

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA I ENERGETYKI
KATEDRA BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ



**Politechnika
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Aktywność biobójcza ditlenku chloru w wieloskładnikowych preparatach dezynfekcyjnych

Biocidal activity of chlorine dioxide in multi-component disinfectants

Dyscyplina: inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka

mgr inż. Weronika AUGUSTYN

Promotorzy pracy:
dr hab. inż. Joanna Kalka, prof. PŚ
dr hab. inż. Wiesław Hreczuch, MEXEO

Opiekun pomocniczy:
dr inż. Arkadiusz Chruściel, MEXEO

Praca badawcza finansowana w ramach:
Programu Doktorat Wdrożeniowy – II edycja na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki
Politechniki Śląskiej

Gliwice, 2023

Praca badawcza finansowana w ramach:

- 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;
 - projektu NCBiR nr POIR. 01.01.01-00-1104/17-00 pt. *Technologia wytwarzania oraz stosowania preparatów dezynfekcyjnych na bazie ditlenku chloru do zwalczania ognisk epidemicznych drobnoustrojów chorobotwórczych, o wysokiej oporności na dezynfekcję chemiczną* realizowanego w firmie MEXEO w Kędzierzynie – Koźlu;
 - funduszu prac badawczo-rozwojowych firmy MEXEO w Kędzierzynie – Koźlu.
-

Składam serdeczne podziękowania:

- *Promotorom pracy, Pani prof. dr hab. inż. Joannie Kalce
oraz Panu dr inż. hab. Wiesławowi Hreczuchowi
za wszechstronną pomoc, cenne rady, wsparcie merytoryczne i
zaangażowanie*

 - *Opiekunowi pomocniczemu, Panu dr inż. Arkadiuszowi Chruścielowi
za wsparcie merytoryczne i pomoc w realizacji badań*

 - *Pracownikom MEXEO i Katedry Biotechnologii Środowiskowej za
życzliwość i pomoc w realizacji badań*

 - *Mężowi i Córce za wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość*
-

SPIS TREŚCI

<i>WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW</i>	11
<i>STRESZCZENIE</i>	13
<i>SUMMARY</i>	15
<i>WPROWADZENIE</i>	17
<i>CZĘŚĆ LITERATUROWA</i>	19
1. Ditlenek chloru	19
1.1. Właściwości fizykochemiczne i zastosowanie	19
1.2. Metody otrzymywania	21
1.3. Metody oznaczania.....	22
1.3.1. Metody elektrochemiczne.....	22
1.3.2. Metody spektrofotometryczne	24
1.3.3. Metody oznaczania ditlenku chloru w powietrzu	24
2. Aktywność biobójcza	25
2.1. Patogeny chorobotwórcze i problemy współczesnej dezynfekcji.....	25
2.2. Aktywność biobójcza ditlenku chloru.....	27
2.3. Metody oznaczania skuteczności biobójczej	28
<i>CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</i>	30
3. Tezy pracy	30
4. Cel i zakres pracy	31
5. Metodyka	33
5.1. Metodyka oznaczania ditlenku chloru w roztworach wodnych.....	33
5.1.1. Przygotowanie podstawowego roztworu wzorcowego ClO ₂	33
5.1.2. Oznaczanie metodą miareczkowania woltamperometrycznego	34
5.1.3. Oznaczanie spektrofotometryczne ClO ₂ w roztworach wodnych – pomiar bezpośredni.....	37

5.1.4.	Oznaczanie spektrofotometryczne ClO ₂ w roztworach wodnych – barwniki spektrofotometryczne	38
5.2.	Metodyka oznaczania gazowego ditlenku chloru w powietrzu.....	38
5.2.1.	Oznaczanie spektrofotometryczne gazowego ClO ₂ w powietrzu	38
5.2.2.	Oznaczanie gazowego ClO ₂ w powietrzu z wykorzystaniem detektora.....	43
5.3.	Metodyka badań preparatywnych	45
5.3.1.	Preparowanie własnych kompozycji myjąco-dezynfekujących	46
5.3.2.	Analiza fizykochemiczna.....	48
5.3.3.	Testy starzeniowe.....	51
5.4.	Metodyka badań skuteczności biobójczej	52
5.4.1.	Charakterystyka czynników chorobotwórczych	53
5.4.2.	Charakterystyka podstawowych parametrów testowych	53
5.4.3.	Badania zawiesinowe.....	54
5.4.4.	Badania nośnikowe z wykorzystaniem czynnika mechanicznego.....	59
5.4.5.	Badania nośnikowe bez działania mechanicznego	63
5.4.6.	Badania nośnikowe z wykorzystaniem zautomatyzowanych procesów dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną	65
5.5.	Metodyka szacowania toksyczności i ekotoksyczności preparatów użytkowych.....	69
5.5.1.	Ocena toksyczności ostrej	69
5.5.2.	Ocena toksyczności wobec środowiska wodnego	71
5.6.	Metodyka badań aplikacyjnych.....	74
5.6.1.	Dezynfekcja masek ochronnych	75
5.6.2.	Dezynfekcja fartuchów rentgenowskich.....	77
5.7.	Metodyka analiz statystycznych.....	79
5.7.1.	Analiza spektrofotometryczna oznaczania ClO ₂ w roztworach wodnych – pomiar bezpośredni.....	79
5.7.2.	Analiza spektrofotometryczna oznaczania gazowego ClO ₂ w powietrzu	80

5.7.3.	Analiza oznaczania gazowego ClO ₂ w powietrzu z wykorzystaniem detektora	81
5.7.4.	Badania preparatywne.....	82
6.	Wyniki	83
6.1.	Oznaczanie woltamperometryczne z wykorzystaniem jodometrii	83
6.2.	Oznaczanie spektrofotometryczne ClO ₂ w roztworach wodnych – pomiar bezpośredni	85
6.3.	Oznaczanie spektrofotometryczne ClO ₂ w roztworach wodnych – barwniki spektrofotometryczne	88
6.4.	Oznaczanie spektrofotometryczne gazowego ClO ₂ w powietrzu	88
6.5.	Oznaczanie gazowego ClO ₂ w powietrzu z wykorzystaniem detektora	94
6.6.	Badania preparatywne	96
6.7.	Badania skuteczności biobójczej w obszarach medycznych	100
6.7.1.	Redukcja liczby czynników patogennych w uzyskanych preparatach	101
6.7.2.	Kontrola i walidacja.....	109
6.8.	Szacowanie toksyczności i ekotoksyczności preparatów użytkowych	111
6.9.	Dezynfekcja masek ochronnych	114
6.10.	Dezynfekcja fartuchów rentgenowskich	121
7.	Dyskusja wyników	127
7.1.	Oznaczanie zawartości ClO ₂	127
7.2.	Skuteczność biobójcza	130
7.3.	Toksyczność i ekotoksyczność	134
8.	Wnioski.....	135
	<i>PODSUMOWANIE</i>	137
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	139
9.	Spis wykorzystanych publikacji	139
10.	Spis tabel.....	151
11.	Spis rysunków	154

<i>ZAŁĄCZNIKI</i>	158
<i>DODATEK</i>	159

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

AM	– amarant
ATE _{mix}	– (ang. <i>Acute Toxicity Estimate</i>) wartość szacowana toksyczności ostrej mieszaniny
BSA	– (ang. <i>Bovine serum albumin</i>) surowicza albumina wołowa
CAGR	– (ang. <i>compound annual growth rate</i>) skumulowany roczny wskaźnik wzrostu
CEN	– Europejski Komitet Normalizacyjny
CFU	– (ang. <i>Colony Forming Unit</i>) liczba jednostek tworzących kolonie
CPE	– (ang. <i>Cytopathic effect</i>) efekt cytopatyczny komórek gospodarza
CPR	– czerwień chlorofenolowa
DASA	– czerwień alizarynowa S
EC ₅₀	– (ang. <i>effective concentration</i>) stężenie powodujące określony efekt np. unieruchomienie, u 50% testowanych organizmów podczas określonego czasu ekspozycji na substancję
ECHA	– (ang. <i>European Chemical Agency</i>) Europejska Agencja Chemikaliów
FCS	– (ang. <i>Fetal calf serum</i>) bydlęca surowica płodowa
LC ₅₀	– (ang. <i>lethal concentration</i>) medialne stężenie śmiertelne, stężenie powodujące śmierć wśród 50% testowanych organizmów podczas określonego czasu ekspozycji na substancję
LD ₅₀	– (ang. <i>lethal dose</i>) medialna dawka śmiertelna, dawka substancji po podaniu której można oczekiwać śmierci 50% narażonych organizmów
LGB	– zieleń lizaminowa typu B
LOD	– (ang. <i>Limit of detection</i>) granica wykrywalności substancji
LOQ	– (ang. <i>Limit of quantification</i>) granica oznaczalności substancji
LPB II	– Laboratorium Projektów Badawczych II
LRKJ	– Laboratorium Rozwojowe i Kontroli Jakości
MEM	– (ang. <i>Eagle's minimal essential medium</i>) bufor zapobiegający namnażaniu się hodowli komórkowej
NDS	– najwyższe dopuszczalne stężenie substancji podczas 8-godzinnej ekspozycji
NDSch	– najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe (ekspozycja nie dłużej niż 15 min)
NOEC	– (ang. <i>no observed effects concentration</i>) najwyższe stężenie, dla którego nie występuje istotny wzrost częstości lub nasilenia skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do próbki kontrolnej
PAO	– tlenek fenyloarsyny
PBS	– (ang. <i>Phosphate buffered saline</i>) sól fizjologiczna buforowana fosforanem
TCID ₅₀	– (ang. <i>Tissue Culture Infective Dose 50</i>) miara stężenia wirusa wystarczająca do wywołania efektu cytopatycznego w 50% hodowli komórkowej gospodarza

THM – trihalometany, halogenki alkilowe, pochodne metanu

URPLWMiPB – Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych

STRESZCZENIE

Oporność patogenów chorobotwórczych na stosowane środki dezynfekujące, skutkuje wzrostem liczby zakażeń. W piramidzie oporności na środki biobójcze szczytowe miejsca, obok prionów, zajmują spory oraz wirusy bezotoczkowe. Za jeden z najbardziej opornych czynników chorobotwórczych uważa się bakterię przetrwalnikową *Clostridioides difficile* R027.

Kluczowym elementem zapobiegania rozprzestrzeniania się patogenów jest dezynfekcja powierzchni. W celu określenia skuteczności biobójczej preparatów do dezynfekcji powierzchni, niezbędne jest dobranie odpowiednich metod, adekwatnych do proponowanej aplikacji produktu, ale również wyznaczenie stężenia skutecznego substancji biobójczej. Ważny aspekt stanowi określenie wpływu produktu na środowisko naturalne.

Celem pracy było zbadanie aktywności biobójczej utworzonych preparatów dezynfekujących i myjąco - dezynfekujących na bazie ditlenku chloru (ClO_2) zgodnie z normatywnymi metodami zawiesinowymi i nośnikowymi. Aby wyznaczyć stężenia skuteczne ClO_2 niezbędne było opracowanie metod jego oznaczania w roztworach wodnych, zawierających komponenty organiczne oraz w powietrzu. Dokonano również analizy szacunkowej toksyczności oraz ekotoksyczności otrzymanych produktów. Przeprowadzono badania aplikacyjne dezynfekcji maseczek ochronnych oraz fartuchów RTG poddanych ekspozycji na gazowy ClO_2 .

Opracowano metodę oznaczania zawartości ClO_2 w produktach dezynfekujących i myjąco-dezynfekujących. Polegała ona na połączeniu technik 1) miareczkowania woltamperometrycznego, umożliwiającego przeprowadzenie mianowania podstawowego roztworu wzorcowego ClO_2 i 2) spektrofotometrycznej, polegającej na sporządzeniu krzywej kalibracyjnej (na podstawie pomiaru woltamperometrycznego). Metodę woltamperometryczną, ze względu na brak możliwości pozyskania wzorca ClO_2 potraktowano jako bezwzględnie metodę odniesienia. Wyznaczono molowy współczynnik absorpcji dla ClO_2 w roztworze $\epsilon_r = 1288 \pm 16,9 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$.

Opracowano sposób kalibracji spektrofotometrycznej metody oznaczania zawartości gazowego ClO_2 w powietrzu, z wykorzystaniem pomiaru specyficznego widma ditlenku chloru w fazie gazowej pozostającej w stanie bliskim równowagi z roztworem ClO_2 . Zaletą przedstawionej metody jest przede wszystkim prostota oznaczania ClO_2 w powietrzu z pominięciem stosowania złożonych układów generowania gazu oraz źródeł potencjalnych błędów wzorcowania.

W aspekcie oznaczania zawartości ClO_2 w powietrzu dokonano również analizy porównawczej wartości stężeń otrzymanych z wykorzystaniem detektora komercyjnego PortaSens III, z wartościami obliczonymi na drodze bilansu masowego w roztworze przed i po procesie gazowania. Uzyskano akceptowalną zgodność wyników.

W badaniach preparatywnych utworzono 5 produktów biobójczych na bazie ClO_2 w formie: koncentratów: **Armex 5 MD**, **Armex 2000 Ultraczysty** i **Armex 5 vH**; pianki: **Armex 5 foam** oraz żelu: **Armex 5 WC**. O właściwościach dezynfekujących (Armex 2000, Armex 5 vH) oraz myjąco –

dezynfekujących (3 pozostałe). Ich cechą charakterystyczną jest m.in. stabilność w warunkach przechowywania, którą uzyskano dzięki zastosowaniu techniki aktywacji *in situ* oraz krótki czas aktywacji do rekomendowanego stężenia ClO₂ – około 1 min.

Skuteczność biobójczą preparatów na bazie ClO₂ określono zgodnie z normami zawieszinowymi i nośnikowymi przeznaczonymi dla obszaru medycznego – jako najbardziej wymagającego. Badania wykonano wobec patogenów ściśle zdefiniowanych w normach, tj. bakterii, grzybów, prątków, spor – z uwzględnieniem opornego *Clostridioides difficile* R027 oraz wirusów – z uwzględnieniem koronawirusa ludzkiego 229E. Zaobserwowano synergistyczne działanie ClO₂ i surfaktantów w badanym układzie. Wykazano, że stężenia skuteczne wyznaczone metodami zawieszinowymi, nie dają pozytywnego rezultatu w badaniach nośnikowych, bardziej adekwatnie odwzorowujących warunki rzeczywiste. W badaniach dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną udowodniono, że skuteczność biobójcza ClO₂ zależała, oprócz stężenia i czasu kontaktu, również od wilgotności względnej powietrza..

Analiza szacunkowa toksyczności ostrej oraz toksyczności ostrej i przewlekłej wobec środowiska wodnego wykazała, że opracowane produkty nie podlegały klasyfikacji w żadnej z kategorii. Opracowane produkty można zatem uznać za bezpieczne.

Skuteczny rezultat dezynfekcji gazowym ClO₂ maseczek ochronnych uzyskano po 2 h ekspozycji w stężeniu 500 ppm *wag.* ClO₂. W przypadku fartuchów RTG, pozytywny rezultat uzyskano po 4 h ekspozycji w stężeniu 1000 ppm *wag.* ClO₂. Analiza spektrometryczna FTIR badanych materiałów nie wykazała uszkodzeń materiałów podczas ekspozycji na gaz.

Przeprowadzone badania pozwoliły na potwierdzenie tezy głównej pracy. Opracowano formuły preparatów dezynfekcyjnych na bazie ditlenku chloru o wysokiej skuteczności w ograniczaniu rozprzestrzeniania organizmów patogennych i znikomej szkodliwości dla środowiska.

SUMMARY

Resistance of pathogens to the disinfectants used results in an increase in the number of infections. Spores and non-enveloped viruses occupy the top positions in the biocide resistance pyramid. The spore bacterium *Clostridioides difficile* R027 is considered to be one of the most resistant pathogens.

An important element in preventing the spread of pathogens is surface disinfection. Testing the biocidal effectiveness of surface disinfectants requires selecting effectiveness methods appropriate to the proposed product application. Moreover, it is necessary to determine the effective concentration of the biocidal substance. An important aspect is the product's impact on the natural environment.

The aim of the study was to examine the biocidal activity of disinfecting and cleaning-disinfecting preparations based on chlorine dioxide (ClO₂). The tests were performed in accordance with suspension and carrier standards. In order to determine effective ClO₂ concentrations, it was necessary to develop methods for its determination in the air and aqueous solutions, which contain organic components. In addition, it was performed an estimated toxicity and ecotoxicity analysis of the obtained products. Application tests were carried out on the disinfection of protective masks and X-ray apron exposed to gaseous ClO₂.

It was developed a method for determining the ClO₂ content in disinfecting and cleaning-disinfecting products. It involved a combination of: 1) voltammetric titration, of the ClO₂ basic standard solution and 2) spectrophotometric techniques, which involves preparing a calibration curve (based on voltammetric measurement). The voltammetric method, was treated as an absolute reference method due to the impossibility of obtaining a ClO₂ standard. The determined molar absorption coefficient for ClO₂ in solution was $\epsilon_r = 1288 \pm 16,9 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$.

It was developed a calibration of spectrophotometric method for determining the content of gaseous ClO₂ in the air. It was used the measurement of the specific spectrum of chlorine dioxide in the gas phase remaining in a state close to equilibrium with the ClO₂ solution. The advantage of the presented method is primarily the simplicity of determining ClO₂ in air, avoiding the use of complex gas generation systems and sources of potential calibration errors.

In terms of determining the ClO₂ content in the air, was made a comparative analysis of the concentration values obtained using the PortaSens III detector, with the values calculated by mass balance in the solution before and after the gassing process.

In preparatory research, were created five ClO₂-based biocidal products in the form of: concentrates: **Armex 5 MD**, **Armex 2000 Ultraczysty** i **Armex 5 vH**; foam: **Armex 5 foam**; and gel: **Armex 5 WC** with disinfecting properties (Armex 2000, Armex 5 vH) and cleaning-disinfecting properties (3 others). Their characteristic feature is, among others: stability in storage conditions,

which was achieved thanks to the use of the *in situ* activation technique and short activation time for the recommended ClO₂ concentration - about 1 min.

The biocidal effectiveness of ClO₂-based preparations was determined in accordance with suspension and carrier standards intended for the medical area - the most demanding one. The research was conducted on pathogens strictly defined in the standards, i.e. bacteria, fungi, mycobacteria, spores - including resistant *Clostridioides difficile* R027 and viruses - including human coronavirus 229E. A synergistic effect of ClO₂ and surfactants in the system was observed. It has been proved that effective concentrations determined using suspension methods don't give positive results in carrier research. In research of surface disinfection by air, it was proven that the biocidal effectiveness of ClO₂ depended on the relative humidity of the air. The estimated analysis of acute toxicity, acute and chronic toxicity to the aquatic environment showed that products weren't subject to classification in any of the categories.

An effective result of ClO₂ gas disinfection of protective masks was obtained after 2 hours of exposure at a concentration of 500 ppm. For X-ray apron, a positive result was obtained after 4 hours of exposure at a concentration of 1000 ppm. FTIR spectrometric analysis of the researched materials didn't show any damage.

The conducted research allowed to confirm the main thesis of the work. It was developed formulas of chlorine dioxide-based disinfectants, which are highly effective in reducing the spread of pathogenic organisms and have little harm to the environment.

WPROWADZENIE

Zabiegi zmierzające do ograniczenia rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych stosowano od wczesnego okresu dziejów ludzkości. Niejednokrotnie miały one charakter tradycji, zwyczajów i przesądów. Pierwsze wzmianki o zastosowaniu mydła pochodzą z Babilonu z roku około 2800 p.n.e. Praktyka zastosowania mydła i mycia rąk nie spotkała się jednak z dobrym przyjęciem wśród ówczesnej ludności. Starożytni Grecy, mimo dostępu do akweduktów, bieżącej wody czy łaźni miejskich, borykali się z groźnymi chorobami zakaźnymi. Badania archeologiczne nieopodal Akropolu pozwoliły na zidentyfikowanie materiału genetycznego pałeczek *Salmonella* wywołujących dur brzuszny, powszechnie uznany za chorobę „brudnych rąk”.

Za ojca dezynfekcji i antyseptyki uważa się Ignaza Semmelweisa – lekarza pracującego w wiedeńskim szpitalu w latach 50-tych XIX w. – który po raz pierwszy zaobserwował związek pomiędzy brakiem mycia rąk przez lekarzy a okołoporodową wysoką śmiertelnością kobiet. Semmelweis wysnuł wniosek, że przyczyną problemu jest „trupi jad”, przenoszony przez lekarzy i studentów odbierających porody, tuż po wyjściu z prosektorium. Wprowadzenie obowiązkowego mycia i dezynfekcji rąk w chlorowanej wodzie, dla lekarzy i studentów opuszczających prosektorium a wchodzących na sale porodowe, zminimalizowało śmiertelność wśród pacjentek prawie do zera. Śmiała hipoteza Semmelweisa była jednak ignorowana i krytykowana przez środowisko medyczne. Dopiero w latach 80-tych XIX w. dezynfekcja została powszechnie zaakceptowana. Brytyjski lekarz Joseph Lister udowodnił, że dezynfekcja rąk, opatrunków, narzędzi i nici chirurgicznych za pomocą kwasu karbolowego, pozwala na znaczne ograniczenie śmiertelnych infekcji. Wierząc w swoje metody skutecznie przeprowadził zabieg mastektomii, obarczonej wówczas dużym ryzykiem śmiertelnego zakażenia.

Aktualnie, pojęcia *higieny* i *dezynfekcji* są powszechnie znane. Trudno wyobrazić sobie codzienne funkcjonowanie z pominięciem nie tylko mycia i dezynfekcji rąk, ale również wszelkiego rodzaju powierzchni, w szczególności powierzchni często dotykanych oraz powierzchni sanitarnych. Obok obszarów weterynaryjnego, przetwórstwa żywności czy też użyteczności publicznej, najbardziej wymagający w aspekcie zwalczania patogenów jest obszar medyczny. Coraz powszechniej obserwowana oporność mikroorganizmów patogennych na zastosowane środki dezynfekcyjne wymusza działania ukierunkowane na ulepszenie istniejących i wdrażania nowych technologii dezynfekcji. Z drugiej strony duży nacisk kładzie się na to aby środowisko naturalne nie było nadmiernie obciążone stosowanymi w dezynfekcji środkami chemicznymi.

Globalny rynek środków dezynfekujących w 2022 roku był wart 6,16 bilionów dolarów (The Business Research Company, 2023). Do najpopularniejszych typów substancji dezynfekujących należały: czwartorzędowe związki amoniowe, kwas nadoctowy, związki na bazie chloru, nadtlenek wodoru, alkohole i aldehydy. Głównymi podmiotami gospodarczymi zaangażowanymi w produkcję środków dezynfekcyjnych są amerykańskie korporacje. W rankingu 10 największych firm

zajmujących się produkcją środków do dezynfekcji powierzchni, aż 7 swoją główną siedzibę posiada w USA (Raports and Data, 2023).

Środki dezynfekujące niewątpliwie odgrywają znaczącą rolę w zapobieganiu rozprzestrzenianiu się infekcji. Kluczowym elementem jest zatem właściwe oznaczenie i kontrola ich skuteczności biobójczej. Do oceny jałowości powierzchni wykorzystuje się badania zawiesinowe, polegające na przeprowadzeniu testów w zawiesinie testowej mikroorganizmów. Ich wadą jest brak odzwierciedlenia warunków rzeczywistych. Ważne jest zatem aby badania skuteczności przeprowadzać wg metod nośnikowych, stricte na powierzchni poddawanej dezynfekcji. Pozytywne wyniki uzyskane na drodze przeprowadzenia testów zawiesinowych bardzo często nie odpowiadają pozytywnemu wynikowi w testach nośnikowych.

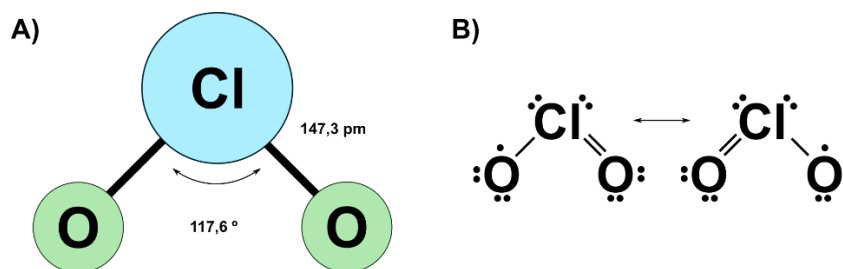
Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie aktywności biobójczej ditlenku chloru w wieloskładnikowych preparatach dezynfekcyjnych z wykorzystaniem metod zawiesinowych i nośnikowych, jak również ich ocena właściwości toksykologicznych i ekotoksykologicznych. Zbadano możliwości analityczne oznaczania substancji czynnej w roztworze oraz w powietrzu. Przeprowadzono badania aplikacyjne dezynfekcji fartuchów RTG oraz maseczek ochronnych.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Ditlenek chloru

1.1. Właściwości fizykochemiczne i zastosowanie

Ditlenek chloru (ClO_2) jest stosunkowo małą i wysoce energetyczną cząsteczką o właściwościach silnie utleniających. Oba wiązania chlor-tlen są równocenne i mają charakter pośredni między wiązaniem pojedynczym a podwójnym. Kąt pomiędzy wiązaniami wynosi $117,6^\circ$, a jego długość – $147,3 \text{ pm}$ (Ulenikov, et al., 2021). Cząsteczka ditlenku chloru jest rodnikiem, posiada jeden niesparowany elektron, który nie jest zlokalizowany przy określonym atomie, lecz wchodzi w skład trójelektronowego wiązania kowalencyjnego. To pozwala uzasadnić stabilność cząsteczki ClO_2 i brak tendencji do dimeryzacji, w przeciwieństwie do innych prostych rodników nieorganicznych o podobnej symetrii (Pauling, 1988). Na Rysunku 1 przedstawiono geometrię cząsteczki (A) oraz struktury rezonansowe ujawniające niesparowany elektron, skupiony wokół atomu tlenu (B).



Rysunek 1. A – geometria cząsteczki ClO_2 ; B – struktury rezonansowe ujawniające elektronem. Wykonanie własne na podst. (Insignares-Carrione, et al., 2021).

Podstawowe właściwości fizykochemiczne ClO_2 zaprezentowano w Tabeli 1. Jedną z najważniejszych właściwości fizycznych ClO_2 jest jego bardzo dobra rozpuszczalność w wodzie i słaba hydroliza, szczególnie w niskich temperaturach. Maksymalna rozpuszczalność ClO_2 pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze 20°C jest 10 razy wyższa niż rozpuszczalność chloru w tych warunkach (Black and Veatch Corporation, 2010).

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne ditlenku chloru (Black and Veatch Corporation, 2010; CIOP-PIB, 2023).

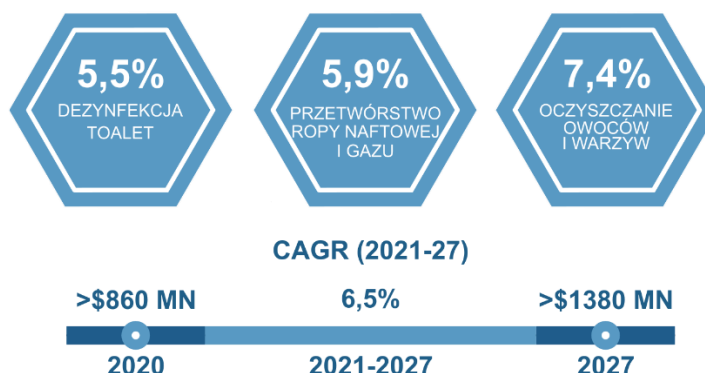
Parametr	Wartość
Masa cząsteczkowa	67,45 $\frac{g}{mol}$
Stan skupienia w temp. 20°C	gaz
Barwa	żółta
Zapach	ostry, duszący
Temperatura topnienia	59,5°C
Temperatura wrzenia	10,9°C
Gęstość gazu w temp 11°C	3,09 $\frac{g}{mL}$
Gęstość gazu względem powietrza	2,33
Ciepło właściwe w temperaturze 25°C	0,62 $\frac{J}{g \cdot K}$
Rozpuszczalność w temp 20°C pod ciśnieniem atmosferycznym	70 $\frac{g}{L}$

Ditlenek chloru znalazł szerokie zastosowanie:

- w przemyśle celulozowo-papierniczym, jako środek wybielający pulpy celulozowej. ClO₂ zyskał przewagę nad chlorem ze względu na brak tworzenia produktów ubocznych w postaci dioksyn (Kaur, et al., 2018; Axegard, 2019);
- w uzdatnianiu wody pitnej. Zastosowanie ClO₂ zamiast Cl₂ pozwoliło na ograniczenie tworzenia szkodliwych trihalometanów (THM), takich jak chloroform, bromoform, ale również chlorofenoli, chlorocyjanów czy kwasów haloctowych (Padhi, et al., 2019);
- w usuwaniu z wody żelaza i manganu (Aieta & Berg, 1986);
- w oczyszczalniach ścieków jako środek utleniający w pierwszym etapie rozkładu chemikaliów, np. barwników azowych stosowanych w przemyśle włókienniczym i farbiarskim (Emmert, et al., 2000);
- w transporcie i przetwórstwie żywności głównie do dezynfekcji warzyw i owoców, mięsa czy owoców morza (Andrews, et al., 2002; Sun, et al., 2019; Singh, et al., 2021);
- w dezynfekcji sprzętu medycznego i usuwaniu biofilmu (Smith, et al., 2001; Vaid, et al., 2010; Lowe, et al., 2013).

Światowy rynek ClO₂ w 2020 roku był wart ponad 860 mln dolarów i przewiduje się, że wartość CAGR (*ang. compound annual growth rate* skumulowany roczny wskaźnik wzrostu) pomiędzy 2020 a 2027 rokiem wzrośnie o 6,5% (GMI, 2021). Największy wzrost upatruje się w dezynfekcji i uzdatnianiu wody, oczyszczaniu owoców i warzyw oraz w przetwórstwie ropy naftowej i gazu. Szybka industrializacja i urbanizacja Chin, Japonii, Korei Południowej czy Australii, a tym samym coraz większe potrzeby kontrolowania zanieczyszczeń wody i ścieków, sprawia, że to właśnie w regionie APAC przewiduje się największe zapotrzebowanie na ClO₂ (Rysunek 2) (GMI, 2021).

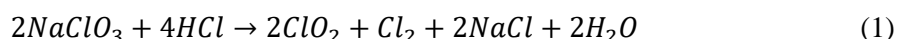
ŚWIATOWY RYNEK DITLENKU CHLORU



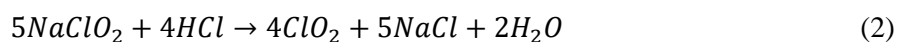
Rysunek 2. Przewidywana wartość rynkowa ditlenku chloru w wybranych obszarach zastosowania. Wykonanie własne na podst. (GMI, 2021).

1.2. Metody otrzymywania

Odkrycie ClO_2 zostało odnotowane w 1811 roku przez Sir Humphrey'a Davy'ego, który zasugerował, że w wyniku reakcji chloranu V potasu z kwasem siarkowym powstaje ditlenek chloru i chlor w stosunku molowym (2:1). Nieco później, głównie ze względów ekonomicznych, kwas siarkowy zastąpiono kwasem solnym, a chloran V potasu – chloranem V sodu (Równanie 1) (Black and Veatch Corporation, 2010)



Równanie stechiometryczne aktywacji chlorynu kwasem solnym przedstawiono w Równaniu 2



Opisywana reakcja jest najczęściej spotykaną metodą otrzymywania ClO_2 (Gordon, et al., 1972).

Inne metody otrzymywania ClO_2 zachodzą w wyniku reakcji chloranu III sodu (NaClO_2) z kwasem siarkowym – z wydajnością 50% (Gordon, et al., 1972), kwasem chlorowym (I) (HOCl) – z wydajnością 93% (Roberts, et al., 1980) czy też z bezwodnikiem octowym z wydajnością 93-95% (Masschelein, 1967). ClO_2 można otrzymać również w wyniku redukcji chloranu V sodu (NaClO_3) za pomocą ditlenku siarki, metanolu, chlorku sodu, kwasu solnego i nadtlenu wodoru (Deshwal & Lee, 2005).

Interesującym aspektem wśród badaczy stały się badania kinetyczne otrzymywania ClO_2 . Opracowano kinetykę reakcji otrzymywania ClO_2 z wykorzystaniem H_2O_2 (Qian, et al., 2004), przy użyciu chloranu V sodu i kwasu solnego (Li, et al., 2013), czy też chloranu V sodu i chlorku sodu w obecności kwasu siarkowego (Deshwal & Lee, 2004). Badano również kinetykę reakcji pomiędzy chloranem III sodu a kwasem solnym dla niskich stężeń ClO_2 , w zależności od temperatury i stężenia molowego reagentów. Wyznaczono makroskopowe równanie szybkości reakcji, które ma postać (Równanie 3) (Mo, et al., 2015):

$$-\frac{d[\text{NaClO}_2]}{dt} = 2,283 * 10^4 * e^{-\frac{37905}{RT}} * [\text{NaClO}_2] * [\text{HCl}]^{1,39} \quad (3)$$

gdzie:

t – czas, s

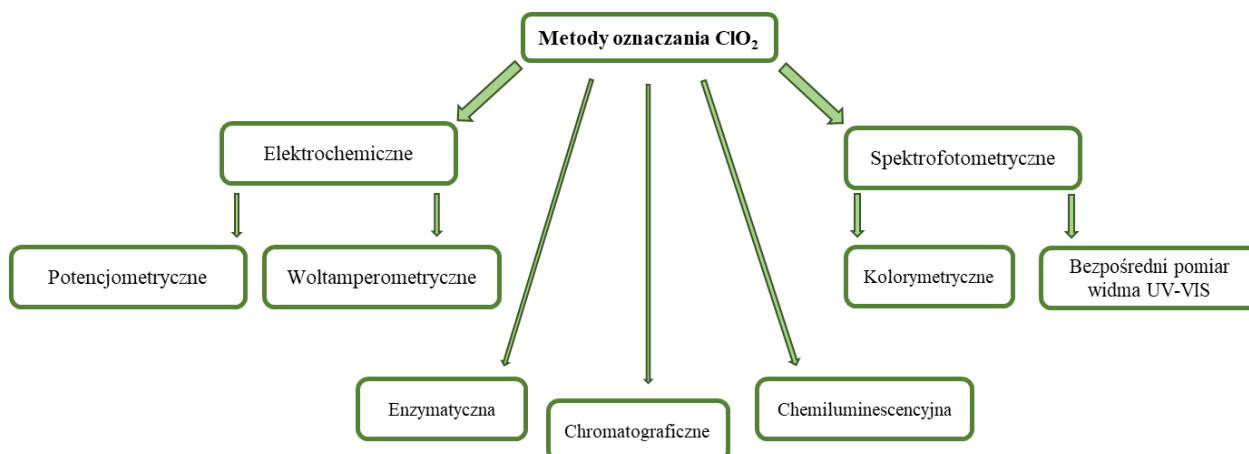
e – liczba Eulera, $e = 2,718$

R – stała gazowa, $R = 8,314 \frac{J}{mol \cdot K}$

T – temperatura, K

1.3. Metody oznaczania

W literaturze naukowej opisano wiele sposobów oznaczania zawartości ClO_2 w roztworach wodnych, ze szczególnym uwzględnieniem wody pitnej (Ammar, et al., 2015). Do najpowszechniej stosowanych należą metody elektrochemiczne, opierające się przede wszystkim na jodometrii oraz spektrofotometryczne. Te ostatnie, ze względu na dużą różnorodność odczynników do analiz spektrofotometrycznych, zaowocowały znaczną ilością publikacji naukowych (Tzanavaras, et al., 2007). Opracowano również techniki separacyjne z wykorzystaniem chromatografii jonowej (Watanabe, et al., 1998) i chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (Shin & Jung, 2006). Znane są także metody chemiluminescencyjne (Hollowell, et al., 1986) i enzymatyczne (Tinoco, et al., 1996) (Rysunek 3).



Rysunek 3. Metody oznaczania ClO_2 .

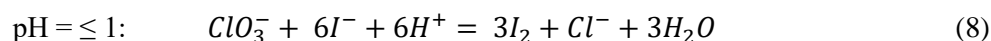
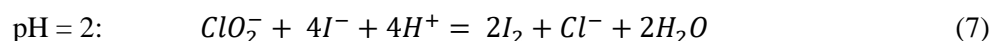
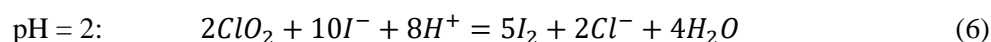
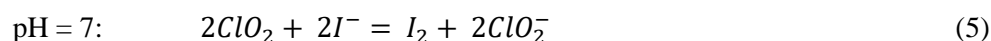
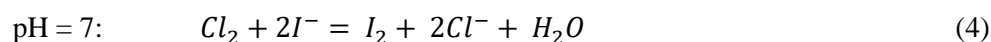
1.3.1. Metody elektrochemiczne

Metody elektrochemiczne oznaczania ClO_2 w roztworach wodnych dotyczą niskich stężeń. Barbolini i in. zaproponowali **metodę potencjometryczną** oznaczania zawartości ClO_2 . Przy stałym natężeniu prądu, badano zależność zmieniającego się potencjału od stężenia ditlenku chloru w analizie (Barbolini, et al., 1981).

