

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Weroniki Augustyn pt. „Aktywność biobójcza ditlenku chloru w wieloskładnikowych preparatach dezynfekcyjnych”

Podstawą opracowania recenzji było pismo z dnia 6.11.2023 (RIE-BD.512.76.2023) wystosowane przez Przewodniczącą Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej, Prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina, w którym powierzono mi wykonanie oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Augustyn

### 1. Wstęp

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Doktorat wdrożeniowy” - II edycja na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej, pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Kalki, prof. PŚ z Katedry Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej oraz dr hab. inż. Wiesława Hreczucha z firmy MEXEO. Jest to praca z zakresu dyscypliny naukowej inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

Praca została wykonana w ramach: a) grantu badawczego MNiSW nr BKM-728/RIE7/2021 pt. *Opracowanie metod analitycznych oznaczania ditlenku chloru w roztworach wodnych w obecności zdefiniowanej matrycy organicznej* realizowanego w Katedrze Biotechnologii Środowiskowej na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej, b) projektu NCBiR nr POIR. 01.01.01-00-1104/17-00 pt. *Technologia wytwarzania oraz stosowania preparatów dezynfekcyjnych na bazie ditlenku chloru do zwalczania ogniska epidemicznych drobnoustrojów chorobotwórczych, o wysokiej oporności na dezynfekcję chemiczną* realizowanego w firmie MEXEO w Kędzierzynie Koźlu i c) funduszu prac badawczo-rozwojowych firmy MEXEO w Kędzierzynie Koźlu.

## **2. Charakterystyka rozprawy doktorskiej**

### **Układ pracy, struktura podziału treści, kolejność rozdziałów, kompletność tez itp.**

Praca liczy 160 stron, układ pracy i kolejność rozdziałów jest prawidłowa, jednak od razu uwagę przykuwa fakt, że część literaturowa stanowi zaledwie 11 stron co w porównaniu do części doświadczalnej liczącej ok 120 stron, stanowi mniej niż 1/10 całej pracy. Na uwagę zasługuje również fakt, że w części eksperymentalnej sama metodyka stanowi 49 stron, a część z omówieniem wyników, dyskusją, podsumowaniem i wnioskami liczy 55 stron nie licząc wyników badań załączonych w pracy w formie elektronicznej.

Pomimo tych dysproporcji w układzie pracy, Autorka w bardzo przemyślany i uporządkowany sposób dokonuje przeglądu literaturowego obejmującego zagadnienia związane z realizacją swojego problemu badawczego.

Część eksperymentalną otwierają jasno sprecyzowane tezy oraz cel i zakres pracy. Następnie Doktorantka przedstawia kolejno metody badań, otrzymane wyniki, przeprowadza ich dyskusję i na tej podstawie przedstawia wnioski wraz z podsumowaniem. Po spisie literaturowym, Autorka pracy podaje spis tabel oraz rysunków umieszczonych w pracy, co uważam za bardzo pomocne w jej czytaniu, ponieważ tabel jest 41, a rysunków 68.

Warty podkreślenia jest fakt, że przed wprowadzeniem Autorka umieściła wykaz dobrze opisanych skrótów i oznaczeń co czyni pracę nie tylko bardziej przystępną czytelnikowi, ale również świadczy o uporządkowanej organizacji pracy Doktorantki.

### **Zasadność podjętego tematu**

Rosnąca liczba zakażeń patogenami chorobotwórczymi wymusza poszukiwanie coraz to nowszych, bardziej skutecznych środków biobójczych, w tym środków dezynfekcyjnych. Substancje te, zwłaszcza w obliczu pandemii COVID-19 wywołanej przez koronawirusa SARS-CoV-2 nabrały szczególnego znaczenia i z uwagi na rosnącą wśród społeczeństwa świadomość zagrożeń chorobami zakaźnymi, środki biobójcze są stale i w coraz większych ilościach stosowane praktycznie w każdej dziedzinie ludzkiego życia, nie tylko w szpitalach, ale również w miejscach użyteczności publicznej czy domach. Tematyka związana z poszukiwaniem nowych, skutecznych środków biobójczych jest obecnie niezwykle istotna z uwagi na zdolność nabywania przez mikroorganizmy oporności na substancje o działaniu antydebroustrojowym. Nawet jeśli mikroorganizmy, które nie wykazują początkowo naturalnej oporności na biocydy, mogą tą cechą nabyć w czasie, na skutek zmian fenotypowych, indukowanych, chromosomalnych czy plazmidowych, co w konsekwencji praktycznie uniemożliwia skuteczne leczenie zakażeń. Dlatego przeciwdziałanie zakażeniom z wykorzystaniem nowoczesnych, skutecznych, ale jednocześnie nietoksycznych dla człowieka czy innych organizmów żywych w środowisku stabilnych biobójczych preparatów użytkowych jest niewątpliwie wyzwaniem rodzaju ludzkiego na całym świecie. Dlatego bez wątpienia, badania Doktorantki wpisują się w tą trudną, ale jednocześnie bardzo aktualną tematykę naukową.

