

dr hab. Andrzej Mazur, prof. UMCS
Katedra Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

Lublin, 13 grudnia 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Janek pt.

“Inteligentne bionanomateriały w betonach samonaprawiających” wykonanej w Katedrze Inżynierii Materiałów Budowlanych i Geoinżynierii, Wydziału Budownictwa i Architektury, Politechniki Lubelskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Franusa i dr Adama Pyzika (promotor pomocniczy)

Rosnące tempo urbanizacji i rozwój infrastruktury sprawia, że innowacje w obszarze budownictwa odgrywają coraz większą rolę w kształtowaniu otaczającego nas świata, a poszukiwanie nowych rozwiązań budowlanych, takich jak samonaprawiające kompozyty cementowe i betony, ma ogromne znaczenie. Współczesne budownictwo stawia przed ludzkością wiele wyzwań m.in. konieczność zrównoważonego rozwoju i ochrony środowiska – redukcja zużycia nowych surowców budowlanych (szczególnie istotna w miastach i terenach, które szybko się rozrastają i gdzie dostępność zasobów naturalnych może być ograniczona) czy ograniczenie emisji CO₂ (produkcja cementu, kluczowego składnika betonu, odpowiada za znaczną część emisji gazów cieplarnianych). Samonaprawiające kompozyty cementowe i betony to odpowiedź na kluczowe wyzwania współczesnej cywilizacji i urbanizacji. Ich zastosowanie może nie tylko ograniczyć degradację środowiska, ale także wydłużyć żywotność, czas eksploatacji i bezpieczeństwo budynków (co jest szczególnie ważne w gęsto zaludnionych obszarach miejskich), pozwolić lepiej przystosować infrastrukturę do zmiennych i często ekstremalnych warunków atmosferycznych. Tego typu materiały doskonale wpisują się w wizję tzw. inteligentnych miast, które wykorzystują nowoczesne technologie do efektywnego zarządzania przestrzenią i zasobami.

W tym kontekście badania podjęte przez Doktorantkę, w Jej rozprawie doktorskiej, dotyczące inteligentnych bionanomateriałów w samonaprawiających się betonach uważam za bardzo aktualne i w pełni uzasadnione. Samonaprawiające kompozyty cementowe charakteryzują się zdolnością do naprawy uszkodzeń strukturalnych w procesach określanych jako autogeniczne oraz autonomiczne. Mechanizmy samonaprawy kompozytów cementowych wykorzystujące bakterie produkujące węglan wapnia (CaCO₃) są coraz bardziej obiecującym rozwiązaniem w technologii budowlanej. Mikrobiologiczne wytrącanie węglanów (MICP) to proces, w którym pod wpływem odpowiednich mikroorganizmów i w specyficznych warunkach mikrośrodowiska dochodzi do powstawania węglanowych związków mineralnych. Bakterie rozproszone w matrycy kompozytu cementowego, dzięki swojej aktywności metabolicznej i obecności prekursorów, stymulują procesy wytrącania węglanów, w szczególności węglanu wapnia, który może wypełniać rysy prowadząc do samonaprawy mikropęknięć. Skuteczność MICP jest wypadkową wielu czynników, m.in. rodzaju zastosowanych mikroorganizmów, warunków środowiskowych, dostępnych substratów odżywczych, skali uszkodzeń oraz rodzaju cementu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Janek liczy 233 strony numerowane i posiada układ typowy dla tego typu opracowań z wydzielonymi rozdziałami takim jak: wstęp, hipoteza badawcza i cel pracy, metody badawcze i materiały, wyniki oraz piśmiennictwo. W opracowaniu znajdują się także streszczenia (w języku polskim i angielskim), informacje na temat finansowania badań, spisy tabel i rysunków oraz obszerne



załączniki, zawierające wykaz norm oraz szczegółowe dane ze statystycznej analizy wyników. Tekst pracy jest poprzedzony spisem treści i wykazem skrótów. W mojej ocenie podział treści pracy i proporcje poszczególnych rozdziałów są prawidłowe.