Innym podejściem charakteryzują się **metody woltamperometryczne**, przy użyciu których mierzy się zależność stężenia analitu od natężenia prądu, przy stałym bądź zmiennym napięciu. Są to najbardziej preferowane metody oznaczania chloru na różnych stopniach utlenienia, tj. ClO_2 , Cl^- , ClO_2^- , ClO_3^- (Ammar, et al., 2015).

Zawartość ClO_2 zbadano m.in. z wykorzystaniem różnicowej polarografii pulsowej, w której stężenie analitu określono na podstawie reakcji ClO_2 z barwnikiem czerwienia alizarynową S (DASA). Metoda nie wykazuje wrażliwości na chloryn i podchloryn, a interferencje pochodzące od jonów miedziowych, manganowych czy glinu mogą być maskowane przez dodatek EDTA (Quentel, et al., 1994). Oikawa i in. (Oikawa, et al., 1992) zaproponowali metodę oznaczania ClO_2 z wykorzystaniem membranowej elektrody woltamperometrycznej. Mechanizm pozwala na oznaczenie ClO_2 na poziomie stężeń poniżej 1 ppm. Dodatkowo, metoda nie wykazuje wrażliwości na obecność jonów nieorganicznych i nie wymaga zastosowania innych odczynników, co może być użyteczne w technologiach automatycznego monitorowania stężenia ClO_2 .

Oznaczanie chloru, w tym także ClO_2 , na różnych stopniach utlenienia, dokonano z wykorzystaniem miareczkowania amperometrycznego reagentów powstałych na skutek reakcji redoks z jodkiem potasu (KI) (Masschelein, 1984). Równowaga redukcji poszczególnych form chloru zależy od pH wg równań (Aieta, et al., 1984):



Redukcja ClO_2 do jonów chlorkowych wymaga przeniesienia 5 elektronów na atom chloru (Gordon, 1983). Reakcja przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie jeden elektron zostaje przeniesiony na atom chloru, w wyniku czego powstaje jon chlorynowy. Jeśli pH układu wynosi 7 lub więcej reakcja zatrzymuje się na tym etapie, a redukcji ulega tylko $\frac{1}{5}$ cząsteczek ClO_2 (Równanie 5). Gdy w drugim etapie, pH zostaje obniżone do 2, następuje przeniesienie kolejnych 4 elektronów na jon chlorynowy (Równanie 7), jak również redukcja pozostałych cząsteczek ClO_2 bezpośrednio do jonu chlorkowego (Równanie 6). Jony chlorynowe obecne w roztworze, w pH 2, również zostają zredukowane do jonów chlorkowych (Równanie 7). W silnie kwasowym środowisku ($\text{pH} \leq 1$), możliwe jest wykrycie i oznaczenie jonów ClO_3^- (Równanie 8).

W oparciu o powyższą wiedzę chemiczną Haller i Listek zaproponowali metodę oznaczania za pomocą czterech miareczkowań amperometrycznych z wykorzystaniem metaarsenu sodu jako titranta (Haller & Listek, 1948). Procedura ujęta jest w zbiorze standardowych metod badania wody i ścieków, jednak oparta jest na miareczkowaniu tlenkiem fenyloarsyny (PAO) zamiast metaarsenu sodu (APHA Method 4500 ClO_2E , 2017).

1.3.2. Metody spektrofotometryczne

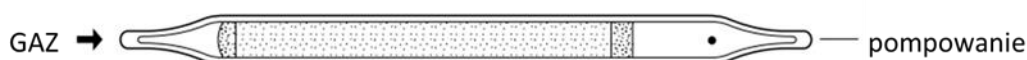
Wśród metod spektrofotometrycznych oznaczania ditlenku chloru w roztworach wodnych wyróżnić można metodę **bezpośredniego pomiaru widma UV-VIS**. Charakterystyczny dla ditlenku chloru pik widoczny jest w obszarze 320-400 nm przy maksimum absorpcji $\lambda_{max} = 360,0 \text{ nm}$ (Gauw, et al., 1999).

W literaturze opisanych jest wiele **metod kolorymetrycznych**, które są oparte na reakcji utlenienia, a tym samym odbarwienia barwnika spektrofotometrycznego pod wpływem ClO_2 . Stężenie określa się poprzez porównanie wartości absorbancji próbki zawierającej ClO_2 i próbki ślepej – pozbawionej analitu. Spadek absorbancji roztworu jest proporcjonalny do stężenia (Emmert, et al., 2000). Barwniki spektrofotometryczne wykorzystywane do oznaczania ClO_2 to m.in.: amarant (Emmert, et al., 2000; Nadupali, et al., 2011), fiolet chromowy K (Hofmann, et al., 1998), zieleń lizaminowa B (Chiswell & O'Halloran, 1991; Pepich, et al., 2007), czerwień chlorofenolowa (Wheeler & Lott, 1978; Fletcher & Hemmings, 1985).

1.3.3. Metody oznaczania ditlenku chloru w powietrzu

Metody wykorzystywane do oznaczania zawartości ClO_2 w powietrzu są analogiczne do tych przedstawionych na Rysunku 3. Zasada polega na pobraniu próbki ClO_2 z powietrza i wykonaniu odpowiedniej analizy. Podstawową wadą takiego postępowania jest narażenie na rozkład ClO_2 w próbce oraz trudność w oznaczaniu w czasie rzeczywistym. Gui i in. przedstawili możliwość zastosowania grafenu i tlenku grafenu w detektorach gazowego ClO_2 . Wykazano bardzo dobre właściwości adsorpcyjne ClO_2 na grafenie i tlenku grafenu w porównaniu z produktami jego rozkładu, np. Cl_2 , HClO , czy HCl (Gui, et al., 2019). Innym rozwiązaniem jest zastosowanie detektorów półprzewodnikowych zbudowanych z tlenku indu i tlenku żelaza (Obvintseva & Gubanova, 2004).

Firma Sensidine przygotowała interesujące rozwiązanie oznaczania zawartości ClO_2 w rurkach detekcyjnych wypełnionych o-toluidyną. Pod wpływem ClO_2 utlenia się ona do ortochionu, zmieniając zabarwienie z białej na czerwono-pomarańczową (Sensidyne, 2023) (Rysunek 4).



Rysunek 4. Rurki detekcyjne do oznaczania gazowego ClO_2 . Wykonanie własne na podst. (Sensidyne, 2023).

2. Aktywność biobójcza

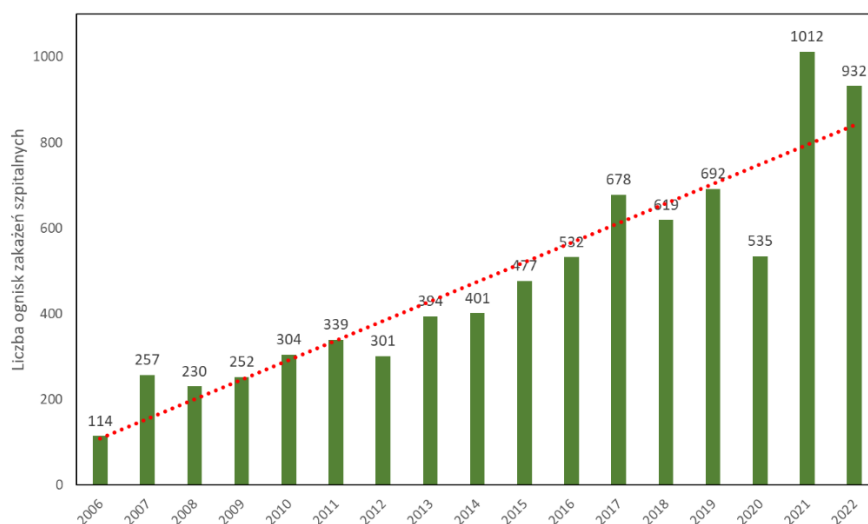
2.1. Patogeny chorobotwórcze i problemy współczesnej dezynfekcji

Oporność patogenów na działanie środków dezynfekcyjnych a jednocześnie zapobieganie ich rozprzestrzeniania to poważny problem. Na Rysunku 5 przedstawiono piramidę oporności patogenów wobec biocydów. Na szczycie piramidy obok prionów znajdują się spory bakteryjne i prątki. Stosunkowo wysoko plasują się również wirusy bezotoczkowe. Najmniej odporne na działanie środków biobójczych są wirusy otoczkowe (Mc Donnell & Burke, 2011).



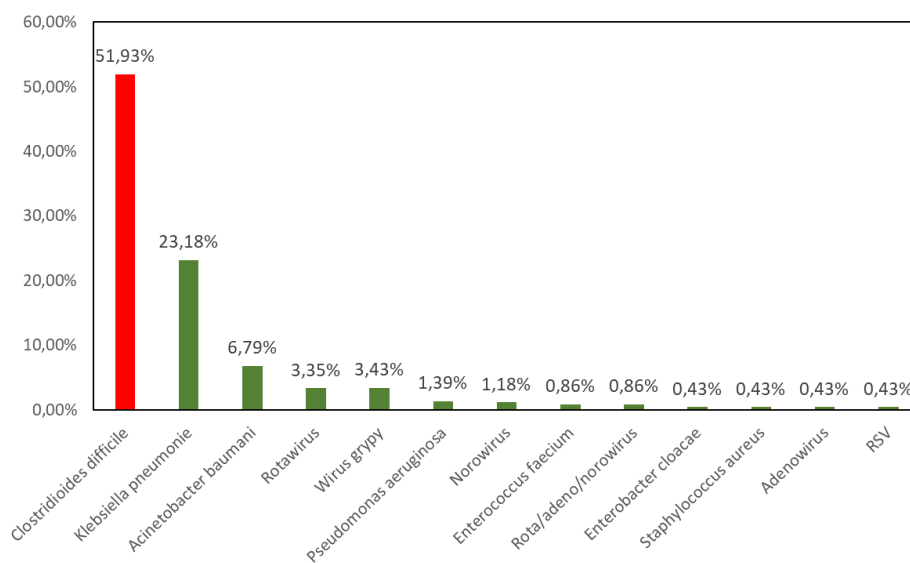
Rysunek 5. Oporność patogenów na biocydy. Wykonanie własne na podst. (Mc Donnell & Burke, 2011).

Obszarem najbardziej narażonym na zjawiska zakażeń patogenami chorobotwórczymi i jednocześnie najbardziej wymagającym jest obszar medyczny. W Polsce w latach 2006-2022 zaobserwowano tendencję wzrostową odnotowanych ognisk zakażeń szpitalnych (Rysunek 6) (GIS, 2023). Zjawisko związane jest przede wszystkim z rosnącym wskaźnikiem przyjmowania antybiotyków i chemioterapii, co znacząco wpływa na odporność pacjentów, ale również z nieefektywnym procesem dezynfekcji (Stephenson, et al., 2020).



Rysunek 6. Liczba ognisk zakażeń szpitalnych w latach 2006-2022. Wyniki bez zakażeń SARS-CoV-2 (GIS, 2023).

Spośród wszystkich zakażeń szpitalnych, odnotowanych w 2022 roku w Polsce, (z pominięciem SARS-CoV-2) ponad połowę stanowiły zakażenia wywołane bakterią przetrwalnikową *Clostridioides difficile*. Na drugim miejscu plasowała się pałeczka zapalenia płuc *Klebsiella pneumoniae* a na trzecim bakteria Gram ujemna *Acinetobacter baumannii* (Rysunek 7) (GIS, 2023).



Rysunek 7. Procentowy udział wybranych patogenów wywołujących ogniska epidemiczne w 2022 roku (GIS, 2023).

Bakteria *Clostridioides difficile* należy do grupy Gram-dodatnich beztlenowych laseczek, tworzących spory umożliwiające długotrwałe przetrwanie w środowisku zewnętrznym (Aminzadeh, et al., 2020). Głównym źródłem szkodliwości opisywanego patogenu jest obecność dwóch toksyn: toksyny *Clostridioides difficile* A (TcdA) oraz toksyny *Clostridioides difficile* B (TcdB) będącymi dużymi wielodomenowymi białkami o masie cząsteczkowej odpowiednio 308 i 270 kDa (Pruitt, et al., 2009). Wykazano związek z zarażeniem bakterią a poantybiotykową biegunką,

rzekomobłoniastym zapaleniem okrężnicy czy perforacją jelit u człowieka (Barbut, et al., 2011). Szczególnie trudnym w zwalczaniu jest szczep o rybotypie R027, który w odróżnieniu od innych, wytwarza kilkunastokrotnie więcej TcdA oraz TcdB, jak również toksynę binarną o aktywności ADP-rybozylotransferazy uczestniczącej w apoptozie komórek i przyczyniającej się do znacznego uszkodzenia tkanek (Gonçalves, et al., 2004; Warny, et al., 2005). Należy dodać, iż wiele patogenów, w tym również *Clostridioides difficile*, przenoszonych jest drogą fekalno-oralną poprzez zanieczyszczone dłonie. Właściwą strategią dla powyższego mechanizmu transmisji walki z drobnoustrojami jest skuteczne czyszczenie i dezynfekcja powierzchni często dotykanych (klamki poręcze, ale również monitory LCD, panele wind itp.) oraz powierzchni sanitarnych (Surawicz, et al., 2013).

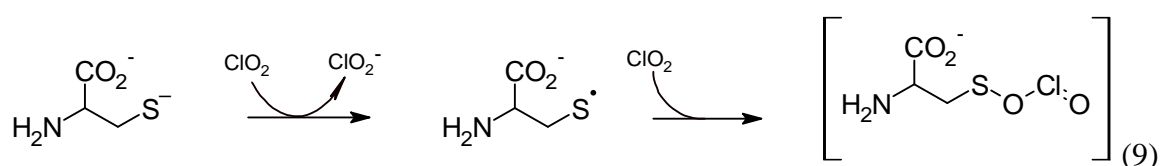
2.2. Aktywność biobójcza ditlenku chloru

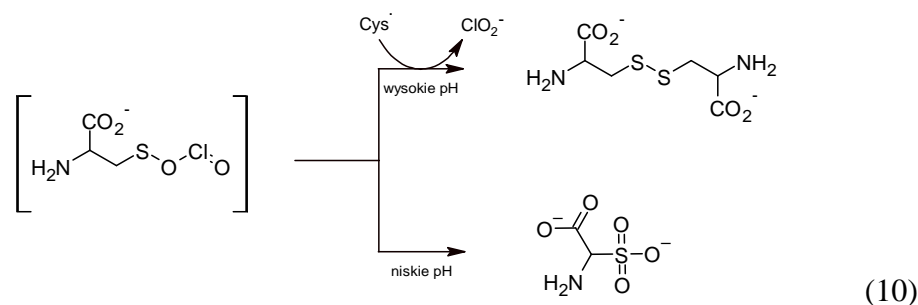
Badania aktywności chemicznej ClO_2 w roztworach wodnych są przedmiotem wielu prac badawczych (Rosenblatt, et al., 1967; Hoigne & Bader, 1982; Hoigne & Tratnyek, 1994; Yakupov, et al., 2011). Badania wykazują możliwość efektywnych i szybkich reakcji z różnymi grupami funkcyjnymi na drodze utleniania wolnorodnikowego. Mechanizm działania biobójczego można uzasadnić oddziaływaniem z wieloma cząsteczkami o kluczowym znaczeniu dla atakowanego organizmu, na różnych poziomach struktury komórki i wirusa. Z uwagi na silne właściwości utleniające, ClO_2 wykazuje aktywność biobójczą poprzez wpływ na równowagę komórkowych procesów przebiegających z przeniesieniem elektronu.

Mechanizm denaturacji białek za sprawą ClO_2 opiera się na reakcji z sześcioma aminokwasami: cysteiną, tryptofanem, tyrozyną, proliną, hydroksyproliną oraz histydyną, przy czym reaktywność trzech pierwszych jest najwyższa (Tan, et al., 1987).

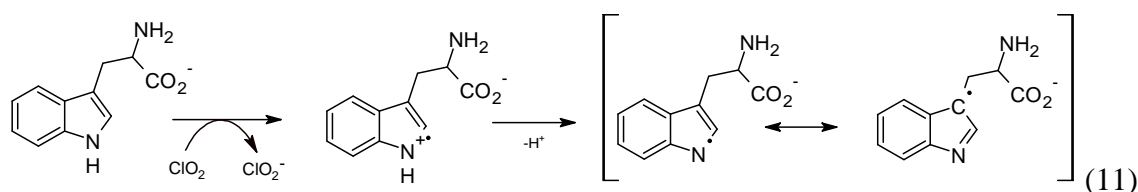
Tyrozyna, pod wpływem ClO_2 ulega utlenieniu do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (DOPA) lub 2,4,5-trihydroksyfenyloalaniny (Ogata, 2007).

Degradacja a tym samym utrata funkcji biochemicznych cysteiny stanowi efekt dimeryzacji tego aminokwasu z wytworzeniem wiązania disulfidowego (Schöneich, 2008). Prekursorem reakcji jest rodnik tiolowy powstający w wyniku wysokiej podatności grupy tiolowej cysteiny na utlenianie rodnikowe. Rekombinacja rodnika tiolowego z kolejną cząsteczką ClO_2 daje przejściowy addukt Cys-ClO_2 (Równanie 9). W warunkach wysokiego pH reakcja z kolejnym rodnikiem tiolowym cysteiny prowadzi do wytworzenia wspomnianego dimeru (cystyna), zaś w pH niskim do sulfonowego kwasu cysteinowego (Równanie 10) (Ison, et al., 2006).





Degradacja tryptofanu zachodzi z udziałem aminowych atomów azotu. Równanie 11 przedstawia jeden z dwóch szlaków rodnikowego ataku cząsteczki ClO_2 skierowanego na indolowy atom azotu i prowadzący do wytworzenia kationorodnika a następnie, po odszczepieniu protonu, do rodnika stabilizowanego, o dwóch formach mezomerycznych (Navalon, et al., 2009).



Mechanizm oddziaływania ClO_2 na organizmy żywe może być wynikiem silnych interferencji ClO_2 w procesach redoks, decydujących o równowagach elektrochemicznych w mitochondriach i błonach komórkowych, w szczególności w odniesieniu do układu redoks NADH/NAD^+ odpowiedzialnego za oddychanie komórkowe i pośredniczącego w syntezie ATP (Bakmutova-Albert, et al., 2008; Voet, et al., 2011).

W kontekście składu aminokwasowego przeanalizowano potencjalny mechanizm inaktywacji toksyn TcdA oraz TcdB w *C. difficile* (Augustyn, et al., 2022) oraz inaktywacji koronawirusa SARS-CoV-2 (Kály-Kullai, et al., 2020) pod wpływem ClO_2 .

2.3. Metody oznaczania skuteczności biobójczej

Na terenie Unii Europejskiej wymagane jest aby skuteczność biobójcza chemicznych środków dezynfekcyjnych była badana wg jednolitych metod (Tarka & Nitsch-Osuch, 2021; Tyski, et al., 2022). Od 1989 roku Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN) opracowuje metody badania skuteczności środków dezynfekcyjnych w Europie. Wprowadzono trójfazowy model badania produktów dezynfekujących obejmujących metody zawiesinowe i nośnikowe (EN 14885, 2022):

- **Badania fazy I** – obejmują podstawowe testy zawiesinowe wobec bakterii, grzybów i drożdży, mające za zadanie określić, czy składniki chemiczne użyte w preparacie wykazują aktywność biobójczą; metody nie wskazują na obszary zastosowań;
- **Badania fazy II** – obejmują 2 typy badań:
 - **Badania fazy II etapu I** – ilościowe badania zawiesinowe wobec bakterii, grzybów, drożdży, prątków, spor i wirusów wykonane w celu określenia skuteczności

biobójczej w zdefiniowanych obszarach działania: medycznym, weterynaryjnym, spożywczym i instytucjonalnym,

- **Badania fazy II etapu II** – ilościowe badania nośnikowe mające na celu ocenę działania biobójczego, na powierzchni w zdefiniowanych jak wyżej obszarach działania. Ze względu na metodę aplikacji, wyróżnić można metody z udziałem i bez udziału czynnika mechanicznego, np. przecierania. Istnieje również podział metod ze względu na rodzaj powierzchni badanej: powierzchnia porowata i nieporowata;
- **Badania fazy III** – obejmują badania w warunkach praktycznych. Normy nie są jeszcze dostępne.

Skuteczność biobójczą określa się na podstawie stopnia redukcji w skali logarytmicznej (log), jako różnicę pomiędzy liczebnością patogenów w próbie kontrolnej i badanej (EN 14885, 2022).

Badania skuteczności procesów gazowania (Lowe, et al., 2013) lub zamglawiania (Schinköthe, et al., 2021) ale również dezynfekcji termicznej (Oliveira, et al., 2010) bądź wykorzystaniem promieni UV (Kierat, et al., 2020) bada się za pomocą pasków bądź krążków wskaźnikowych, na których umieszczona jest określona ilość patogenów (najczęściej $10^3 - 10^6$ CFU). Mikroorganizmami najczęściej stosowanymi na paskach wskaźnikowych są spory *Bacillus atropaheus* oraz *Geobacillus stearothermophilus*. Charakteryzują się one dużą opornością na czynniki zewnętrzne a jednocześnie są łatwe w hodowli i nieszkodliwe. Odgrywają zasadniczą rolę w monitorowaniu skuteczności sterylizacji i dezynfekcji. Wskaźniki dokładniej opisane są w normie ISO 11138-1:2017 (ISO 11138-1:2017, 2017).

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

3. Tezy pracy

Na podstawie dostępnych danych literaturowych dotyczących skuteczności biobójczej ditlenku chloru, jak również metod analitycznych jego oznaczania oraz danych dotyczących toksyczności oraz ekotoksyczności, sformułowano następujące tezy pracy:

Teza główna:

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

Tezy cząstkowe:

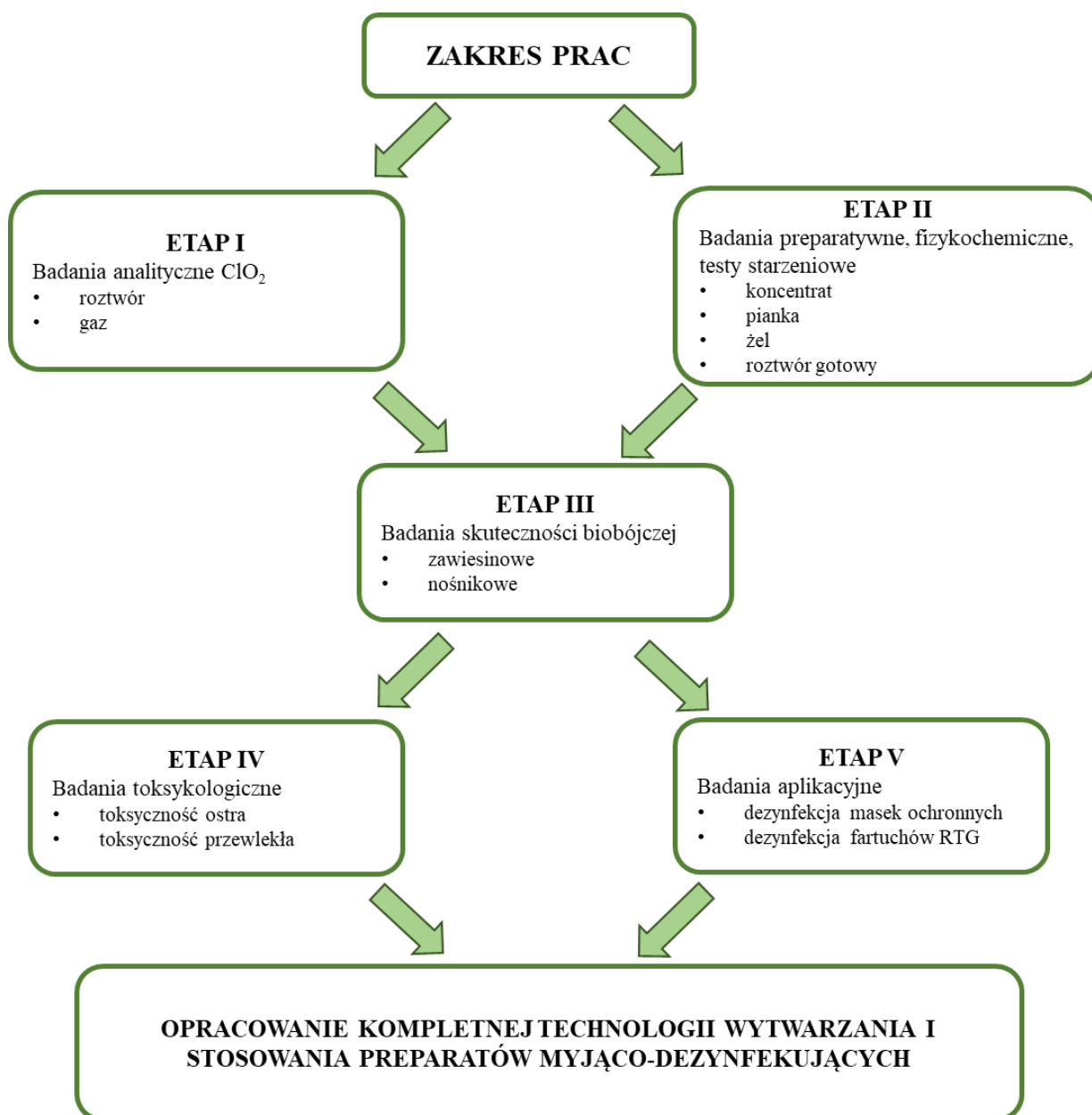
- *Połączenie technik analitycznych: woltamperometrycznej oraz spektrofotometrycznej pozwala na oznaczenie zawartości ditlenku chloru w układach innych niż woda.*
- *Obecność związków powierzchniowo czynnych w układach z ditlenkiem chloru zwiększa skuteczność biobójczą.*
- *Istnieje zależność pomiędzy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

4. Cel i zakres pracy

Celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności biobójczej ClO₂ w wieloskładnikowych preparatach dezynfekcyjnych.

Badania realizowane były w 5 etapach:

- **Badania analityczne ClO₂.** Badania obejmowały elektrochemiczne i spektrofotometryczne metody oznaczania stężenia ClO₂ w roztworach wodnych, jak również bilansowe i spektrofotometryczne metody oznaczenia związku w formie gazowej. Istotnym aspektem było określenie wpływu matrycy organicznej na oznaczalność ClO₂. W tym etapie dobrano oraz zwalidowano odpowiednie metody analityczne do zastosowania w kolejnych etapach badań.
- **Badania preparatywne** uwzględniały przygotowanie formułacji preparatów dezynfekcyjnych w różnych formach użytkowych tj. koncentracie myjąco-dezynfekującym do dużych powierzchni, pianki do powierzchni dotykowych, żelu do powierzchni sanitarnych, płynu dezynfekcyjnego gotowego oraz koncentratu do produkcji gazu. Produkty poddano testom stabilności, a następnie po pozytywnej weryfikacji kontynuowano prace badawcze w kolejnych etapach.
- **Badania skuteczności biobójczej,** obejmowały testy zawiesinowe zgodne z normami: PN EN 13727, PN-EN 13624, PN-EN 14348, PN-EN 14476 oraz nośnikowe zgodne z normami: PN-EN 16615, PN-EN 16777, PN-EN 17387 i PN-EN 17272. Testy przeprowadzono wobec zdefiniowanych dla obszarów medycznych patogenów chorobotwórczych: bakterii, grzybów, prątków, spor oraz wirusów.
- **Badania toksykologiczne i ekotoksykologiczne** obejmowały wyznaczenie parametrów granicznych dla właściwości toksykologicznych i ekotoksykologicznych przygotowanych preparatów.
- **Badania aplikacyjne i testy użytkowe.** W ich skład weszły procesy dezynfekcji gazowym ClO₂ masek ochronnych i fartuchów RTG, z uwzględnieniem określenia wytrzymałości materiałów, z których wykonane były środki ochrony osobistej.



Rysunek 8. Schemat zakresu prac wykonanych w ramach pracy doktorskiej.

5. Metodyka

5.1. Metodyka oznaczania ditlenku chloru w roztworach wodnych

Analityka oznaczania ClO_2 w roztworach wodnych jest skomplikowana ze względu na brak możliwości pozyskania wzorca. Z tego powodu zastosowano podejście wielometodyczne, a uzyskane wyniki porównano pomiędzy poszczególnymi metodami, jak również odniesiono do dostępnych danych literaturowych. W zakresie stężeń 20-100 ppm *wag.* ClO_2 zastosowano metodę spektrofotometryczną przez pomiar bezpośredni. Dla stężeń niskich tj. do 20 ppm *wag.* zastosowano metodę miareczkowania woltamperometrycznego z wykorzystaniem jodometrii oraz metody spektrofotometryczne z wykorzystaniem barwników: amarantu (AM), zieleni lizaminowej B (LGB) oraz czerwieni chlorofenolowej (CPR). Badania analityczne oraz wszelkie interakcje ClO_2 z substancjami potencjalnie interferującymi, prowadzono z wykorzystaniem podstawowego roztworu wzorcowego, zawierającego ClO_2 i pozbawionego nieprzereagowanego NaClO_2 . Działania miały zweryfikować, które z metod będzie można docelowo zastosować w oznaczaniu zawartości ClO_2 w utworzonych produktach, bogatych w substancje organiczne. W gotowych formułacjach substancje organiczne zawarte były w takich elementach jak prekursorzy i aktywatory (były to między innymi surfaktanty); wyróżniano także przyspieszacze aktywacji które stanowiły część aktywatorów.

5.1.1. Przygotowanie podstawowego roztworu wzorcowego ClO_2

Podstawowy roztwór wzorcowy ClO_2 sporządzano poprzez rozpuszczenie w wodzie 0,25 g NaClO_2 i 5 mL roztworu stęż. HCl w stosunku 1:1 z wodą oraz mianowanie metodą miareczkowania woltamperometrycznego opisanego w pkt. 5.1.2. W celu aktywacji, roztwór pozostawiono w ciemni na 24 h (Równanie 12).



Stechiometryczna zawartość otrzymanego ClO_2 przy całkowitym przereagowaniu NaClO_2 wynosi 0,1492%, czyli 1492 ppm *wag.* (Równania 13-14):

$$\frac{c_{\text{ClO}_2}}{c_{\text{NaClO}_2}} = \frac{4 \cdot M_{\text{ClO}_2}}{5 \cdot M_{\text{NaClO}_2}} \quad (13)$$

$$c_{\text{ClO}_2} = \frac{4}{5} * \frac{67,5}{90,5} * c_{\text{NaClO}_2} = 0,597 * 0,25\% = 0,1492\% = 1492 \text{ ppm} \quad (14)$$

W reakcji zastosowano duży nadmiar HCl aby zmaksymalizować wydzielanie ClO_2 oraz doprowadzić do całkowitego przereagowania NaClO_2 w układzie.

5.1.2. Oznaczanie metodą miareczkowania woltamperometrycznego

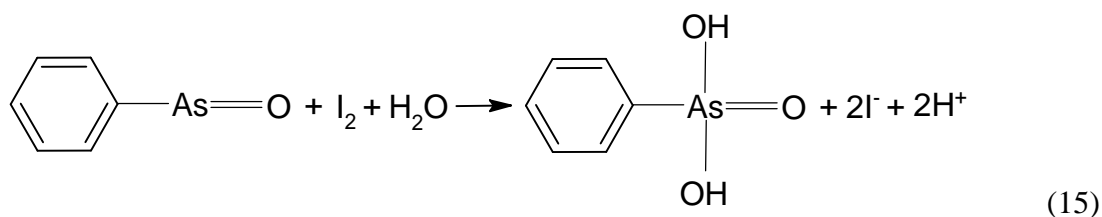
Procedura

Oznaczenia zawartości ditlenku chloru przeprowadzono z wykorzystaniem titratora woltamperometrycznego TitraLab AT 1000 Series firmy HACH wyposażonego w podwójną elektrodę platynową IntelliCAL MTC695 (Rysunek 9). Pomiary wg metody woltamperometrycznej przeprowadzono opierając się na metodzie APHA 4500-ClO₂ E, przeznaczonej do oznaczania ClO₂ w wodzie i ściekach (APHA Method 4500 ClO₂E, 2017).



Rysunek 9. Titrator woltamperometryczny TitraLab AT 1000 Series.

Analizę wykonano dla roztworu wzorcowego przygotowanego wg pkt. 5.1.1. i rozcieńczonego 1000 razy oraz dla 0,25% czystego roztworu NaClO₂ rozcieńczonego 1000-krotnie. Dla każdego z roztworów odmierzone po 200 ml przygotowanego rozcieńczenia do dwóch zlewek. Metoda opierała się na czterech miareczkowaniach amperometrycznych z wykorzystaniem jako titranta tlenku fenylarsyny (PAO) o stężeniu 0,00564 eq/mL. Na skutek reakcji redoks, PAO utlenia się do kwasu fenylarsonowego zaś jod redukuje do jonu jodkowego (Równanie 15).



W miareczkowaniu 1 do próbki dodano 1 mL buforu fosforanowego o pH 7 i 1 g KI, które pozwoliły na oznaczenie cząsteczek ClO₂ oraz wolnego Cl₂. Następnie do tej samej próbki dodano 2 mL roztworu HCl o stężeniu 2,5 M w celu obniżenia pH do 2. W miareczkowaniu 2 oznaczono zawartość jonów ClO₂⁻ z reakcji (1) oraz z pierwotnego, obecnego w próbce. Drugą próbkę w pH 7 poddano barbotażowi strumieniem gazowego azotu przez 15 min, w celu usunięcia ClO₂, po czym oznaczono zawartość wolnego Cl₂ – miareczkowanie 3. W pH 2 oznaczono zawartość jonów ClO₂⁻ pierwotnie obecnych w próbce – miareczkowanie 4 (Tabela 2).

Tabela 2. Procedura miareczkowania amperometrycznego.

Próbka 1	
Miareczkowanie 1 (pH 7)	$2ClO_2 + 2I^- \rightarrow 2ClO_2^- + I_2 \quad (1)$ $Cl_2 + 2I^- \rightarrow 2Cl^- + I_2$ $I_2 + As(I) \rightarrow As(III) + 2I^-$
Miareczkowanie 2 (pH 2)	$5ClO_2^- \text{ (z reakcji 1)} + 4H^+ \rightarrow 4ClO_2 + Cl^- + 2H_2O$ $5ClO_2^- \text{ (pierwotny)} + 4H^+ \rightarrow 4ClO_2 + Cl^- + 2H_2O$
Próbka 2	
Miareczkowanie 3 (pH 7)	$Cl_2 + 2I^- \rightarrow 2Cl^- + I_2$ $I_2 + As(I) \rightarrow As(III) + 2I^-$
Miareczkowanie 4 (pH 2)	$5ClO_2^- \text{ (pierwotny)} + 4H^+ \rightarrow 4ClO_2 + Cl^- + 2H_2O$ $I_2 + As(I) \rightarrow As(III) + 2I^-$

Obliczenia przedstawiono dla ClO_2 oraz jonów ClO_2^- . Zawartość jonów ClO_2^- obliczono na podstawie stechiometrii równań wg miareczkowania 4 w Tabeli 2 oraz wg Równania 16

$$N_{ClO_2} * v_p = N_{PAO} * v_{PAO}^{(4)} \quad (16)$$

stąd:

$$\frac{m_{ClO_2}}{m_{ClO_2} * 1L} = \frac{v_{PAO}^{(4)}}{v_p} * N_{PAO} \quad (17)$$

oraz

$$\frac{m_{ClO_2}}{1L} = c_{ClO_2} = \frac{v_{PAO}^{(4)}}{v_p} * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} = D * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} \quad (18)$$

Stosunek stechiometryczny $ClO_2:ClO_2^-$ wynosi 5:4. Zawartość jonów ClO_2^- oblicza się zatem z wykorzystaniem wzoru:

$$c_{ClO_2^-} = \frac{5}{4} * D * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} = D * N_{PAO} * 16875, \frac{mg \ ClO_2^-}{L} \quad (19)$$

Obliczeń zawartości ClO_2 dokonano na podstawie różnicy pomiędzy zawartością jonów ClO_2^- oznaczonych w miareczkowaniu 2 oraz w miareczkowaniu 4 (Tabela 2). Zawartość jonów ClO_2^- w miareczkowaniu 2 obliczono wg Równania 20:

$$c_{ClO_2^-}^{(2)} = \frac{5}{4} * \frac{v_{PAO}^{(2)}}{v_p} * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} = \frac{5}{4} * B * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} \quad (20)$$

Ze względu na równe masy cząsteczkowe ClO_2 oraz ClO_2^- oraz równy stosunek ilościowy (1:1) tych reagentów w reakcji z miareczkowania 1 (Tabela 2) zawartość ClO_2 można obliczyć wg Równania 21:

$$c_{ClO_2} = c_{ClO_2^-}^{(1)} = \frac{5}{4} * B * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} - \frac{5}{4} * D * N_{PAO} * \frac{M_{ClO_2}}{5} \quad (21)$$

stąd:

$$c_{ClO_2} = \frac{5}{4} (B - D) * N_{PAO} * 13500, \frac{mg \ ClO_2}{L} \quad (22)$$

gdzie:

N_{ClO_2} – stężenie ditlenku chloru, $\frac{mol}{L}$

v_p – objętość próbki badanej, L

N_{PAO} – stężenie titranta, $\frac{mol}{L}$

$v_{PAO}^{(x)}$ – objętość titranta w miareczkowaniu (x), L

m_{ClO_2} – masa ditlenku chloru, mg

c_{ClO_2} – stężenie ditlenku chloru, $\frac{mg}{L}$

M_{ClO_2} – masa molowa ditlenku chloru, $\frac{mg}{mol}$

$c_{ClO_2^-}$ – stężenie jonów chlorynowych, $\frac{mg}{L}$

$c_{ClO_2^-}^{(x)}$ – stężenie jonów chlorynowych w miareczkowaniu (x), $\frac{mg}{L}$

B – rezultat miareczkowania 2 (mL titranta w punkcie równoważnym/ mL próbki)

D – rezultat miareczkowania 4 (mL titranta w punkcie równoważnym/ mL próbki)

Interferencje

W celu zbadania prawidłowości oznaczenia ditlenku chloru w obecności substancji potencjalnie przeszkadzających, przygotowano roztwory wyjściowe o stężeniu 50, 250, oraz 500 mg/L ClO_2 . Roztwory zawierały tylko ClO_2 , jak również ClO_2 wraz z interferentami, tj. 0,5% przyspieszacza aktywacji ClO_2 lub 2% związku powierzchniowo czynnego. Każdy z przygotowanych roztworów rozcieńczono do stężenia 0,5 mg/L ClO_2 (rozcieńczenia odpowiednio 100-, 250-, 1000-krotne) i poddano analizie woltamperometrycznej. Wpływ interferentów określono na podstawie % odzysku (*Recovery*), wg Równania 23:

$$Rec = \frac{c_{ClO_2}^i}{c_{ClO_2}} * 100\% \quad (23)$$

gdzie:

Rec – procent odzysku, %

$c_{ClO_2}^i$ – stężenie ditlenku chloru w próbkach zawierających interferent, $\frac{mg}{L}$

c_{ClO_2} – stężenie ditlenku chloru w próbce pozbawionej interferentu, $\frac{mg}{L}$

5.1.3. Oznaczanie spektrofotometryczne ClO₂ w roztworach wodnych – pomiar bezpośredni

Procedura

Analizy spektrofotometrycznej dokonano z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS U-2900 firmy Hitachi (Rysunek 10).