## **Analiza przeglądu literaturowego**

Część literaturowa złożona jest z dwóch rozdziałów, przy czym pierwszy rozdział obejmuje charakterystykę fizykochemiczną, zastosowanie oraz metody oznaczania ditlenku chloru jako substancji aktywnej użytej w części eksperymentalnej. Autorka opisuje metody otrzymywania tego gazu, a także charakteryzuje jego metody oznaczania wliczając w to metody elektrochemiczne, spektrofotometryczne oraz oznaczania  $\text{ClO}_2$  w powietrzu.

Drugi rozdział dotyczy aktywności biobójczej, w którym zostały opisane patogeny chorobotwórcze w świetle problemów współczesnej dezynfekcji, a także bardzo zwięźle przedstawiono metody oznaczania skuteczności biobójczej w oparciu o trójfazowy model badania produktów dezynfekujących obejmujących metody zawieszinowe i nośnikowe wg. normy EN 14885 z roku 2022 rekomendowanej przez Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN).

Brakuje mi tu zdecydowanie dwóch rozdziałów, pierwszego w którym warto było uzasadnić wybór ditlenku chloru porównując go do innych substancji biobójczych opisanych w literaturze oraz rozdziału o roli preparatów (formulacji) użytkowych w ogóle, w tym biocydów. Formulacje użytkowe mają ogromne znaczenie dla efektywności działania końcowego produktu i jego faktycznych właściwości, co jest między innymi przedmiotem badań w części eksperymentalnej Doktorantki, gdzie badane są preparaty w postaci żelów, pianek, czy koncentratów. Moim zdaniem, badania przeprowadzone przez Doktorantkę w części eksperymentalnej powinny być uzupełnieniem przeglądu literatury na ten temat w części teoretycznej. Rozdział ten znacznie wzbogaciłby wiedzę czytelnika w tym zakresie i byłoby to doskonałym wprowadzeniem do realizowanej części doświadczalnej.

Naturalnie, bez obu tych rozdziałów w części teoretycznej i tak możemy się dużo dowiedzieć z części eksperymentalnej, która opisana jest bardzo szczegółowo i obejmuje zwłaszcza zagadnienia związane ze skutecznością działania różnych formuł użytkowych.

Niemniej jednak, powyższe zastrzeżenia nie wpływają na moją pozytywną ocenę części teoretycznej rozprawy.

## **Analiza części eksperymentalnej**

Część eksperymentalną rozprawy słusznie rozpoczynają tezy, cel i zakres pracy, które są jasno i zwięźle skonstruowane.

Na podstawie przeprowadzonego przez Doktorantkę przeglądu literaturowego dotyczącego skuteczności biobójczej ditlenku chloru, uwzględniając metody analityczne służące do jego oznaczania oraz biorąc pod uwagę dane dotyczące ekotoksyczności tego składnika aktywnego, Autorka sformułowała jedną główną i 3 cząstkowe tezy pracy:

Teza główna: Możliwe jest opracowanie formuły preparatu dezynfekującego na bazie ditlenku chloru o wysokiej skuteczności w ograniczaniu rozprzestrzeniania organizmów patogennych i znikomej szkodliwości dla środowiska.

Tezy cząstkowe:

- Połączenie technik analitycznych: woltamperometrycznej oraz spektrofotometrycznej pozwala na oznaczenie zawartości ditlenku chloru w układach innych niż woda
- Obecność związków powierzchniowo czynnych w układach z ditlenkiem chloru zwiększa skuteczność biobójczą
- Istnieje zależność pomiędzy skutecznością gazowego ditlenku chloru a wilgotnością powietrza.