We wstępie Doktorantka logicznie i konsekwentnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie. Opisuje kolejno mechanizmy samonaprawy kompozytów cementowych, zjawisko mikrobiologicznego wytrącania węglanów, czynniki wpływające na przebieg tego procesu oraz wpływ środowiska matrycy cementowej na aktywność metaboliczną bakterii. Przedstawia także samonaprawiające się zaprawy i betony, metody aplikacji bakterii do kompozytów cementowych oraz aktualny stan wiedzy na temat efektywności stosowania metody MICP w tych materiałach. Taki rozkład akcentów dotyczących treści wstępu jest bardzo trafny. Zasadniczo wstęp jest napisany poprawnym językiem i czyta się go dobrze.

Jednak z obowiązku recenzenta w odniesieniu do pierwszej części rozprawy mam także kilka krytycznych uwag dotyczących nieprecyzyjnych lub niefortunnych sformułowań szczególnie odnoszących się do „sfery mikrobiologicznej” rozprawy.

Str. 8. wykaz skrótów

Doktorantka definiuje oznaczenia „IV i V” jako zaprawy zawierające składniki odżywcze itd. oraz endospory *B. subtilis* rozpuszczone w wodzie zarobowej. O ile składniki odżywcze rzeczywiście mogą się rozpuścić, o tyle endospory z pewnością nie ulegają rozpuszczeniu. Dlatego bardziej precyzyjne jest stwierdzenie, że była to zawiesina endospor.

JTK (Jednostki Tworzące Kolonie, ang. CFU – Colony Forming Units) odnosi się do liczby żywych i zdolnych do namnażania komórek bakterii (lub endospor) w próbce o określonej objętości, które są w stanie utworzyć kolonie na odpowiednim podłożu mikrobiologicznym. „Wartość jednostek komórek bakterii” brzmi niejasno. Na szczęście w dalszej części rozprawy Doktorantka opisuje ten skrót już poprawnie.

Wstęp

Nie do końca podoba mi się sformułowanie „stężenie komórek bakterii” wielokrotnie stosowane przez Doktorantkę w pracy. W przypadku bakterii lepiej chyba mówić o ich mianie (czyli liczbie jtk), lub gęstości zawiesiny, którą można zmierzyć np. spektrofotometrycznie. Jeśli już chcemy koniecznie użyć zwrotu stężenie komórek należy podać wymiar czyli „jtk/ml”

Str. 24 „szczep bakterii *Thiobacilli*”: raczej szczepy bakterii z rodzaju *Thiobacillus*, albo spolszczając „*Thiobacillus*”

Str. 24 powinno być raczej: Typowe środowisko wytrącania węglanów charakteryzuje się dużym stężeniem kationów wapnia i małym stężeniem protonów wodorowych

Str. 25 zamiast „wymaga aktywnego wewnątrzkomórkowego eksportu jonów wapnia” powinno być raczej „wymaga aktywnego eksportu wewnątrzkomórkowego wapnia”

Rys. 2.5 Powinno być bakterie fotosyntetyzujące: algi i sinice, bakterie purpurowe itp.

Str. 29 „W proces denitryfikacji zaangażowane są cztery różne enzymy, spośród których każdy ma inną lokalizację w strukturach komórkowych” to jest nieprecyzyjne sformułowanie, ponieważ bakterie nie mają struktur komórkowych takich jak komórki eukariotyczne; w denitryfikacji biorą udział enzymy, z niektóre z nich związane są z błoną komórkową (np. zakotwiczone w niej), a inne zlokalizowane są w cytoplazmie.

Str. 35 doktorantka pisze o szczepach, a wymienia nazwy rodzajów lub co najwyżej gatunków bakterii

Str. 36, Tabela 2.3: co do zasady nazwy rodzajowe i gatunkowe bakterii piszemy kursywą, spośród wymienionych w tabeli większość gramododatnich rzeczywiście tworzy endospory, natomiast bakterie gramujemne tworzą spory niesłychanie rzadko, nie znam przypadków tworzenia tego typu struktur przez bakterie *P. aeruginosa* czy *E. coli*.

