

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Alicji Hryniszyn

Udział bakterii w powstawaniu osadów obecnych w skorodowanych rurach wodociągowych

wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Beaty Cwalina

w Katedrze Biotechnologii Środowiskowej, Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki
Politechniki Śląskiej

1. Celowość podjęcia problemu naukowego

Jednym z najistotniejszych problemów decydujących o jakości wody pitnej jest korozja powierzchni urządzeń do dystrybucji wody oraz obecność biofilmów jako źródła mikroorganizmów, w tym drobnoustrojów oportunistycznych i patogennych zasiedlających te systemy. Zjawiska te są przyczyną obniżenia wydajności hydraulicznej oraz awarii rurociągów, których efektem są wycieki wody, jak również pogorszenia parametrów jakości wody takich jak: mętność, barwa, przewodność, stężenie żelaza, zawartość tlenu i innych. Awarie wynikające z korozji układów dystrybucji wody pitnej i technologicznej generują olbrzymie straty ekonomiczne; przykładowo w USA rocznie wynoszą one około 36 mln dolarów. Szacuje się, iż 20% kosztów zniszczeń spowodowanych korozją wynika z korozji wzbudzonej przez mikroorganizmy (MIC – Microbiologically Induced Corrosion). Ponadto osady korozyjne mogą być miejscem rozwoju drobnoustrojów i tworzenia biofilmów, które mogą dezaktywować dezynfektanty, jak również kumulować metale ciężkie i inne niebezpieczne zanieczyszczenia, co wpływa na pogorszenie jakości wody pitnej.

Dotychczasowe badania związane z korozją wzbudzoną przez mikroorganizmy dotyczyły „żywych i aktywnych metabolicznie” biofilmów albo tzw. próbek osadów uwodnionych i odnosiły się do warunków kolonizacji metalu, tworzenia biofilmu i obserwacji procesów korozji wzbudzonej przez mikroorganizmy w warunkach panujących w wodociągach. **Nie prowadzono dotąd badań w próbkach tzw. samoistnie „odwodnionych” osadów, co w przypadku dochodzenia natury korozji zachodzącej w przeszłości ma istotne znaczenie. Brak badań nad takimi osadami w kontekście poszukiwania udziału mikroorganizmów w korozji rurociągów wytyczył cel recenzowanej pracy.** Rozwój metod instrumentalnych, w tym spektroskopii odbicia rozproszonego w podczerwieni (DRIFTS) oraz dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) umożliwiły badanie składu chemicznego osadów, co zostało wykorzystane w planowaniu badań. W pracy postawiono hipotezę badawczą, iż produkty korozji obecne w badanych rurach wodociągowych powstały z udziałem bakterii.

Podjęcie wyjątkowo trudnego problemu badawczego w pracy doktorskiej przez mgr inż. Alicję Hryniszyn dotyczącego poszukiwania udziału mikroorganizmów w tworzeniu „starych, odwodnionych osadów korozyjnych” uważam za **odważne, nowatorskie i uzasadnione**. Jednocześnie chciałabym zwrócić uwagę, iż jest to zagadnienie **nowe**; publikacje dotyczące badania osadów uwodnionych i biofilmów mają niespełna kilka lat, natomiast badań na temat osadów odwodnionych, które mogły powstać z udziałem bakterii, nie ma w literaturze światowej.

2. Formalna ocena pracy

Praca doktorska jest opracowaniem obejmującym 152 strony maszynopisu, 14 tabel, 53 rysunki oraz spis piśmiennictwa. W bibliografii ujęto 191 pozycji, w tym około 90% stanowią prace w języku angielskim, ponad 50% to literatura z ostatnich dziesięciu lat. Część teoretyczna zaprezentowana na 25 stronach jest przeglądem aktualnej wiedzy na temat biofilmów, biofoulingu, problemów korozji w układach dystrybucji wody pitnej oraz wykorzystania metod spektroskopii w podczerwieni i dyfrakcji rentgenowskiej w analizie osadów korozyjnych. Z przedstawionej treści wyłania się motywacja podjętych badań. **Celem pracy** było określenie możliwości udziału bakterii w powstawaniu osadów obecnych w skorodowanych rurach wodociągowych na podstawie badań przeprowadzonych z użyciem technik spektroskopii w podczerwieni oraz dyfrakcji rentgenowskiej. W pracy założono udowodnienie jasno sprecyzowanej hipotezy badawczej, iż bakterie brały udział w korozji badanych rur wodociągowych. Pozostałe części pracy dotyczące metodyki badawczej, omówienia i dyskusji wyników, wniosków oraz streszczenia w swej kolejności odpowiadają strukturze rozpraw o charakterze eksperymentalnym.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Badania przeprowadzono na 18 próbkach osadów pobranych z wnętrza skorodowanej rury żeliwnej oraz stalowej pochodzących z układu dystrybucji wody pitnej. Analizę osadów wykonano z użyciem dyfrakcji rentgenowskiej, która obejmowała określenie faz krystalicznych oraz ilościowego składu za pomocą metody Rietvelda. Badania wykonane metodą spektroskopii w podczerwieni obejmowały: dobranie warunków suszenia osadów (rozpatrywano temp.: 22°C, 40°C, 105°C i liofilizację temp.-50°C, ciś. 0,035 mba, czas 5 godz.), tak aby usunąć wodę z próbek i jednocześnie wyeliminować możliwość zachodzenia zmian w strukturze biocząstek pochodzących z mikroorganizmów; analizę widm pod kątem pasm absorpcyjnych wskazujących na obecność biofilmu w próbkach; oraz ocenę obecności kwasu dipikolinowego, który świadczy o obecności przetrwalników bakteryjnych.