Celem pracy było zbadanie aktywności biobójczej utworzonych, wieloskładnikowych preparatów dezynfekujących i myjąco dezynfekujących na bazie ditlenku chloru ( $\text{ClO}_2$ ) zgodnie z normatywnymi metodami zawiesinowymi i nośnikowymi.

Zakres pracy doktorskiej obejmował 5 etapów:

- badania analityczne ditlenku chloru – obejmowały elektrochemiczne i spektrofotometryczne metody oznaczania stężenia badanego gazu w roztworach wodnych oraz bilansowe i spektrofotometryczne metody oznaczania związku w formie gazowej
- badania preparatywne – przygotowanie form użytkowych zawierających składnik aktywny (tu  $\text{ClO}_2$ ), m.in. koncentrat myjąco-dezynfekujący do dużych powierzchni, pianka do powierzchni dotykowych, żel do powierzchni sanitarnych, gotowy płyn dezynfekujący oraz koncentrat do produkcji gazu
- badania skuteczności biobójczej wobec definiowanych dla obszarów medycznych patogenów chorobotwórczych takich jak: bakterie, grzyby, prątki, spory czy wirusy. Badania te przeprowadzono w oparciu o szereg obowiązujących norm PN-EN.
- badania toksykologiczne i ekotoksykologiczne
- badania aplikacyjne i testy użytkowe obejmujące m.in. proces dezynfekcji gazowym ditlenkiem chloru masek ochronnych i fartuchów RTG z uwzględnieniem określenia wytrzymałości materiałów, z których wykonane były te środki ochrony osobistej.

Kolejny rozdział to metodyka badań, która w moim przekonaniu jest opisana bardzo dokładnie co świadczy o dojrzałości i umiejętności planowania eksperymentu naukowego. Rozdział ten liczy sobie aż 49 stron co w stosunku do wyników badań przedstawionych przez Autorkę (55 stron) czyni go naprawdę obszernym.

Autorka, trzymając się wyznaczonych przez siebie etapów pracy, w logiczny i uporządkowany sposób opisuje najpierw metodykę oznaczania ditlenku chloru w roztworach wodnych, a następnie gazowego  $\text{ClO}_2$  w powietrzu. Analizując wnikliwie oba te podrozdziały należy podkreślić niesłychaną staranność Doktorantki, która w sposób szczegółowy tłumaczy zasady oznaczeń wykazując się przy tym gruntowną znajomością chemii zarówno analitycznej jak i fizycznej. Fakt ten od razu zwraca uwagę na interdyscyplinarny charakter podjętych badań z zakresie chemii, toksykologii czy ekotoksykologii. Kolejny podrozdział w sekcji Metodyka zawiera opis badań preparatywnych w którym Autorka przedstawia skład poszczególnych preparatów i zasady ich wytwarzania. Przygotowując własne kompozycje myjąco – dezynfekujące, Doktorantka uzasadnia dobór środków powierzchniowo czynnych, substancji zagęszczających w żelach oraz rodzaju kwasu i substancji przyspieszających aktywację. Moim zdaniem jest to jeden z najtrudniejszych i czasochłonnych etapów pracy, ponieważ skład formuły użytkowej musi być dobrany w taki sposób, aby uzyskać odpowiednie stężenie ditlenku chloru, który zachowa swoją skuteczność w okresie daty ważności, określonej na podstawie oceny skuteczności biobójczej w czasie (badania starzeniowe). Choć Autorka pisze w tej sekcji o doborze różnych kwasów czy surfaktantów, nie wymienia ich z nazwy co jest w moim przekonaniu nieco brakującym elementem tej części metodyki. Opierając się o normy Autorka dokonuje wreszcie analizy fizykochemicznej otrzymanych preparatów oznaczając ich postać, pH, liczbę kwasową, zawartość chlorynu sodu, ditlenku chloru, zdolność pianotwórczą oraz emulgowania tłuszczu, a także lepkość kinematyczną żeli. Niezwykle istotnym jest podrozdział dotyczący testów starzeniowych otrzymanych preparatów, ponieważ pozwala on na optymalizację składu preparatu pod kątem zachowania jego efektywności w jak najdłuższym czasie. Naturalną rzeczą jest fakt, że mieszanina różnych substancji chemicznych

w różnych proporcjach może ulegać zarówno chemicznym jak i fizycznym przemianom podczas procesu przechowywania i tym samym deaktywować substancję aktywną, dlatego testy starzeniowe z punktu widzenia końcowego przeznaczenia tych preparatów są jak najbardziej uzasadnionym elementem tej pracy.