Str. 36. „Powłoka” endospory to struktura bardzo złożona, zbudowana nie tylko z białek (ten komponent dominuje w warstwie zwanej płaszczem), która nadaje jej wysoką odporność na niekorzystne czynniki zewnętrzne:

Ponadto we wstępie pojawiają się liczne sformułowania, które stanowią przykład tzw. kalki językowej, czyli zbyt dosłownego tłumaczenia tekstu angielskiego np.:



Str. 43 „Z uwagi na możliwe trudności z aplikacją i zatrzymaniem roztworów naprawczych wewnątrz spękania, inne techniki zapobiegania temu zjawisku, obok materiałów mineralnych, są proponowane w literaturze.”

Str. 45 „Środki naprawcze wytwarzane poprzez impregnację nośników mogą składać się wyłącznie z materiału pokrytego na powierzchni i/lub wewnątrz porowatej struktury bakteriami”

Str. 46 „Ponadto, różne materiały były dotąd proponowane jako ewentualne zewnętrzne warstwy ochronne”.

Str. 46. Piszac o wartości „stężenia bakterii, endospor” trzeba koniecznie dopisać jednostkę w tym przypadku za pewne chodziło o „jtk”

Mam też pytania związane z tym rozdziałem

Str. 26. Napisano: „W przypadku zajścia niekompletnej reakcji podczas denitryfikacji uwalniane są tlenki azotu, natomiast skutkiem beztlenowego utleniania metanu oraz redukcji siarczanów jest powstawanie łatwopalnego i toksycznego gazu H_2S ”. Czy biorąc pod uwagę skalę użycia bakterii w procesach samonaprawy te produkty uboczne mogą stanowić rzeczywiste zagrożenie?

Str. 47 W charakterystyce technik immobilizacji biologicznych środków naprawczych na nośnikach jest wymienione mieszanie m.in. z użyciem sonikatora. Stosowanie ultradźwięków jest jednym ze sposobów dezintegracji komórek bakterii, czy w związku z tym użycie tej metody nie wpływa negatywnie na liczbę mikroorganizmów immobilizowanych na nośnikach?

Str. 55 Jak wygląda użycie mikroskopii fluorescencyjnej, stosowanej do obserwacji gojenia spękań, dostarczające informacji na temat zmian porowatości kompozytów cementowych zawierających biologiczne środki naprawcze. W technikach fluorescencyjnych potrzebny jest zwykle jakiś komponent emitujący świecenie pod wpływem określonej długości fali świetlnej. Czy w takich badaniach chodzi o znakowanie np. komórek bakterii lub produktów ich metabolizmu tego typu znacznikami?

Problemem naukowym pracy była ocena zdolności zaleczania spękań w kompozytach cementowych za pomocą biologicznych środków naprawczych, opracowanych na bazie ureolitycznego szczepu bakterii *Bacillus subtilis* oraz odpowiednich składników odżywczych i prekursorów reakcji wytrącania. W mojej opinii jasność sformułowania hipotezy badawczej nie budzi żadnych zastrzeżeń, a zaplanowane (opisane dokładnie w celach cząstkowych) i zrealizowane prace w pełni odpowiadają na postawione pytania.

Mam jedynie drobne zastrzeżenie, co do brzmienia pkt 3 celu cząstkowego: „szczegółowe wyjaśnienie wpływu czynników warunkujących proces MICP (m.in. stężenie jonów wapnia oraz rozpuszczonego węgla nieorganicznego, pH, obecność mikroorganizmów, właściwości materiału, w środowisku którego zachodzi proces) na jego efektywność w obecności wybranego szczepu bakterii – czy można rozpatrywać obecność mikroorganizmów jako czynnik wpływający na proces MICP, skoro on z definicji jest uzależniony od ich obecności i aktywności ?”

Plan badań został logicznie podzielony na 3 etapy, a w każdym zaplanowano określony ciąg eksperymentów. Plan badań jest hierarchiczny i prawidłowy ułożony.