Rysunek 10. Spektrofotometr UV-VIS U-2900.

W celu zdefiniowania charakterystyki kalibracyjnej dla oznaczeń zawartości ClO₂ w roztworze wodnym, przygotowano serię roztworów kalibracyjnych. Stężenie ClO₂ obliczono na podstawie oznaczenia metodą woltamperometryczną, stanowiącą bezpośrednią metodę odniesienia (pkt 5.1.2).

Parametry analizy:

- zakres długości fal: 200-400 nm
- prędkość skanowania: 400 nm/min
- kuweta: kwarcowa o drodze optycznej $l = 1$ cm

Wartości absorbancji odnotowywano w maksimum absorpcji dla ClO₂ tj. przy długości fali $\lambda_{\max} = 358,5$ nm.

Interferencje

Aby zbadać wpływ potencjalnie przeszkadzających interferentów na wynik analizy zawartości ClO₂ w wodzie destylowanej przygotowano roztwory o stężeniu 1% wybranych związków powierzchniowo czynnych oraz przykładowych substancji przyspieszających aktywację ClO₂ (tzw. przyspieszaczy aktywacji). Sporządzono widma UV-VIS wg parametrów zdefiniowanych w procedurze.

5.1.4. Oznaczanie spektrofotometryczne ClO₂ w roztworach wodnych – barwniki spektrofotometryczne

W zakresie niskich stężeń ClO₂ przystąpiono do opracowania i zwalidowania metod spektrofotometrycznych wykorzystujących barwniki spektrofotometryczne: AM, LGB oraz CPR. Zbadano stabilność badanych próbek w czasie. Wyznaczono granice wykrywalności LOD (*ang. limit of detection*) oraz granice oznaczalności LOQ (*ang. limit of quantification*). Określono zakres badanych stężeń oraz ich liniowość i precyzję. Określono wpływ obecności surfaktantów, przyspieszaczy aktywacji oraz NaClO₂ na oznaczanie zawartości ClO₂ w roztworach wodnych. Metody te nie spełniły minimalnych założeń związanych z wpływem interferentów na oznaczalność zawartości ClO₂.

Szczegółowy opis metodyki zamieszczono na płycie CD w Załączniku 1.

5.2. Metodyka oznaczania gazowego ditlenku chloru w powietrzu.

Opracowano sposób oznaczania zawartości gazowego ClO₂ w powietrzu metodą spektrofotometryczną. Przeprowadzono pomiary absorbancji fazy gazowej pozostającej w stanie bliskim równowagi z niewielką znaną objętością roztworu w kuwecie pomiarowej, znajdującej się poza wiązką pomiarową. Dodatkowo sporządzono widma dla roztworu przed i po procesie desorpcji równowagowej. Taki sposób postępowania pozwolił na możliwość bilansowego oznaczenia zdesorbowanego ClO₂, a tym samym na wyznaczenie krzywej kalibracyjnej. Wyznaczenie stężenia ClO₂ w fazie gazowej w stanie bliskim równowagi z roztworem rozpatrzono z wykorzystaniem trzech modeli doświadczalnych: 1) zgodnie z prawem Henry'ego, 2) zgodnie z modelem nieliniowym, dopasowanym do punktów doświadczalnych, 3) zgodnie z modelem liniowym wyznaczonym metodą regresji liniowej.

Drugim sposobem oznaczania gazowego ClO₂ w powietrzu było zastosowanie specjalistycznego detektora PortaSense III. Uzyskane wyniki porównano do wartości obliczonych na drodze bilansu masowego uwzględniającego różnicę w zawartości ClO₂ w roztworze przed i po procesie gazowania oraz kubaturę komory dekontaminacyjnej, w której przeprowadzono proces dezynfekcji.

5.2.1. Oznaczanie spektrofotometryczne gazowego ClO₂ w powietrzu

Procedura

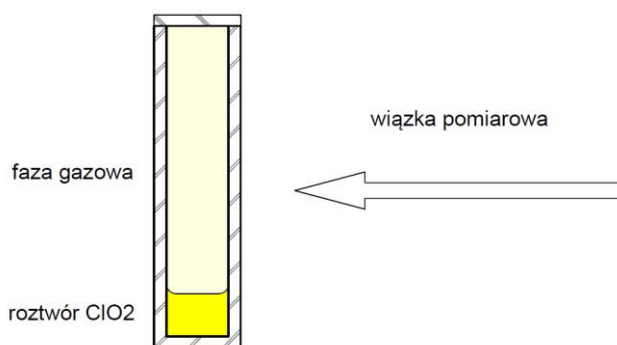
W kolbkach miarowych przygotowano serię rozcieńczeń podstawowego roztworu wzorcowego o stężeniu ok $c = 1500$ ppm wag. wg pkt. 5.1.1 (Tabela 3). Stężenie roztworu wzorcowego zostało wyznaczone z wykorzystaniem metody woltamperometrycznej, traktowanej jako bezwzględna metoda odniesienia (pkt. 5.1.2).

Tabela 3. Rozcieńczenia podstawowego roztworu wzorcowego do pomiarów spektrofotometrycznych.

Lp.	Rozcieńczenie	Zawartość ClO ₂ , ppm wag.
1	0,4 c	600 ppm
2	0,3 c	450 ppm
3	0,2 c	300 ppm
4	0,1 c	150 ppm

c – stężenie podstawowego roztworu wzorcowego

Do kuwety kwarcowej przeniesiono 0,5 mL przygotowanego rozcieńczenia i uszczelniono za pomocą korka i parafilmu. Próbkę inkubowano przez 15 min w ciemności w celu desorpcji ClO₂ z fazy ciekłej do fazy gazowej i ustalenia równowagi układu. Następnie kuwetę przeniesiono do spektrofotometru i sporządzono widmo fazy gazowej. Aparat wyzerowano wcześniej względem pustej, suchej kuwety. Szkic układu pomiarowego przedstawiono na Rysunku 11.



Rysunek 11. Szkic układu pomiarowego.

W kolejnym kroku sporządzono widmo wody destylowanej jako próbki zerowej, a do kuwety zawierającej 0,5 mL r-ru ClO₂ dodano 3,5 mL wody destylowanej (8-krotne rozcieńczenie roztworu). Sporządzono widmo roztworu ClO₂ po desorpcji o stężeniu końcowym (x). Następnie do kuwety kwarcowej dodano 0,5 mL świeżego roztworu ClO₂ (wg Tabeli 3) i od razu 3,5 mL wody destylowanej. Sporządzono widmo roztworu ClO₂ o stężeniu początkowym (x_0).

Parametry analizy:

- zakres długości fal: 200-400 nm
- prędkość skanowania: 400nm/min
- kuweta: kwarcowa o drodze optycznej $l = 1$ cm

Wartości absorbancji odnotowywano dla roztworu wodnego przy długości fali $\lambda_{max} = 358,5$ nm oraz gazu przy $\lambda_{max} = 351,0$ nm.

Bilans desorpcji ClO₂

Stężenie początkowe (x_0) i końcowe (x) (przed i po desorpcji) roztworów wyznaczono za pomocą bezpośredniej metody spektrofotometrycznej z wykorzystaniem równania krzywej kalibracyjnej wyznaczonej w pkt 6.2 (Równanie 24):

$$x_0, x = 52,39 * A_i \quad (24)$$

gdzie:

- x_0, x – stężenie początkowe i końcowe, ppm wag.
- A_i – wartość absorbancji roztworu w $\lambda_{max} = 358,5 \text{ nm}$

Dla danego układu doświadczalnego, w pierwszej kolejności, wyznaczono charakterystykę równowagi gaz-ciecz wynikającej z prawa Henry'ego. Przebieg krzywej równowagowej wykreślono z wykorzystaniem Równania 25:

$$\frac{y^*}{x^*} = H_{ClO_2} \quad (25)$$

gdzie:

- y^* – stężenie równowagowe ClO_2 w fazie gazowej, ppm wag.
- x^* – stężenie równowagowe ClO_2 w fazie ciekłej, ppm wag.
- H_{ClO_2} – stała Henry'ego, $\frac{ppm}{ppm}$

stąd:

$$y^* = \frac{(x_0 - x^*) * m_r}{m_g} = H_{ClO_2} \cdot x^* \quad (26)$$

gdzie:

- m_r – masa roztworu ClO_2 w kuwecie, g
- m_g – masa fazy gazowej, g

zatem:

$$x^* = \frac{(x_0 - x^*)}{H_{ClO_2}} * \frac{m_r}{m_g} \quad (27)$$

Przyjąwszy wartość stałej Henry'ego dla ClO_2 $H_{ClO_2} = 35.5 \frac{ppm}{ppm}$ (Young, 1983), oraz tożsamość z Równania 28:

$$\gamma = \frac{m_r}{m_g} = \frac{v_r}{v_g} * \frac{\rho_r}{\rho_g} = \frac{0.5}{4.5} * \frac{1000}{1.2} = 92,59 \quad (28)$$

gdzie:

- v_r – objętość fazy ciekłej, mL
- v_g – objętość fazy gazowej, mL
- ρ_r – gęstość roztworu ClO_2 , $\frac{kg}{m^3}$
- ρ_g – gęstość powietrza, $\frac{kg}{m^3}$

równanie opisujące krzywą równowagi przyjmie postać (Równanie 29):

$$x^* = 0,7228 * x_0 \quad (R=1,0000) \quad (29)$$

Krzywą doświadczalną zależności stężenia ClO₂ po desorpcji od stężenia początkowego ClO₂ aproksymowano z wykorzystaniem modelu nieliniowego eksponencjalnego wyrażonego Równaniem 30:

$$\hat{x}(x_0) = 1481,6 * \left[\exp\left(\frac{x_0}{2085,9}\right) - 1 \right] \quad (R=1,0000) \quad (30)$$

Istotną cechą powyższego modelu jest zachowanie sensu fizycznego w badanym obszarze stężeń, poprzez spełnienie warunku zbieżności do krzywej opisującej prawo Henry'ego (Równania 31-32):

$$\frac{d\hat{x}(x_0)}{dx_0} = \left\{ a \left[\exp\left(\frac{x_0}{b}\right) - 1 \right] \right\} = a * \frac{1}{b} * \exp\left(\frac{x_0}{b}\right) \quad (31)$$

$$\lim_{x_0 \rightarrow 0} \frac{d\hat{x}(x_0)}{dx_0} = \frac{a}{b} * \exp\left(\frac{x_0}{b}\right) = \frac{a}{b} = \frac{1481,6}{2085,9} = 0,71 \approx \frac{\gamma}{\gamma + H_{ClO_2}} \quad (32)$$

Przebieg krzywej empirycznej aproksymowano również uproszczonym modelem liniowym. Współczynnik nachylenia prostej uzyskano metodą najmniejszych kwadratów. Krzywa przyjmuje postać (Równanie 33):

$$\hat{x} = 0,8091 * x_0 \quad (R=0,9994) \quad (33)$$

Stężenie ClO₂ w fazie gazowej (y) wyznaczono na podstawie bilansu masowego ClO₂ w fazie ciekłej przed i po desorpcji (x_0, x_i). Uzyskane wartości empiryczne porównano z prawem Henry'ego. W tym celu wyznaczono charakterystykę równowagi gaz-ciecz dla układu ClO₂-woda wykorzystując znaną wartość stałej Henry'ego wyrażoną Równaniem 34:

$$y_i^* = H_{ClO_2} * x_i = 35,5 * x_i \quad (34)$$

Wartości ClO₂ w fazie gazowej obliczono z ogólnego równania bilansowego (Równanie 35):

$$y_i = [x_{0i} - x(x_{0i})] * \gamma = \Delta x_i * \gamma \quad (35)$$

Wartość przyrostu stężenia Δx_i oszacowano na podstawie równania regresji liniowej (Równanie 33). Równanie ma wówczas postać (Równanie 36):

$$y_i = 21,846 * x_i \quad (36)$$

W przypadku wartości przyrostu oszacowanych na podstawie aproksymacji nieliniowej (Równanie 30) równanie wygląda następująco (Równanie 37):

$$y_i = \gamma * \left[2085,9 \ln\left(\frac{x_i}{1481,6} + 1\right) - x_i \right] \quad (37)$$

Badania fazy gazowej

Widma UV-VIS gazowego ClO₂ charakteryzowały się znaczącą absorbcją tła w zakresie 0,15-0,50 jednostek absorbcji. W celu redukcji wpływu tła na wartość sygnału ilościowego, każde z uzyskanych widm poddano korekcji poprzez odjęcie widma tła zdefiniowanego Równaniem 38:

$$A_t(\lambda) = \frac{A_{500} - A_{250}}{250}(\lambda - 250) + A_{250} \quad (38)$$

gdzie:

- $A_t(\lambda)$ – wartość absorbancji tła odpowiadającej długości fali λ , *AU*
- A_{500} – wartość absorbancji na widmie mierzonym odpowiadająca długości fali $\lambda=500$ nm, *AU*
- A_{250} – wartość absorbancji na widmie mierzonym odpowiadająca długości fali $\lambda=250$ nm, *AU*
- λ – długość fali, *nm*

W obliczeniach wykorzystano wynik pomiaru absorbancji pików o maksymalnej wartości absorbancji tj. przy długości fali $\lambda = 351$ nm.

Zależności absorbancji fazy gazowej ClO₂ nad roztworem od stężenia początkowego i końcowego roztworu aproksymowano modelem prostoliniowym przechodzącym przez początek układu współrzędnych.

Wyznaczenie zależności absorbancji fazy gazowej nad roztworem od bilansowego stężenia ClO₂ w fazie gazowej pozwoliła na oszacowanie wartości molowego współczynnika absorpcji gazowego ditlenku chloru dla długości fali $\lambda = 351$ nm.

W celu odniesienia wyznaczonej wartości molowego współczynnika ClO₂ do wartości przytoczonych w artykułach skoncentrowanych na badaniach właściwości widma UV gazowego ClO₂ dokonano konwersji wyznaczonej wartości molowego współczynnika absorpcji do wartości powierzchni przekroju czynnego cząsteczki ClO₂ na absorpcję promieniowania (Wahner, et al., 1987; Kromminga, et al., 2003; Arango, et al., 2014).

W celu przeliczenia wykorzystano postać prawa Beera daną Równaniem 39:

$$\frac{dI(z)}{dz} = -N * I(z) * \sigma \quad (39)$$

gdzie:

- $I(z)$ – strumień promieniowania w punkcie drogi optycznej, *W*
- z – współrzędna długości drogi optycznej, *cm*
- N – stężenie molekularne absorbujących cząsteczek, *cm⁻³*
- σ – przekrój czynny cząsteczki ClO₂ na absorpcję promieniowania, *cm²*

Przyjmując granice całkowania zgodnie z Równaniem 40

$$\int_{I_0}^I \frac{dI(z)}{I(z)} = -N * \sigma * \int_0^l dz \quad (40)$$

jak również wprowadzając zależności (Równania 41-42):

$$N = N_A * c \quad (41)$$

$$a \stackrel{\text{def}}{=} \log \frac{I_0}{I} \quad (42)$$

gdzie:

- c – stężenie molowe, $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$
- N_A – stała Avogadro, $N_A = 6.023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

- a – absorbancja, AU
 I_0 – natężenie światła padającego, lx
 I – natężenie światła po przejściu przez ośrodek gazowego ClO_2 , lx

otrzymano Równanie 43 dogodne dla obliczeń:

$$\sigma = 1000 * \frac{\ln 10}{N_A} * \epsilon = 3823 * 10^{-23} * \epsilon \quad (43)$$

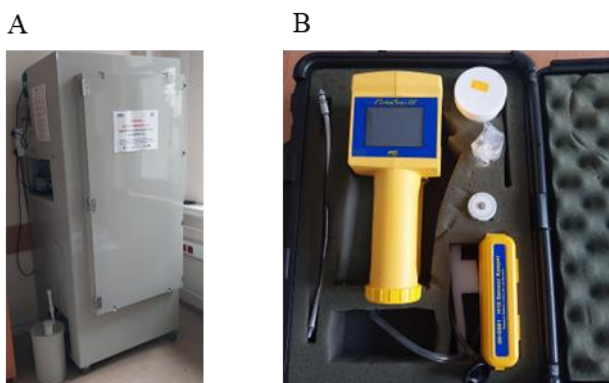
gdzie:

ϵ - molowy współczynnik absorpcji dla ClO_2 , $\frac{L}{mol*cm}$

5.2.2. Oznaczanie gazowego ClO_2 w powietrzu z wykorzystaniem detektora

Procedura

Do generatora gazowego ClO_2 o pojemności 3 L połączonego z komorą dekontaminacyjną o pojemności 1000 L (Rysunek 12A) wprowadzono roztwór ClO_2 w ilości i stężeniu odpowiadającym 200, 500, 750 oraz 1000 ppm *wag.* gazowego ClO_2 . Układ uszczelniono i uruchomiono pompę powietrza na około 10 min w celu desorpcji ClO_2 z fazy ciekłej do fazy gazowej. Pierwszego odczytu stężenia ClO_2 w powietrzu, z wykorzystaniem detektora PortaSens III model ATI D16 z sensorem 00 1359 (Rysunek 12B), dokonano po 5 min, kolejnych co 15 min przez okres 4 h.



Rysunek 12. A – komora dekontaminacyjna; B – detektor PortaSens III.

Oszacowanie stężenia gazowego ClO_2 w komorze dekontaminacyjnej

Stężenie ClO_2 w fazie gazowej zostało oszacowane na drodze bilansu masowego, z wykorzystaniem spektrofotometrycznego oznaczenia ClO_2 w roztworze przed i po desorpcji przez pomiar bezpośredni (pkt. 5.2.3.). Stężenie początkowe x_0 oraz objętość v_r roztworu do wygenerowania gazowego ClO_2 przy założonym stężeniu gazu y_i obliczono z równań dla bilansu masowego (Równania 44-47):

$$y_i = (x_0 - x_i) * \gamma \quad (44)$$

oraz

$$y_i = H_{ClO_2} * x_i \quad (45)$$

stąd:

$$x_0 = y_i * \frac{1 + \frac{\gamma}{H_{ClO_2}}}{\gamma} \quad (46)$$

oraz:

$$\gamma = \frac{v_r}{\rho_g * (v_c - \frac{v_r}{10^3})} \quad (47)$$

gdzie:

y_i – stężenie równowagowe ClO_2 w fazie gazowej, *ppm wag.*

x_0 – stężenie początkowe ClO_2 w roztworze, *ppm wag.*

x_i – stężenie równowagowe ClO_2 w roztworze, *ppm wag.*

γ – tożsamość $\frac{m_r}{m_g}$

H_{ClO_2} – stała Henry'ego, $H_{ClO_2} = 35,5 \frac{ppm}{ppm}$

v_r – objętość wprowadzonego do generatora roztworu ClO_2 , *mL*

ρ_g – gęstość powietrza, $\frac{kg}{m^3}$

v_c – objętość całkowita aparatury badawczej, $v_c = 1003 L$

Roztwory o stężeniu początkowym odpowiadającym zawartości ClO_2 w powietrzu na poziomie 200-1000 *ppm wag.* przygotowano poprzez zmieszanie z wodą 4% roztworu $NaClO_2$ o stężeniu 25% i 4% roztworu H_2SO_4 o stężeniu 21%. Roztwór pozostawiono do aktywacji w ciemni przez 24 h, a następnie przygotowano odpowiednie rozcieńczenie. Zawartość ClO_2 zweryfikowano na podstawie metody spektrofotometrycznej wg pkt. 5.1.3.

Stężenie gazowego ClO_2 mierzonego z wykorzystaniem detektora rejestrowano w jednostkach *ppm objętościowych (ppmv)*. Konwersji na *ppm wag.* dokonano z wykorzystaniem równania gazu doskonałego (Równanie 48):

$$p * V = n * R * T \quad (48)$$

po przekształceniu:

$$m = \frac{p * V * M * 10^3}{R * T} \quad (49)$$

gdzie:

m – masa ClO_2 w $1 m^3$ powietrza, *kg*

p – ciśnienie gazu, $p = 101325 Pa$

V – objętość gazowego ClO_2 w komorze tj. w $1 m^3$, *cm³*

n – liczba moli gazowego ClO_2 , *mol*

M – masa molowa ClO_2 , $M = 67,5 \frac{g}{mol}$

R – stała gazowa, $R = 8,31 \frac{Pa * m^3}{mol * K}$

T – temperatura gazu, $T = 293,15K$

Masę gazowego ClO₂ m otrzymano w przeliczeniu na 1 m³ powietrza. W celu uzyskania stężenia w ppm wag. wartości odniesiono w przeliczeniu na 1 kg powietrza z wykorzystaniem wzoru (Równanie 50):

$$C_g = \frac{m \cdot 10^6}{\rho_g \cdot v_g} \quad (50)$$

gdzie:

C_g – stężenie wagowe gazowego ClO₂, ppm wag.

m – masa ClO₂ w 1 m³ powietrza, kg

ρ_g – gęstość powietrza, $\rho_g = 1,2 \frac{kg}{m^3}$

v_g – objętość fazy gazowej, $v_g = 1,003 m^3$

Dokonano analizy porównawczej wartości stężeń gazowego ClO₂ uzyskanych poprzez pomiar detektorem PortaSens III, wartości otrzymanych w wyniku analizy bilansowej roztworu oraz wartości założonych teoretycznie.

5.3. Metodyka badań preparatywnych

Przystąpiono do tworzenia receptur następujących produktów:

- **Armex 5 MD** – koncentratu do **mycia i dezynfekcji** dużych powierzchni;
- **Armex 5 foam** – pianki do **mycia i dezynfekcji** powierzchni dotykowych;
- **Armex 5 WC** – żelu do **mycia i dezynfekcji** powierzchni sanitarnych;
- **Armex 2000 ultraczysty** – koncentratu do **dezynfekcji** powierzchni;
- **Armex 5 vH** – koncentratu do **dezynfekcji** powierzchni drogą powietrzną.

W Tabeli 4 zaprezentowano skład poszczególnych preparatów. Produkty generowane *in situ* do mycia i dezynfekcji składały się z:

- PREKURSORA, którego kluczowym składnikiem był chloryn sodu, niezbędny do wygenerowania ClO₂ poprzez zakwaszenie oraz związki powierzchniowo czynne;
- AKTYWATORA, w skład którego wchodziły przede wszystkim kwasy, środki powierzchniowo czynne, substancje wspomagające aktywację (tzw. przyspieszacze aktywacji), w przypadku żeli – zagęstniki.

Preparaty wyłącznie do dezynfekcji charakteryzowały się brakiem matrycy organicznej.

Tabela 4. Skład utworzonych preparatów na bazie ClO₂.

Produkt	Aktywacja	Skład	
Armex 2000 ultraczysty	produkt gotowy do rozcieńczenia	czysty roztwór aktywnego ClO ₂	
		PREKURSOR	AKTYWATOR
Armex 5 vH	<i>in situ</i>	chloryn sodu	kwasy
Armex 5 MD	<i>in situ</i>	chloryn sodu + surfaktanty	kwasy+ surfaktanty + przyspieszacze aktywacji
Armex 5 foam	<i>in situ</i>	chloryn sodu + surfaktanty	kwasy+ surfaktanty + przyspieszacze aktywacji
Armex 5 WC	<i>in situ</i>	chloryn sodu + surfaktanty + zagęstniki	kwasy+ surfaktanty + przyspieszacze aktywacji + zagęstniki

Istotą badań preparatywnych było dobranie środków powierzchniowo czynnych oraz zagęstników (w przypadku żeli), uwzględniając kompatybilność z chlorynem sodu przed i po aktywacji, stabilność w środowisku kwasowym, właściwości pianotwórcze i emulgujące. Badania nad składem aktywatorów skoncentrowano głównie na doborze odpowiedniego kwasu oraz substancji wspomagających szybkie generowanie ditlenku chloru w układzie (tzw. przyspieszaczy aktywacji).

Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowano receptury preparatów do testów starzeniowych. Ich celem była weryfikacja parametrów fizykochemicznych, zawartości ClO₂, lepkości w przypadku żeli w czasie 12-18 miesięcy.

5.3.1. Preparowanie własnych kompozycji myjąco-dezynfekujących

Dobór środków powierzchniowo czynnych

Preparowanie własnych kompozycji myjąco-dezynfekujących rozpoczęto od doboru środków powierzchniowo czynnych uwzględniając kompatybilność, w rozumieniu stabilności i homogeniczności roztworu, z NaClO₂ w prekursorze oraz w środowisku kwasowym aktywatora. W tym celu sporządzono formułacje zawierające: 1) 0,6% NaClO₂ oraz 2% wybranego surfaktantu; 2) 5% kwasu cytrynowego oraz 0,4-2% wybranego związku powierzchniowo czynnego. Obserwowano wizualnie stabilność próbek w czasie 1 miesiąca.

Po tym czasie, przeprowadzono aktywację wybranych formułacji prekursorów i aktywatorów w stosunku (1:1). W przypadku uzyskania stabilnej postaci formy aktywnej produktu, zbadano zdolność pianotwórczą oraz zdolność emulgowania.

Dobór substancji zagęszczających w żelach

Prace nad preparatem żelowym Armex 5 WC należało dodatkowo rozszerzyć o dopasowanie odpowiednich substancji zagęszczających w prekursorze zawierającym NaClO₂ oraz aktywatorze zawierającym kwas. Sporządzono próbki zawierające: 1) 0,6% NaClO₂ oraz 0,5% wybranego zagęstnika; 2) 5% kwasu cytrynowego oraz 0,5% wybranego zagęstnika. Obserwowano wizualnie stabilność próbek w czasie 1 miesiąca.

Po tym czasie, stabilne próbki prekursora aktywowano 5% roztworem kwasu cytrynowego w stosunku (1:1). Z kolei stabilnymi próbkami aktywatora, aktywowano czysty roztwór NaClO₂ o stężeniu 0,6% w stosunku (1:1). Obserwowano wizualnie stabilność otrzymanych roztworów aktywnych ClO₂.

Dobór kwasu i substancji przyspieszających aktywację

Badania nad składem aktywatora skoncentrowano przede wszystkim na doborze odpowiedniego kwasu oraz substancji przyspieszających aktywację w taki sposób, aby uzyskać odpowiednie stężenia ClO₂ w poszczególnych produktach. W Tabeli 5 zaprezentowano założenia dotyczące stężenia, czasu i sposobu aktywacji. Koncentrat Armex 2000 ultraczysty zawierał aktywny ClO₂, stąd czas aktywacji nie był wymagany. Roztwór należało jedynie rozcieńczyć 20 razy. Dla produktu Armex 5 vH założeniem było, aby po zmieszaniu 2% prekursora i 2% aktywatora otrzymać stężenie powyżej 2000 ppm wag. ClO₂ w czasie 24 h.

Tabela 5. Założone stężenia ClO₂ i sposób aktywacji opracowywanych produktów

Produkt	Założone stężenie, ppm wag.	Czas aktywacji	Sposób aktywacji
Armex 5 MD	100	5 min	<i>in situ</i> ; 0,5% prekursora i 0,5% aktywatora rozpuścić w 99% wody
Armex 5 foam	1500	1 min	<i>in situ</i> ; zmieszać 50% prekursora i 50% aktywatora
Armex 5 WC	1500	1 min	<i>in situ</i> ; zmieszać 50% prekursora i 50% aktywatora
Armex 2000 ultraczysty	100	-	rozcieńczyć 5% produktu z 95% wody
Armex 5 vH	2000	do 24 h	<i>in situ</i> ; 2% prekursora i 2% aktywatora rozpuścić w 96% wody *

* stężenie roztworu, a tym samym ilość zastosowanego prekursora i aktywatora zależy od kubatury dezynfekowanego pomieszczenia

Stężenie ClO₂ po aktywacji z badanymi kwasami i przyspieszaczami aktywacji oznaczono po 1, 5 oraz 10 min od aktywacji.

Opracowanie technologii otrzymywania produktu z aktywnym ClO₂

Proces wytwarzania preparatu na bazie roztworu aktywnego ClO₂ Armex 2000 ultraczysty polegał na absorpcji gazowego ClO₂ do wody demineralizowanej. Szczegóły opisywanego procesu

otrzymywania produktu stanowi *know – how* firmy MEXEO i nie zostały zaprezentowane w niniejszej pracy.

5.3.2. Analiza fizykochemiczna

Analizy fizykochemicznej preparatów na bazie ClO₂ dokonano dla produktów referencyjnych oraz własnych formułacji myjąco-dezynfekujących. Metodykę opierano na normach PKN, normach zakładowych oraz skróconych instrukcji obsługi aparatury badawczej dostępnych w firmie MEXEO w Laboratorium Rozwojowym i Kontroli Jakości (LRKJ) oraz w Laboratorium Projektów Badawczych II (LPB II).

Określenie postaci badanych próbek

Postać badanych roztworów dezynfekujących określono wizualnie. Uwzględniono barwę, stan skupienia i stopień zmętnienia formułacji.

Oznaczanie pH w roztworach wodnych

Pomiaru pH dokonano na podstawie normy PN-EN 1262:2004 (PN-EN 1262, 2004). Zmierzono wartości pH 1% roztworów w wodzie destylowanej oraz czystych produktów bez rozcieńczania – 100%.

Oznaczenie liczby kwasowej

Liczbę kwasową (I_A) oznaczono zgodnie z normą zakładową nr MEXEO ZN/12/12: „Oznaczanie liczby kwasowej”. Do kolby stożkowej odważono około 1 g badanej próbki produktu. Dodano 30-40 mL wody destylowanej i 3-4 krople 0,1% roztworu tymoloftaleiny. Próbkę miareczkowano 0,5 M roztworem KOH do momentu zmiany zabarwienia roztworu na kolor niebieski, utrzymujący się 1 min.

Liczbę kwasową obliczono ze wzoru (Równanie 51):

$$I_A = \frac{28,05 \cdot V_{KOH} \cdot f_{KOH}}{m}, \quad (51)$$

gdzie:

I_A – liczba kwasowa, $\frac{mg\ KOH}{g}$

28,05 – ilość KOH zawarta w 1 mL roztworu o stężeniu 0,5 M, $\frac{mg}{mL}$

V_{KOH} – objętość roztworu mianowanego KOH zużyta w miareczowaniu, mL

f_{KOH} – współczynnik normalności 0,5 M roztworu KOH,

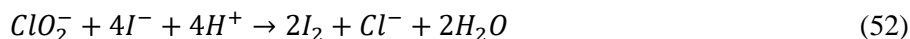
m – naważka badanej próbki, g

Oznaczanie zawartości chlorynu sodu

Zawartość NaClO₂ w próbkach oznaczono na podstawie normy PN-74/C-04600/13 stosowanej do oznaczania ClO₂ w wodzie w stężeniu powyżej 5 ppm wag. (PN-74/C-04600/13, 1975). Norma przewiduje oznaczanie nie tylko **aktywnego ClO₂** w roztworze, ale również

całkowicie **dostępnego ClO₂**. W prekursorach produktów możliwe jest zatem zbadanie zawartości NaClO₂.

Do kolby z korkiem odważono około 1 g badanej próbki, dodano wodę destylowaną, roztwór KI oraz roztwór H₂SO₄. Zamkniętą korkiem kolbę pozostawiono w zaciemnionym miejscu na około 5 min. W układzie zaszła reakcja zgodna z Równaniem 52:



W następnym kroku próbkę zmiareczkowano 0,1 M roztworem Na₂S₂O₃ do uzyskania jasnożółtego zabarwienia. Dodano około 1 mL roztworu skrobi i dalej miareczkowano do zaniku niebieskiego zabarwienia (Równanie 53).



Zawartość NaClO₂ obliczono z wykorzystaniem Równania 54:

$$C_{\text{NaClO}_2} = \frac{2,26 \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot f_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 100\%}{m \cdot 1000}, \quad (54)$$

gdzie:

C_{NaClO_2} – zawartość chlorynu sodu, %

2,26 – ilość NaClO₂ odpowiadająca 1 mL roztworu Na₂S₂O₃, zużytego do zmiareczkowania 1 g próbki, $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

$V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ – objętość roztworu mianowanego Na₂S₂O₃, zużyta w miareczkowaniu, mL

$f_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ – współczynnik normalności 0,1 M roztworu Na₂S₂O₃,

m – naważka badanej próbki, g

Oznaczanie zawartości ditlenku chloru

Zawartość **aktywnego ClO₂** w produktach referencyjnych, jak również w przygotowywanych formulacjach oznaczano z wykorzystaniem opracowanej metody spektrofotometrycznej poprzez bezpośredni pomiar absorbancji wg punktu 6.2. Parametry analizy spektrofotometrycznej były następujące:

- zakres długości fal: 200-400 nm
- prędkość skanowania: 400 nm/min
- kuweta: kwarcowa o drodze optycznej $l = 1$ cm

Wartości absorbancji odnotowywano w maksimum absorpcji dla ClO₂ tj. przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 358,5$ nm. Stężenie ClO₂ w ppm wag. określono wg Równania 55 wyznaczonego na podstawie wyników badań przedstawionych w pkt. 5.9:

$$C_{\text{ClO}_2} = 51,39 \cdot A \cdot R, \quad (55)$$

gdzie:

C_{ClO_2} – stężenie aktywnego ClO₂, ppm wag.

51,39 – współczynnik kierunkowy prostej zależności stężenia ClO₂ od absorbancji wg pkt. 6.2, ppm wag.