W dalszej części metodyki opisano procedury badawcze związane ze skutecznością biobójczą przygotowanych preparatów. Porównanie skuteczności biobójczej wykonano w oparciu o normy (przeznaczone do obszaru medycznego) do dezynfekcji powierzchni. W tej sekcji Autorka w sposób bardzo klarowny ujęła w tabeli normy i mikroorganizmy testowe, wobec których przeprowadzono badania skuteczności biobójczej. Dokładnie opisuje procedury związane zarówno z badaniami zawiesinowymi jak i nośnikowymi podpierając to kontrolą i walidacją dla obu zastosowanych metod wraz z obliczeniami. Parametrem końcowym określającym skuteczność danego środka biobójczego w obu zastosowanych metodach jest stopień redukcji R wyrażony w skali logarytmicznej, którym później Doktorantka posługuje się przy interpretacji wyników badań i w dyskusji.

W kolejnym podrozdziale zostaje opisana metodyka szacowania toksyczności i ekotoksyczności preparatów użytkowych w oparciu o zalecenia Rozporządzenia (WE) Nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin z późn. zmianami. Autorka opisała procedurę oznaczania toksyczności ostrej i na podstawie wartości ATE (acute toxicity estimate) przyporządkowała otrzymane produkty do odpowiednich kategorii klasyfikacji toksyczności ostrej dla poszczególnych dróg narażenia (drogą pokarmową, skórą i oddechową). Czynnikiem determinującym badania aplikacyjne wykonane przez Doktorantkę w ramach pracy był czas pandemii, a więc niewątpliwie było to rzeczywiste odzwierciedlenie zagrożenia wynikającego z możliwości zarażenia się, w tym przypadku, koronawirusem SARS-CoV-2. Z uwagi na niedostępność w tamtym czasie maseczek ochronnych o odpowiednich właściwościach filtrujących, Autorka w ramach swoich badań dokonała oceny możliwości sterylizacji tychże maseczek. Co więcej, podjęto także badania wpływu wybranych preparatów dezynfekujących na fartuchy ochronne RTG, ponieważ, z uwagi na swoją konstrukcję, nie mogą być prane. W związku z tym, w podrozdziałach 5.6.1 i 5.6.2 zostały opisane procedury badań dezynfekcyjnych z uwzględnieniem oddziaływania badanych preparatów na zmiany w strukturze chemicznej dla obu tych środków ochrony osobistej.

Spis literatury znajduje się na 11 stronach łącząc spis publikacji oraz norm w kolejności alfabetycznej co uważam za bardzo czytelną formę cytowania prac.

Autorka dla ułatwienia i poprawienia czytelności rozprawy, przygotowała na końcu pracy spis 41 tabel i 68 rysunków. Jako dodatek Doktorantka umieściła wykaz dorobku naukowego obejmującego spis publikacji oraz swoje doniesienia konferencyjne. Jest współautorką 5 publikacji z wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEIN (3 po 20 pkt oraz dwie po 100 pkt). Brała czynny udział w 4 krajowych konferencjach, w których dwukrotnie prezentowała plakat, zaś w dwóch pozostałych wygłosiła referaty ustne przy czym za jeden została wyróżniona.

Podsumowując część eksperymentalną, w ramach badań opisanych w przedstawionej rozprawie doktorskiej, Autorka opracowała skład 5-ciu preparatów użytkowych dezynfekujących i myjąco-dezynfekujących o wysokiej stabilności produktów i wydłużonym czasie przechowywania, uzyskaną na drodze generowania ditlenku chloru in situ z szybkim czasem aktywacji (po minucie od zastosowania), co stanowi uniwersalny i nowatorski element podjętych badań. Oryginalności pracy nadaje opracowanie metod analitycznych oznaczania

zawartości ditlenku chloru w układach innych niż woda, czyli tych, które zawierają komponenty organiczne jak również opracowanie metody prostego sposobu kalibracji i oznaczania ClO<sub>2</sub> w powietrzu metodą spektrofotometryczną. Zaplanowany przez Autorkę zakres prac został zrealizowany, zaś wyznaczone cele pracy zostały osiągnięte.