W następnym rozdziale Doktorantka opisuje metodykę i materiały zastosowane w swojej pracy badawczej. Rozdział ten przedstawiono z odpowiednią dokładnością, co warunkuje możliwość powtórzenia analizy przez innych badaczy. W doświadczeniach uwzględniono odpowiednią liczbę powtórzeń, opisano stosowane układy kontrolne oraz testy statystyczne użyte w ocenie rozrzutu uzyskanych wyników. Wachlarz stosowanych metod służących analizie właściwości zapraw cementowych i betonów dobrano poprawnie, tego typu analizy są rutynowo używane w badaniach jakości tych materiałów. Pojawiają się w nich także elementy uczenia maszynowego. W metodach wytrzymałościowych przywołano stosowne normy, które zawierają wartości referencyjne dla uzyskiwanych pomiarów. Metody mikrobiologiczne są raczej podstawowe, ale należy jasno powiedzieć, że są one adekwatnie dobrane do zakładanych celów pracy. Natomiast to, co uważam za cenne w metodyce i planie



badania to dobrze opracowany schemat badawczy składający się z serii obejmujących różne ścieżki wytrącania węglanów, w zależności od zastosowanych źródeł węgla (mocznik, mleczan wapnia i octan wapnia), rodzajów i źródeł jonów (wapń i magnez), który pozwolił wytypować najbardziej prawdopodobny przebieg procesu MICP w testowanych układach. Z obowiązku recenzenta wymieniam także moje drobne uwagi/wątpliwości dotyczące tego podrozdziału.

Na stronie 67 w opisie badania przeżywalności bakterii Doktorantka napisała, że żywotność bakterii unieruchomionych na nośnikach oceniano na podstawie wartości jtk, a testy polegały na zliczeniu komórek bakterii hodowanych na standardowej pożywce LB. Z pewnością liczono kolonie bakterii a nie komórki. Liczba kolonii pośrednio mówi o liczbie komórek/spor, które mogły je utworzyć.

Str. 67 podrozdział „Wytrącanie węglanów w warunkach kontrolowanych” Mam zastrzeżenie co do użycia ekstraktu drożdżowego – skoro zakładane są kontrolowane warunki, to stosując ekstrakt trudno ocenić jednoznacznie, który jego składnik może wpływać na przebieg MICP ze względu na sposób przygotowania tego suplementu. Poza tym trudno wyobrazić sobie użycie ekstraktu w skali poza-laboratoryjnej. To nie jest bezpośredni zarzut pod adresem badań zaplanowanych przez Doktorantkę, tylko dotyczy raczej samej koncepcji użycia ekstraktu drożdżowego.

Str. 74 podrozdział „Oznaczenie zawartości porów” napisano: powierzchnie analizowane spryskano roztworem spor bakterii *Bacillus subtilis*, poprawniej byłoby napisać „zawiesiną spor bakterii”.

Rozdział wyniki przedstawiono w formie połączonej z elementami dyskusji: Doktorantka na bieżąco komentuje i zestawia wyniki swoich doświadczeń z danymi literaturowymi, co jest rozwiązaniem często praktykowanym i w mojej ocenie bardzo dobrym. Wyniki bardzo obszernych badań przedstawiono w trzech częściach, które odpowiadają etapom planu badawczego.

Etap I obejmował syntezę i charakterystykę nośników, przygotowanie endospor *B. subtilis*, wybór metody immobilizacji bakterii na nośnikach, a także optymalizację składu roztworów odżywczych dla bakterii oraz prekursorów reakcji wytrącania. Ten etap badań został bardzo drobiazgowo zrealizowany i obszernie opisany w pracy. Duży nacisk na realizację tego etapu jest uzasadniony, jako że stanowił on krytyczny punkt dalszych badań. W ramach I etapu określono także wpływ nośników na wytrzymałość zapraw cementowych, żywotności bakterii immobilizowanych na różnych nośnikach, współczynnik zmniejszania powierzchni rys, skład fazowy oraz mikrostrukturę produktów wytrącania węglanu wapnia.