Otrzymane wyniki badań zostały poddane analizie matematycznej. Widma absorpcyjne opisywano funkcją Kubelka-Munk, która jest zależnością intensywności pasm absorpcyjnych od stężenia badanej substancji oraz od współczynnika rozproszenia i jest wyrażona w jednostkach Kubelka-Munk (KM). Dodatkowo dla najważniejszych zakresów spektralnych świadczących o obecności biomolekuł obliczono drugą pochodną z wykorzystaniem algorytmu Savitzkiego-Golaya. Pozwoliło to na szczegółową analizę danych w wąskich zakresach spektralnych. Analiza matematyczna dała podstawę do wyboru odpowiednich warunków przygotowania próbek osadu (temp. 22°C) oraz porównania analizowanych widm z literaturą. **Matematyczne opracowanie wyników pracy zasługuje na wyróżnienie**, gdyż zostało zrobione bardzo starannie i pozwoliło na właściwe sformułowanie wniosków.

Metoda dyfrakcji rentgenowskiej wykazała obecność w badanych osadach różnych faz krystalicznych związków żelaza, takich jak mackinawit (FeS), syderyt (FeCO₃), magnetyt (Fe₃O₄(FeOxFe₂O₃), hematyt (αFe₂O₃), goethyt (α FeOOH) i kalcyt (CaCO₃). Szczegółowa analiza przyczynowo-skutkowa równoczesnej obecności jednych i nieobecności innych spośród związków żelaza wykrytych w badanych osadach umożliwiła wskazanie, jakie bakterie mogły brać udział w powstaniu osadów. Na podstawie wykrycia poszczególnych związków oraz braku obecności innych związków korozyjnych np. Fe(OH)₂ zasugerowano, iż określony skład osadów może świadczyć o obecności bakterii redukujących siarczany, bakterii magnetotaktycznych, bakterii utleniających żelazo, bakterii redukujących żelazo, a także obecności pozostałości biofilmu. W tym miejscu z uwagi na ciekawy, aczkolwiek pominięty w pracy aspekt porównania próbek osadów, które różniły się wyglądem (osady z rury stalowej były luźne, miękkie, brązowo-rude, natomiast osady z rury żeliwnej – twarde, skorupiaste, ciemno-brązowe) chciałabym zadać pytanie: **czy występowały istotne różnice w składzie chemicznym dwóch badanych osadów i czy mogły one wynikać z różnego przebiegu procesów biokorozji?**

Stwierdzono, iż warunki przygotowania próbek odwodnionych osadów mają istotny wpływ na skład próbek, o czym świadczą odmienne widma otrzymane w metodzie spektrometrii w podczerwieni w różnych warunkach temperatury. Intensywność pasm absorpcyjnych malała wraz ze wzrostem temperatury suszenia osadów. Najniższą intensywność otrzymano w przypadku liofilizacji, najwyższą pozwalającą na uzyskanie największej liczby widm – w przypadku próbek suszonych w temp. 22°C, która została uznana za najbardziej optymalną do przygotowania próbek osadów. **Ten aspekt pracy jest wartościowym elementem metodycznym**, który pozwoli w przyszłości na odpowiednie przygotowanie próbek osadów z biofilmami.

Analiza widm pod kątem pasm absorpcyjnych uzyskanych dla próbek osadu z rury stalowej wykazała obecność: amidów, polipeptydów, kwasów tłuszczowych, oligosacharydów i polisacharydów, co potwierdziło obecność biofilmów w korozyjnych osadach. Stwierdzono, iż w przypadku obecności w próbce osadu fosforanów mogą zaistnieć pewne ograniczenia metody spowodowane przesunięciem lub zanikiem niektórych pasm absorpcyjnych. Recenzowana praca rozwija wiele aspektów metodycznych, jak również nowe matematyczne metody interpretacji uzyskanych wyników, co w konsekwencji czyni Autorkę pracy **dobrym specjalistą w zakresie spektroskopii w podczerwieni oraz dyfrakcji rentgenowskiej**. Na uwagę zasługuje również **bardzo dobra znajomość literatury** dotyczącej procesów biokorozyjnych, co umożliwiło zinterpretowanie wyników badań własnych i postawienie hipotez na temat mechanizmów biokorozji prowadzącej do powstania badanych osadów. Na podstawie uzyskanych wyników i ich rzeczowej dyskusji z literaturą określono, jakie grupy drobnoustrojów mogły uczestniczyć w korozji wzbudzonej mikrobiologicznie, **co stanowi istotny wkład naukowy doktorantki** i może stać się ważne przy opracowaniu wytycznych do interpretacji wyników dla naukowców zajmujących się tą tematyką badawczą.