-
- A – absorbancja mierzonej próbki,
 R – rozcieńczenie próbki

Oznaczenie zdolności pianotwórczej

Zdolność pianotwórczą określono na podstawie normy PN-EN 12728:2001 (PN-EN 1278, 2001). Metoda wytwarzania piany polegała na ubijaniu, z wykorzystaniem znormalizowanego perforowanego dysku o średnicy 5 cm osadzonego na końcu pręta, 200 cm³ roztworu produktu o stężeniu 1%. Ubijanie miało miejsce w cylindrze o pojemności 1000 cm³ z częstotliwością 60 uderzeń /min. Wysokość słupa piany mierzono po 1 min, 5 min i 10 min od zakończenia ubijania. Zdolność pianotwórczą X po upływie określonego czasu obliczono z wykorzystaniem Równania 56:

$$X = \frac{\pi * D^2 * H}{4}, \quad (56)$$

gdzie:

- X – zdolność pianotwórcza, cm³
 D – średnica wewnętrzna cylindra pomiarowego, $D = 5,8$ cm
 H – wysokość słupa piany po upływie określonego czasu, cm

Wskaźnik trwałości piany X_1 (Równanie 57) określono jako stosunek objętości piany zmierzonej po upływie 10 min, do objętości zmierzonej po upływie 1 min od chwili jej wytworzenia.

$$X_1 = \frac{V_2}{V_1} * 100\%, \quad (57)$$

gdzie:

- X_1 – wskaźnik trwałości piany, %
 V_1 – objętość piany zmierzona po upływie 1 min, cm³
 V_2 – objętość piany zmierzona po upływie 10 min, cm³

Ocena zdolności emulgowania tłuszczu

Właściwości emulgowania określono na podstawie normy zakładowej MEXEO nr ZN/16/17. Metoda ma charakter porównawczy właściwości emulgujących próbek laboratoryjnych, produkcyjnych i referencyjnych w firmie MEXEO. Wykonanie oznaczenia polegało na pomiarze czasu rozdziału roztworu próbki badanej i oleju rzepakowego zabarwionego czerwienią sudanową. Procedura pomiaru była następująca: do cylindra z korkiem dodano po 20 ml oleju rzepakowego zabarwionego czerwienią sudanową oraz 20 ml wodnego roztworu badanej próbki o stężeniu 1%. W temperaturze 20°C wykonano 5 energicznych półobrotów cylindra z mieszaniną, po czym odstawiono na czas 1 min. Procedurę powtórzono pięciokrotnie. Po ostatnim wytrząsaniu mierzono czas, w którym 10 ml roztworu próbki oddzieli się od mieszaniny.

Oznaczenie lepkości kinematycznej żeli

Lepkość kinematyczną żeli określono na podstawie instrukcji obsługi oraz instrukcji wzorcowania I-07/ LR-KJ/S-10-02 w firmie MEXEO. Rysunek (13) przedstawia schemat wiskozymetru kapilarnego Ubbelohde'a. Aby zmierzyć czas przepływu badanej cieczy napełniono

zbiornik B tak aby poziom mieścił się między kreskami. Następnie zatkało rurkę (2) i gruszką gumową zassano ciecz powyżej poziomu a_1 w rurce (3). Po odsłonięciu rurki (2) i usunięciu gruszki z rurki (3) odczekano aż ciecz przepłynie do zbiornika C (do pojawienia się menisku). Po odsłonięciu rurki (3) zmierzono czas t przesunięcia się menisku od poziomu a_1 do poziomu a_2 . Pomiar wykonywano w temperaturze 20°C. Lepkość kinematyczną badanych żeli obliczono z Równania 58:

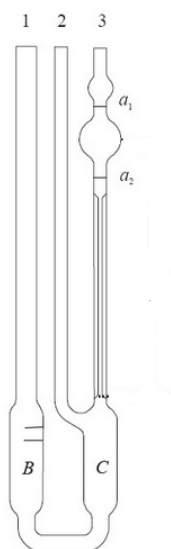
$$v = K * t, \quad (58)$$

gdzie:

v – lepkość kinematyczna, $\frac{mm^2}{s}$

K – stała kapilary, $K = 2,717 \frac{mm^2}{s^2}$

t – czas przepływu badanego żelu między poziomami a_1 i a_2 (Rysunek 13), s



Rysunek 13. Schemat wiskozymetru kapilarnego Ubbelohde'a.

5.3.3. Testy starzeniowe

Po uwzględnieniu zależności pomiędzy poszczególnymi składnikami wchodzącymi w skład produktów, przygotowano formułacje preparatów do testów starzeniowych. Polegały one na cyklicznej analizie fizykochemicznej próbek (średnio raz w miesiącu) przez okres 12 miesięcy (w przypadku Armex 2000 ultraczysty – 6 miesięcy). Próbki przechowywano na półce w laboratorium w temperaturze pokojowej z narażeniem na światło dzienne. Dokonano analizy fizykochemicznej prekursorów i aktywatorów oraz ich mieszaniny aktywnej w stosunku (1:1). Najbardziej istotnym elementem było określenie stężenia ClO_2 metodą spektrofotometryczną przez pomiar bezpośredni a w przypadku żeli oznaczenie lepkości form nieaktywnych i aktywnych. Dla koncentratów Armex 5 MD, Armex 2000 ultraczysty oraz Armex 5 vH oznaczenia zawartości ClO_2 dokonano w rozcieńczeniach z wodą, w stężeniach docelowo mających zastosowanie w praktyce – wg Tabeli 5.

5.4. Metodyka badań skuteczności biobójczej

Jednym z najbardziej istotnych aspektów szeroko pojętej dezynfekcji, a tym samym zapobiegania rozprzestrzeniania się mikroorganizmów patogennych, jest dezynfekcja powierzchni, zwłaszcza dotykowych. Producenci środków dezynfekujących wykazują ich działanie na drodze przeprowadzonych badań zawiesinowych (fazy 2 etapu 1) i nośnikowych (fazy 2 etapu 2) wg ściśle zdefiniowanych norm w konkretnych obszarach działania, np. spożywczym, przemysłowym, instytucjonalnym czy weterynaryjnym. W Tabeli 6 przedstawiono stopień redukcji liczby bakterii, grzybów i spor, wyrażony w skali logarytmicznej (log) oraz warunki obciążenia organicznego wymagane do przeprowadzenia badań skuteczności w poszczególnych obszarach zastosowań. Jednym z najbardziej wymagających jest obszar medyczny. Wymagany stopień redukcji liczby patogenów jest w tym obszarze wyższy o 1 w porównaniu do pozostałych. Warunki obciążenia organicznego, szczególnie w warunkach brudnych, również są wymagające. Porównania skuteczności biobójczej dokonano na podstawie norm do dezynfekcji powierzchni: nośnikowych dla bakterii i grzybów (EN 17387, 2021; EN 13697, 2015; EN 14349, 2012) oraz norm zawiesinowych dla spor (EN 17126, 2018; EN 13704, 2018).

Badania skuteczności biobójczej otrzymanych preparatów przeprowadzono wg norm przeznaczonych do obszaru medycznego a co za tym idzie wg norm charakteryzujących się najwyższym wymaganym stopniem redukcji liczby mikroorganizmów.

Tabela 6. Wymagane stopnie redukcji i warunki obciążające w badaniach skuteczności biobójczej dla powierzchni w poszczególnych obszarach.

	Obszar medyczny	Obszar spożywczy, przemysłowy, instytucjonalny	Obszar weterynaryjny
Wymagany stopień redukcji, log			
Bakterie	log 5	log 4	log 4
Grzyby	log 4	log 3	log 3
Spory	log 4	log 3	-
Warunki obciążenia organicznego			
Warunki czyste	$0,3 \frac{g}{L}$ BSA	$0,3 \frac{g}{L}$ BSA	$3 \frac{g}{L}$ BSA
Warunki brudne	$3 \frac{g}{L}$ BSA + $3 \frac{mL}{L}$ erytrocytów krwi baraniej	$3 \frac{g}{L}$ BSA	$10 \frac{g}{L}$ BSA + $10 \frac{g}{L}$ ekstraktu drożdżowego

BSA – (ang. *Bovine serum albumin*) surowicza albumina wołowa

5.4.1. Charakterystyka czynników chorobotwórczych

W Tabeli 7 przedstawiono czynniki chorobotwórcze, wobec których przeprowadzono badania i odpowiadające im numery norm. Norma EN 16615 dedykowana jest badaniom wobec bakterii i drożdży, jednak badania rozszerzono i testy skuteczności przeprowadzono również wobec prątków, spor i wirusów. Z kolei badania wobec *A. baumani* przeprowadzono zgodnie z normą EN 17272. W pozostałych szczep ten nie jest wymagany. Podobnie, w przypadku *E. coli* i Poliowirusa, badania wymagane są jedynie w normach odpowiednio EN 13727 i EN 14476. Badania wobec wirusów rozszerzono o koronawirusa ludzkiego 229E, jako przedstawiciela wirusów osłonkowych.

Tabela 7. Normy i mikroorganizmy testowe wobec których przeprowadzono badania skuteczności biobójczej.

Rodzaj czynników chorobotwórczych	Szczep	Normy zawiesinowe	Normy nośnikowe
Bakterie	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442; <i>Escherichia coli</i> K12 NCTC 10538 ¹⁾ ; <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541; <i>Acinetobacter baumani</i> ATCC 19606 ²⁾ ;	(EN 13727, 2015)	(EN 16615, 2015) ³⁾ (EN 17387, 2021) (EN 17272, 2020)
Grzyby i drożdże	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC16404; <i>Candida albicans</i> ATCC 10231;	(EN 13624, 2013)	(EN 16615, 2015) ³⁾ (EN 17387, 2021) (EN 17272, 2020)
Prątki	<i>Mycobacterium avium</i> ATCC 15769; <i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755;	(EN 14348, 2005)	(EN 16615, 2015) ³⁾ (EN 17272, 2020)
Spory	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633; <i>Bacillus cereus</i> CIP105151; <i>Clostridioides difficile</i> R027 NCTC 13366;	(EN 17126, 2018)	(EN 16615, 2015) ³⁾ (EN 17272, 2020)
Wirusy	Poliowirus typ 1 LSc-2ab ⁴⁾ ; Norowirus myszy szczep S99 Berlin; Adenowirus typ 5 szczep Adenoid 75 Koronawirus ludzki 229E VR-740 ⁵⁾	(EN 14476, 2019)	(EN 16615, 2015) ³⁾ (EN 16777, 2019) (EN 17272, 2020)

¹⁾ wymagane jedynie wg normy EN 13727; ²⁾ wymagane jedynie wg normy EN 17272; ³⁾ norma dedykowana dla bakterii i drożdży, w rozprawie rozszerzono badania o pozostałe patogeny; ⁴⁾ wymagane jedynie wg normy EN 14476; ⁵⁾ szczep dodatkowy, jako przedstawiciel wirusów osłonkowych.

5.4.2. Charakterystyka podstawowych parametrów testowych

Badania skuteczności biobójczej, zarówno wg metod zawiesinowych, jak i nośnikowych wymagają zastosowania charakterystycznych reagentów. Pierwszym z nich jest **roztwór substancji obciążającej**. Zgodnie z wytycznymi Agencji ECHA umieszczonymi w *Guidance on the Biocidal Products Regulation* (ECHA, 2023) zaleca się aby środki myjąco-dezynfekujące badać w warunkach silnego obciążenia organicznego (w tzw. warunkach brudnych), natomiast środki dezynfekujące w warunkach słabszego obciążenia organicznego – w warunkach czystych.

Drugim ważnym reagentem jest **neutralizator** badanego produktu. Pozwala on na natychmiastowe przerwanie działania biobójczego produktu, ale jednocześnie nie może wykazywać właściwości toksycznych w stosunku do badanych czynników chorobotwórczych.

Istotnymi parametrami badań są również **temperatura** prowadzenia procesu, oraz **czas kontaktu** produktu z patogenami. W Tabeli 8 przedstawiono charakterystykę ww. parametrów dla stosowanych patogenów:

Tabela 8. Charakterystyka podstawowych parametrów testowych.

Parametr testowy	Bakterie, grzyby, prątki, spory	Wirusy
Skład substancji obciążającej	warunki czyste: $0,3 \frac{g}{L}$ BSA; warunki brudne: $3 \frac{g}{L}$ BSA + $3 \frac{mL}{L}$ erytrocytów krwi baraniej	
Skład neutralizatora	$30 \frac{g}{L}$ polisorbatu 80 + $10 \frac{g}{L}$ tiosiarczanu sodu + $3 \frac{g}{L}$ lecytyny	MEM + 2% FCS
Temperatura	20°C	
Czas kontaktu	5 min; 15 min	30 s; 5 min

MEM – (Eagle's *minimal essential medium*) bufor zapobiegający namnażaniu się hodowli komórkowej;
FCS - (*Foetal calf serum*) bydlęca surowica płodowa

5.4.3. Badania zawiesinowe

Badane produkty

W Tabeli 9 zaprezentowano otrzymane produkty badane wg norm zawiesinowych wraz z podstawowymi wytycznymi dotyczącymi stężeń, sposobu aktywacji i warunków badania.

Tabela 9. Produkty badane zgodnie z normami zawiesinowymi.

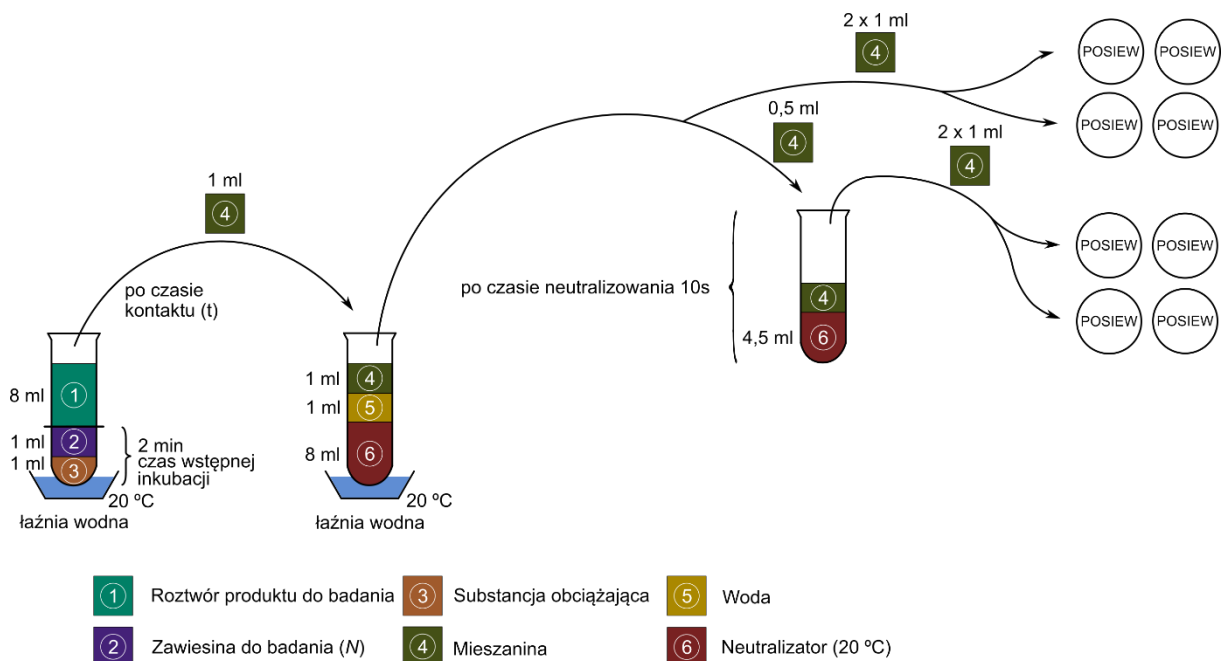
Produkt	Stężenie ClO ₂ ppm wag.	Aktywacja	Warunki badania
Armex 5 MD	25, 50, 100	100 ppm wag.: 0,5% prekursora + 0,5% aktywatora + 99% wody; pozostałe roztwory – przez rozcieńczenie	czyste i brudne
Armex 5 foam	1500	50% prekursora + 50% aktywatora	brudne
Armex 5 WC	1500	50% prekursora + 50% aktywatora	brudne
Armex 2000 ultraczysty	25, 50, 100	100 ppm wag.: 5% produktu + 95% wody; pozostałe roztwory – przez rozcieńczenie	czyste

Zawiesiny testowe czynników chorobotwórczych

Zawiesiny wyjściowe czynników chorobotwórczych oraz zawiesiny testowe, zawierające substancje obciążające przygotowano zgodnie z dedykowanymi normami zawiesinowymi wobec bakterii (EN 13727, 2015), grzybów (EN 13624, 2013), prątków (EN 14348, 2005) spor (EN 17126, 2018) i wirusów (EN 14476, 2019). Dla każdego czynnika (oprócz wirusów) przygotowano zawiesinę do badań (N), zawiesinę do walidacji (N_v) oraz zawiesinę walidacyjną do kontroli neutralizatora (N_{VB}).

Procedura

W celu wykonania testu zawiesinowego, do próbki wprowadzono 1 mL substancji obciążającej i 1 mL zawiesiny do badania (N). Próbkę umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 20°C na 2 min. Następnie dodano 8 mL roztworu produktu do badania i wymieszano. Pozostawiono w łaźni wodnej na określony czas kontaktu. Następnie pobrano 1 mL mieszaniny i przeniesiono do próbki zawierającej 1 mL sterylnej wody destylowanej i 8 mL neutralizatora. Zamieszano i pozostawiono na 10 s. Po tym czasie pobrano 2 próbki po 1 mL i posiano na płytki, stosując technikę posiewu powierzchniowego lub wglębego – w zależności od normy. Dodatkowo, przeniesiono 0,5 mL tej mieszaniny do 4,5 mL neutralizatora w celu uzyskania rozcieńczenia 10^{-1} i również wykonano posiew. Na Rysunku 14 przedstawiono schemat postępowania w metodzie zawiesinowej.



Rysunek 14. Schemat procedury badań zawiesinowych. Wykonanie własne na podst. (EN 13727, 2015).

Po wykonaniu posiewów na zdefiniowanych podłożach (wg Tabeli 10), próbki poddano inkubacji w warunkach określonych przez poszczególne normy. Następnie przystąpiono do zliczania mikroorganizmów i wyznaczania stopnia redukcji

Tabela 10. Podłoże, inkubacja i metody zliczania mikroorganizmów w metodach zawieszinowych.

Rodzaj czynnika (norma)	Zastosowane podłoże	Warunki inkubacji	Metoda zliczania
Bakterie (EN 13727, 2015)	TSA	37 ± 1°C przez 24 h + 24 h	Posiew wgłębnny na płytkach
Grzyby i drożdże (EN 13624, 2013)	MEA	30 ± 1°C przez 42 h do 48 h	Posiew wgłębnny na płytkach
Prątki (EN 14348, 2005)	MCA	36 ± 1°C przez 21 dni w atmosferze CO ₂	Posiew wgłębnny na płytkach
Spory (EN 17126, 2018)	TSA (dla <i>Bacillus</i> spp.) i BHIYT-L (dla <i>C. difficile</i>)	37 ± 1°C przez 24 h + 24 h (dla <i>Bacillus</i> spp.); 37 ± 1°C przez 5 dni w warunkach beztlenowych (dla <i>C. difficile</i>)	Posiew wgłębnny na płytkach
Wirusy (EN 14476, 2019)	MEM + 2% FCS	37 ± 1°C przez 72 h w atmosferze 5% CO ₂	Ocena efektu cytopatycznego metodą Spearmana-Kärbera

Kontrola i walidacja

W celu kontroli warunków doświadczenia wykonano próbkę kontrolną (**A**), gdzie zastosowano 1 mL zawiesiny do walidacji N_v oraz 8 mL wody twardej zamiast produktu do badania.

Brak efektu toksycznego działania neutralizatora określono wykonując kontrolę neutralizatora (**B**). W tym celu wprowadzono do próbki 9 mL neutralizatora i 1 mL zawiesiny do walidacji neutralizatora N_{VB} . Następnie wykonano rozcieńczenia 10^{-1} oraz 10^{-2} mieszaniny w neutralizatorze. Próbkę o rozcieńczeniu 10^{-2} umieszczono w łaźni wodnej w temp. 20°C na 5 min. Po tym czasie pobrano 2 próbki po 1 mL i wykonano posiew powierzchniowy lub wgłębnny – w zależności od normy.

W celu zwalidowania metody (**C**) do próbki wprowadzono 1 mL substancji obciążającej i 1 mL rozcieńczalnika. Dodano 8 mL produktu do badania w najwyższym stosowanym stężeniu. Po zmieszaniu, próbkę inkubowano w temp. 20°C przez określony czas kontaktu. Następnie przeniesiono 1 mL mieszaniny do próbki zawierającej 8 mL neutralizatora. Po zmieszaniu próbkę inkubowano w temp. 20°C przez 5 min, a następnie dodano 1 mL zawiesiny do walidacji N_v . Próbkę umieszczono w łaźni wodnej (20°C) na czas 30 min. Po tym czasie pobrano 2 próbki po 1 mL i wykonano posiew powierzchniowy lub wgłębnny – w zależności od normy.

W celu sprawdzenia całego systemu badawczego w metodzie skuteczności biobójczej wobec wirusów wykonano kontrolę negatywną (**A**), w której zamiast badanego produktu, zastosowano roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Wykonano również kontrolę pozytywną

z zastosowaniem produktu referencyjnego tj. 0,7% roztworem aldehydu glutarowego w czasie kontaktu 30 min (**D**). i 60 min (**E**).

Obliczenia

Dokładne obliczenia dotyczące określenia liczby mikroorganizmów w zawiesinach testowych, kontrolach oraz próbkach z produktem opisano w normach. Parametrem końcowym określającym skuteczność środka biobójczego jest stopień redukcji R , wyrażony w skali logarytmicznej wg Równania 59:

$$R = \log N_0 - \log N_a \quad (59)$$

gdzie:

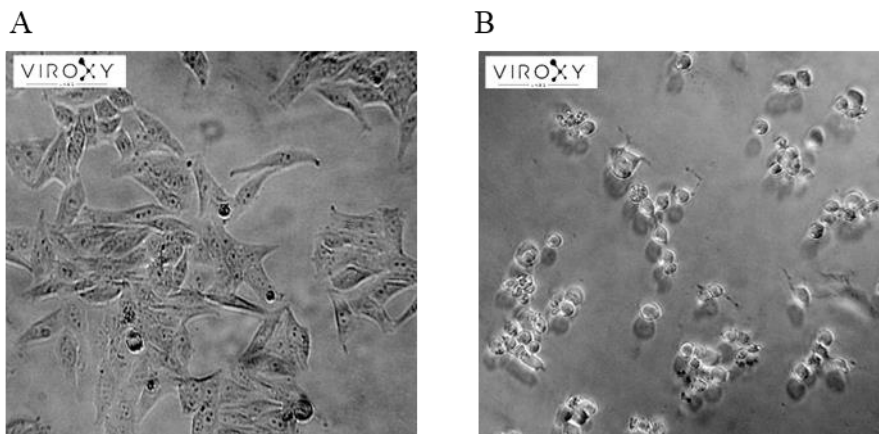
R – redukcja liczby czynników chorobotwórczych w skali logarytmicznej

N_0 – liczba patogenów w 1 mL zawiesiny do badania na początku czasu kontaktu, $\frac{CFU}{mL}$ lub $\frac{TCID_{50}}{mL}$

N_a – liczba patogenów w 1 mL mieszaniny do badania, które przeżyły na końcu czasu kontaktu a przed neutralizacją, $\frac{CFU}{mL}$ lub $\frac{TCID_{50}}{mL}$

Specyficznym sposobem zliczania patogenów charakteryzuje się metoda zawiesinowa oznaczania skuteczności biobójczej wobec wirusów (EN 14476, 2019). Zarówno namnażanie, jak również określenie działania środka biobójczego odbywa się pośrednio w zdefiniowanych dla każdego typu wirusa, liniach komórkowych (tzw. komórkach gospodarza).

Po zneutralizowaniu próbek badawczych, miano wirusa określono z wykorzystaniem metody titracji punktu końcowego. W tym celu wykonano serię 10-krotnych rozcieńczeń mieszaniny testowej i przeniesiono po 0,1 mL każdego rozcieńczenia do 6 dołków płytki do mikromiareczkowania. Dodano 0,1 mL zawiesiny komórek gospodarza o gęstości > 90% aby umożliwić utworzenie monowarstwy. Równolegle wykonano próbkę, gdzie 6 dołków nie zawierało zawiesiny wirusa i pełniło rolę kontroli komórkowej. Po inkubacji (wg Tabeli 10) badano efekt cytotacyjny (CPE) komórek gospodarza z wykorzystaniem odwróconego mikroskopu. Na Rysunku 15 przedstawiono fotografie komórek gospodarza przed (**A**) i po (**B**) narażeniu na Poliowirusa. Obserwuje się obkurczenie oraz znaczącą zmianę kształtu i struktury komórek (Firma Viroxy Labs, 2022).



Rysunek 15. Efekt cytopatyczny komórek gospodarza przed (A) i po (B) narażeniu na Poliowirusa. Własność firmy VIROXY Labs (Firma Viroxy Labs, 2022).

Miana wirusów w próbkach badawczych wyrażono jako stężenie wywołujące CPE w 50% hodowli komórek gospodarza $TCID_{50}/mL$ (ang. *Tissue Culture Infective Dose 50*). Obliczenia wykonano z wykorzystaniem metody Spearmana-Kärbera (Ramakrishnan, 2016). Polega ona na ocenie CPE hodowli komórek w przygotowanych rozcieńczeniach, począwszy od tych, w których wszystkie komórki zostały zakażone, skończywszy na tych, gdzie wirus się nie namnaża. Oceny CPE dokonano w każdym z 6 dołków płytki do mikromiareczkowania wg 5-cio punktowej skali :

- 0 – brak CPE;
- 1 – 25% komórek wykazuje CPE;
- 2 – 50% komórek wykazuje CPE;
- 3 – 75% komórek wykazuje CPE;
- 4 – 100% komórek wykazuje CPE.

Oznaczenia $TCID_{50}$ dokonano na podstawie Równań 60-61. Aktywność wirusobójczą określono jako różnicę między wartościami $TCID_{50}/mL$ w próbce kontrolnej i testowej. Na ich podstawie wyznaczono stopnie redukcji w skali logarytmicznej.

$$x = a - b * \left(\frac{c}{100} - 0,5\right), \quad (60)$$

gdzie:

- x – ujemny logarytm punktu końcowego ($-\log_{10}TCID_{50}$),
- a – ujemny logarytm z najwyższego użytego stężenia wirusa
- b – wartość logarytmiczna różnicy pomiędzy rozcieńczeniami
- c – suma wartości procentowych CPE z wszystkich rozcieńczeń

$$TCID_{50} = 10^{-x} \quad (61)$$

5.4.4. Badania nośnikowe z wykorzystaniem czynnika mechanicznego

Badane produkty

Badania nośnikowe z wykorzystaniem czynnika mechanicznego wykonano wg normy EN 16615:2015-06 (EN 16615, 2015) nazywanej często normą „4 pól”. W Tabeli 11 zaprezentowano produkty badane wg omawianej normy wraz z podstawowymi wytycznymi dotyczącymi stężeń, sposobu aktywacji i warunków badania. Norma EN 16615 dedykowana jest badaniom skuteczności wobec bakterii i drożdży. W rozprawie doktorskiej badania rozszerzono o prątki, spory i wirusy.

Tabela 11. Produkty badane zgodnie z normą nośnikową EN 16615.

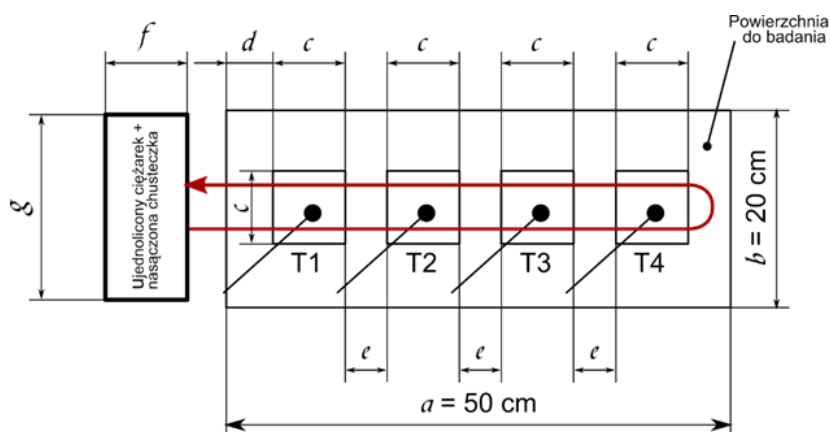
Produkt	Stężenie ClO ₂ ppm wag.	Aktywacja	Warunki badania
Armex 5 MD	25, 50, 100	100 ppm wag.: 0,5% prekursora + 0,5% aktywatora + 99% wody; pozostałe roztwory – przez rozcieńczenie	czyste i brudne
Armex 5 foam	1500	50% prekursora + 50% aktywatora	brudne

Zawiesiny testowe mikroorganizmów

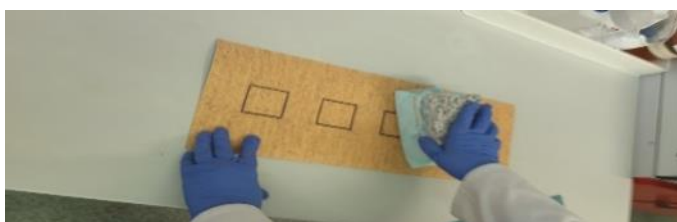
Zawiesiny wyjściowe oraz zawiesiny testowe bakterii i drożdży przygotowano zgodnie z dedykowaną normą EN 16615. Dla prątków spor i wirusów, do przygotowania hodowli roboczych mikroorganizmów i zawiesin testowych wykorzystano wiedzę zawartą w normach zawiesinowych (EN 14348, 2005; EN 17126, 2018; EN 14476, 2019). Dla każdego czynnika chorobotwórczego przygotowano zawiesinę do badań (N) i zawiesinę do walidacji (N_v).

Procedura

Na badanej powierzchni wykonanej z PVC przedstawionej na Rysunku 16 zaznaczono w rzędzie 4 kwadraty o wym. 5 x 5 cm, stanowiące pola do badania. Na pole T1 naniesiono punktowo 0,05 mL zawiesiny testowej złożonej z 9 mL zawiesiny do badań (N) oraz 1 mL substancji obciążającej. Szklaną szpatułką rozprowadzono zawiesinę po całym polu i pozostawiono do wyschnięcia. Następnie chusteczkę wykonaną z polipropylenu, nasączono 16 mL produktu do badania, nałożono na ciężarek i przetarto powierzchnię zgodnie z czerwoną strzałką na Rysunku 16

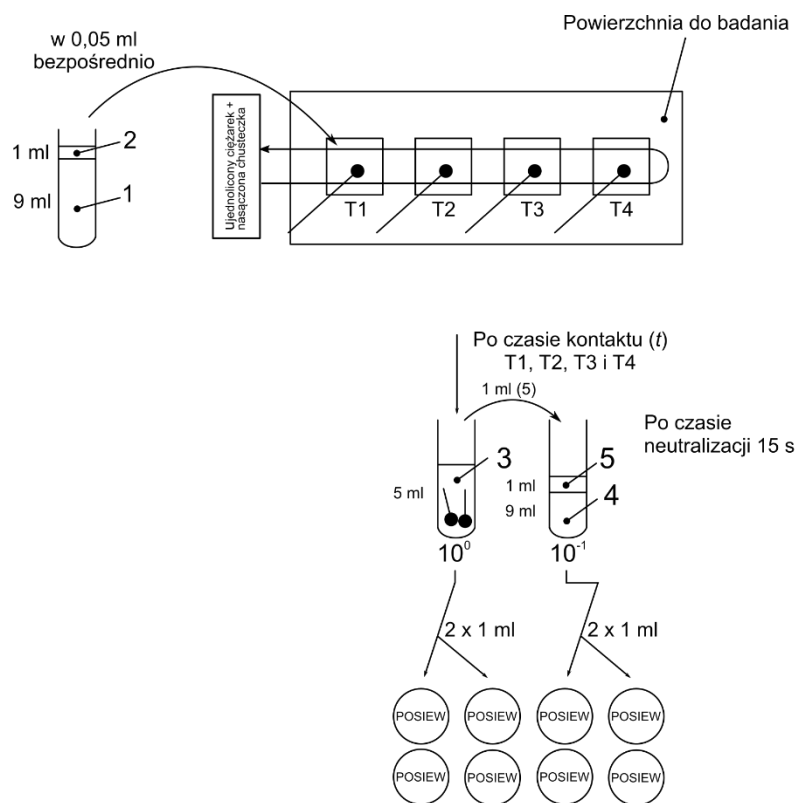


$a = 50 \text{ cm}$ $c = 5 \text{ cm}$ $e = 5 \text{ cm}$ $g = 12,1 \text{ cm}$
 $b = 20 \text{ cm}$ $d = 10 \text{ cm}$ $f = 8,6 \text{ cm}$



Rysunek 16. Powierzchnia do badania wg normy EN 16615. Wykonanie własne na podst. (EN 16615, 2015).

Po założonym czasie kontaktu, wacikiem nasączonym neutralizatorem, przetarto całą powierzchnię pola $T1$ i wypłukano w 5 mL neutralizatora. Procedurę powtórzono tym samym wacikiem i umieszczono go na stałe w probówce z neutralizatorem. Proces powtórzono drugim suchym wacikiem do całkowitego wysuszenia pola i umieszczono w tej samej probówce. Analogiczne czynności wykonano dla pól $T2$, $T3$ oraz $T4$. Po czasie neutralizowania 15 s pobrano 1 mL próbki i posiano na płytkach techniką posiewu powierzchniowego lub wgłębego. Czynność powtórzono również dla rozcieńczenia 10^{-1} . W przypadku wirusów zastosowano metodę titracji punktu końcowego. Parametry dotyczące podłoża, inkubacji oraz metody zliczania są analogiczne jak w metodach zawiesinowych wg pkt 5.4.3 w Tabeli 10. Schemat procedury badania wg normy EN 16615 przedstawiono na Rysunku 17:



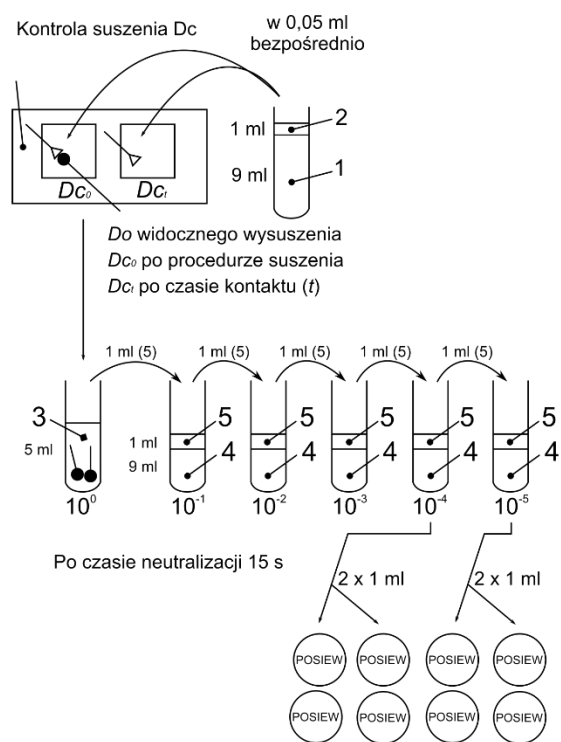
- | | | |
|---------------------------------|--------------------|------------------------------|
| 1 - Zawiesina do badań <i>N</i> | 3 - Neutralizator | 5 - Mieszanina |
| 2 - Substancja obciążająca | 4 - Rozcieńczalnik | T1, T2, T3, T4 - Badane pola |

Rysunek 17. Schemat procedury badania wg normy 16615. Wykonanie własne na podst. (EN 16615, 2015).

Kontrola i walidacja

W celu kontroli warunków doświadczenia wykonano tzw. kontrolę wodną (**A**), w której przeprowadzono identyczne czynności jak w procedurze badania, ale zamiast roztworu produktu zastosowano wodę z dodatkiem 0,1% polisorbatu 80.

Bardzo istotnym elementem było wyznaczenie kontroli suszenia po czasie całkowitego wysuszenia naniesionej próbki (D_{C0}) i kontroli suszenia po czasie kontaktu t (D_{Ct}). Badania wykonano na małej powierzchni do badań. 0,05 mL zawiesiny testowej naniesiono punktowo na wyznaczone pola i równomiernie rozprowadzono za pomocą szpatułki. Odzyskiwanie mikroorganizmów odbywało się analogicznie jak w procedurze z badanym produktem dla (D_{C0}) – od razu po zakończonym procesie suszenia, dla (D_{Ct}) – od razu po zakończeniu czasu kontaktu (t). W celu policzenia mikroorganizmów wykonano serię rozcieńczeń i z rozcieńczenia 10^{-4} oraz 10^{-5} wykonano posiew techniką powierzchniową lub wgłębną (Rysunek18).



- 1 - Zawiesina do badań *N* 3 - Neutralizator 5 - Mieszanina
2 - Substancja obciążająca 4 - Rozcieńczalnik

Rysunek 18. Schemat procedury badania kontroli suszenia wg normy EN 16615. Wykonanie własne na podst. (EN 16615, 2015).

Brak efektu toksycznego działania neutralizatora określono wykonując kontrolę neutralizatora (**B**). W tym celu wprowadzono do próbki 8 mL neutralizatora, 1 mL wody i 1 mL zawiesiny do walidacji neutralizatora N_v . Próbkę umieszczono w łaźni wodnej w temp. 20°C na 5 min. Po tym czasie pobrano 2 próbki po 1 mL i wykonano posiew powierzchniowy lub wgłębny.