Doktorantka wykazała, że zastosowane nośniki tj. diatomit, halozyt i zeolity miały zróżnicowany wpływ na wytrzymałość (rozciąganie przy zginaniu i ściskanie) zapraw cementowych (korzystny efekt dla zeolitów). W różnym stopniu pozwalały także na obniżenie pH roztworu (pod tym względem najlepiej spisywał się diatomit). Stwierdzono, że żywotności bakterii na nośnikach zależała w pewnym stopniu od sposobu przygotowania zawiesiny oraz sposobu immobilizacji bakterii. Niestety w większości preparatów odnotowano spadek liczby bakterii na nośnikach wraz z upływem czasu, który po 90 dniach sięgał niemal 100%. Rzeczywiście spadek w ujęciu procentowym był duży, choć jak opisano w pracy przekładał się na ciągle dość wysokie (bo rzędu 10^7) miano bakterii. Wydaje się zatem, że to nie sama przeżywalność, ale inne czynniki wpływają na niską wydajność procesu MICP wykazaną w dalszej części pracy (biorąc pod uwagę fakt, że użyto materiały po 7 dniach od impregnacji i wydajność samonaprawy na drodze MICP była niska, to w perspektywie długoterminowej należy się spodziewać że będzie praktycznie zerowa). Mimo to wykazano, że bakterie *B. subtilis* były zdolne do wytrącania produktów naprawczych, a efektywność tego zjawiska była większa w tzw. ścieżce ureolitycznej. Ten wynik pozostaje w zgodności ze właściwościami metabolicznymi tego gatunku. Doktorantka potwierdziła silny, pozytywny wpływ jonów magnezowych na zaleczanie rys w warunkach naśladujących odczyn matrycy cementowej (czyli w wysokim alkalicznym pH), co koreluje z wykryciem w badaniach mikrostrukturalnych brucytu (wodorotlenku magnezu) i sugeruje, że rzeczywiście w tym układzie dominują procesy niezależnie od mikroorganizmów. Doktorantka słusznie zauważa jednak, że nie da się zupełnie



wykluczyć wpływu mikroorganizmów. Pojawia się tylko pytanie, jakie to mogą być mikroorganizmy biorąc pod uwagę fakt, że warunki eksperymentu nie były mikrobiologicznie sterylne. Do tej uwagi nawiązałem w ostatniej części recenzji.

Etap II obejmował badanie cech mechaniczno-wytrzymałościowych zapraw cementowych z biologicznymi środkami naprawczymi przygotowanymi na bazie odpowiednich nośników, bakterii *B. subtilis* oraz składników odżywczych i prekursorów reakcji wytypowanych w pierwszym etapie prac. Doktorantka wykazała, że składniki naprawcze negatywnie wpływały na parametry wytrzymałościowe (ściskanie i rozciąganie) zapraw cementowych. Jednocześnie wykazano jedynie niewielki wpływ biologicznych składników środków naprawczych na parametry wytrzymałościowe zapraw cementowych, co nie wyklucza kompatybilności biokomponentów z kompozytami cementowymi. Wyniki realizacji tego etapu wskazały, że dominującą rolę w wytrącaniu osadów naprawczych odgrywały procesy abiotyczne związane z obecnością w roztworach stosowanych do naprawy określonych jonów (głównie magnezowych), podczas gdy proces biologiczny mógł mieć jedynie charakter wspomagający (np. intensyfikujący tworzenie brucytu zaobserwowanego w analizach przełamów spękań próbek poddanych leczeniu). Wykazano, że skuteczność środków naprawczych jest zależna od wielkości spękań powstających w kompozycie cementowym. Biologiczne środki naprawcze były skuteczne w inicjowaniu procesów samonaprawy tzw. mikrospękań. Natomiast przy naprawie spękań o większej rozwartości, bakterie mogą raczej pełnić rolę wspomagającą i stabilizującą (a nie inicjującą proces naprawy), co i tak należy uznać za wynik wartościowy, który nie wyklucza stosowania komponentów biologicznych w procesach naprawy.

W III etapie przeprowadzono badania betonów zawierających biologiczne środki naprawcze wytworzone na bazie dwóch z uprzednio stosowanych nośników.