Za ważne osiągnięcie Autorki w pracy uważam wykazanie obecności w próbkach osadów pobranych ze skorodowanych rur wodociągowych **obecności kwasu dipikolinowego** - związku chemicznego budującego endospory mikroorganizmów przetrwalnikujących i wskaźnika ich obecności, potwierdzając ich udział w powstawaniu osadów. Związek ten ze względu na swoją stabilność jest ważnym biomarkerem w analizie odwodnionych osadów.

W podsumowaniu pracy Autorka zastrzega, iż uzyskane wyniki nie pozwoliły jednoznacznie ustalić, czy produkty korozji powstały w wyniku korozji abiotycznej czy biotycznej, szczególnie magnetyt, hematyt i goethyt. W pełni zgadzam się z tym stwierdzeniem. W **pracy zabrakło analiz osadów metodami biologii molekularnej**, które potwierdziłyby obecność konkretnych grup mikroorganizmów odpowiedzialnych za korozję. Z opracowania nie wynika, czy doktorantka podjęła próbę izolacji DNA i określenia jego stężenia. Sformułowanie tematu pracy „Udział bakterii” nie ma pełnego odzwierciedlenia w przyjętej w pracy metodyce badawczej, gdyż żadna z metod nie odnosi się wprost do wykrywania bakterii, dlatego w mojej opinii bardziej precyzyjne byłoby sformułowanie tematu rozprawy: „*Ocena udziału czynników biotycznych w powstawaniu osadów obecnych w skorodowanych rurach wodociągowych*”. Nie wydaje się, iż identyfikacja bakterii z badanych osadów, to łatwe zadanie do wykonania - z kilku powodów: niskiej koncentracji DNA, obecności w próbkach wielu związków – produktów korozji, które mogą utrudniać efektywną izolację i amplifikację DNA w reakcji PCR. Przedstawiona w pracy doktorskiej propozycja wykorzystania w przyszłości metody DGGE (rozdzielenia produktów PCR z wykorzystaniem gradientu czynnika denaturującego) do identyfikacji bakterii w osadach nie jest jedyną metodą, a może nawet najmniej obiecującą. Chciałabym, aby w trakcie obrony pracy doktorantka **przedstawiła inne metody biologii molekularnej oparte o analizę DNA, należące do metod nowej generacji**, które mogłyby być pomocne w ostatecznej interpretacji wyników.

Uwagi edytorskie

Poniższe uwagi, jakie nasunęły mi się w trakcie czytania pracy mają charakter edytorski i nie umniejszają dużej wartości poznawczej pracy.

- W dwóch fragmentach pracy zauważyłam niespójną interpretację wyników: na str. 62. stwierdzono, iż „*W próbkach pobranych z wnętrza rury stalowej (s 1/1, s 1/2, s 1/3 oraz 2/3) nie wykryto kalcytu CaCO₃...*, co **może wskazywać na udział mikroorganizmów w powstawaniu osadów obecnych we wnętrzu badanej rury**”, natomiast we wniosku 1.6 stwierdzono, iż **obecność kalcytu w osadach pobranych z elementów rurociągów zasilanych wodą o znacznej twardości może wskazywać na udział biofilmu w ich powstaniu**. Proszę o uściślenie tych stwierdzeń.
- W pracy występują drobne błędy językowe, literowe i edytorskie (np. dwa różne skróty dla bakterii redukujących siarczan SRB oraz BRS, str.29; zgubiony przyimek „do” na str. 31; błąd w sformułowaniu „*małał natomiast udział grup karboksylowych rósł*”, str.33; zdanie „*woda dostarczona do gleby zaszczerpiona bakteriami Bacillus cereus, B.thuringensis, ich kokultur lub zawierająca składniki odżywcze*” - raczej nie stosowane w j.polskim pojęcie „kokultur”, str.37; powtórzenia „*o barwie brązowo-rudawej barwie*”, str. 41; megentotaktycznych zamiast magnetotaktycznych, str. 60 i inne).

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, iż rozprawa doktorska Pani mgr inż. Alicji Hryniszyn **jest oryginalnym i wartościowym opracowaniem dotąd nie podejmowanym w literaturze naukowej**. Sposób stawiania hipotezy naukowej, a także opracowania wyników z wykorzystaniem wielu metod matematycznych oraz interpretacji uzyskanych wyników w oparciu o dojrzałą dyskusję świadczą **o umiejętności prowadzenia pracy naukowej i zasługują na wysoką ocenę**. Drobne uwagi i wątpliwości zamieszczone w recenzji mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na pozytywną ocenę.

W moim przekonaniu, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. *Udział bakterii w powstawaniu osadów obecnych w skorodowanych rurach wodociągowych* mgr inż. Alicji Hryniszyn spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13. Ust.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14.03.2003 (z późniejszymi zmianami).

Wnioskuje o przyjęcie rozprawy przez Radę Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Beata Gutkowska

