziału powinno być l.mn. podłoży nie podłóż.
- W opisie metodyki hodowania mikroorganizmów podano, że próbki były wstrząsane (str. 38). Jakie były parametry wytrząsania prócz temperatury utrzymywanej podczas hodowli? W metodyce pracy ponadto, że stosowane są różne temperatury - przy izolacji i hodowli wstrząsanej w zakresie 36-37 °C, a potem 20 i 26 °C. Proszę o wyjaśnienie skąd taki dobór temperatur na różnych etapach badań?
- W opisie wyników badań (str. 48) pojawia się próba wyjaśnienia zjawiska znacznego wytwarzania przetrwalników bakterii zanieczyszczeniem gruntu z jakiego izolaty pochodziły. Proszę o wyjaśnienie skąd takie domniemanie? Tym bardziej, że zostało ono powielone na str. 92 w rozdziale dotyczącym dyskusji wyników.
- W tabelach 7 i 8 zamieszczonych na str. 59 pracy znajdują się po dwie wartości dla każdego pomiaru. Co to za wartości i z czego one wynikają? Ma to szczególne znaczenie, ponieważ w przypadku stopnia zagęszczenia rozpiętość między wartościami dla piasku średniego jest od 0,5 do 3,4.
- Analiza mikroskopowa SEM przedstawiona od str. 85 została zaprezentowana dla szczepu referencyjnego i szczepów B i C. Dlaczego tylko dla tych szczepów? Załącznik obejmujący analizy mikroskopowe pokazuje 3 szczepy środowiskowe (trudno jednak określić który jest który) oraz szczep referencyjny.
- Niejasny jest dla mnie zapis akapitu drugiego na stronie 95 dotyczącego Szczepów B i C. Proszę o wyjaśnienie co badaczka miała na myśli.
- Na str. 97 w 2 linijce od góry pojawił się zapis pielęgnowano, który raczej nie jest właściwym w zakresie mikrobiologii. Należałoby go zastąpić innym, przyjętym w mikrobiologii wyrażeniem.
- W pracy pojawiają się znaczne wahania parametrów analizowanych po 20 dniach, w stosunku do dnia 10 czy 40 (tab. 15 i 16). Czy Autorka pracy ma jakieś wyjaśnienie tego zjawiska?
- Biorąc pod uwagę, że wyniki uzyskane przez badaczkę są odmienne od tych uzyskanych przez innych autorów, jakim parametrem należałoby się zdaniem Doktorantki kierować przy ocenie procesu biocementowania – wartością kąta tarcia czy wartością spójności?
- Należy poprawić zapisy powołań przytoczone w pozycjach 41 i 44 na stronie 114 w Bibliografii. Proszę o zweryfikowanie zapisów, bowiem nie podają one pełnych informacji o publikacjach.

- W ramach cytowań stron internetowych należałoby podać dokładniej odnośnik do strony zapisanej jako: <https://naukapolska.pl> w chwili obecnej podana strona nie istnieje, co nie pozwala w żaden sposób zweryfikować treści podanych na tej stronie.

Po zapoznaniu się z całością pracy nasuwają się również dwa dodatkowe pytania:

- Czy wykonano analizę statystyczną, która pozwalałaby lub zaprzeczała korelacji między aktywnością ureolityczną poszczególnych szczepów a wynikami wytrzymałości na ścinanie gruntów?
- Czy w opinii doktorantki prócz zastosowania w stabilizacji gruntów pod budownictwo można zastosować podobne zabiegi w celu ograniczenia erozji gleb podatnych na ten proces?

Podsumowując merytoryczną ocenę pracy i poruszaną problematyka badawczą uważam, że stanowi logiczny układ dobrze zaplanowanego procesu badawczego. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematyki badawczej, a zdefiniowane problemy badawcze w pracy zostały zrealizowane zgodnie z założeniami i stanowią cenny dorobek Autorki. Wychwycone braki, uwagi i komentarze nie wpływają na całościową, pozytywną ocenę pracy.

Wniosek końcowy

Oceniając przedstawioną do zrecenzowania rozprawę doktorską pragnę podkreślić następujące jej walory:

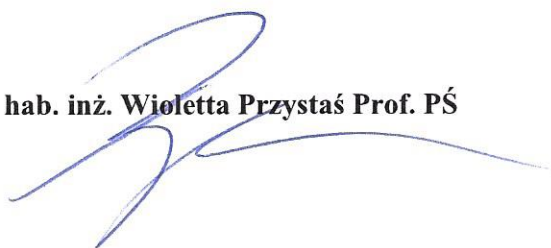
1. Zasadność podjętej tematyki badawczej i sposób jej realizacji,
2. Znajomość i umiejętność przedstawienia aktualnego stanu wiedzy w tej tematyce,
 1. Odpowiedni dobór metod analitycznych i ich wykorzystanie, a także zwięzłe i właściwe interpretowanie złożonych zjawisk.

W pracy badaczka wykazała się wiedzą interdyscyplinarną, a praca stanowi istotny dorobek Doktorantki i znaczący wkład w rozwój inżynierii środowiska.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Misilek zatytułowana „Proces biocementacji gruntów z wykorzystaniem bakterii ureolitycznych” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązujące ustawowe przepisy (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce t.j. Dz.U. z 2020 r. poz.85, z późn. zm.), a także że doktorantka na podstawie przeprowadzonych badań wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego

prowadzenia badań naukowych. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz dopuszczenie do publicznej obrony pracy.

Dr hab. inż. Wioletta Przysaś Prof. PŚ

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'P' followed by a long horizontal stroke.