W celu zwalidowania metody (**C**) do próbki wprowadzono 8,8 mL neutralizatora i 0,2 mL roztworu produktu do badania w najwyższym stosowanym stężeniu. Po zmieszaniu, próbkę inkubowano w temp. 20°C przez określony czas kontaktu. Następnie przeniesiono 1 mL mieszaniny do próbki zawierającej 8 mL neutralizatora. Po zmieszaniu próbkę inkubowano w temp. 20°C przez 5 min, a następnie dodano 1 mL zawiesiny do walidacji N_v . Próbkę umieszczono w łaźni wodnej (20°C) na czas 30 min. Po tym czasie pobrano 2 próbki po 1 mL i wykonano posiew powierzchniowy lub wgłębny.

Obliczenia

Obliczenia dotyczące określenia liczby patogenów w zawiesinach testowych, kontrolach oraz próbkach z produktem wykonywano zgodnie z zapisami zawartymi w normie. Miano redukcji wirusów w próbkach określono z wykorzystaniem metody Spearmana – Kärbera, omówionej w pkt 5.4.3.

Parametrem końcowym określającym skuteczność środka biobójczego jest stopień redukcji R , na badanym polu T1 wyrażony w skali logarytmicznej wg Równania 62:

$$R = \log D_{Ct} - \log N_a \quad (62)$$

gdzie:

R – redukcja liczby czynników chorobotwórczych w skali logarytmicznej

D_{Ct} – liczba patogenów w 1 mL w kontroli suszenia, $\frac{CFU}{mL}$ lub $\frac{TCID_{50}}{mL}$

N_a – liczba patogenów w 1 mL mieszaniny do badania, które przeżyły na końcu czasu kontaktu a przed neutralizacją na polu T1, $\frac{CFU}{mL}$ lub $\frac{TCID_{50}}{mL}$

Zbadano również akumulację drobnoustrojów na polach T2 T3 oraz T4, poprzez obliczenie ich liczby na płytkach. Średnia liczba patogenów na polach T2-T4 obliczonej z Równania 63 nie może przekraczać 50 CFU (*ang. Colony Forming Unit*, jednostki tworzące kolonie).

$$\bar{x}_{wm} = \frac{(V_{T2} + V_{T3} + V_{T4}) * 5}{4} \quad (63)$$

gdzie:

\bar{x}_{wm} – średnia liczba drobnoustrojów na polach T2, T3 i T4, CFU lub TCID₅₀

V_{T2-T4} – liczba patogenów na poszczególnych polach, CFU lub TCID₅₀

5.4.5. Badania nośnikowe bez działania mechanicznego

Badane produkty

Badania nośnikowe bez czynnika mechanicznego wykonano wg norm EN 17387-2021 wobec bakterii i grzybów (EN 17387, 2021) oraz EN 16777:2019 wobec wirusów (EN 16777, 2019). W Tabeli 12 zaprezentowano produkty badane wg omawianej normy wraz z podstawowymi wytycznymi dotyczącymi stężeń, sposobu aktywacji i warunków badania.

Tabela 12. Produkty badane zgodnie z normami nośnikowymi EN 17387 oraz EN 16777.

Produkt	Stężenie ClO ₂ ppm wag.	Aktywacja	Warunki badania
Armex 5 MD	25, 50, 100	100 ppm wag.: 0,5% prekursora + 0,5% aktywatora + 99% wody; pozostałe roztwory – przez rozcieńczenie	czyste i brudne
Armex 5 foam	1500	50% prekursora + 50% aktywatora	brudne
Armex 5 WC	1500	50% prekursora + 50% aktywatora	brudne
Armex 2000 ultraczysty	25, 50, 100	100 ppm wag.: 5% produktu + 95% wody; pozostałe roztwory – przez rozcieńczenie	czyste

Zawiesiny testowe czynników chorobotwórczych

Zawiesiny wyjściowe oraz zawiesiny testowe bakterii, grzybów i wirusów, zawierające substancje obciążające przygotowano zgodnie z dedykowanymi normami EN 17387 oraz EN 16777.

Procedura

Na krążek stalowy o średnicy 2 cm i grubości 1,25 mm naniesiono 50 μL zawiesiny testowej złożonej z 1 mL zawiesiny patogenów i 1 mL roztworu substancji obciążającej wg (EN 17387, 2021) oraz 9 mL zawiesiny wirusa i 1 mL substancji obciążającej wg (EN 16777, 2019). Próbkę pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze 37°C. Następnie na krążek naniesiono 100 μL produktu do badania i pozostawiono na czas kontaktu 5 min (Rysunek 19). Potem krążek przeniesiono do pojemnika zawierającego 10 mL neutralizatora ze szklanymi kuleczkami i intensywnie wytrząsano przez 1 min. Celem było przeniesienie mikroorganizmów z powierzchni do roztworu neutralizatora. Po czasie neutralizacji 5 min przygotowano rozcieńczenia 10^{-1} oraz 10^{-2} . Pobrano po 1 mL próbki każdego rozcieńczenia i posiano na płytkach techniką posiewu wgłębnego. W celu zbadania liczby mikroorganizmów pozostałych na powierzchni testowej po wypłukaniu w neutralizatorze i wodzie, nośnik przeniesiono na szalkę Petriego zawierającą 10 mL zestalonej pożywki. Krążek umieszczono na powierzchni agaru i dodano 10 mL płynnego podłoża o temperaturze 45°C. Do oznaczenia liczby wirusów zastosowano metodę titracji punktu końcowego. Parametry dotyczące podłoża, inkubacji oraz metody zliczania są analogiczne jak w metodach zawiesinowych wg pkt 5.4.3 w Tabeli 10.



Rysunek 19. Dyski stalowe o średnicy $d=2$ cm, do badań nośnikowych bez udziału czynnika mechanicznego z naniesionym produktem do badania (EN 17387, 2021).

Kontrola i walidacja

W celu kontroli warunków doświadczenia wykonano próbkę kontrolną (**A**), gdzie na stalowy nośnik naniesiono 100 μL wody twardej zamiast produktu badanego. Sprawdzono również zawartość patogenów pozostałych na stalowym krążku po procesie wytrząsania w neutralizatorze, wg opisu w procedurze.

Brak efektu toksycznego działania neutralizatora określono wykonując kontrolę neutralizatora (**B**). W tym celu do pojemnika z 10 mL neutralizatora i szklanymi kulkami wrzucono

zainfekowany stalowy krążek. Następnie dodano 100 μL wody twardej, zamieszano i pozostawiono na 5 min w temperaturze 20°C. Po tym czasie energicznie wytrząsano próbkę. Następnie wykonano serię rozcieńczeń mieszaniny w neutralizatorze. Z próbek o rozcieńczeniu 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} pobrano dwukrotnie po 1 mL i wykonano posiew wgłębnny.

W celu zwalidowania metody (**C**) do pojemnika wprowadzono 10 mL neutralizatora wraz ze szklanymi kulkami oraz 100 μL produktu o najwyższym stężeniu. Zamieszano i inkubowano przez 5 min w temperaturze 20°C. Następnie do układu wprowadzono zainfekowany stalowy krążek. Po intensywnym mieszaniu przez 1 min, wykonano serię rozcieńczeń 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} , pobrano 2 próbki po 1 mL i wykonano posiew wgłębnny.

W celu sprawdzenia całego systemu badawczego w metodzie skuteczności biobójczej wobec wirusów wykonano kontrolę negatywną (**A**), w której zamiast badanego produktu, zastosowano roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Wykonano również kontrolę pozytywną (**D**), z zastosowaniem produktu referencyjnego tj. 0,7% roztworem aldehydu glutarowego w czasie kontaktu 5 min.

Obliczenia

Obliczenia dotyczące określenia liczby mikroorganizmów w zawiesinach testowych, kontrolach oraz próbkach z produktem wykonywano zgodnie z zapisami zawartymi w normach. Miano redukcji wirusów w próbkach określono z wykorzystaniem metody Spearmana – Kärbera, omówionej w pkt 5.4.3.

Parametrem końcowym określającym skuteczność środka biobójczego jest stopień redukcji R , wyrażony w skali logarytmicznej wg Równania 64:

$$R = \log N_w - \log N_a \quad (64)$$

gdzie:

R – redukcja liczby czynników chorobotwórczych w skali logarytmicznej

N_w – liczba patogenów w 1 mL w kontroli z wodą zamiast badanego produktu, $\frac{CFU}{mL}$ lub $\frac{TCID_{50}}{mL}$

N_a – liczba patogenów w 1 mL mieszaniny do badania, które przeżyły na końcu czasu kontaktu a przed neutralizacją, $\frac{CFU}{mL}$ lub $\frac{TCID_{50}}{mL}$

5.4.6. Badania nośnikowe z wykorzystaniem zautomatyzowanych procesów dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną

Badane produkty

Badania nośnikowe z wykorzystaniem czynnika mechanicznego wykonano wg normy EN 17272:2020 (EN 17272, 2020). W Tabeli 13 zaprezentowano produkty badane wg omawianej normy wraz z podstawowymi wytycznymi dotyczącymi stężeń, sposobu aktywacji i warunków badania.

Tabela 13. Produkt badany zgodnie z normą nośnikową EN 17272.

Produkt	Stężenie ClO ₂ ppmv.	Aktywacja	Warunki badania
Armex 5 vH	50, 200, 250	1:1 w generatorze ClO ₂ firmy MEXEO	czyste

Zawiesiny testowe czynników chorobotwórczych

Zawiesiny mikroorganizmów oraz zawiesiny testowe mikroorganizmów zawierające substancje obciążające przygotowano wg normy EN 17272.

Pomieszczenie badawcze i sposób wytworzenia gazowego ClO₂

Pomieszczenie badawcze o kubaturze 32,5 m³ wyposażone było w:

- generator gazowego ClO₂ typu MEX-5/250 dla mniejszych objętości oraz MEX-5/10 dla większych objętości;
- wentylator do zapewnienia obiegu powietrza i wyrównania ciśnienia w pomieszczeniu;
- nawilżacz powietrza celem utrzymania odpowiedniej wilgotności;
- kaloryfer do utrzymania stałej temperatury 23°C;
- stojaki z umieszczonymi na nośnikach patogenami;
- sprzęt pomiarowy: higrometr do pomiaru wilgotności, detektor PortaSens III do pomiaru stężenia gazowego ClO₂ w ppmv.

Do zbiornika generatora wprowadzono prekursor Armex 5 vH. Następnie na półce generatora ustawiono kanister z kranikiem z taką samą ilością aktywatora Armex 5 vH Uruchomiono pompę napowietrzającą i rozpoczęto ostrożne wkraplanie aktywatora do wnętrza generatora. W Tabeli 14 przedstawiono stężenia założone ClO₂ w powietrzu, jak również użyte masy prekursora i aktywatora.

Tabela 14. Stężenia gazowego ClO₂ i odpowiadające im masy prekursora i aktywatora użyte w procesie gazowania.

Stężenie, ppmv	Stężenie, ppm wag.	Masa prekursora, g	Masa aktywatora, g
250	585	225	225
200	468	180	180
50	117	45	45

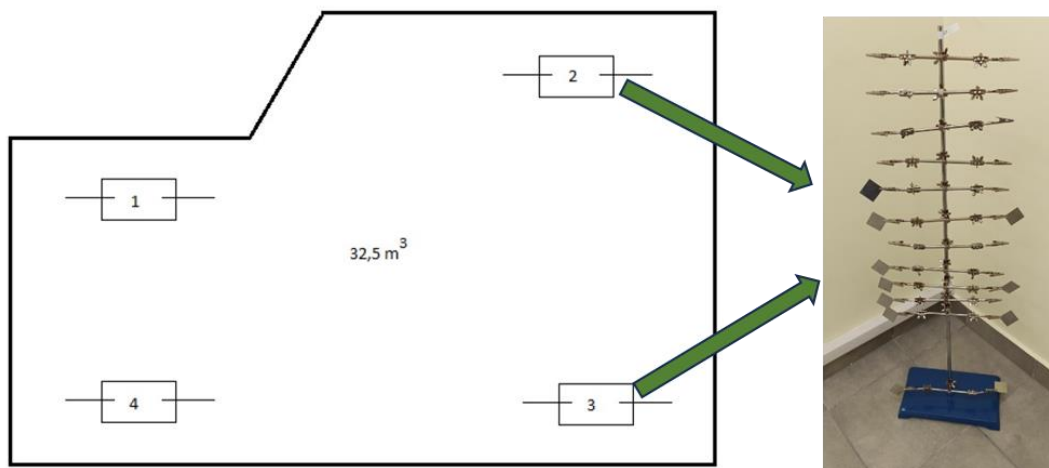
Proces dezynfekcji odbywał się bez obecności ludzi w pomieszczeniu. Podczas pobierania próbek, bądź pomiarów stężenia ClO₂ z wykorzystaniem detektora PortaSens III zachowywano wszelkie wymagane środki ostrożności. Generator ClO₂ przestawiono na Rysunku 20.



Rysunek 20. Generator gazowego ClO₂ typu MEX-5/10 firmy MEXEO.

Procedura

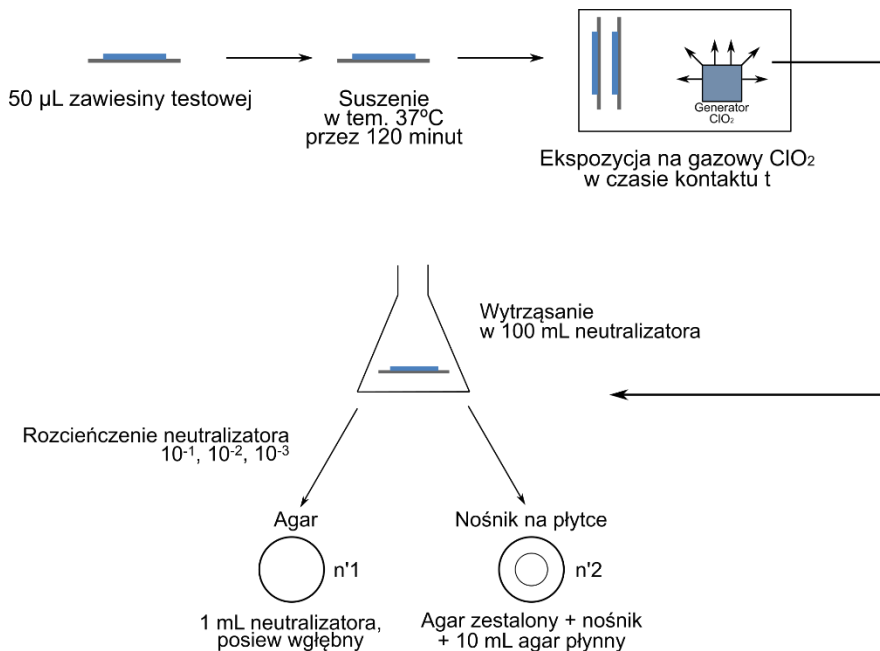
Na stalowy nośnik o średnicy 4 cm naniesiono 50 µL zawiesiny testowej złożonej z 9 części zawiesiny wyjściowej patogenu i 1 części roztworu substancji obciążającej. Próbki poddano suszeniu w temperaturze 37°C przez 2 h. Po tym czasie w pomieszczeniu o kubaturze 32,5 m³ w temperaturze 23°C i określonej wilgotności przeprowadzono proces gazowania ClO₂ w stężeniu 250, 200 i 50 ppmv (tj. „, ppm wag.) i w czasie kontaktu 15 i 60 min (Rysunek 21). Do wytworzenia gazu wykorzystano generator ClO₂ firmy MEXEO. Stężenie ClO₂ kontrolowano z wykorzystaniem detektora PortaSense III.



Rysunek 21. Sposób rozmieszczenia nośników w pomieszczeniu badawczym podczas dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną.

Po czasie ekspozycji na gazowy ClO₂ nośniki przeniesiono do 100 mL (w przypadku wirusów do 20 mL) neutralizatora. i intensywnie wytrząsano przez 1 min w obecności szklanych kulek. Celem było przeniesienie mikroorganizmów z powierzchni nośnika do roztworu neutralizatora. Po 5 min. neutralizacji wykonano rozcieńczenia 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ i posiano na płytkach techniką posiewu wgłębnego (**n'1**) W celu zbadania ilości czynników pozostałych na powierzchni testowej po wypłukaniu w neutralizatorze i wodzie, nośnik przeniesiono na szalkę Petriego

zawierającą 10 mL zestalonej pożywki. Nośnik umieszczono na powierzchni agaru i dodano 10 mL płynnego podłoża o temperaturze 45°C o ($n'2$). Do oznaczenia liczby wirusów zastosowano metodę titracji punktu końcowego. Parametry dotyczące podłoża, inkubacji oraz metody zliczania są analogiczne jak w metodach zawieszinowych wg pkt 5.4.3 w Tabeli 10. Na Rysunku 22 przedstawiono schemat metody.



Rysunek 22. Schemat procedury badania wg normy E 17272. Wykonanie własne na podst. (EN 17272, 2020).

Kontrola i walidacja

W celu kontroli warunków doświadczenia wykonano próbkę kontrolną (**T**), gdzie na stalowy nośnik z naniesioną zawiesiną testową nie poddano ekspozycji gazowym ClO₂. Sprawdzone również zawartość patogenów pozostałych na stalowym krążku po procesie wytrząsania w neutralizatorze, wg opisu w procedurze.

Badania walidacyjne polegały na ocenie działania hamującego związanego z posiewami na płytkach agarowych. W tym celu porównano liczbę patogenów w zawieszynie walidacyjnej (**N1**) do:

- wartości, które uzyskano z posiewu neutralizatora, tj. po naniesieniu inokulum na nośnik, i w kolejnym kroku po wypłukaniu nośnika w neutralizatorze (**n1**),
- wartości, które uzyskano po umieszczeniu wypłukanego w neutralizatorze i wodzie nośnika na płytce agarowej (**n2**).

Aby badanie uznane zostało za ważne musiały zostać spełnione warunki:

$$n1 > 0,5 N1 \text{ oraz } n2 > 0,5 N1$$

Obliczenia

Obliczenia dotyczące określenia liczby czynników chorobotwórczych w zawiesinach testowych, kontrolach oraz próbkach z produktem wykonywano zgodnie z zapisami zawartymi w normach. Miano redukcji wirusów w próbkach określono z wykorzystaniem metody Spearmana – Kärbera, omówionej w pkt. 5.4.3.

Parametrem końcowym określającym skuteczność środka biobójczego jest stopień redukcji R , wyrażony w skali logarytmicznej wg Równania 65:

$$R = \log T - (\log n'1 + \log n'2) \quad (65)$$

gdzie:

R – redukcja liczby czynników chorobotwórczych w skali logarytmicznej

T – liczba patogenów w kontroli nie poddanej działaniu gazowego ClO_2 , $\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$ lub $\frac{\text{TCID}_{50}}{\text{mL}}$

$n'1$ – liczba patogenów, które przeżyły ekspozycję na gaz i znalazły się w neutralizatorze, $\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$ lub $\frac{\text{TCID}_{50}}{\text{mL}}$

$n'2$ – liczba patogenów, które przeżyły ekspozycję na gaz i pozostały na nośniku, $\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$ lub $\frac{\text{TCID}_{50}}{\text{mL}}$

5.5. Metodyka szacowania toksyczności i ekotoksyczności preparatów użytkowych

Wyznaczenie parametrów granicznych dla właściwości toksykologicznych i ekotoksykologicznych uzyskanych preparatów, dokonano na podstawie metod obliczeniowych wyznaczenia klasyfikacji zgodnie z zaleceniami *Rozporządzenia (WE) Nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin* – z późniejszymi zmianami (Rozporządzenie Nr 1272/2008, 2008).

We wszystkich obliczeniach przyjęto całkowity stopień przereagowania substratów i doskonałą stabilność produktów reakcji. W układach rzeczywistych ostateczne stężenia ClO_2 (mającego decydujący wpływ na klasyfikację) są niższe niż obliczone. Niniejsze działanie miało na celu rozpatrzenie najgorszego możliwego przypadku.

5.5.1. Ocena toksyczności ostrej

Toksyczność ostra ma miejsce, gdy niekorzystne skutki występują po podaniu drogą pokarmową, po naniesieniu na skórę jednej lub kilku dawek substancji bądź mieszaniny substancji w przeciągu 24 godzin, lub po narażeniu inhalacyjnym trwającym 4 godziny. Preferowanym gatunkiem zwierząt do badań toksyczności ostrej w wyniku narażenia drogą pokarmową i przez drogi oddechowe jest szczur, natomiast do oceny toksyczności ostrej po naniesieniu na skórę preferowanymi gatunkami są szczur i królik. W przypadku szacowania toksyczności preparatów wieloskładnikowych do oszacowania wartości toksyczności ostrej – ATE (*ang. Acute Toxicity Estimate*) wykorzystuje się wartość dawki letalnej LD_{50} .

Klasyfikację mieszaniny wyznaczono na podstawie wartości ATE stosując tzw. regułę addytywności, opartą na znanej toksyczności ostrej poszczególnych składników w mieszaninie. W tym celu:

- uwzględniono składniki o znanej toksyczności ostrej, które zaliczają się do dowolnej kategorii toksyczności ostrej;
- pominięto składniki, które przypuszczalnie nie są klasyfikowane ze względu na toksyczność ostrą (np. woda);
- pominięto składniki, których toksyczność ostra (LD_{50}) po wprowadzeniu do żołądka lub w kontakcie ze skórą jest wyższa niż $2000 \frac{mg}{kg} m. c.$

Oszacowano toksyczność ostrą mieszaniny (ATE_{mix}) odpowiednio dla drogi pokarmowej, po naniesieniu na skórę oraz narażeniu inhalacyjnym z wykorzystaniem wzoru (Równanie 66):

$$\frac{100\%}{ATE_{mix}} = \sum_n \frac{C_{to}}{ATE_{to}} \quad (66)$$

stąd:

$$ATE_{mix} = \frac{100\%}{\sum_n \frac{C_{to}}{ATE_{to}}} \quad (67)$$

gdzie:

ATE_{mix} – oszacowana toksyczność ostra mieszaniny, $\frac{mg}{kg} m. c.$ lub $\frac{mg}{L}$

n – liczba składników mieszaniny powodująca toksyczność ostrą

C_{to} – stężenie masowe lub objętościowe składnika powodującego toksyczność ostrą w mieszaninie, %

ATE_{to} – toksyczność ostra składnika mieszaniny, $\frac{mg}{kg} m. c.$ lub $\frac{mg}{L}$

Na podstawie wartości ATE_{mix} przyporządkowano otrzymane produkty do odpowiednich kategorii klasyfikacji toksyczności ostrej (wg Tabeli 15).

Tabela 15. Kategorie klasyfikacji toksyczności ostrej wg wartości ATE_{mix} dla poszczególnych dróg narażenia.

Droga narażenia	Kategoria klasyfikacji toksyczności ostrej na podstawie wartości ATE_{mix}
Pokarmowa, $\frac{mg}{kg}$ masy ciała	$0 < \text{Kategoria 1} \leq 5$ $5 < \text{Kategoria 2} \leq 50$ $50 < \text{Kategoria 3} \leq 300$ $300 < \text{Kategoria 4} \leq 2000$
Skórna, $\frac{mg}{kg}$ masy ciała	$0 < \text{Kategoria 1} \leq 50$ $50 < \text{Kategoria 2} \leq 200$ $200 < \text{Kategoria 3} \leq 1000$ $1000 < \text{Kategoria 4} \leq 2000$
Oddechowa, $\frac{mg}{L}$	$0,0 < \text{Kategoria 1} \leq 0,5$ $0,5 < \text{Kategoria 2} \leq 2,0$ $2,0 < \text{Kategoria 3} \leq 10,0$ $10,0 < \text{Kategoria 4} \leq 20,0$

ATE_{mix} – toksyczność ostra mieszaniny

5.5.2. Ocena toksyczności wobec środowiska wodnego

Ocena toksyczności substancji lub mieszaniny wobec środowiska wodnego dzieli się na dwie klasy zagrożenia:

- **toksyczność ostrą wobec środowiska wodnego** – substancja lub mieszanina są szkodliwe dla organizmów wodnych po krótkotrwałym narażeniu;
- **toksyczność przewlekłą wobec środowiska wodnego** – to właściwość substancji lub mieszaniny do wywierania niekorzystnego wpływu na organizmy wodne w czasie narażenia określanego w odniesieniu do cyklu życia organizmu.

Kryteria klasyfikacji substancji w kategorii 1 toksyczności ostrej określa się wyłącznie na podstawie danych dotyczących toksyczności ostrej dla środowiska wodnego (LC_{50} lub EC_{50}) Kryteria klasyfikacji substancji w kategoriach toksyczności przewlekłej łączą dwa rodzaje informacji, tj. dane dotyczące toksyczności ostrej dla środowiska wodnego oraz dane dotyczące losu środowiskowego (dane dotyczące potencjału do degradacji i bioakumulacji). System klasyfikacji mieszanin obejmuje wszystkie kategorie klasyfikacyjne stosowane dla substancji, tj. toksyczność ostrą i toksyczność przewlekłą w kategoriach 1-4. Istotne składniki mieszaniny to te, które:

- są zaklasyfikowane do powodujących toksyczność ostrą w kategorii 1 lub toksyczność przewlekłą w kategorii 1 i występują w stężeniu wagowym co najmniej 0,1% oraz

-
- które są zaklasyfikowane jako powodujące toksyczność przewlekłą, kategoria 2-4 i występują w stężeniu wagowym co najmniej 1%.

W przypadku składników wysoce toksycznych, składnik występujący w niższym stężeniu może również mieć znaczenie dla klasyfikacji mieszaniny ze względu na zagrożenie dla środowiska wodnego. Dla ocenianych mieszanin zastosowano regułę addytywności.

Mieszaninę klasyfikuje się w kategorii 1 toksyczności ostrej, jeżeli suma stężeń składników mieszaniny zaklasyfikowanych w kategorii 1 toksyczności ostrej, pomnożonych przez odpowiadające im współczynniki M, jest równa lub wyższa niż 25% (Równanie 68):

$$\text{Toksyczność ostra Kategoria 1} = \sum_n (C_{ko1} * M) \geq 25\% \quad (68)$$

gdzie:

- n – liczba składników mieszaniny zaklasyfikowanych w kategorii 1 toksyczności ostrej
- C_{ko1} – stężenie składnika zaklasyfikowanego w kategorii 1 toksyczności ostrej, % wag.
- M – współczynnik stosowany w odniesieniu do substancji zaklasyfikowanej jako stwarzająca zagrożenie dla środowiska wodnego w kategorii 1 toksyczności ostrej oraz kategorii 1 toksyczności przewlekłej

Współczynnik M wyznacza się dla substancji stwarzających zagrożenie dla środowiska wodnego, które zaklasyfikowano ze względu na toksyczność ostrą w kategorii 1 oraz toksyczność przewlekłą w kategorii 1. Ze względu na to, że omawiane substancje przyczyniają się do toksyczności mieszaniny nawet przy niskim stężeniu, należy przywiązywać do nich większą wagę przy klasyfikacji mieszanin za pomocą metody obliczeniowej. W Tabeli 16 przedstawiono regułę wyznaczania współczynnika M dla substancji. Jego wartość zależy od uzyskanej wartości toksyczności ostrej (LC_{50} lub EC_{50}) lub przewlekłej ($NOEC$) w stosunku do ryb, rozwielitek (skorupiaków) lub glonów (alg), przy czym zawsze bierze się pod uwagę najniższą z dostępnych wartości pomiędzy wymienionymi poziomami troficznymi (Rozporządzenie Nr 1272/2008, 2008).

Tabela 16. Zasada wyznaczenia współczynnika M

Toksyczność ostra		Toksyczność przewlekła		
Wartość $L(E)C_{50}, \frac{mg}{L}$	Współczynnik M	Wartość NOEC, $\frac{mg}{L}$	Współczynnik M	
			Składniki NRD	Składniki RD
$0,1 < L(E)C_{50} \leq 1,0$	1	$0,01 < NOEC \leq 0,1$	1	-
$0,01 < L(E)C_{50} \leq 0,1$	10	$0,001 < NOEC \leq 0,01$	10	1
$0,001 < L(E)C_{50} \leq 0,01$	100	$0,0001 < NOEC \leq 0,001$	100	10
(itd. co 10)		(itd. co 10)		

LC_{50} – (*lethal concentration*) stężenie powodujące śmierć wśród 50% testowanych organizmów podczas określonego czasu ekspozycji na substancję

EC_{50} – (*effective concentration*) stężenie powodujące unieruchomienie 50% testowanych organizmów podczas określonego czasu ekspozycji na substancję

NOEC – (*no observed effects concentration*) najwyższe stężenie, dla którego nie występuje istotny wzrost częstości lub nasilenia skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do próbki kontrolnej

NRD – substancje nie ulegające rozkładowi

RD – substancje ulegające rozkładowi

Mieszaninę klasyfikuje się w kategorii 1 toksyczności przewlekłej, jeżeli suma stężeń składników mieszaniny, zaklasyfikowanych do tej kategorii, pomnożonych przez odpowiadające im współczynniki M, jest równa lub wyższa niż 25%.

Jeśli mieszaniny nie zaklasyfikowano w kategorii 1 toksyczności przewlekłej, rozważa się klasyfikację w kategorii 2 toksyczności przewlekłej, którą obliczono jako 10-krotną sumę stężeń składników zaklasyfikowanych w kategorii 1 toksyczności przewlekłej, pomnożonych przez odpowiadające im współczynniki M plus sumę stężeń składników zaklasyfikowanych w kategorii 2 toksyczności przewlekłej. Gdy wynik jest większy bądź równy niż 25% mieszaninę kwalifikuje się w kategorii 2 toksyczności przewlekłej.

W przypadku gdy mieszaniny nie zaklasyfikowano w kategorii 1 lub 2 toksyczności przewlekłej, rozważa się klasyfikację mieszaniny w kategorii 3 toksyczności przewlekłej. Jeżeli 100-krotna suma stężeń składników zaklasyfikowanych w kategorii 1 toksyczności przewlekłej, pomnożonych przez odpowiadające im współczynniki M plus 10-krotna suma stężeń składników zaklasyfikowanych w kategorii 2 toksyczności przewlekłej plus suma stężeń składników zaklasyfikowanych w kategorii 3 toksyczności przewlekłej jest większa bądź równa niż 25%, mieszaninę klasyfikuje się w kategorii 3 toksyczności przewlekłej.

Gdy mieszaniny nie zaklasyfikowano w żadnej z kategorii 1, 2 lub 3 toksyczności przewlekłej, rozważa się klasyfikację mieszaniny w kategorii 4 toksyczności przewlekłej. Mieszaninę klasyfikuje się w tej kategorii, jeżeli suma stężeń składników zaklasyfikowanych w kategoriach 1-4 toksyczności przewlekłej jest równa lub wyższa od 25% (Tabela 17).

Tabela 17. Klasyfikacja mieszaniny dla toksyczności przewlekłej oparta na regule addytywności – sumę zaklasyfikowanych składników

Klasyfikacja mieszaniny	Równanie
Kategoria 1 toksyczności przewlekłej	$Kp(1) = \sum_n C_{kp1} * M \geq 25\%$
Kategoria 2 toksyczności przewlekłej	$Kp(2) = \sum_n 10 * C_{kp1} * M + \sum_n C_{kp2} \geq 25\%$
Kategoria 3 toksyczności przewlekłej	$Kp(3) = \sum_n 100 * C_{kp1} * M + \sum_n 10 * C_{kp2} + \sum_n C_{kp3} \geq 25\%$
Kategoria 4 toksyczności przewlekłej	$Kp(4) = \sum_n C_{kp1} + \sum_n C_{kp2} + \sum_n C_{kp3} + \sum_n C_{kp4} \geq 25\%$

$Kp(1 - 4)$ – kategoria 1-4 toksyczności przewlekłej; n – liczba składników mieszaniny z danej kategorii toksyczności przewlekłej; C_{kp1-4} – stężenie składnika mieszaniny z danej kategorii toksyczności przewlekłej; M – współczynnik stosowany w odniesieniu do stężeń substancji zaklasyfikowanej jako stwarzająca zagrożenie dla środowiska wodnego

5.6. Metodyka badań aplikacyjnych

Badania aplikacyjne prowadzono w czasie pandemii COVID 19, stąd też wynikał ich szczególny charakter. Personel medyczny jednostek ochrony zdrowia wielokrotnie sygnalizował niedostępność maseczek ochronnych o odpowiednio dobrych właściwościach filtrujących. Wobec braku realnej możliwości pełnego i szybkiego wyposażenia służb medycznych w środki ochrony indywidualnej, oceniono możliwość sterylizacji maseczek ochronnych.

Częsty problem w pracowniach radiologicznych stanowi zapewnienie braku zanieczyszczenia patogenami ochronnych fartuchów rentgenowskich, które ze względu na swoją konstrukcję nie mogą być prane.

W związku z powyższym zbadano skuteczność dezynfekcji masek ochronnych i fartuchów RTG za pomocą gazowego ClO_2 . Produktem stosowanym do badań dezynfekcji drogą powietrzną był koncentrat dwuskładnikowy Armex 5 vH. Z wykorzystaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR) zbadano wpływ atmosfery ClO_2 na stabilność struktury chemicznej materiałów, z których wykonano środki ochrony osobistej (Rysunek 23).



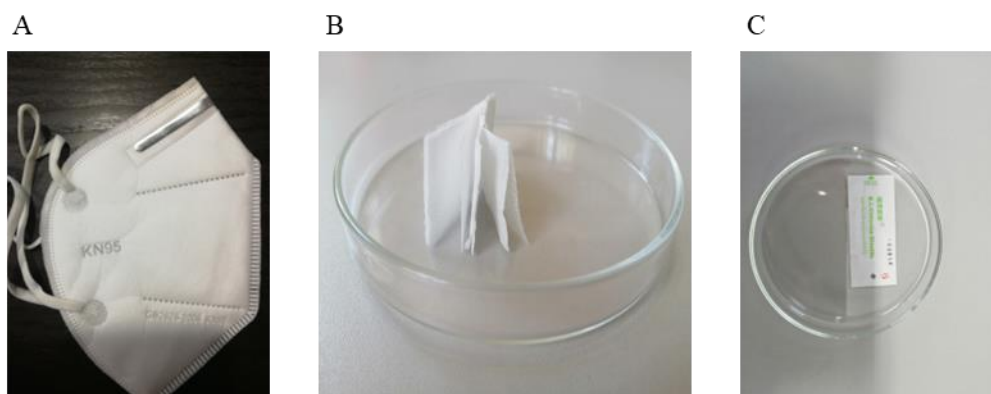
Rysunek 23. Spektrometr FTIR z przystawką ATR.

5.6.1. Dezynfekcja masek ochronnych

Określono skuteczność gazowego ClO₂ w stężeniach 200-4000 ppm wag. wobec spor *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) umieszczonych na standardowych paskach wskaźnikowych zawierających 10⁶ spor/pasek.

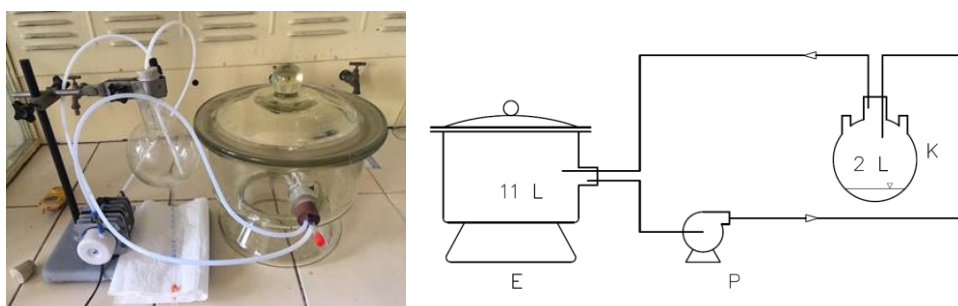
Procedura

Maseczki ochronne 5-warstwowe LXD-03V rozcięto na fragmenty o wymiarach 4 x 9 cm. Pod drugą – środkową, a zatem najtrudniej dostępną warstwą, umieszczono paski wskaźnikowe ze sporami *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372). Krawędzie maski zabezpieczono, aby gaz penetrował jedynie przez poszczególne warstwy maseczki (Rysunek 24).



Rysunek 24. A – maseczka LXD-03V poddana badaniu; B – fragment rozciętej maseczki, w której umieszczono kopertę z paskiem wskaźnikowym; C – koperta z paskiem wskaźnikowym zawierającym spory *B. atrophaeus*

Przygotowany materiał umieszczono w eksykatorze) aparatury badawczej zaprezentowanej na Rysunku 25. Dodatkowo, w eksykatorze umieszczono paski wskaźnikowe nieupakowane w materiał maseczki oraz kwarcową kuwetę spektrofotometryczną, za pomocą której dokonano pomiaru zawartości gazowego ClO₂ w układzie.



