

Prof. dr hab. Anna Malm

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel./fax 81 448-71-00

Lublin, dn. 2.08. 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Mariusza Nowaka pt. „Modyfikacja materiałów polimerowych przy użyciu wysokociśnieniowego ditlenku węgla w celu uzyskania właściwości antybakteryjnych i antybiofilmowych” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Ireny Žižović w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-chemicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

Biofilm stanowi podstawową formę bytowania mikroorganizmów w środowisku naturalnym. Jest on jedno- lub wielogatunkową, wielokomórkową strukturą otoczoną egzopolisacharydami, tworzoną przez drobnoustroje na powierzchniach biotycznych i abiotycznych, w tym materiałów polimerowych powszechnie stosowanych w medycynie, ochronie środowiska i różnych gałęziach przemysłu. Dobry materiał polimerowy w aspekcie mikrobiologicznym powinien charakteryzować się „opornością” na przyleganie i adhezję komórek drobnoustrojów, co w konsekwencji ogranicza lub wręcz uniemożliwia tworzenie biofilmu. Tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Mariusza Nowaka dotyczy zatem aktualnego i ważnego problemu o znaczeniu interdyscyplinarnym.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było wytworzenie nowych materiałów polimerowych o właściwościach antybakteryjnych i antybiofilmowych na drodze procesów impregnacji i szczepienia w fazie nadkrytycznego ditlenku węgla przy zachowaniu ich funkcjonalności i właściwości struktury. Założono, że możliwa jest modyfikacja materiałów na bazie poliamidu i octanu celulozy za pomocą karwakrolu z użyciem metody impregnacji nadkrytycznej oraz modyfikacja materiałów na bazie octanu celulozy i blendu skrobiowo-chitozanowego poprzez przyłączenie czwartorzędowych związków amoniowych do grup hydroksylowych za pomocą linkera (szczepienie materiałów) w warunkach nadkrytycznych. Należy zaznaczyć, że metody wysokociśnieniowe wykorzystywane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej zgodne są z koncepcją zielonej chemii.

Rozprawa doktorska mgr inż. Mariusza Nowaka oparta jest o wyniki badań nieopublikowanych oraz opublikowanych w roku 2021 (1 praca) i w roku 2023 (dwie prace). Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach; ukazały się one w prestiżowych czasopismach: *Molecules* (IF = 4,927), *The Journal of Supercritical Fluids* (IF = 3,4), *Journal of Water Process Engineering* (IF = 6,3). Chciałabym zaznaczyć, że taka informacja powinna być zamieszczona na początku rozprawy wraz z kompletnymi danymi bibliograficznymi publikacji. Ponadto, zazwyczaj w tego typu dysertacjach zamieszcza się stosowne oświadczenia wszystkich współautorów, wyrażających zgodę na wykorzystanie publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora, jak również

przedstawiające udział Doktoranta i poszczególnych współautorów w tworzeniu publikacji. Można również załączyć publikacje.

Recenzowana rozprawa doktorska, licząca 141 stron, składa się z rozdziałów, takich jak: (1) „Wstęp” zakończony celem i założeniami rozprawy oraz znaczeniem przeprowadzonych badań, (2) „Część eksperymentalna”, zawierająca opis stosowanych materiałów, aparatury i metod, (3) „Rezultaty i wnioski”, (4) „Podsumowanie”, (5) „Bibliografia”, (6) „Spis rysunków i zdjęć”, (7) „Spis tabel”. Ponadto, w załączniku zamieszczono dodatkowe wykresy i rysunki, uzupełniające dane eksperymentalne. Praca jest poprzedzona streszczeniem w języku polskim i angielskim. Bibliografia zawiera 190 pozycji, w tym prace o znaczeniu historycznym z punktu widzenia stosowanych w pracy technik wysokociśnieniowych oraz najnowsze pozycje z ostatnich 5 lat.