Środki naprawcze dodane do betonów miały zróżnicowany, choć raczej niewielki, wpływ na ich parametry fizyko-mechaniczne. Efekty samonaprawy betonów były zasadniczo zgodne z wynikami badań zapraw cementowych (czyli etapu II) i wskazywały, że skuteczność naprawy zależy od warunków pielęgnacji i rodzaju spękań. Doktorantka wykazała, że zalecanie mikrospękań betonu było bardziej efektywne przy pielęgnacji w wodzie, a obecność środków naprawczych sprzyjała wzrostowi współczynnika odzyskiwania wytrzymałości na ściskanie, co sugeruje przynajmniej częściowy udział mikroorganizmów w procesie samonaprawy. Wyniki naprawy większych spękań potwierdziły już wyraźny wpływ jonów zawartych w roztworze naprawczym na proces uszczelniania rys, a tym samym dominującą rolę abiotycznego procesu wytrącania osadów. Jednak w przypadku betonów (w przeciwieństwie do uszczelniania spękań zapraw), biologiczne środki naprawcze miały większy wpływ na wytrącanie osadów, co wskazuje na pewną ich rolę w promowaniu samonaprawy takich kompozytów. Obserwacje mikrostruktury przełamów spękań betonów były zgodne z wynikami dla zapraw cementowych w kontekście przewagi abiotycznego mechanizmu tworzenia brucytu, ale wykazywały również zwiększony udział form węglanu wapnia w strukturach krystalicznych, co może sugerować większe znaczenie procesów MICP. Ten wynik również należy uznać za cenny z perspektywy realizacji założeń pracy.

Należy podkreślić, że sposób formułowania wniosków przez Doktorantkę wskazuje na Jej dojrzałość naukową i umiejętność krytycznej analizy wyników badań. Dużą wartością pracy jest bardzo skrupulatna analiza statystyczna wyników.

W mojej opinii uzyskane wyniki są oryginalne i bardzo ciekawe. Choć rezultaty badań nie potwierdziły wiodącej roli biokomponentów w procesach naprawczych (równocześnie jej definitywnie nie wykluczając), to z pewnością stanowią odpowiedzi na wszystkie pytania postawione w częściowych celach pracy i otwierają potencjalnie nowe ścieżki dalszych badań.

W ostatnim akapicie wniosków końcowych Doktorantka przedstawia wizję dalszych kierunków badań dotyczących inteligentnych bionanomateriałów. Z perspektywy recenzenta – mikrobiologa szczególnie interesująco brzmi zdanie dotyczące weryfikacji rzeczywistego udziału procesów abiotycznego formowania produktów naprawy w obecności innych szczepów bakterii.

Tu pojawia się moje pytanie do Doktorantki: czy kiedykolwiek prowadzono badania dotyczące np. tzw. mikroflory towarzyszącej miejscom, które poddaje się leczeniu z użyciem określonego gatunku bakterii. Z pewnością w miejscu leczonym ze względu na niesterylne



warunki i aplikację potencjalnych substancji odżywczych takie mikroorganizmy się pojawiają. Czy znane są prace dotyczące tego, co dzieje się np. w miejscu powierzchniowej aplikacji sprayu zawierającego bakterie w określonej pożywce? Wydaje się, że miejsce takie ze względu na otwarty dostęp do środowiska będzie chętnie kolonizowane przez inne mikroorganizmy, zwłaszcza grzyby. Pomimo iż beton jest materiałem nieorganicznym może stanowić podłoże do formowania biofilmów, szczególnie w środowiskach wilgotnych. Badania nad mikrobiomem betonów wydają się szczególnie istotne szczególnie w kontekście „bio-betonów”, w których wykorzystuje określone bakterie do autogenicznej naprawy mikropęknięć. Czy mikrobiom rozwijający się w miejscu aplikacji biokomponentów może wpływać (pozytywnie lub negatywnie) na proces MICP? Analiza składu mikrobiomu pęknięć poddawanych leczeniu mogłaby także pozwolić wyselekcjonować mikroorganizmy o potencjalnie większej wydajności procesów metabolicznych związanych z procesami bio-naprawy. Wydaje mi się, że ten aspekt warto rozważyć w przyszłych badaniach.

Wniosek końcowy

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Janek stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a zatem spełnia warunki stawiane tego typu opracowaniom określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawa o szkolnictwie wyższym i nauce, zarówno w warstwie merytorycznej jak i metodycznej. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Lądowa, Geodezja i Transport, Politechniki Lubelskiej o dopuszczenie mgr inż. Martyny Janek do dalszych etapów postępowania o nadanie Jej stopnia doktora.

Dr hab. Andrzej Mazur, prof. UMCS