Rysunek 25. Układ badawczy z eksykatorem pełniący rolę komory dezynfekcyjnej. E – eksykator o poj. 11 L; P – pompa powietrza; K – kolba z roztworem ClO₂ o poj. 2 L

Do kolby (K) wprowadzano 100 mL roztworu ClO₂ o stężeniu odpowiadającym 200, 500, 1000, 2000 i 4000 ppm wag. gazowego ClO₂. Proces dezynfekcji prowadzono w ciemni przez 3 h dla każdego ze stężeń. Fragmenty maseczek wraz z paskami wskaźnikowymi pobierano z komory doświadczalnej co 1 h (w trzech powtórzeniach). W tym czasie, komora dezynfekcyjna została

przewietrzona, a w kolbie umieszczono nowy roztwór ClO₂. Po każdej godzinie procesu kuwetę kwarcową zabezpieczono korkiem. Zarejestrowano widmo gazu w zakresie 300-400 nm. Sporządzono również widma spektrofotometryczne roztworu z kolby przed i po procesie dezynfekcji.

Po procesie dezynfekcji paski wskaźnikowe przeniesiono, w warunkach sterylnych, do pożywki sojowo-kazeinowej, zawierającej wskaźnik pH – purpurę bromokrezolową. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 7 dni. Po tym czasie oceniano zmianę zabarwienia pożywki.

Oszacowanie stężenia gazowego ClO₂ w układzie doświadczalnym

Stężenie ClO₂ w fazie gazowej zostało oszacowane na drodze bilansu masowego, na podstawie spektrofotometrycznego oznaczenia ClO₂ w roztworze przed i po desorpcji wg pkt. 5.2.3. Stężenie początkowe x_0 oraz objętość v_r roztworu do wygenerowania gazowego ClO₂ o stężeniu y_i obliczono wykorzystując Równania 44-47 bilansu masowego (pkt. 5.2.2.). Objętość wprowadzonego do układu roztworu ClO₂, $v_r = 100 \text{ mL}$, natomiast objętość całkowita aparatury badawczej, $v_c = 13 \text{ L}$.

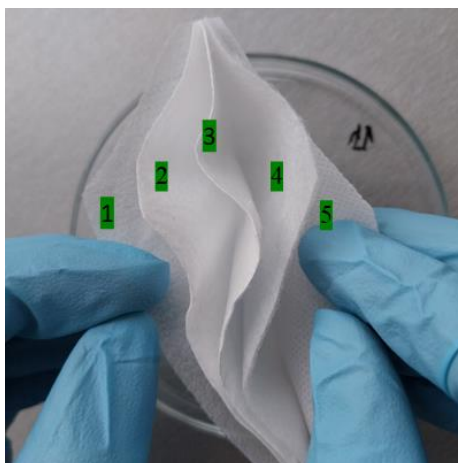
Robocze roztwory wzorcowe o stężeniu początkowym x_0 odpowiadającym zawartości ClO₂ w powietrzu na poziomie 200-4000 ppm *wag.* przygotowano poprzez rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego przygotowanego wg pkt. 5.1.1.

Dokonano analizy porównawczej wartości stężeń gazowego ClO₂ uzyskanych na drodze bezpośredniego pomiaru spektrofotometrycznego próbki do wartości otrzymanych w wyniku analizy bilansowej roztworu i wartości założonych teoretycznie.

Badanie odporności chemicznej materiału maseczek na oddziaływanie gazowego ClO₂

Sporządzono widma FTIR-ATR poszczególnych warstw materiału maseczki przed i po oddziaływaniu gazowego ClO₂ w komorze dezynfekcyjnej, w stężeniu 4000 ppm *wag.* ClO₂ i czasie 3 h (Rysunek 26). Pomiar FTIR wykonano metodą powierzchniową z wykorzystaniem przystawki ATR. Parametry badania:

- detektor DTGS KBr
- dzielnik wiązki: KBr
- liczba skanów próbki: 16
- liczba skanów tła: 16
- prędkość skanowania: $0,4747 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$



Rysunek 26. Warstwy maseczki ochronnej poddane badaniu FTIR. 1- warsta zewnętrzna maseczki; 5 – warstwa wewnętrzna maseczki.

5.6.2. Dezynfekcja fartuchów rentgenowskich

Do przeprowadzenia badań dezynfekcji fartuchów RTG gazowym ClO_2 zastosowano metodę oznaczania z wykorzystaniem detektora PortSens III wg pkt. 5.2.2. Określono skuteczność gazowego ClO_2 w stężeniach 200-1500 ppm *wag.* wobec spor *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372) umieszczonych na standardowych paskach wskaźnikowych zawierających 10^6 spor/pasek. Zbadano odporność materiału fartucha po ekspozycji na gazowy ClO_2 w stężeniu 1500 ppm *wag.* ClO_2 z wykorzystaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni.

Procedura metody

Na fartuchu RTG rozmieszczono paski wskaźnikowe zgodnie z Rysunkiem 27 Fartuch umieszczono w komorze i prowadzono proces dezynfekcji w czasie 4 h w stężeniach 200, 500, 1000 oraz 1500 ppm *wag.* gazowego ClO_2 . Szacowanie stężenia ClO_2 w fazie gazowej na podstawie bilansu masowego, jak również porównanie wartości do wskazań detektora, odbywały się analogicznie jak w pkt. 5.2.2. Po zakończeniu procesu dezynfekcji paski wskaźnikowe, w warunkach sterylnych, przeniesiono do próbek z pożywką sojowo-kazeinową zawierającą purpurę bromokrezolową, będącą wskaźnikiem pH. Próbki inkubowano przez 7 dni w temperaturze 37°C . Po tym czasie obserwowano zmianę barwy pożywki z fioletowej na słomkową w przypadku rozwoju mikroorganizmów w próbce.



Rysunek 27. Sposób rozmieszczenia wskaźników biologicznych na powierzchni fartucha.

Badanie odporności chemicznej materiału fartuchów na oddziaływanie gazowego ClO_2

Sporządzono widma FTIR-ATR zewnętrznej warstwy materiału fartucha RTG przed i po oddziaływaniu gazowego ClO_2 w szafie dekontaminacyjnej w stężeniu 1500 ppm wag. ClO_2 i czasie 4 h. Badaniom poddano warstwę zewnętrzną fartucha, pozostającą w bezpośrednim kontakcie z gazowym ClO_2 (Rysunek 28 warstwy 1 i 3). Pomiary FTIR wykonano metodą powierzchniową z wykorzystaniem przystawki ATR. Parametry badania:

- detektor DTGS KBr
- dzielnik wiązki: KBr
- liczba skanów próbki: 16
- liczba skanów tła: 16
- prędkość skanowania: $0,4747 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$



Rysunek 28. Zdjęcia fragmentu fartucha RTG z uwidocznionymi warstwami funkcjonalnymi 1,3 – poszycie tkaninowe; 2 – warstwy gumy ołowiowej

5.7. Metodyka analiz statystycznych

5.7.1. Analiza spektrofotometryczna oznaczania ClO_2 w roztworach wodnych – pomiar bezpośredni

Molowy współczynnik absorpcji dla ClO_2 w roztworze oszacowano metodą najmniejszych kwadratów. Przedział ufności skonstruowano na podstawie Równania 69:

$$\varepsilon_r = \hat{\varepsilon}_r \pm t_{\alpha, N-2} * s_{\hat{\varepsilon}_r} \quad (69)$$

gdzie:

ε_r – estymator wartości molowego współczynnika absorpcji, $\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$

$\hat{\varepsilon}_r$ – wartość molowego współczynnika absorpcji wyznaczona z analizy regresji (współczynnik regresji liniowej), $\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$

$t_{\alpha, N-2}$ – statystyka o rozkładzie t -Studenta dla $N-2$ stopni swobody i poziomie istotności, $\alpha = 0,025$

$s_{\hat{\varepsilon}_r}$ – odchylenie standardowe współczynnika absorpcji wyznaczonego z analizy regresji, $\frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$

Wartość $s_{\hat{\varepsilon}_r}$ obliczono z Równania 70:

$$s_{\hat{\varepsilon}_r} = \sqrt{\frac{1}{N-2} \frac{\sum_{i=1}^N (A_i - \hat{\varepsilon}_r * C_i)^2}{\sum_{i=1}^N (C_i - \bar{C})^2}} \quad (70)$$

gdzie:

N – liczba par zmierzonych wartości absorbancji i stężenia

A_i – wartość absorbancji roztworu ClO_2 , AU

C_i – stężenie molowe ClO_2 w roztworze, $\frac{\text{mol}}{L}$

\bar{C} – średnia arytmetyczna stężenia molowego ClO_2 w roztworze, $\frac{\text{mol}}{L}$

Krzywą kalibracyjną, a więc zależność stężenia ClO₂ w roztworach wodnych od absorbancji wyznaczono metodą regresji liniowej. Granice przedziału ufności omawianej krzywej skonstruowano wg Równania 71:

$$w(A_i) = \widehat{w}(A_i) \pm t_{\alpha, N-2} * \sqrt{s_{\widehat{w}}^2 * \left[\frac{1}{N} + \frac{(A_i - \bar{A})^2}{\sum_{k=1}^N (A_k - \bar{A})^2} \right]} \quad (71)$$

gdzie:

$w(A_i)$ – wartość oczekiwana stężenia ClO₂ dla absorbancji A_i , ppm

$\widehat{w}(A_i)$ – wartość stężenia ClO₂ obliczona na podstawie krzywej kalibracyjnej, ppm

$t_{\alpha, N-2}$ – statystyka o rozkładzie t -Studenta o $N-2$ stopniach swobody i poziomie ufności, $\alpha = 0,025$

A_i – wartość absorbancji z szeregu przedziału ufności, AU

\bar{A} – średnia arytmetyczna zmierzonych wartości absorbancji, AU

A_k – wartość absorbancji z szeregu kalibracyjnego, AU

N – liczba par zmierzonych wartości absorbancji i stężenia

$s_{\widehat{w}}^2$ – wariancja reszt dana Równaniem 72:

$$s_{\widehat{w}}^2 = \frac{1}{N-2} * \sum_{k=1}^N [(w(A_k) - \widehat{w}(A_k))]^2 \quad (72)$$

Błąd względny w przedmiotowym zakresie pomiarowym wyznaczono wg Równania 73:

$$\delta = \frac{|w(A_i) - \widehat{w}(A_i)|}{\widehat{w}(A_i)} = \frac{t_{\alpha, N-2} * \sqrt{s_{\widehat{w}}^2 * \left[\frac{1}{N} + \frac{(A_i - \bar{A})^2}{\sum_{k=1}^N (A_k - \bar{A})^2} \right]}}{\widehat{w}(A_i)} * 100\% \quad (73)$$

5.7.2. Analiza spektrofotometryczna oznaczania gazowego ClO₂ w powietrzu

Na podstawie przeprowadzonej analizy regresji oszacowano wartość molowego współczynnika absorpcji gazowego ClO₂ dla długości fali $\lambda = 351$ nm. Sposób konstrukcji przedziału ufności przedstawia Równanie (74):

$$\varepsilon_g = \hat{\varepsilon}_g \pm t_{\alpha, N-2} * s_{\hat{\varepsilon}_g} \quad (74)$$

gdzie:

ε_g – estymator wartości molowego współczynnika absorpcji, $\frac{L}{mol*cm}$

$\hat{\varepsilon}_g$ – wartość molowego współczynnika absorpcji wyznaczona z analizy regresji (współczynnik regresji liniowej), $\frac{L}{mol*cm}$

$t_{\alpha, N-2}$ – statystyka o rozkładzie t -Studenta dla $N-2$ stopni swobody i poziomie istotności, $\alpha = 0,025$

$s_{\hat{\varepsilon}_g}$ – odchylenie standardowe współczynnika absorpcji wyznaczonego z analizy regresji, $\frac{L}{mol*cm}$

Wartość $s_{\hat{\varepsilon}_g}$ obliczono z Równania 75:

$$s_{\hat{\varepsilon}_g} = \sqrt{\frac{1}{N-2} \frac{\sum_{i=1}^N (A_i - \hat{\varepsilon}_g * C_i)^2}{\sum_{i=1}^N (C_i - \bar{C})^2}} \quad (75)$$

gdzie:

N – liczba par zmierzonych wartości absorbancji i stężenia

A_i – wartość absorbancji fazy gazowej, AU

C_i – stężenie molowe ClO_2 w fazie gazowej, $\frac{mol}{L}$

\bar{C} – średnia arytmetyczna stężenia molowego ClO_2 w fazie gazowej, $\frac{mol}{L}$

5.7.3. Analiza oznaczania gazowego ClO_2 w powietrzu z wykorzystaniem detektora

Na podstawie odczytów stężeń ClO_2 w komorze dekontaminacyjnej co 15 min w czasie 4 h wyznaczono średnie stężenie gazu w układzie. Przedział ufności wyznaczono zgodnie z Równaniem 76:

$$C_g = \bar{C}_g \pm t_{\alpha, N-1} * \frac{s_{\bar{C}_g}}{\sqrt{N-1}} \quad (76)$$

gdzie:

C_g – estymator wartości stężenia gazowego ClO_2 w komorze dekontaminacyjnej, $ppm\ wag.$

\bar{C}_g – średnia wartość stężenia gazowego ClO_2

$t_{\alpha, N-1}$ – statystyka o rozkładzie t -Studenta dla $N-1$ stopni swobody i poziomie istotności, $\alpha = 0,025$

$s_{\bar{C}_g}$ – odchylenie standardowe średniej wartości stężenia gazowego ClO_2 , $ppm\ wag.$

Wartość $s_{\bar{C}_g}$ obliczono z Równania 77:

$$s_{\bar{C}_g} = \sqrt{\frac{\sum (C_{gi} - \bar{C}_g)^2}{N-1}} \quad (77)$$

gdzie:

C_{gi} – wartość stężenia gazowego ClO_2

N – ilość pomiarów stężenia

Współczynnik zmienności CV wyznaczono z wykorzystaniem Równania 78:

$$CV = \frac{s_{\bar{C}_g}}{\bar{C}_g} * 100\% \quad (78)$$

Analogicznych obliczeń statystycznych dokonano wyznaczając wartości stężeń gazowego ClO_2 na podstawie bilansu masowego.

5.7.4. Badania preparatywne

Oznaczanie suchej masy

Za wynik końcowy oznaczania suchej masy przyjęto średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń.

Oznaczanie pH w roztworach wodnych

Za wynik końcowy przyjęto średnią arytmetyczną dwóch kolejnych oznaczeń pH, wykonanych na jednym pH-metrze z różnicą nie większą niż 0,1 jednostki pH.

Oznaczenie liczby kwasowej

Za wynik końcowy oznaczenia liczby kwasowej przyjęto średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń.

Oznaczanie zawartości chlorynu sodu

Za wynik końcowy oznaczania zawartości NaClO₂ przyjęto średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń nie różniących się między sobą o więcej niż 5%.

Oznaczanie zawartości ditlenku chloru

Za wynik końcowy oznaczenia zawartości ClO₂ przyjęto średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń nie różniących się między sobą o więcej niż 10%.

Oznaczenie zdolności pieniającej

Wysokość słupa piany określono jako średnią arytmetyczną z co najmniej dwóch równoległych oznaczeń, których różnica nie przekraczała 2 cm.

Ocena zdolności emulgowania tłuszczu

Za wynik końcowy zdolności emulgowania tłuszczu przyjęto średnią arytmetyczną z co najmniej dwóch wyników nie różniących się między sobą o więcej niż 5%.

Oznaczenie lepkości żeli z wykorzystaniem wiskozymetru kapilarnego Ubbelohde'a

Za wyniki końcowy oznaczenia lepkości kinematycznej przyjęto średnią arytmetyczną z co najmniej dwóch wyników nie różniących się między sobą o więcej niż 5%.

6. Wyniki

6.1. Oznaczanie woltamperometryczne z wykorzystaniem jodometrii

W Tabeli 18 przedstawiono wyniki analiz stężenia poszczególnych form chloru w 12 roztworach uzyskanych przez 1000-krotne rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego. Uzyskano wyniki zgodne z założeniami stechiometrycznymi. Podstawowy roztwór wzorcowy charakteryzował się zatem stężeniem $1502 \pm 24,4$ ppm wag. ClO_2 . Na podstawie otrzymanych wyników wg metody woltamperometrycznej, przygotowano serię roztworów kalibracyjnych, celem wyznaczenia krzywej kalibracyjnej i molowego współczynnika absorpcji dla ClO_2 w metodzie spektrofotometrycznej przez pomiar bezpośredni.

Tabela 18. Stężenia jonów ClO_2^- oraz ClO_2 w roztworach wzorcowych uzyskanych przez 1000-krotne rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego.

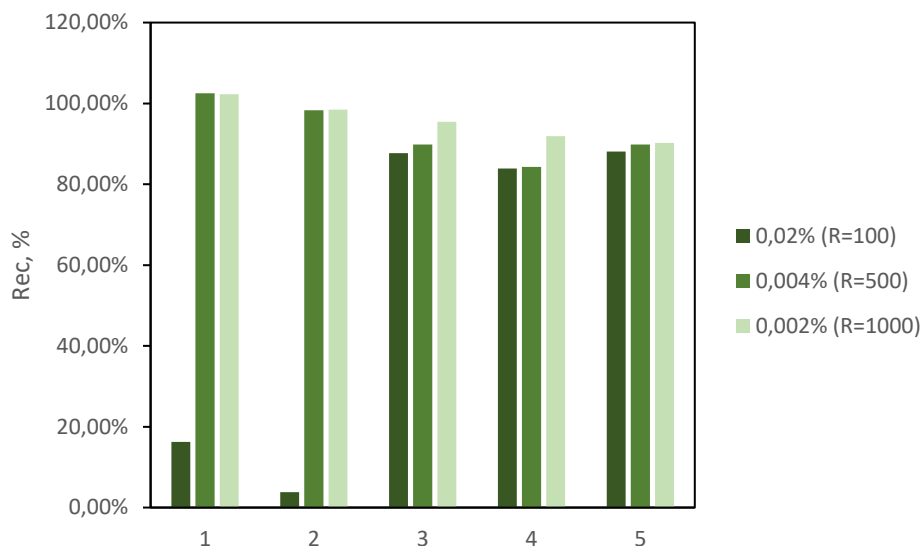
Lp.	ClO_2^- , ppm wag	ClO_2 , ppm wag.
1	0,000	1,480
2	0,000	1,500
3	0,000	1,512
4	0,000	1,486
5	0,000	1,482
6	0,000	1,538
7	0,000	1,479
8	0,000	1,552
9	0,000	1,528
10	0,000	1,498
11	0,000	1,490
12	0,000	1,490

Omawiana metoda pozwoliła z dużą dokładnością określić również stężenie NaClO_2 w roztworze. Dla przygotowanego roztworu zawierającego 0,25% tj. 2500 ppm wag. NaClO_2 rozcieńczonego 1000 razy, zawartość jonów ClO_2^- oznaczono na poziomie 1,9 ppm wag., co w przeliczeniu na NaClO_2 daje wartość 2,5 ppm wag. Duża dokładność wyniku pozwoliła uzyskać pewność, iż w podstawowym roztworze wzorcowym rzeczywiście doszło do całkowitego przereagowania NaClO_2 .

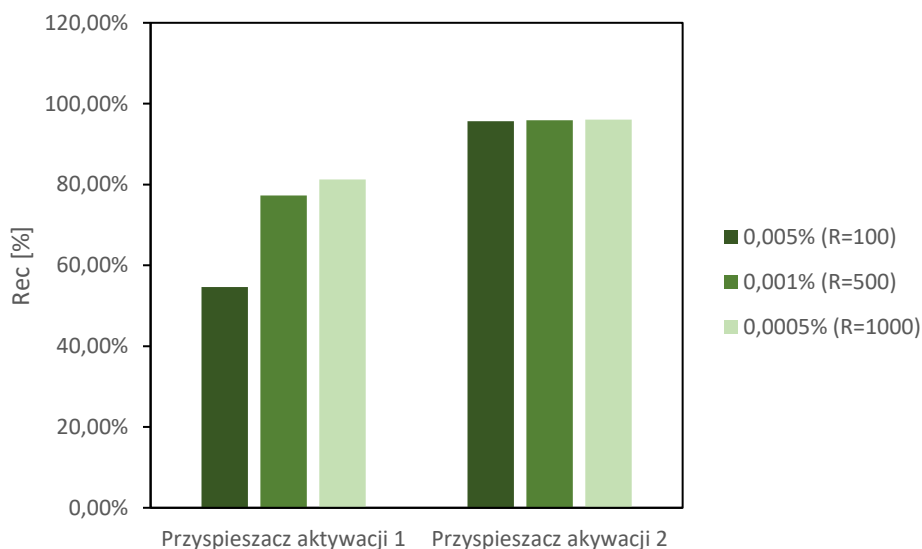
Rysunki 29 i 30 przedstawiają procent odzysku ClO_2 w obecności interferentów tj. surfaktantów w prekursorach i aktywatorach produktów oraz przyspieszaczy aktywacji w aktywatorach produktów. Stopnie odzysku dla ClO_2 w obecności związków powierzchniowo czynnych na poziomie $\leq 0,002\%$ (rozcieńczenie $R=1000$) wynosiły $>90\%$. Dla wyższych stężeń surfaktantów, uzyskano mniejsze stopnie odzysku ClO_2 , które szczególnie w przypadku N-tlenku

C12-14 alkilodimetyloaminy oraz kokamidopropylobetainy wahają się w szerokim zakresie 4-102% (Rysunek 29).

Stopień odzysku ClO_2 w obecności przyspieszacza aktywacji 2 wynosił >95% i nie zależał od stężenia. Przyspieszacz aktywacji 1 w dużym stopniu wpływał na oznaczenie zawartości ClO_2 . Dla stężenia 0,005% w układzie stopień odzysku wynosił tylko 54% (Rysunek 30).



Rysunek 29. Procent odzysku ClO_2 oznaczonego metodą voltamperometryczną w obecności surfaktantów: 1- N-tlenek C12-14 alkilodimetyloamina; 2- Kokamidopropylobetaina; 3- Alkohol C9-11 etoksylogowany; 4- Drugorzędowa sól sodowa alkanosulfonianu C14-17; 5- Sól sodowa kwasu alkilobenzenosulfonowego C10-13. R – rozcieńczenie.



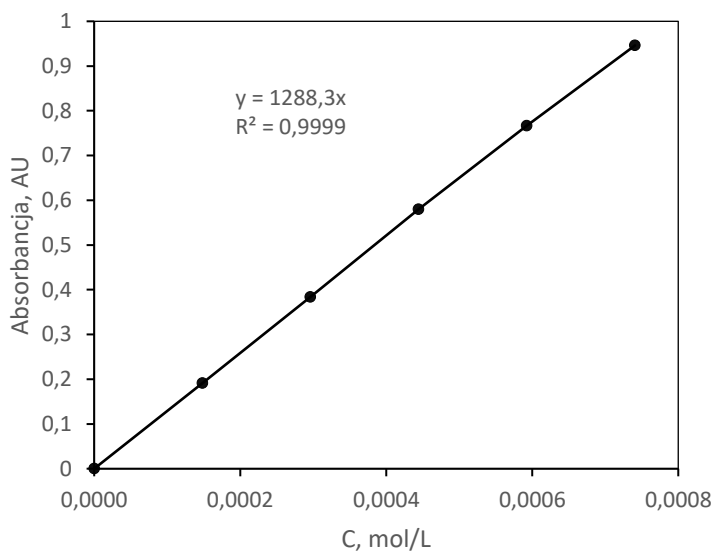
Rysunek 30. Procent odzysku ClO_2 oznaczonego metodą voltamperometryczną w obecności przyspieszaczy aktywacji. R – rozcieńczenie.

Metoda miareczkowania voltamperometrycznego mianowania podstawowego roztworu wzorcowego ClO_2 stanowiła bezwzględną metodę odniesienia, na podstawie której zdefiniowano charakterystykę kalibracyjną w metodzie spektrofotometrycznej przez pomiar bezpośredni (w pkt 6.2).

Jednak uzyskane wyniki wpływu interferentów na oznaczalność zawartości ClO₂ eliminują metodę woltamperometryczną w oznaczaniu produktów myjąco-dezynfekujących, które oprócz ClO₂ zawierają bogatą matrycę organiczną. Tlenki, aminy, alkohole, sole sodowe itp. mogą tworzyć układy redoks, zakłócające reakcje analityczne wykorzystywane w tej metodzie.

6.2. Oznaczanie spektrofotometryczne ClO₂ w roztworach wodnych – pomiar bezpośredni

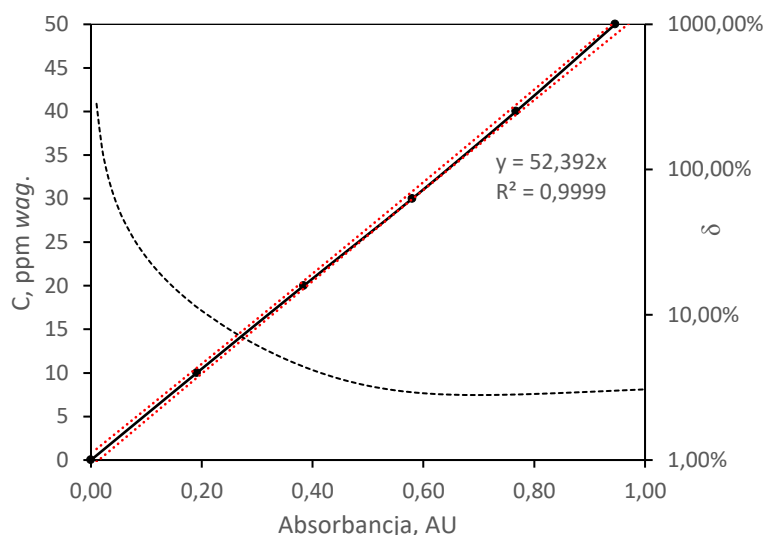
Charakterystykę kalibracyjną określono poprzez wyznaczenie zależności absorbancji roztworu ClO₂ od stężenia. Stężenie obliczono na podstawie wyniku analizy woltamperometrycznej (pkt. 6.1) stanowiącej bezwzględną metodę odniesienia. Wykres zależności absorbancji od stężenia ClO₂ w roztworze przedstawiono na Rysunku 31. Molowy współczynnik absorpcji przy długości fali 358,5 nm, będący jednocześnie współczynnikiem regresji liniowej oszacowanym metodą najmniejszych kwadratów, wynosi $\epsilon_r = 1288 \pm 16,9 \frac{\text{L}}{\text{M}\cdot\text{cm}}$.



Rysunek 31. Krzywa zależności absorbancji od stężenia serii roztworów ClO₂.

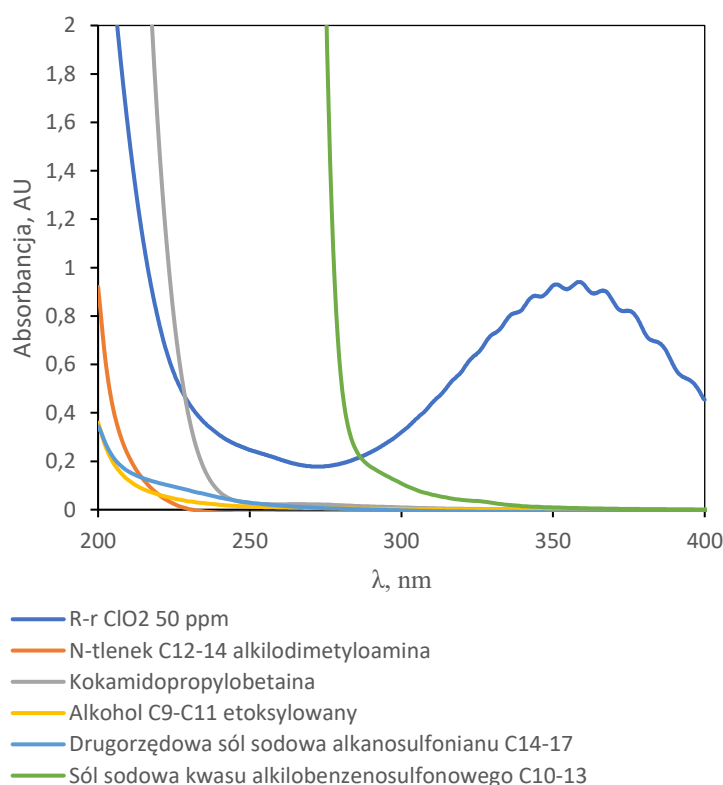
Graficzny obraz zależności stężenia ClO₂ od absorbancji w roztworach wodnych, wraz z granicami przedziału ufności dla krzywej uzyskanej metodą regresji liniowej, przedstawiono na Rysunku 32.

Minimalny przedział błędów względnego δ (1,40-1,44%) występuje w przedziale absorbancji 0,6 – 0,8, co odpowiada stężeniom 30-40 ppm wag. ClO₂. Dla stężeń poniżej 5 ppm wag. szacowany błąd względny może przekroczyć 10%.

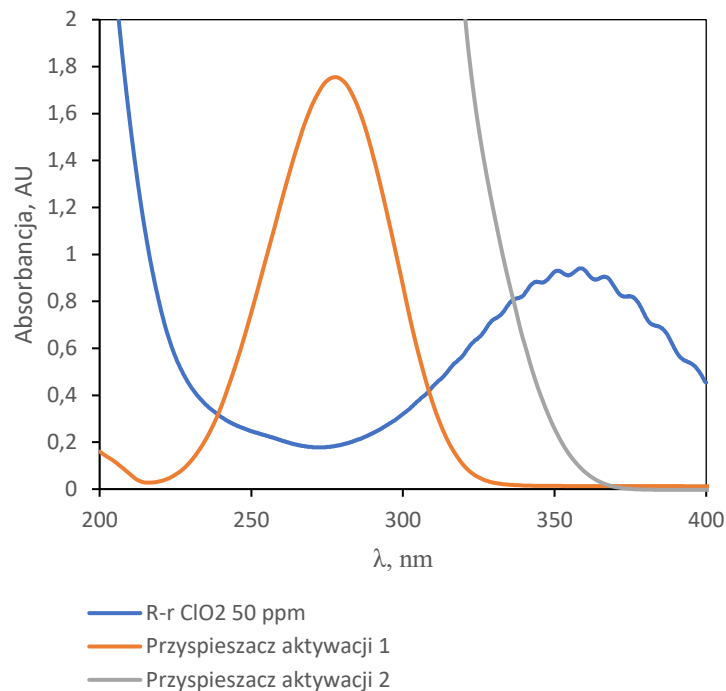


Rysunek 32. Krzywa kalibracyjna spektrofotometrycznej metody oznaczania ClO₂ w roztworach wodnych poprzez pomiar bezpośredni przy $\lambda = 358,5$ nm.

Rysunki 33 i 34. przedstawiają widma UV dla czystego roztworu ClO₂ o stężeniu 50 ppm wag. oraz 1% roztworów surfaktantów i 1% roztworów związków mających za zadanie przyspieszenie aktywacji ClO₂. Cechą charakterystyczną widma ClO₂ w roztworze, jest jego oscylacyjna struktura, uwidoczniiona serią lokalnych maksimów absorpcji. Matryca organiczna nie wykazuje interferencji dla ClO₂ w maksimum jego absorpcji tj. przy 358,5 nm.



Rysunek 33. Widma absorpcyjne UV czystego roztworu ClO₂ oraz 1% roztworów przykładowych surfaktantów.



Rysunek 34. Widma absorpcyjne UV wodnego roztworu ClO₂ oraz 1% roztworów przykładowych przyspieszczy aktywacji.

Wyniki oznaczania zawartości ClO₂ metodą spektrofotometryczną przez pomiar bezpośredni, zarówno w kontekście liniowości, jak również dokładności i precyzji są wysoce zadowalające. Brak wpływu matrycy organicznej na oznaczalność zawartości ClO₂ pozwala na zastosowanie metody w odniesieniu do utworzonych produktów myjąco-dezynfekujących.

Podsumowując, na podstawie wyników analiz woltamperometrycznych roboczych roztworów wzorcowych, uzyskanych przez rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego ClO₂, wyznaczono krzywą kalibracyjną oznaczania ClO₂ w metodzie spektrofotometrycznej. Jednak metoda woltamperometryczna nie może być zastosowana w badaniach produktów zawierających matrycę organiczną. Do tego celu, idealnie natomiast nadaje się metoda spektrofotometryczna, w której obecność dodatkowych substancji organicznych w układzie nie wpływa na oznaczalność ClO₂. Zatem, połączenie obu technik pozwala na oznaczanie ClO₂ w układach innych niż woda, w tym wypadku w preparatach myjąco – dezynfekujących.

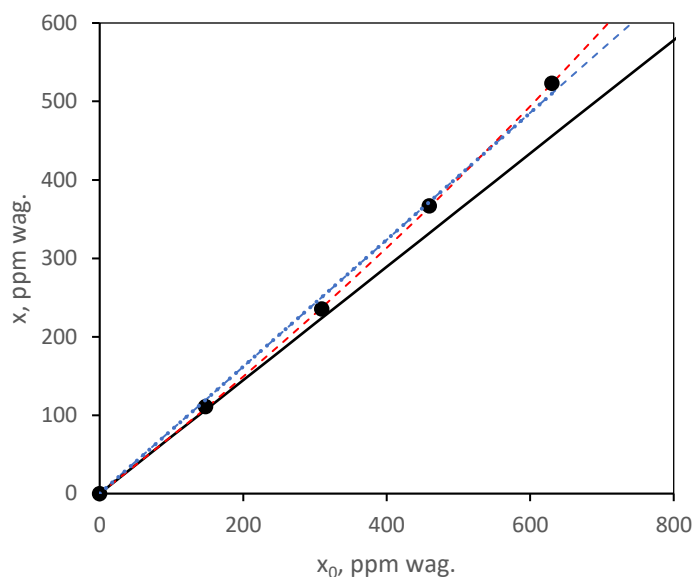
6.3. Oznaczanie spektrofotometryczne ClO₂ w roztworach wodnych – barwniki spektrofotometryczne

Wykazano stabilność próbek analitycznych, dla poszczególnych barwników spektrofotometrycznych. Wyznaczono zależność stężenia ClO₂ od absorbancji wraz z granicami przedziału ufności i wartościami błędu względnego. Wartości LOD i LOQ w żadnej z metod nie były większe niż 0,2 ppm *wag.* ClO₂ Miarą precyzji, a tym samym zróżnicowania układu był współczynnik zmienności (CV). Dla metody z wykorzystaniem AM i CPR nie przekroczył on 1%, dla metody z wykorzystaniem LGB – 2%. Znaczący wpływ interferentów, tj. przykładowych surfaktantów i przyspieszaczy aktywacji, a także NaClO₂, na oznaczalność ClO₂ wyeliminował metody wykorzystujące barwniki spektrofotometryczne do badania produktów z bogatą matrycą organiczną. Podobnie jak w przypadku metody woltamperometrycznej, szereg złożonych układów redoks zakłócił reakcje właściwe z barwnikami spektrofotometrycznymi. W związku z tym, że metody analityczne z wykorzystaniem barwników AM, CPR oraz LGB nie posłużyły do oznaczania zawartości ClO₂ w produktach, zdecydowano się nie umieszczać szczegółowej metodyki oraz wyników w części właściwej pracy.

Szczegółowy opis wyników badań zamieszczono na płycie CD w Załączniku 1.

6.4. Oznaczanie spektrofotometryczne gazowego ClO₂ w powietrzu

Rysunek 35 przedstawia wykres bilansu masowego desorpcji ClO₂ w postaci krzywej zależności stężenia ClO₂ w roztworze po desorpcji (x) od stężenia początkowego (x_0). Linia ciągła odpowiada charakterystyce równowagi gaz-ciecz wynikającej z prawa Henry'ego. Uzyskane krzywe empiryczne oznaczono linią przerywaną: czerwona – wg modelu eksponencjalnego, niebieska – wg modelu liniowego.

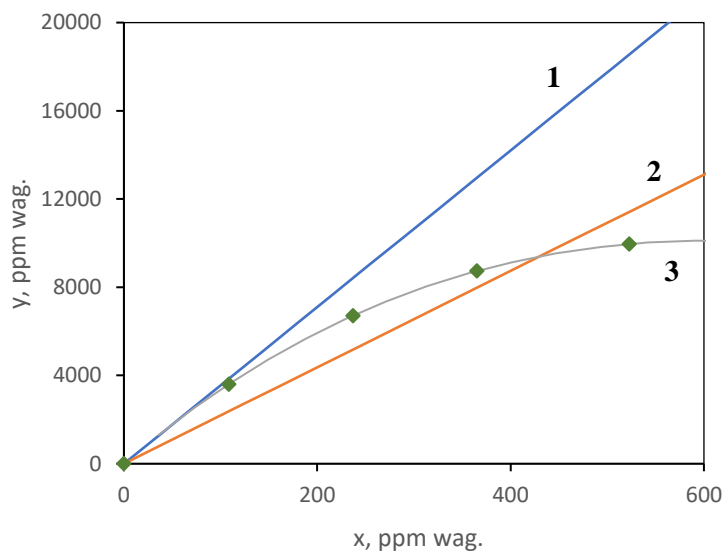


Rysunek 35. Wykres zależności stężenia ClO_2 w roztworze wodnym po desorpcji ClO_2 od stężenia początkowego ClO_2 . Linia ciągła: zależność wynikająca z prawa Henry'ego; linie przerywane: modele krzywych doświadczalnych, punkty – wartości oznaczone spektrofotometrycznie.