We Wstępie Doktorant przedstawił syntetycznie następujące zagadnienia związane ściśle z tematyką rozprawy: (1) biofilm i jego znaczenie w procesie kolonizacji materiałów polimerowych, z uwzględnieniem zjawiska biofoulingu, (2) charakterystyka i zastosowanie materiałów polimerowych, będących przedmiotem rozprawy, tj. octanu celulozy, poliamidu, skrobi i chitozanu, (3) podstawy metod nadkrytycznych, (4) impregnacja metodą nadkrytyczną materiałów polimerowych związkami o aktywności antybakteryjnej wraz z przykładami otrzymanych w ten sposób polimerów, (5) szczepienie chemiczne jako metoda modyfikacji materiałów polimerowych związkami o aktywności antybakteryjnej z uwzględnieniem czwartorzędowych związków amoniowych, szczepienie celulozy, skrobi i chitozanu oraz możliwości aplikacji zmodyfikowanych materiałów. Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę badawczą realizowaną przez Doktoranta. W ostatnim podrozdziale Wstępu przedstawiono cel i założenia rozprawy oraz znaczenie badań przeprowadzonych w trakcie realizacji doktoratu w aspekcie teoretycznym i aplikacyjnym.

W rozdziale Część eksperymentalna na uwagę zasługuje szczegółowy opis stosowanych metod badawczych, co wskazuje na opanowanie przez Doktoranta nowoczesnego warsztatu eksperymentalnego.

Rozdział „Rezultaty i wnioski” jest podzielony tematycznie na dwie części, zakończone wnioskami z przeprowadzonych badań. Doktorant przedstawił uzyskane wyniki z uwzględnieniem danych literaturowych. Należy podkreślić, że zakres eksperymentów przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, zgodny z jej celem i założeniami, jest imponujący.

W pierwszej części omówiono wyniki badań w zakresie impregnacji karwakrolem membran poliamidowych oraz membran z octanu celulozy w fazie nadkrytycznego ditlenku węgla. W toku tych badań wykazano możliwość impregnacji nadkrytycznej ww. membran karwakrolem wraz z charakterystyką otrzymanych materiałów przy użyciu szeregu metod, takich jak: FTIR (potwierdzenie obecności substancji bioaktywnej na powierzchni membrany), pomiar potencjału Zeta (ocena ładunku membrany po załadowaniu karwakrolem), SEM (ocena właściwości strukturalnych membrany), analiza porozymetryczna (rozkład wielkości porów), test filtracji krzyżowej (ocena wpływu pęcznienia na wydajność filtracyjną membrany) oraz uwalnianie karwakrolu. Efektywność przeciwbakteryjną zmodyfikowanej membrany poliamidowej oceniano w opracowanym, na podstawie danych literaturowych, modelu otwartej klatki piersiowej, symulującym procedurę napowietrzania czystym ditlenkiem węgla w zabiegach kardiochirurgicznych. Wykazano, że zastosowanie tej

zmodyfikowanej membrany zmniejszyło poziom mikrobiologicznego zanieczyszczenia jamy o 27% w warunkach przepływu czystego CO₂. Ponadto, zastosowano cytometrię przepływową do oceny kolonizacji membrany z octanu celulozy impregnowanej karwakrolem przez komórki referencyjnego szczepu *Staphylococcus aureus* w zależności od jego stężenia. Wykazano obniżenie liczby komórek bakteryjnych osadzonych na zmodyfikowanej membranie proporcjonalnie do stężenia karwakrolu, co wskazywało na jej właściwości antyadhezyjne. Czy mogłabym prosić Doktoranta o interpretację tego rezultatu? Czy powinniśmy brać pod uwagę wyłącznie ujemny ładunek membrany, czy również aktywność biobójczą karwakrolu? Wyniki filtracji krzyżowej przez niezmodyfikowane i zmodyfikowane membrany z octanu celulozy z użyciem referencyjnego szczepu *S. aureus* przeanalizowano stosując modelowanie dla różnych mechanizmów blokujących. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia karwakrolu następuje zmiana mechanizmu blokowania membran z filtracji plackowej poprzez blokowanie pośrednie w kierunku blokowania całkowitego i standardowego. Czy mogłabym prosić Doktoranta o przedstawienie praktycznych aspektów modyfikacji materiałów polimerowych w celu otrzymania membrany o określonym modelu blokowania?