Nie ulega wątpliwości, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinarny z dużym potencjałem wdrożeniowym w ochronie zdrowia, przemyśle spożywczym, ale także obszarach instytucjonalnych i domowych.

### 3. Uwagi krytyczne

- Strona 74: „Częsty problem w pracowniach radiologicznych stanowi zapewnienie braku zanieczyszczenia patogenami ochronnych fartuchów rentgenowskich...” – to dość skomplikowane sformułowanie można było zastąpić prostszym zapisem
- Strona 27: „Mechanizm denaturacji białek za sprawą ClO<sub>2</sub> opiera się na reakcji z sześcioma aminokwasami: cysteiną, tryptofanem, tyroziną, proliną, hydroksyproliną oraz histydyną, przy czym reaktywność trzech pierwszych jest najwyższa” Podano mechanizmy działania na pierwsze trzy aminokwasy a nie podano dla proliny hydroksyproliny i histydyny. Moim zdaniem, bardzo ciekawym, bo na czasie, byłoby również przedstawienie mechanizmu inaktywacji koronawirusa SARS-CoV-2 poddanego działaniu ditlenku chloru o czym mowa na stronie 28.
- W dyskusji wyników brakuje odniesienia się do istniejących danych literaturowych dotyczących wpływu innych środków biobójczych na ewentualne zmiany struktury substancji, z których wykonane są środki ochrony osobistej
- Nie podjęto próby wyjaśnienia w dyskusji skąd może brać się zmiana zabarwienia fartucha RTG
- Strona 120: Zdanie „Położenie oraz intensywność zidentyfikowanych pasm absorpcji odpowiadających drganiom wiązań występujących w reaktywnych grupach funkcyjnych cząstek polimerów nie uległo zmianie” – Sprostowanie: W poliolefinach (PP, PE) nie ma grup funkcyjnych w cząsteczce monomeru (słownik IUPAC – „functional groups”).
- W dyskusji wyników warto byłoby odnieść się do badań skuteczności biobójczej innych preparatów dezynfekujących, bądź to opisanych w literaturze, bądź dostępnych komercyjnie. Wówczas mielibyśmy porównanie ich oddziaływania toksycznego/ekotoksycznego.

### 4. Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym zwłaszcza części eksperymentalnej i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W obliczu rosnącej oporności patogenów chorobotwórczych, poszukiwanie coraz to nowszych i bardziej skutecznych środków dezynfekujących i myjąco-dezynfekujących jest niezwykle ważne z punktu widzenia nie tylko ochrony zdrowia ludzkiego, ale także środowiska naturalnego, dlatego podjęcie się tego typu badań uważam za jak najbardziej uzasadnione, mając zwłaszcza w pamięci niedawną pandemię z którą mierzył się cały świat. Autorka wykazała, że posiada dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie, potrafi bardzo dobrze zaplanować eksperyment, wnikliwie opisać metodykę i prawidłowo zinterpretować wyniki, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Zamieszczone w recenzji drobne uwagi krytyczne nie umniejszają wysokiej ocenie pracy. Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Weroniki Augustyn spełnia wymagania prac doktorskich zapisane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce oraz wnioskuję o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.

**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Weroniki Augustyn pt. „Aktywność biobójcza ditlenku chloru w wieloskładnikowych preparatach dezynfekcyjnych”**

Przedstawiona rozprawa doktorska, w moim przekonaniu, stanowi innowacyjne i szczególnie wartościowe osiągnięcie badawcze o bardzo wysokim potencjale wdrożeniowym. Doktorantka w bardzo przemyślany sposób, niczym doświadczony już pracownik naukowy zaplanowała i konsekwentnie zrealizowała ambitny i bardzo obszerny program badawczy o charakterze interdyscyplinarnym co pozwoliło na wysunięcie bardzo rzeczowych i komplementarnych wniosków, które niewątpliwie będą bardzo przydatne w późniejszym procesie komercjalizacji otrzymanych preparatów użytkowych o charakterze biobójczym.