Dla niskich stężeń początkowych ClO_2 , tj. w obszarze 0-200 ppm wag. stężenie w roztworze po desorpcji jest zbliżone z przebiegiem krzywej równowagi, Powyżej stężenia początkowego 200 ppm obserwowany jest nieliniowy, dodatni wzrost odchylenia krzywych empirycznych od prawa Henry'ego. Dodatni charakter odchylenia wskazuje na wyższe stężenie ClO_2 w roztworze wodnym w stosunku do przewidywanego przez prawo Henry'ego. Możliwą przyczyną obserwowanego odchylenia jest niedostatecznie długi czas desorpcji (15 min).

Rysunek 36 przedstawia wykres krzywych zależności stężenia ClO_2 w fazie gazowej (y) od stężenia ClO_2 w fazie ciekłej, wyznaczonego na podstawie bilansu masowego w fazie ciekłej przed i po desorpcji. Wykres przedstawia następujące zależności:

- **krzywa 1** – charakterystyka równowagi gaz-ciecz dla układu ClO_2 -woda wyznaczona z prawa Henry'ego
- **krzywa 2** – krzywa zależności stężenia ClO_2 w fazie gazowej obliczona z ogólnego równania bilansowego, gdzie wartość przyrostu stężenia Δx_i wyznaczono z wykorzystaniem modelu liniowego,
- **krzywa 3** – krzywa zależności stężenia ClO_2 w fazie gazowej obliczona z ogólnego równania bilansowego, gdzie wartość przyrostu stężenia Δx_i wyznaczono z wykorzystaniem modelu eksponencjalnego,
- **punkty** – obrazujące zależność stężenia ClO_2 w fazie gazowej obliczonego na podstawie wartości stężeń x_0, x_i oznaczonych spektrofotometrycznie



Rysunek 36. Wykres zależności bilansowego stężenia ClO_2 w fazie gazowej od stężenia ClO_2 w fazie ciekłej (opis krzywych w tekście).

Charakterystyka poszczególnych krzywych i punktów doświadczalnych przedstawiona jest w Tabeli 19.

Tabela 19. Charakterystyka krzywych przedstawionych na Rysunku 36.

	Równanie krzywej	R^2
Krzywa 1	$y = 35,5 * x$	1,000
Krzywa 2	$y = 21,846 * x$	1,000
Krzywa 3	$y = 92,59 * \left[2085,9 \ln \left(\frac{x}{1481,6} + 1 \right) - x \right]$	1,000
Punkty doświadczalne (model liniowy)	$y = 21,878 * x$	0,972
Punkty doświadczalne (model nieliniowy)	$y = 92,59 * \left[2085,9 \ln \left(\frac{x}{1481,6} + 1 \right) - x \right]$	1,000

Przebieg zmienności krzywych zależności stężenia ClO_2 w fazie gazowej od stężenia w fazie ciekłej w stanie bliskim równowagi, zależy od przyjętego sposobu szacowania ubytku ClO_2 w roztworze przed i po desorpcji. Zastosowanie aproksymacji liniowej prowadzi do uzyskania krzywej 2. Współczynnik nachylenia został oszacowany na podstawie współczynnika regresji zależności stężenia ClO_2 w roztworze po desorpcji od stężenia początkowego (Rysunek 36). Jednocześnie, odpowiada on wartości współczynnika regresji liniowej zależności empirycznej – krzywa 2 pokrywa się zatem z krzywą regresji liniowej punktów oznaczonych kolorem zielonym.

Współczynnik determinacji liniowej R^2 będący miarą dopasowania wartości empirycznych od linii regresji, wskazuje na znaczący błąd aproksymacji w przypadku zastosowania modelu liniowego. Adekwatnym modelem opisującym przebieg zależności bilansowych stężeń ClO_2 w fazie gazowej od stężenia ClO_2 w fazie ciekłej, będzie model nieliniowy opisany krzywą 3. Uzyskane

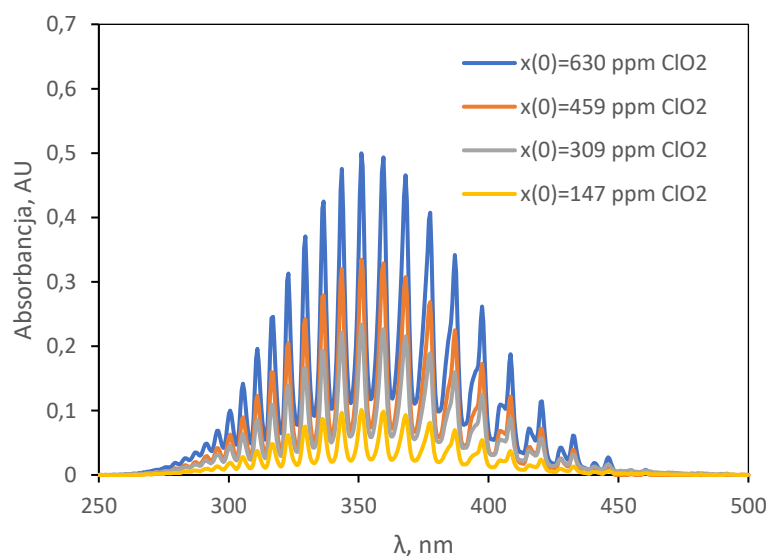
równanie krzywej jest tożsame z równaniem krzywej regresji nieliniowej aproksymującej zależność empiryczną daną wektorem punktów oznaczonych kolorem zielonym.

Podobnie jak w przypadku zależności stężenia ClO_2 w roztworze po desorpcji od stężenia początkowego (Rysunek 36) w przypadku przebiegu zależności danej krzywą 3 obserwowany jest obszar zgodności z prawem Henry'ego w zakresie 0-100 ppm *wag.* Powyżej tego zakresu obserwowane jest odchylenie związane z pozostawaniem ClO_2 w roztworze wodnym.

Ze względów czysto praktycznych, prostoty rozwiązania oraz satysfakcjonujących wyników do celów analitycznych, w dalszych obliczeniach przyjęto krzywą regresji wg modelu liniowego.

Badania fazy gazowej

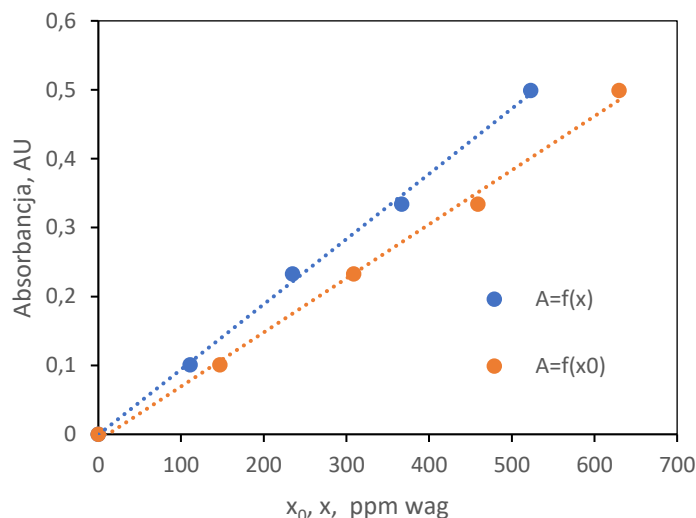
Na Rysunku 37 przedstawiono widma UV ditlenku chloru fazy gazowej nad roztworem w stanie bliskim równowagi. Przebieg i kształt uzyskanych widm jest specyficzny dla gazowego ClO_2 i odpowiada opisom widm elektronowych zawartym w literaturze naukowej (Esposito, et al., 1999). Maksimum absorpcji dla gazowego ClO_2 zaobserwowano przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 351 \text{ nm}$. Znamioną cechą widma absorpcyjnego jest oscylacyjno – rotacyjna struktura elektronowa pasma absorpcji w zakresie 270 – 480 nm. Omawiana struktura jest obserwowana w postaci charakterystycznych zygzaków, tj. serii lokalnych maksimum absorpcji.



Rysunek 37. Widma UV fazy gazowej nad roztworami ClO_2 .

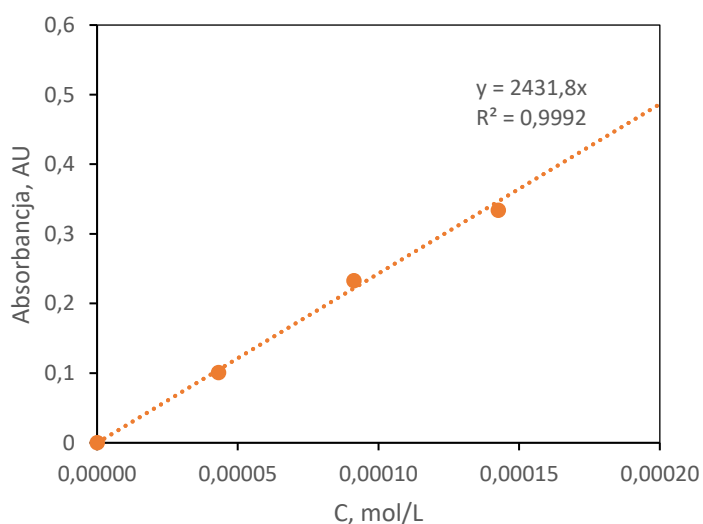
Na Rysunku (38) przedstawiono krzywe zależności zmierzonej absorbancji fazy gazowej nad roztworem, zawierającej zdesorbowany gazowy ditlenek chloru od stężenia początkowego oraz końcowego w roztworze (po desorpcji i osiągnięciu stanu bliskiego równowagi). Obie zależności aproksymowano modelem prostoliniowym, przechodzącym przez początek układu współrzędnych, ze współczynnikiem korelacji bliskim jedności (0,998-0,999). Liniowy charakter zależności absorbancji od stężenia początkowego i końcowego, a tym samym różnicy obu stężeń,

determinującej bilansowe stężenia ClO_2 w fazie gazowej, sugeruje zgodność z prawem Beera właściwości spektrofotometrycznych fazy gazowej w równowadze z roztworem.



Rysunek 38. Krzywe zależności absorpcji fazy gazowej nad roztworem ClO_2 ($\lambda = 351 \text{ nm}$) od stężenia początkowego oraz końcowego ClO_2

Krzywą zależności absorpcji fazy gazowej nad roztworem ClO_2 w stanie bliskim równowagi od bilansowego stężenia ClO_2 w fazie gazowej przedstawiono na Rysunku (39). Zależność absorpcji fazy gazowej od stężenia zawartego w niej ditlenku chloru wykazuje cechy funkcji prostoliniowej zgodnie z prawem Beera. Na podstawie przeprowadzonej analizy regresji oszacowano wartość molowego współczynnika absorpcji gazowego ClO_2 dla długości fali $\lambda = 351 \text{ nm}$, która wyniosła $\epsilon_g = 2432 \pm 33,4 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$.



Rysunek 39. . Krzywa zależności absorpcji fazy gazowej nad roztworem ClO_2 ($\lambda = 351 \text{ nm}$) od bilansowego stężenia ClO_2 w fazie gazowej.

Molowy współczynnik absorpcji ϵ_g wyznaczono dla 3 przypadków doświadczalnych. Parametrami zmiennymi były: długość drogi optycznej, czas ustalenia równowagi ciecz-gaz,

oraz objętość fazy ciekłej i gazowej (Tabela 20). Niniejszy rozdział przedstawia dokładne omówienie wyników dla przypadku nr 1. Dla pozostałych, procedura obliczeniowa była analogiczna jak dla przypadku nr 1.

Tabela 20. Parametry zmienne oraz wartość molowego współczynnika absorpcji dla trzech przypadków doświadczalnych.

Lp.	l, cm	t, min	V_r, mL	V_g, mL	$\epsilon_g, \frac{L}{mol \cdot cm}$
1	1	10	0,50	4,50	2430 ± 140
2	1	15	0,25	4,75	2520 ± 210
3	10	15	5,00	22,00	2500 ± 480

l.p. – nr próbki; l – droga optyczna pomiaru spektrofotometrycznego; t – czas ustalenia równowagi ciecz-gaz; v_r – objętość fazy ciekłej; v_g – objętość fazy gazowej

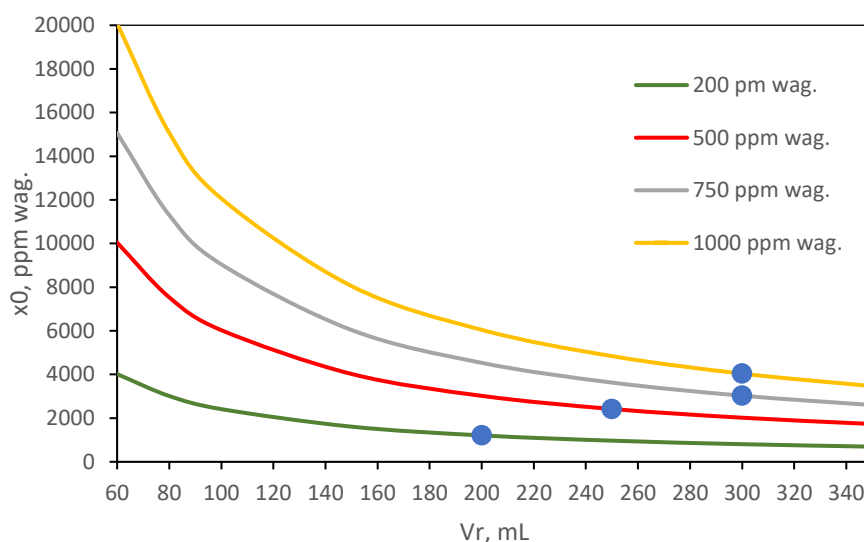
W Tabeli 21 przedstawiono porównanie wartości przekroju czynnego cząsteczki ClO_2 obliczonych na podstawie przeprowadzonych pomiarów, z wartościami przytoczonymi w literaturze (Wahner, et al., 1987; Kromminga, et al., 2003; Arango, et al., 2014). Przytoczone wartości dotyczą pomiaru absorbancji piku związanego z drganiami rozciągającymi symetrycznymi wiązań Cl-O dla przejścia wibronicznego $\nu_{11,0,0}$ (Richard & Vaida, 1991), któremu odpowiada długość fali 351 nm. Uzyskane w niniejszej pracy wartości przekroju czynnego są zbliżone do wartości będących rezultatem badań.

Tabela 21. Porównanie otrzymanej wartości przekroju czynnego ClO_2 z wartościami przedstawionymi w literaturze.

$\sigma \cdot 10^{-17}, cm^2$	λ, nm	Źródło
$1,27 \pm 0,04$	351,3	(Wahner, et al., 1987)
$1,19 \pm 0,1$	351,5	(Kromminga, et al., 2003)
0,839	351,0	(Arango, et al., 2014)
$0,93 \pm 0,05$		
$0,97 \pm 0,08$	351,0	niniejsza praca
$0,97 \pm 0,18$		

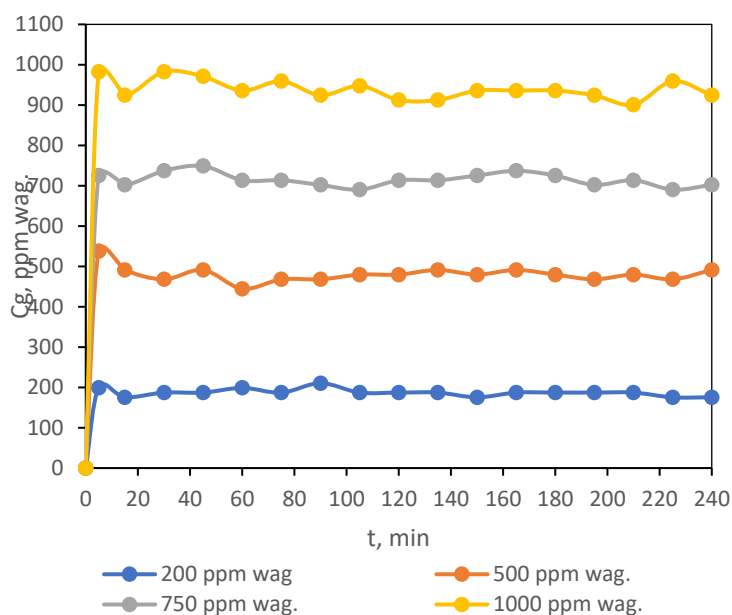
6.5. Oznaczanie gazowego ClO₂ w powietrzu z wykorzystaniem detektora

Na podstawie założonych stężeń ClO₂ w powietrzu y_i oraz obliczeń bilansu masowego w komorze dekontaminacyjnej, określono objętość v_r oraz stężenie początkowe x_0 roztworu wprowadzanego do układu (Rysunek 40). Objętości roztworów v_r wynosiły 200-300 mL (wartości empiryczne zaznaczono niebieskimi punktami), co odpowiadało ich stężeniom początkowym x_0 na poziomie 1200-4000 ppm wag.



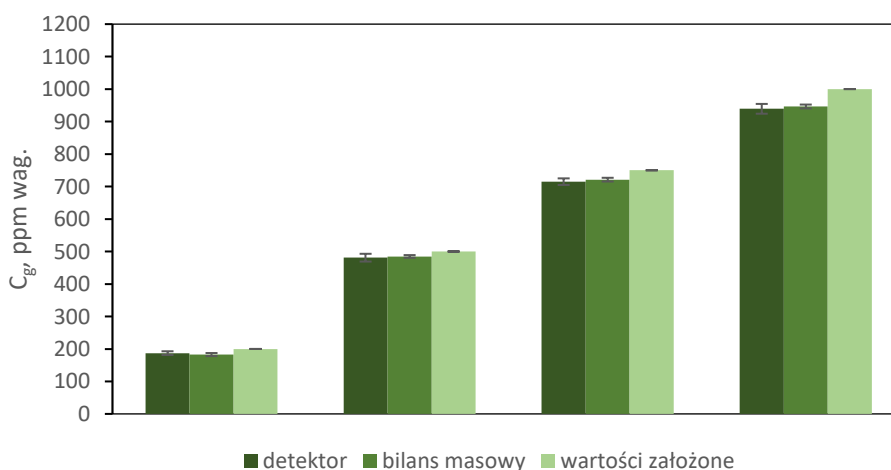
Rysunek 40. Wykres zależności stężenia początkowego roztworu od jego objętości oraz stężenia równowagowego ClO₂ w fazie gazowej, $y_i = 200; 500; 750$ oraz 1000 ppm wag. ClO₂.

Pomiarów stężenia ClO₂ w powietrzu dokonywano za pomocą detektora PortaSens III co 15 min przez 4 h. W tym czasie nie zaobserwowano znaczących spadków stężenia ClO₂ w komorze dekontaminacyjnej. Wykres zależności stężenia ClO₂ od czasu przedstawiono na Rysunku 41. Współczynnik zmienności CV, będący miarą zróżnicowania stężenia w czasie, dla żadnego przypadku nie przekroczył 5%.



Rysunek 41. Wykres zależności stężenia gazowego ClO_2 (odczyt z detektora PortaSens III) w komorze dekontaminacyjnej od czasu.

Porównano wartości stężenia gazowego ClO_2 będących wskazaniem detektora do wartości założonych teoretycznie i wyznaczonych na drodze bilansu masowego poprzez pomiar spektrofotometryczny stężenia początkowego i końcowego roztworu (Rysunek 42). Nie uzyskano znaczących różnic pomiędzy wartościami empirycznymi, a teoretycznymi. Stosunek stężeń uzyskanych z bilansu masowego i teoretycznych mieścił się w przedziale 0,91-0,97, zaś stosunek stężeń zmierzonych detektorem i teoretycznych w przedziale 0,93-0,96. Współczynniki zmienności CV dla wszystkich pomiarów empirycznych nie przekroczyły 5%.



Rysunek 42. Porównanie wartości stężeń gazowego ClO_2 w komorze dekontaminacyjnej uzyskanych empirycznie i założonych teoretycznie.

6.6. Badania preparatywne

Prace rozpoczęto od doboru surfaktantów w formulacjach. Obserwowano wizualnie stabilność związków w obecności NaClO₂ (pH zasadowego) oraz kwasu cytrynowego (pH kwasowego). Za stabilną próbkę uznano postać klarowną, bez oznak opalizacji, zmętnienia, wytrącania osadu, czy rozdziału. Surfaktanty niejednokrotnie wykazują niestabilność w silnie zasadowych i kwasowych środowiskach, co w kontekście tworzenia formulacji jest cechą niekorzystną. W Tabeli 22 przedstawiono wyniki stabilności dla przykładowych surfaktantów (nie wszystkich przebadanych). W następnym kroku dokonano aktywacji poprzez zmieszanie w stosunku (1:1) wybranych stabilnych roztworów prekursora i aktywatora wraz z surfaktantami. Dla stabilnych mieszanin zbadano wskaźnik trwałości piany oraz zdolność emulgowania. Wyniki szczegółowe, dotyczące stabilnych par związków powierzchniowo czynnych nie zostały zamieszczone w rozprawie.

Tabela 22. Stabilność wybranych surfaktantów w środowisku NaClO₂ oraz kwasu cytrynowego.

Lp.	Rodzaj surfaktantu	Nazwa chemiczna surfaktantu	Stabilność w obecności 0,6% NaClO ₂	Stabilność w obecności 5% kwasu cytrynowego
1	niejonowy	Polisorbat 80	niestabilna	-
2	niejonowy	Alkohol C12-14 etoksylogowany	niestabilna	-
3	niejonowy	Alkohol C9-11 etoksylogowany	niestabilna	Stabilna
4	niejonowy	Alkohol C12-15 etoksylogowany	niestabilna	-
5	kationowy	Chlorek didecyldimetyloamoniowy	-	Stabilna
6	anionowy	Sól sodowa siarczanowanego alkoholu laurylowego	stabilna	-
7	anionowy	Sól sodowa sarkozynianu	niestabilna	-
8	anionowy	Drugorzędowa sól sodowa alkanosulfonianu C14-17	stabilna	-
9	anionowy	Sól sodowa kwasu alkilobenzenosulfonowego C10-13	stabilna	-
10	anionowy	Kwas dodecylobenzenosulfonowy	-	Stabilna

Z myślą o sporządzeniu preparatu żelowego, analogicznych badań stabilności dokonano dla dostępnych zagęstników. Przykładowe wyniki (nie dla wszystkich przebadanych zagęstników) zaprezentowano w Tabeli 23. Napotkano na duże trudności w doborze substancji zagęszczających, co mogło wynikać z faktu, iż są one stabilne w stosunkowo wąskich zakresach pH. Dla dwuskładnikowego żelu, gdzie prekursor charakteryzuje się pH zasadowym, a aktywator pH kwasowym znalezienie odpowiednich zagęstników, które dodatkowo będą stabilne po aktywacji stało się sporym wyzwaniem. Ostatecznie wytypowano odpowiednio stabilne zagęstniki.

Tabela 23. Stabilność wybranych zagęstników w środowisku NaClO_2 oraz kwasu cytrynowego.

Lp.	Nazwa zagęstnika	Typ zagęstnika	Stabilność w obecności 0,6% NaClO_2	Stabilność w obecności 5% kwasu cytrynowego
1	CELULOSE QP 100 MH	hydroksyetyloceluloza	niestabilna	Niestabilna
2	METHOCEL 311	hydroksypropylometyloceluloza	niestabilna	Niestabilna
3	ACUSOL 880	hydrofobowy niejonowy poliol	niestabilna	Niestabilna
4	CRYSTASENSE HP5	polimer amidowy	niestabilna	Niestabilna
5	METHOCEL F50	hydroksypropylometyloceluloza	niestabilna	Niestabilna
6	ALGINIAN SODU	sól sodowa kwasu alginowego	niestabilna	Niestabilna
7	ETHOMENN C/12	bis(2-hydroksyetylo)kokamina	-	Stabilna
8	CECAJEL 210	etoksylat aminy tłuszczowej	-	Stabilna

Prace związane z ustaleniem składu aktywatorów są najważniejszym etapem badań preparatywnych. Dobór kwasów i przyspieszaczy aktywacji tak, aby w kontrolowany sposób uzyskiwać założone stężenia ClO_2 w czasie, jest zagadnieniem trudnym i zajmuje sztanarową pozycję w *know-how* technologii wytwarzania omawianych preparatów. Szczegółowy skład preparatów użytkowych jest własnością firmy MEXEO i nie zostanie przedstawiony w rozprawie doktorskiej.

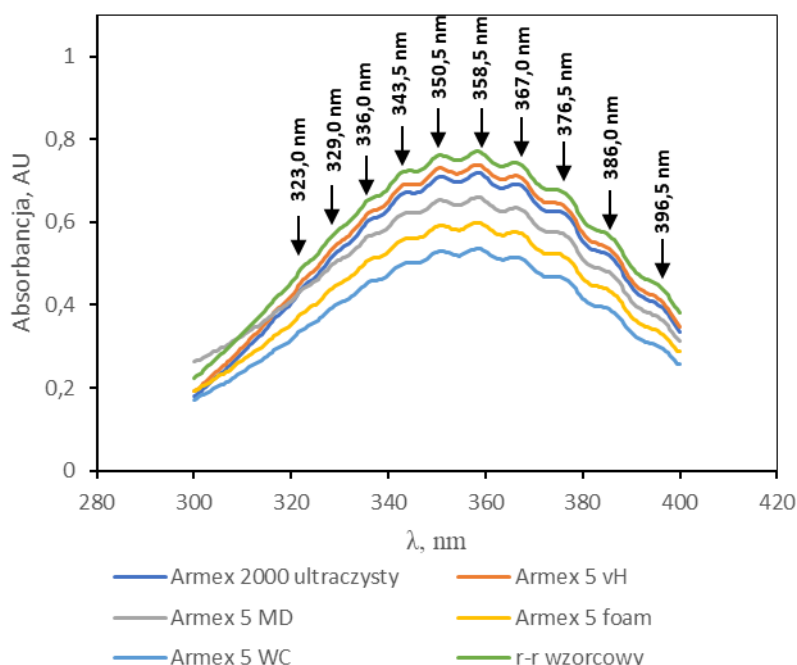
Ostatnim etapem badań preparatywnych było przeprowadzenie testów starzeniowych, którym poddano stabilne formułacje zawierające kompletną matrycę organiczną (jeżeli preparat ją zawierał). Badano parametry fizykochemiczne aktywnych i nieaktywnych form, w czasie do 8-24 miesięcy w zależności od produktu. Na podstawie oceny przeprowadzonych analiz ustalono terminy ważności: 6 miesięcy dla Armexu 2000 Ultraczystego i 12 miesięcy dla pozostałych 4 produktów. W wyznaczonym czasie nie zaobserwowano znaczących różnic w parametrach fizykochemicznych. Dla każdego produktu wyłoniono po jednej stabilnej formułacji, gdzie uzyskano założone stężenia ClO_2 w czasie oraz satysfakcjonujące wyniki dotyczące właściwości pianotwórczych i emulgujących, a w przypadku żelu – właściwości reologicznych. W Tabeli 24 porównano wyniki zawartości ClO_2 założone i rzeczywiste w wybranych próbkach preparatów. Dla koncentratów Armex 2000 Ultraczysty oraz Armex 5 vH zawartość ClO_2 mierzono jednorazowo – odpowiednio: po przygotowaniu rozcieńczenia, oraz po 24 h od aktywacji. W kolejnych 3 preparatach pomiarów dokonano po 1, 5 i 10 min od aktywacji.

Tabela 24. Porównanie założonych i rzeczywiście uzyskanych stężeń ClO₂ w roztworach otrzymanych produktów..

Produkt	Założone stężenie ClO ₂ , ppm wag.	Uzyskane stężenie ClO ₂ 1-5-10 min, ppm wag.	Sposób aktywacji
Armex 5 MD	100	64-83-96	<i>in situ</i> ; 0,5% prekursora i 0,5% aktywatora rozpuścić w 99% wody
Armex 5 foam	1500	1528 - 1516 - 1270	<i>in situ</i> ; zmieszać 50% prekursora i 50% aktywatora
Armex 5 WC	1500	1472-1681-1527	<i>in situ</i> ; zmieszać 50% prekursora i 50% aktywatora
Armex 2000 ultraczysty	100	110 ¹⁾	rozcieńczyć 5% produktu z 95% wody
Armex 5 vH	2000	2132 ²⁾	<i>in situ</i> ; 2% prekursora i 2% aktywatora rozpuścić w 96% wody

¹⁾ zawartość ClO₂ mierzona jednorazowo po przygotowaniu roztworu; ²⁾ zawartość ClO₂ mierzona po 24 h od aktywacji.

Na Rysunku 43 przedstawiono widma UV-VIS roztworów ClO₂ otrzymanych produktów. Przebieg i kształt widm ClO₂ nie różni się od widma roztworów wzorcowych ClO₂ co wskazuje na brak istotnego wpływu matrycy organicznej zawartej w preparatach użytkowych na oznaczalność ClO₂. Lokalne maksima absorpcji wynikające ze struktury oscylacyjnej ClO₂ pokrywają się dla wszystkich preparatów. Nie zaobserwowano żadnych przesunięć. Można zatem wnioskować, że fragment widma elektronowo-wibracyjnego ClO₂ obserwowany w zakresie długości fal 270-480 nm stanowi sygnał diagnostyczny i może być wykorzystany w analizie ilościowej.



Rysunek 43. Widma UV-VIS roztworów ClO₂ otrzymanych produktów.

Zbadano właściwości fizykochemiczne otrzymanych preparatów przed aktywacją (prekursor i aktywator), jak również po aktywacji wykonanej wg Tabeli 24. Sposób aktywacji odzwierciedlał

warunki rzeczywiste w jakich preparaty będą stosowane. Wyjątek stanowił Armex 2000 Ultraczysty, który jest produktem w postaci ClO₂ już zaktywowanego (Tabela 25). Uzyskane wyniki badań są zadowalające.

Tabela 25. Parametry fizykochemiczne uzyskanych preparatów przed (aktywator i prekursor) i po aktywacji (wg Tabeli 24)

Parametry fizykochemiczne	Prekursor	Aktywator	Aktywacja (wg Tabeli 24)
Koncentrat Armex 5 MD			
Postać	Jasnożółta klarowna ciecz	Bezbarwna klarowna ciecz	Klarowna żółta ciecz
pH 1% r-ru	10,41	3,11	4,08
pH 100% r-ru	12,04	2,57	-
Liczba kwasowa, $\frac{mg\ KOH}{g}$	-	243,7	-
Zawartość NaClO ₂ , %	12,52	-	-
Zawartość ClO ₂ , ppm wag. Po 1 – 5 – 10 min	-	-	64 – 83 – 96
Zdolność pianotwórcza, cm ³ po 0,5 – 1 – 10 min	0 – 0 – 0	753–713 – 554	280 – 270 – 220
Wskaźnik trawności piany, %	0,0	77,7	81,5
Pianka Armex 5 foam			
Postać	Jasnożółta klarowna ciecz	Bezbarwna klarowna ciecz	Klarowna żółta ciecz
pH 1% r-ru	10,93	3,00	-
pH 100% r-ru	12,55	1,96	2,50
Liczba kwasowa, $\frac{mg\ KOH}{g}$	-	44,14	-
Zawartość NaClO ₂ , %	0,725	-	-
Zawartość ClO ₂ , ppm wag. po 1 – 5 – 10 min	-	-	1528 – 1516 – 1270
Zdolność pianotwórcza, cm ³ po 0,5 – 1 – 10 min	185 – 172 – 132	145 – 132 – 119	211 – 198 – 145
Wskaźnik trawności piany, %	76,7	90,1	73,2
Żel Armex 5 WC			
Postać	Klarowny bezbarwny żel	Klarowny bursztynowy żel	Klarowny żółty żel
pH 1% r-ru	10,94	2,94	-
pH 100% r-ru	12,49	1,91	2,31
Liczba kwasowa, $\frac{mg\ KOH}{g}$	-	44,61	-
Zawartość NaClO ₂ , %	0,77	-	-
Zawartość ClO ₂ , ppm wag. po 1 – 5 – 10 min	-	-	1472 – 1681 – 1527
Zdolność pianotwórcza, cm ³ po 0,5 – 1 – 10 min	40 -40 – 26	383 – 277 – 211	330 – 258 – 211
Wskaźnik trawności piany, %	65,0	76,2	81,8
Lepkość kinematyczna, $\frac{mm^2}{s}$	885,7	979,2	1720,5

Koncentrat Armex 5 vH			
Postać	Klarowna bezbarwna ciecz	Klarowna bezbarwna ciecz	Klarowna żółta ciecz
pH 1% r-ru	10,85	1,55	-
pH 100% r-ru	12,00	-	-
Liczba kwasowa, $\frac{mg\ KOH}{g}$	-	232,25	-
Zawartość NaClO ₂ , %	23,75	-	-
Zawartość ClO ₂ , ppm wag. po 24 h	-	-	2132
Koncentrat Armex 2000 ultraczysty			
Postać	Klarowna żółta ciecz		
pH 1% r-ru	5,30		
pH 100% r-ru	3,42		
Zawartość ClO ₂ (rozc 20x), ppm wag.	110		

Sposób aktywacji produktu Armex 5 vH, a tym samym zawartość ClO₂ w roztworze i jego objętość, zależy od kubatury dezynfekowanego pomieszczenia. Do celów analitycznych ustalono bezpieczne stężenie około 2000 ppm wag. Jednak proces dezynfekcji drogą powietrzną, szczególnie dużych powierzchni, wiąże się ze znacznie wyższymi stężeniami ClO₂. Nie sposób ich zmierzyć ze względu na właściwości wybuchowe gazu. Dlatego dezynfekcję przeprowadza się w generatorach ClO₂ opracowanych w firmie MEXEO, których specjalistyczna technologia minimalizuje ryzyko wybuchowości.

6.7. Badania skuteczności biobójczej w obszarach medycznych

Skuteczność biobójczą określono dla wytypowanych na drodze badań preparatywnych próbek preparatów. Dobór metod badań skuteczności, szczególnie nośnikowych, zależał przede wszystkim od tego w jaki sposób preparat będzie aplikowany na powierzchni. Dla produktów, których zastosowanie wiąże się z przecieraniem powierzchni, zastosowano metody z użyciem czynnika mechanicznego (Armex 5 MD, Armex foam). Dla produktów Armex 2000 Ultraczysty oraz żelu Armex 5 WC, badania przeprowadzono wg norm nośnikowych bez użycia czynnika mechanicznego. Aplikacja zakłada natrysk preparatu na powierzchnię, bezpośrednio z butelki bądź butelki z atomizerem. Armex 5 vH to produkt zaprojektowany w kontekście dezynfekcji drogą powietrzną, tzw. gazowania ClO₂. Badania przeprowadzono zgodnie z normą do zautomatyzowanych procesów dezynfekcji drogą powietrzną.

Preparaty w formie koncentratów badano w stricte zadanych stężeniach ClO₂. Zakłada się również ich rozcieńczanie przez konsumentów. W związku z intensywnym i charakterystycznym zapachem ClO₂ stosowanie jak najniższych stężeń jest bardzo korzystne. Armex 5 foam oraz Armex 5 WC to tzw. preparaty gotowe do użycia po aktywacji (1:1). Badanie nośnikowe wykonano w 100% produktach. Należy jednak zauważyć, że badania zawieszinowe mogą być wykonane w maksymalnie 80% produkcie. Wynika to z metodyki, w której produkt w próbówce musi być rozcieńczony

zawiesiną mikroorganizmów i dodatkiem substancji obciążającej. W przypadku koncentratów przyjęto zasadę, że aby uzyskać zadane stężenia ClO₂ w badaniu, stężenie wyjściowe produktu odpowiednio zwiększono.

Wyniki stopnia redukcji R widnieją niejednokrotnie ze znakami „< >”. Tak przedstawione wyniki wiążą się ze sposobem zliczania mikroorganizmów szczegółowo opisanym w normach. Jeżeli liczba kolonii na jednej płytce jest większa niż 330, wynik zapisujemy jako „> 330”. Jeżeli wartość jest mniejsza niż 14 wynik zapisano jako „< 14”. Zatem ostateczny wynik stopnia redukcji R również przyjmuje taką postać.

6.7.1. Redukcja liczby czynników patogennych w uzyskanych preparatach

W Tabeli 26 zaprezentowano stopnie redukcji patogenów w badaniach nad produktem **Armex 2000 Ultraczysty** prowadzonych w warunkach czystych w czasie kontaktu 5 min i temperaturze 20°C.

W badaniach zawiesinowych dla spor nie uzyskano wymaganego stopnia redukcji log 4 w stężeniu 25 ppm wag. ClO₂. Dla spor *C. difficile* wymaganego stopnia redukcji nie uzyskano nawet w stężeniu 100 ppm wag. ClO₂. W badaniach dla 25 ppm wag. obserwuje się uzyskiwanie wyższych stopni redukcji dla bakterii Gramm dodatnich (*S. aureus* i *E. hirae*) aniżeli Gramm ujemnych (*E. coli*, *P. aeruginosa*).