W drugiej części omówiono wyniki badań związane z modyfikacją octanu celulozy oraz blendów skrobiowo-chitozanowych w procesie szczepienia chemicznego, polegającego na przyłączeniu zsyntetyzowanych czwartorzędowych związków amoniowych (QAC 1, QAC 2, QAC 3) do grup hydroksylowych materiału za pomocą linkera – diizocyjanianu heksametylenu. W charakterystyce otrzymanych materiałów polimerowych z octanu celulozy stosowano pomiary kąta zwilżania (ocena hydrofobowości), analizę FTIR (potwierdzenie przyłączenia linkera, QAC 1, QAC 2), SEM (ocena właściwości strukturalnych polimeru), analizę DSC (ocena temperatury topnienia i temperatury zeszklenia) i pomiar siły ściskania (ocena odporności na odkształcenie). W toku badań mikrobiologicznych z użyciem referencyjnych szczepów bakterii, reprezentujących ważne patogeny człowieka, wykazano, że najkorzystniejsze właściwości zarówno antybiofilmowe (redukcja komórek ulegających adhezji do polimeru) jak i antybakteryjne (redukcja liczebności populacji komórek planktonowych bakterii) posiadały materiały polimerowe z octanu celulozy zawierające bromek N-(11-hydroksyundekanylo-N,N-dimetylotetradekan-1-aminowy (QAC 2). Należy podkreślić, że komórki szczepów referencyjnych *Escherichia coli* i *Salmonella* Enteritidis oraz metycylinowrażliwego i metycylinoopornego szczepu *Staphylococcus aureus* nie wykazywały adhezji do tego polimeru, a stopień przylegania komórek referencyjnych szczepów *Bacillus cereus* oraz *Listeria monocytogenes* był znacznie ograniczony. W tej części przedstawiono również wyniki badań w zakresie szczepienia chemicznego blendu skrobiowo-chitozanowego z udziałem wspomnianego wcześniej linkera oraz QAC 2 lub QAC 3. W charakterystyce powyższych materiałów polimerowych stosowano pomiary kąta zwilżania (ocena hydrofobowości) oraz analizę FTIR.

W rozdziale „Podsumowanie” Doktorant przedstawił streszczenie rozprawy doktorskiej.

W recenzowanej dysertacji zabrało mi wyodrębnionej dyskusji uzyskanych wyników w odniesieniu do danych literaturowych, podkreślającej nowatorski charakter prowadzonych badań oraz uzyskanie nowych materiałów polimerowych o korzystnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, jak również kilku ustrukturyzowanych wniosków na zakończenie

pracy, przedstawiających najważniejsze osiągnięcia Doktoranta. Ponadto, w pracy zauważyłam nieliczne błędy edytorskie i stylistyczne oraz pewne niefortunne sformułowania z zakresu terminologii mikrobiologicznej, np. roztwór bakterii, odporność na metycylinę czy bulion *S. aureus*. Te drobne niedociągnięcia nie rzutują jednak na moją wysoką ocenę rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Mariusza Nowaka pt. „Modyfikacja materiałów polimerowych przy użyciu wysokociśnieniowego ditlenku węgla w celu uzyskania właściwości antybakteryjnych i antybiofilmowych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.). Stanowi oryginalne i cenne opracowanie w zakresie możliwości otrzymywania modyfikowanych polimerów o właściwościach antyadhezyjnych i biobójczych. Należy zaznaczyć, że cel pracy został zrealizowany poprzez wykonanie szeregu dobrze zaplanowanych prac- i czasochłonnych eksperymentów przy wykorzystaniu szerokiego spektrum technik badawczych. Doktorant zaprezentował się jako dojrzały badacz, posiadający ugruntowaną wiedzę oraz doświadczenie w zakresie nowoczesnego warsztatu badawczego.

W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Chemiczna Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Mariusza Nowaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-chemicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej

prof. dr hab. n. farm. Anna Malm