W badaniach nośnikowych bez udziału czynnika mechanicznego nie uzyskano wymaganych stopni redukcji log 5 dla bakterii oraz log 4 dla pozostałych mikroorganizmów w żadnym z rozpatrywanych przypadków. Skuteczność biobójcza potwierdzona w badaniach zawiesinowych nie odzwierciedla wyników w badaniach nośnikowych – bardziej zbliżonych do rzeczywistych. Największe różnice zaobserwowano w stopniach redukcji liczby wirusów.

W sposób znaczący skuteczność ClO₂ wobec patogenów poprawia obecność w układzie związków powierzchniowo czynnych. Właściwości zwilżające surfaktantów sprawiają, że ClO₂ jest bardziej dostępny dla patogenów, niszcząc ich struktury. **Armex 5 MD**, którego wyniki stopnia redukcji zaprezentowano w Tabelach 27 i 28 po aktywacji różni się od Armex 2000 Ultraczysty w zasadzie tylko obecnością związków powierzchniowo czynnych. Porównano zatem wyniki dla obu produktów w warunkach czystych i czasie kontaktu 5 min. W badaniach zawiesinowych dla Armex 5 MD uzyskano wymagany stopień redukcji log 4 dla spor *C. difficile* w stężeniu 100 ppm wag. ClO₂. W badaniach nośnikowych bez udziału czynnika mechanicznego wobec wirusów również uzyskano wymagany stopień redukcji log 4. Związki powierzchniowo czynne w połączeniu z ClO₂ odgrywają zatem bardzo ważną rolę w niwelowaniu czynników chorobotwórczych (Tabela 27).

Badania nośnikowe z udziałem czynnika mechanicznego (przecieranie chusteczką) w warunkach czystych wykazały brak skuteczności działania produktu Armex 5 MD wobec spor w czasie kontaktu 5 min i stężeniu 100 ppm wag. ClO₂. Dopiero wydłużenie czasu kontaktu do

15 min pozwoliło uzyskać wymagane stopnie redukcji. Nie uzyskano również wymaganego stopnia redukcji dla norowirusa w stężeniu 50 ppm wag. ClO₂ (Tabela 27).

W przeciwieństwie do powyższego, bardzo dobre wyniki stopnia redukcji w metodach zawieszinowych i nośnikowych, uzyskano dla koronawirusa ludzkiego 229E, będącego przedstawicielem wirusów otoczkowych już w czasie kontaktu 30 s (Tabela 27).

W badaniach zawieszinowych Armex 5 MD przeprowadzonych w warunkach silnego obciążenia organicznego nie uzyskano wymaganej skuteczności dla bakterii Gramm dodatnich, grzybów, drożdży, prątków i spor w stężeniu 25 ppm wag. ClO₂. Dla *A. brasiliensis* stopień redukcji nawet przy 100 ppm wag. ClO₂ nie osiągnął wartości log 4. W badaniach nośnikowych z użyciem czynnika mechanicznego również nie osiągnięto wymaganych stopni redukcji dla bakterii Gramm dodatnich, drożdży, a także noro- i adenowirusa w stężeniu 25 ppm wag. ClO₂ oraz norowirusa w stężeniu 50 ppm wag. ClO₂ (Tabela 28).

W badaniach produktu Armex 5 MD w warunkach czystych jak i brudnych zaobserwowano wyższe poziomy redukcji liczby wirusów w metodzie nośnikowej bez udziału czynnika mechanicznego, aniżeli z udziałem czynnika mechanicznego. Różnica może wynikać z samej metodyki zdefiniowanej w normach EN 16615 oraz EN 16777. W przeliczeniu na 1 m² powierzchni ilość zużytego środka dezynfekującego znacząco się różni. W normie EN 16615 wynosi 160 $\frac{mL}{m^2}$, w normie EN 16777 – dwukrotnie więcej 318 $\frac{mL}{m^2}$. Dodatkowym czynnikiem może być sposób aplikacji. W normie 16777 produkt наносzony jest bezpośrednio na zainfekowaną powierzchnię krążka, w normie EN 16615 pośrednio na chusteczkę, a dopiero potem na powierzchnię, przy czym, cała objętość preparatu może nie być przeniesiona z chusteczki na powierzchnię (Tabele 27-28).

Kolejnym interesującym spostrzeżeniem jest tendencja malejąca stopnia redukcji wraz ze wzrostem stężenia ClO₂ w badaniach zawieszinowych wobec wirusów, w produktach Armex 2000 Ultraczysty oraz Armex 5 MD. Powodem mogą być różnice w pH przygotowanych rozcieńczeń, które w zawieszinie odgrywają ważną rolę. Opisywanej tendencji nie zaobserwowano w badaniach nośnikowych, w których inokulum наносzone było bezpośrednio na powierzchnię badania (Tabele 26, 28).

Wartość akumulacji mikroorganizmów ($\overline{x_{wm}}$) na polach T2, T3 oraz T4 w badaniach wg normy z udziałem czynnika mechanicznego EN 16615 w żadnym przypadku, w którym uzyskano wymagany stopień redukcji, nie przekroczyła granicznych 50 CFU.

Tabela 26. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 Ultraczysty w warunkach czystych w czasie kontaktu 5 min

Armex 2000 Ultraczysty						
Mikroorganizm	Badania w warunkach czystych					
	zawiesinowe			nośnikowe bez czynnika mechanicznego		
	25 ppm	50 ppm	100 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
<i>S. aureus</i>	5,34	>5,52	>5,52	<2,47	<2,47	3,54
<i>P. aeruginosa</i>	5,02	>5,42	>5,42	<2,36	<2,36	<2,36
<i>E. coli</i>	>5,09	>5,47	>5,47	<2,45	<2,45	3,71
<i>E. hirae</i>	>5,54	>5,54	>5,54	<2,50	<2,50	3,56
<i>A. brasilensis</i>	>4,13	>4,13	>4,13	<1,7	<1,7	<1,7
<i>C. albicans</i>	>4,47	>4,47	>4,47	<1,39	<1,39	1,97
<i>M. avium</i>	>5,41	>5,41	>5,41	nie badano		
<i>M. terrae</i>	>5,43	>5,43	>5,43			
<i>B. subtilis</i>	2,27	4,27	>4,54			
<i>B. cereus</i>	3,94	>4,47	>4,47			
<i>C. difficile</i>	<2,10	<2,10	3,19			
Poliowirus typ 1 LSc 2ab	>7,44	>7,44	>6,44			
Norowirus myszy	>7,52	>7,52	>6,52	0,12	3,17	3,76
Adenowirus typ 5	>7,33	>7,33	>6,33	0,19	0,79	1,45

badania, w których nie uzyskano wymaganego stopnia redukcji


Tabela 27. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 MD w warunkach czystych w czasie kontaktu 5 min.

Armex 5 MD					
Mikroorganizm	Badania w warunkach czystych				
	zawiesinowe	nośnikowe z czynnikiem mechanicznym		nośnikowe bez czynnika mechanicznego	
		100 ppm	50 ppm	100 ppm	50 ppm
<i>S. aureus</i>	>5,44	>5,5	>5,5	nie badano	
<i>P. aeruginosa</i>	>5,52	>5,47	>5,47		
<i>E. coli</i>	>5,42	nie badano			
<i>E. hirae</i>	>5,48	>5,60	>5,60		
<i>A. brasiliensis</i>	>4,15	nie badano			
<i>C. albicans</i>	>4,48	>4,72	>4,72		
<i>M. avium</i>	>6,47	5,26	5,26		
<i>M. terrae</i>	>6,49	5,23	5,23		
<i>B. subtilis</i>	>4,48	nie badano	<2,92		
<i>B. cereus</i>	>4,51		<2,57		
<i>C. difficile</i>	>4,49		<3,01		
<i>B. subtilis</i> (15 min)	nie badano	4,04	4,22		
<i>B. cereus</i> (15 min)		4,56	4,74		
<i>C. difficile</i> (15 min)		4,24	4,15		
Poliowirus typ 1 LSc 2ab	>7,52	nie badano			
Norowirus myszy	>7,35	3,04	>6,22	>6,62	>6,62
Adenowirus typ 5	>7,61	>5,83	>5,83	>6,34	>6,34
Koronawirus 229E (30 s)	>7,63	>5,18	>5,18	>6,20	>6,20

badania, w których nie uzyskano wymaganego stopnia redukcji

Tabela 28. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 MD w warunkach brudnych w czasie kontaktu 5 min.

Armex 5 MD												
Mikroorganizm	Badania w warunkach brudnych											
	zawiesinowe			nośnikowe z czynnikiem mechanicznym			nośnikowe bez czynnika mechanicznego					
	25 ppm	50 ppm	100 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm			
<i>S. aureus</i>	4,25	>5,54	>5,54	<3,43	5,96	>6,07	nie badano					
<i>P. aeruginosa</i>	5,23	5,42	>5,48	>5,74	>5,93	>5,93						
<i>E. coli</i>	>5,51	>5,51	5,4	nie badano								
<i>E. hirae</i>	4,78	5,39	5,53	<3,5	>6,08	>6,08						
<i>A. brasilensis</i>	<3,12	<3,12	<3,12	nie badano								
<i>C. albicans</i>	<3,06	>4,43	>4,43	3,64	4,23	>4,54						
<i>M. avium</i>	<2,88	5,02	>6,25	nie badano								
<i>M. terrae</i>	<3,15	5,05	>6,53									
<i>B. subtilis</i>	3,21	>4,08	>4,20									
<i>B. cereus</i>	3,07	4,01	>4,35									
<i>C. difficile</i>	<2,71	4,01	>4,08									
Poliowirus typ 1 LSc 2ab	>6,66	>6,66	>5,66	nie badano								
Norowirus mysy	>6,40	>6,40	>5,40							2,44	3,51	4,46
Adenowirus typ 5	>6,25	>6,25	>5,25				3,01	4,32	4,86	5,76	>6,42	>6,54
Koronawirus ludzki 229E	nie badano						4,16	>5,06	>5,06	4,68	5,12	>6,22

 badania, w których nie uzyskano wymaganego stopnia redukcji

W Tabelach 29 i 30 zaprezentowano wyniki badań skuteczności dla produktów gotowych do użycia po aktywacji *in situ* w stosunku (50% : 50%), tj. dla **Armex 5 foam** i **Armex 5 WC**. Ze względu na swoją specyfikę aplikacyjną, produkty badano w stężeniu 100% w badaniach nośnikowych oraz maksymalnym 80% w badaniach zawiesinowych. Ze względu na wysoką zawartość ClO₂ około 1500 ppm *wag.* uzyskano wymagane stopnie redukcji we wszystkich badanych przypadkach.

Wartość akumulacji mikroorganizmów ($\overline{x_{wm}}$) na polach *T2*, *T3* oraz *T4* w badaniach wg normy z udziałem czynnika mechanicznego EN 16615 w produkcie Armex 5 foam w każdym przypadku wyniosła 0.

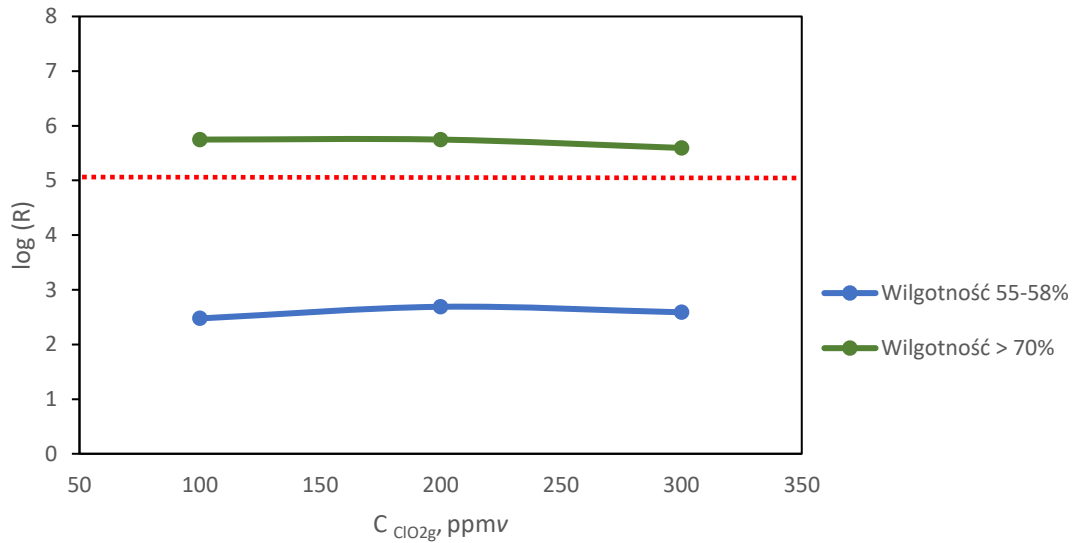
Tabela 29. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 foam w warunkach brudnych w czasie kontaktu 5 min.

Armex 5 foam			
Mikroorganizm	Badania w warunkach brudnych		
	zawiesinowe	nośnikowe z czynnikiem mechanicznym	nośnikowe bez czynnika mechanicznego
	80%	100%	100%
<i>S. aureus</i>	>5,49	>5,31	nie badano
<i>P. aeruginosa</i>	>5,52	>5,51	
<i>E. coli</i>	>5,48	nie badano	
<i>E. hirae</i>	>5,50	>5,04	
<i>A. brasilensis</i>	>4,40	nie badano	
<i>C. albicans</i>	>4,51	>4,07	
<i>M. avium</i>	>6,47	5,26	
<i>M. terrae</i>	>6,53	5,28	
<i>B. subtilis</i>	>4,54	>5,36	
<i>B. cereus</i>	>4,48	5,07	
<i>C. difficile</i>	>4,28	4,15	
Poliowirus typ 1 LSc 2ab	4,26	nie badano	
Norowirus myszy	>6,37	>5,22	>5,62
Adenowirus typ 5	>6,34	>5,34	>5,86
Koronawirus ludzki 229E (30 s)	nie badano	>5,18	>5,20

Tabela 30. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 WC w warunkach brudnych w czasie kontaktu 5 min.

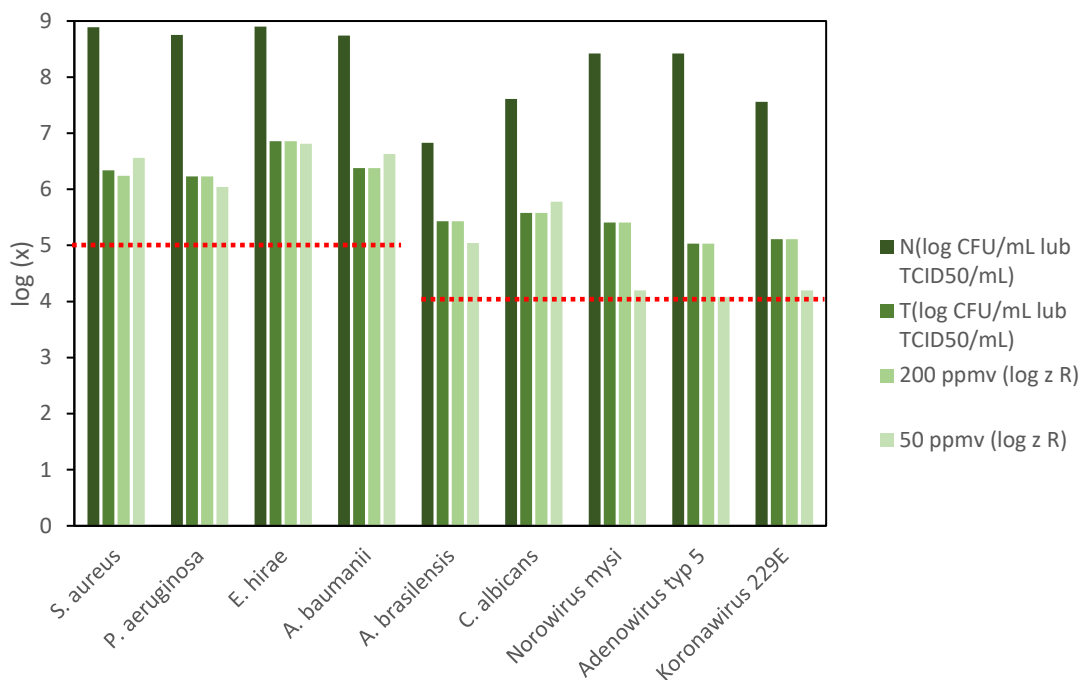
Armex 5 WC		
Mikroorganizm	Badania w warunkach brudnych	
	zawiesinowe	nośnikowe bez czynnika mechanicznego
	80%	100%
<i>S. aureus</i>	>5,46	>5,73
<i>P. aeruginosa</i>	>5,41	>5,83
<i>E. coli</i>	>5,47	>5,72
<i>E. hirae</i>	>5,43	>5,62
<i>A. brasiliensis</i>	>4,41	4,12
<i>C. albicans</i>	>4,22	4,2
<i>M. avium</i>	>6,47	nie badano
<i>M. terrae</i>	>6,43	
<i>B. subtilis</i>	>4,14	
<i>B. cereus</i>	>4,11	
<i>C. difficile</i>	4,13	
Poliowirus typ 1 LSc 2ab	>5,54	
Norowirus myszy	>6,44	4,44
Adenowirus typ 5	>5,40	>6,14

Skuteczność biobójczą wg nośnikowej normy EN 17272 dotyczącej dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną, oznaczono dla produktu **Armex 5 vH**. W pierwszej – wstępnej części testów (tzw. *Preliminary test*) wykonano badania wobec gronkowca złocistego *S. aureus* celem dobrania odpowiednich parametrów procesu, głównie stężenia ClO₂ i wilgotności. Na Rysunku 44 przedstawiono wykres zależności stopnia redukcji dla *S. aureus* od stężenia ClO₂ w powietrzu przy wilgotności powietrza 55-58% i >70% w czasie kontaktu 60 min. Przy niższych wartościach wilgotności nie uzyskano wymaganego stopnia redukcji log 5 (oznaczonego na wykresie czerwoną przerywaną linią). Dopiero podwyższenie stopnia wilgotności do >70% pozwoliło na otrzymanie wymaganych wartości.

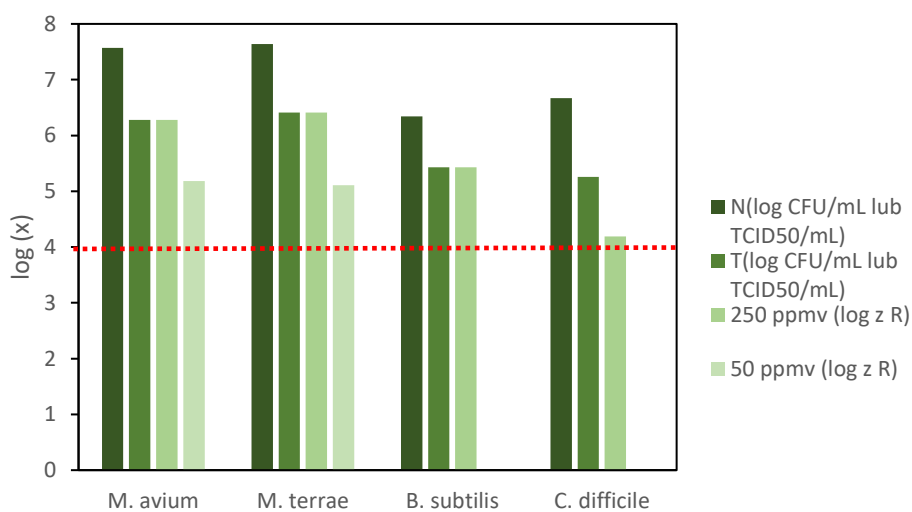


Rysunek 44. Wykres zależności stopnia redukcji dla *S. aureus* od stężenia ClO_2 w powietrzu przy wilgotności powietrza 55-58% i >70% w czasie kontaktu 60 min.

W kolejnym kroku, przystąpiono do badań właściwych, prowadzonych w warunkach czystych w temperaturze 23°C, wilgotności powietrza >70% i czasie kontaktu 60 min. Na Rysunkach 45 i 46 przedstawiono porównanie liczby poszczególnych patogenów w zawiesinie do badania (N) i kontroli nie poddanej ekspozycji na ClO_2 (T). Dodatkowo, przedstawiono stopnie redukcji (R) patogenów w stężeniach 250, 200, oraz 50 ppmv ClO_2 . Uzyskano wymagane stopnie redukcji we wszystkich badanych przypadkach. Najbardziej odporne okazały się spory *C. difficile*. W stężeniu 250 ppmv ClO_2 i czasie kontaktu 60 min uzyskano stopień redukcji log 4,1 (Rysunek 46). Na granicznym poziomie uzyskano również wartości stopnia redukcji dla wirusów, w stężeniu 50 ppmv ClO_2 (Rysunek 45).



Rysunek 45. Wyniki badań skuteczności wg normy EN 17272 dla produktu Armex 5 vH wobec bakterii, grzybów drożdży i wirusów. N – liczba patogenów w zawieszynie do badań; T – kontrola nie poddana ekspozycji ClO₂; R – stopień redukcji.



Rysunek 46. Wyniki badań skuteczności wg normy EN 17272 dla produktu Armex 5 vH wobec prątków i spor. N – liczba patogenów w zawieszynie do badań; T – kontrola nie poddana ekspozycji ClO₂; R – stopień redukcji

6.7.2. Kontrola i walidacja

Istotnym elementem badań mikrobiologicznych jest wykonanie próbek kontrolnych i walidacji, w celu sprawdzenia poprawności działania całego systemu badawczego. W normach, wg których przeprowadzono badania skuteczności biobójczej zdefiniowano dokładnie wymagania i limity jakie należy spełnić, aby badanie zostało uznane za ważne. Limity te dotyczą przede wszystkim liczby patogenów w zawieszynie do badań, ale również w przeprowadzanych kontrolach. W przypadku gdy chociaż jeden z parametrów nie mieści się w limitach, należy uznać całe badanie za nieważne.

W badaniach zawiesinowych wykonano próbkę kontrolną (**A**) w której zamiast produktu do badania użyto wody lub PBS (w przypadku wirusów). Efekt cytotoksyczny neutralizatora oceniono na podstawie kontroli (**B**), natomiast walidacji metody dokonano na podstawie kontroli (**C**). W badaniach wobec wirusów, w celu sprawdzenia systemu badawczego, zamiast kontroli (**B**) i (**C**), wykonano kontrole pozytywne (**D**) i (**E**) z produktem referencyjnym w czasie kontaktu odpowiednio 30 i 60 min. Limity dla poszczególnych kontroli przedstawiono w Tabeli 31 Liczba patogenów we wszystkich przeprowadzonych badaniach kontrolnych mieściła się w wymaganych limitach. Badania zawiesinowe dla produktów na bazie ClO₂ można zatem uznać za ważne.

Tabela 31. Limity dla prób kontrolnych w normach zawiesinowych (EN 13727, 2015; EN 14476, 2019).

Norma	Patogeny	A	B	C	D	E
EN 13727	bakterie	$1,5 \cdot 10^1 < \mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C} < 0,8 \cdot 10^2$ CFU/mL			-	-
EN 13624	grzyby i drożdże					
EN 14348	prątki					
EN 17126	spory					
EN 14476	wirusy	$1 \cdot 10^7 < \mathbf{A} < 1 \cdot 10^8$ TCID ₅₀ /mL	-	-	Poliovirus: $0,5 < \log \mathbf{D} < 2,5$ Norowirus: $1,0 < \log \mathbf{D} < 3,0$ Adenowirus: $3,0 < \log \mathbf{D} < 5,0$ Koronawirus: $0,75 < \log \mathbf{D} < 3,5$	Poliovirus: $2,0 < \log \mathbf{E} < 4,5$ Norowirus: $2,0 < \log \mathbf{E} < 4,0$ Adenowirus: $3,5 < \log \mathbf{E} < 5,5$ Koronawirus: $2,0 < \log \mathbf{E} < 4,0$

– kontrola negatywna; B – kontrola neutralizatora; C- kontrola walidacji, D – kontrola pozytywna z produktem referencyjnym, czas kontaktu 30 min; E - kontrola pozytywna z produktem referencyjnym, czas kontaktu 60 min.

W badaniach nośnikowych z użyciem czynnika mechanicznego również wykonano próbki kontrolne (**A**), (**B**) i (**C**), których znaczenie jest analogiczne jak zawiesinowych. Dodatkowo, przeprowadzono próby kontrolne suszenia (**D_{C0}**) i (**D_{Ct}**), mające na celu sprawdzić przeżywalność drobnoustrojów na powierzchni, przed użyciem produktu biobójczego. Limity dla poszczególnych kontroli przedstawiono w Tabeli 32. Liczba patogenów we wszystkich przeprowadzonych badaniach kontrolnych mieściła się w wymaganych limitach. Badania nośnikowe z udziałem czynnika mechanicznego dla produktów na bazie ClO₂ można zatem uznać za ważne.

Tabela 32. Limity dla prób kontrolnych w normie nośnikowej z udziałem czynnika mechanicznego (EN 16615, 2015).

Norma	Patogeny	A	B	C	D _{C0}	D _{Ct}
EN 16615	bakterie	$\mathbf{A} > 10$ CFU/25cm ² na polach T2-T4	$1,5 \cdot 10^1 < \mathbf{B}, \mathbf{C} < 0,8 \cdot 10^2$ CFU/mL		$7,5 \cdot 10^6 < \mathbf{D}_{C0}, \mathbf{D}_{Ct} < 2,5 \cdot 10^8$ CFU/mL	
	grzyby i drożdże				$7,5 \cdot 10^5 < \mathbf{D}_{C0}, \mathbf{D}_{Ct} < 2,5 \cdot 10^7$ CFU/mL	
	prątki					
	spory					
	wirusy				$7,5 \cdot 10^5 < \mathbf{D}_{C0}, \mathbf{D}_{Ct} < 2,5 \cdot 10^7$ TCID ₅₀ /mL	

A – kontrola negatywna; B – kontrola neutralizatora; C- kontrola walidacji, D_{C0} – kontrola suszenia po wyschnięciu próbki, przed czasem kontaktu t; D_{Ct} – kontrola suszenia po wyschnięciu próbki, po czasie kontaktu t.

W badaniach nośnikowych bez użycia czynnika mechanicznego wykonano próby kontrolne (**A**), (**B**) i (**C**), których znaczenie jest analogiczne do powyższych. W badaniach wobec wirusów wykonano kontrolę pozytywną (**D**) z produktem referencyjnym w czasie kontaktu 5 min. Limity dla poszczególnych kontroli przedstawiono w Tabeli 33 Liczba patogenów we wszystkich

przeprowadzonych badaniach kontrolnych mieściła się w wymaganych limitach. Badania nośnikowe bez udziału czynnika mechanicznego dla produktów na bazie ClO₂ można zatem uznać za ważne.

Tabela 33. Limity dla prób kontrolnych w normach nośnikowych bez udziału czynnika mechanicznego (EN 16777, 2019; EN 17387, 2021).

Norma	Patogeny	A	B	C	D
EN 17387	bakterie	$1 \cdot 10^7 < A < 1 \cdot 10^8$ CFU/mL	log B - log A < log 0,3	log C - log A < log 0,3	-
	grzyby i drożdże	$1 \cdot 10^6 < A < 1 \cdot 10^7$ CFU/mL			
EN 16777	wirusy	$1 \cdot 10^7 < A < 1 \cdot 10^8$ TCID ₅₀ /mL	-	-	Norowirus: $1,5 < \log D < 3,0$ Adenowirus: $2,0 < \log D < 3,5$ Koronawirus: $\log D < 3,0$

A – kontrola negatywna; B – kontrola neutralizatora; C- kontrola walidacji, D – kontrola pozytywna z produktem referencyjnym, czas kontaktu 5 min.

Próbka kontrolna w metodzie dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną nie była poddana ekspozycji na gazowy ClO₂ (**T1**). Walidację metody i jednocześnie wpływ neutralizatora na drobnoustroje przeprowadzono poprzez ocenę efektu hamującego związanego z posiewem drobnoustrojów na płycie agarowej. W tym celu porównano zawartość drobnoustrojów w zawiesinie walidacyjnej (**N1**) i na płytkach agarowych uzyskanych z posiewu neutralizatora (**n1**) oraz z posiewu krążka (**n2**). Limity dla poszczególnych kontroli przedstawiono w Tabeli 34 Liczba patogenów we wszystkich przeprowadzonych badaniach kontrolnych mieściła się w wymaganych limitach. Badania nośnikowe bez udziału czynnika mechanicznego dla produktu Armex 5 vH można zatem uznać za ważne.

Tabela 34. Limity dla prób kontrolnych w normie nośnikowej dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną (EN 17272, 2020).

Norma	Patogeny	T1	N1	n1	n2
EN 17272	bakterie	log T1 > 6	$1 \cdot 10^3 < N1 < 1 \cdot 10^4$ CFU/mL	n1 > 0,5 N1	n2 > 0,5 N1
	grzyby i drożdże	log T1 > 5			
	prątki				
	spory				
	wirusy				

T1 – kontrola negatywna, nie poddana ekspozycji na gaz; N1 – zawiesina walidacyjna; n1- liczba patogenów w posiewie z neutralizatora, n2 – liczba patogenów w posiewie z nośnika.

6.8. Szacowanie toksyczności i ekotoksyczności preparatów użytkowych

Źródłem danych dotyczących toksyczności ostrej oraz toksyczności ostrej i przewlekłej w stosunku do środowiska wodnego poszczególnych składników preparatów były karty charakterystyki stosowanych surowców, a dokładniej informacje zawarte w sekcjach: **3 – Skład / informacja o składnikach**, **8 – Kontrola narażenia / środki ochrony indywidualnej**, **11 – Informacje toksykologiczne**, **12 – Informacje ekologiczne**. Ze względu na to, że receptury preparatów objęte są tajemnicą firmy MEXEO, w niniejszym rozdziale nie przedstawiono klasyfikacji wszystkich

substancji wchodzących w skład mieszanin a jedynie wartości końcowe toksyczności gotowych preparatów.

Decydujący wpływ na klasyfikację posiadał ClO₂, który znajduje się na Wykazie zharmonizowanej klasyfikacji oraz oznakowania stwarzającego zagrożenie w Rozporządzeniu CLP (Rozporządzenie Nr 1272/2008, 2008). W związku z powyższym, dane dotyczące właściwości toksyczności i ekotoksyczności są dostępne na stronie Europejskiej Agencji Chemikaliów (ECHA) i każdy producent lub importer ma obowiązek z nich korzystać przy wyznaczaniu klasyfikacji mieszaniny. W Tabeli 35 zaprezentowano wartości toksyczności dla ClO₂ wg klasyfikacji zharmonizowanej (ECHA, 2004). Badania oznaczenia toksyczności ostrej drogą skórną nie zostały przeprowadzone, ponieważ ClO₂ sklasyfikowany jest jako żrący dla skóry.

Tabela 35. Parametry toksyczności dla ClO₂ udostępnione przez ECHA (ECHA, 2004).

Toksyczność ostra (ang. Acute Toxicity)				
	Wskaźnik	Wartość	Czas ekspozycji	Organizm testowy
Droga pokarmowa	LD ₅₀	93,86 $\frac{mg}{kg}$ m. c.	-	szczur szczepu Sprague - Dawley
Droga skórna	-	-	-	-
Droga oddechowa	LC ₅₀	0,041 $\frac{mg}{L}$	4 h	szczur szczepu Sprague - Dawley
Toksyczność w stosunku do środowiska wodnego (ang. Aquatic Toxicity)				
Toksyczność dla ryb	LC ₅₀	0,021 $\frac{mg}{L}$	96 h	Danio rerio
Toksyczność dla dafnii i innych bezkręgowców wodnych	EC ₅₀	0,063 $\frac{mg}{L}$	48 h	Daphnia magna
Toksyczność dla dafnii i innych bezkręgowców wodnych	EC ₅₀	0,076 $\frac{mg}{L}$	24 h	Daphnia magna
Toksyczność dla alg	EC ₅₀	1,096 $\frac{mg}{L}$	72 h	Pseudokirchneriella subcapitata
Toksyczność dla alg	NOEC	0,02 $\frac{mg}{L}$	72 h	Pseudokirchneriella subcapitata
Toksyczność przewlekła dla ryb	NOEC	≥ 500 $\frac{mg}{L}$	36 dni	Danio rerio
Toksyczność przewlekła dla bezkręgowców wodnych	NOEC	≥ 500 $\frac{mg}{L}$	21 dni	Daphnia magna

LD₅₀ – (ang. lethal dose) dawka substancji po podaniu której można oczekiwać śmierci 50% narażonych organizmów

Wartości toksyczności ostrej dla uzyskanych preparatów (mieszanin) na bazie ClO₂, przedstawiono w Tabeli 36. Obliczeń dokonano dla najgorszego możliwego przypadku, a więc doskonałej stabilności produktów reakcji oraz całkowitego stopnia przereagowania substratów.

Dla narażenia drogą pokarmową oszacowane wartości ATE_{mix} były wyższe od 2000 $\frac{mg}{kg}$ m. c. Zatem preparaty te nie zostały zakwalifikowane do żadnej z kategorii toksyczności ostrej.

Dla narażenia drogą skórną jedynie dla produktu Armex 5 MD wyznaczono wartość ATE_{mix}. Ponieważ toksyczność ostra niektórych składników produktu była niższa od 2000 $\frac{mg}{kg}$ m. c.

sprawdzono metodą obliczeniową klasyfikację produktu. Wartość ATE_{mix} w sposób znaczący przekraczała $2000 \frac{mg}{kg} m.c$ i nie zaklasyfikowała produktu Armex 5 MD do żadnej z kategorii. Dla pozostałych produktów nie obliczano wartości ATE_{mix} , ponieważ toksyczność ostra poszczególnych składników była wyższa niż $2000 \frac{mg}{kg} m.c$.

W przypadku narażenia drogą oddechową preparaty Armex 5 foam, Armex 5 WC, Armex 5 vH zaklasyfikowano do kategorii 4 toksyczności ostrej. Armex 5 MD nie klasyfikuje się w żadnej z kategorii, gdyż wartość ATE_{mix} jest większa od $20,0 \frac{mg}{L}$.

Tabela 36. Wartości toksyczności ostrej ATE_{mix} dla uzyskanych preparatów na bazie ClO_2 .

Produkt	Droga narażenia		
	pokarmowa, $\frac{mg}{kg} m.c$.	skórna, $\frac{mg}{kg} m.c$.	oddechowa, $\frac{mg}{L}$
Armex 5 MD	251 785,97	1 164 835,60	110,53
Armex 5 foam	39 693,10	-	19,52
Armex 5 WC	44 695,24	-	19,49
Armex 5 vH	31 286,67	-	12,81
Armex 2000 ultraczysty	46 930,00	-	20,50

Żaden z otrzymanych produktów nie spełnia klasyfikacji w klasie toksyczności ostrej oraz przewlekłej w stosunku do środowiska wodnego. Otrzymane wartości klasyfikacji w obu kategoriach nie przekraczają granicznej wartości 25% (Tabela 37).

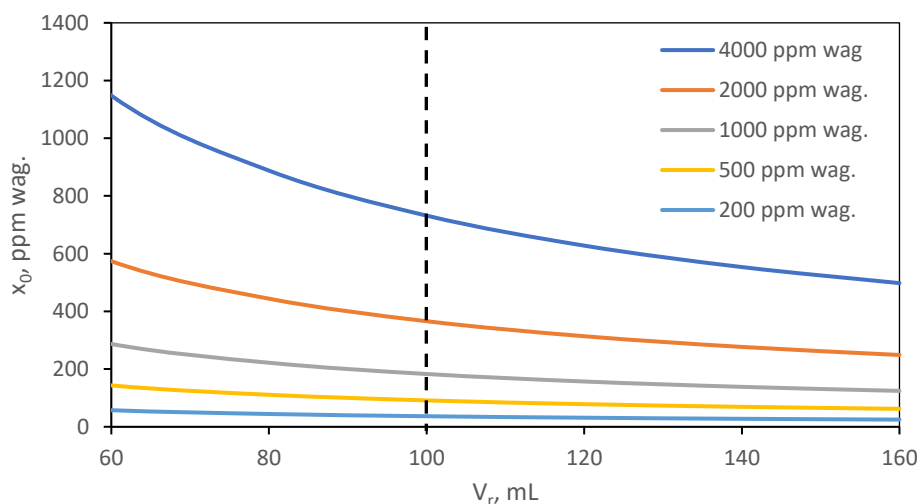
Tabela 37. Wartości procentowe klasyfikacji w kategorii toksyczności ostrej oraz przewlekłej dla środowiska wodnego dla uzyskanych preparatów na bazie ClO_2 .

Produkt	Kategoria ostra, %	Kategoria przewlekła, %			
	1	1	2	3	4
Armex 5 MD	0,37	-	0,005	0,085	0,040
Armex 5 foam	2,40	-	0,400	4,350	0,750
Armex 5 WC	2,10	-	0,100	1,000	0,100
Armex 5 vH	3,00	-	-	-	-
Armex 2000 ultraczysty	2,00	-	-	-	-

6.9. Dezynfekcja masek ochronnych

Badanie stężenia ClO_2

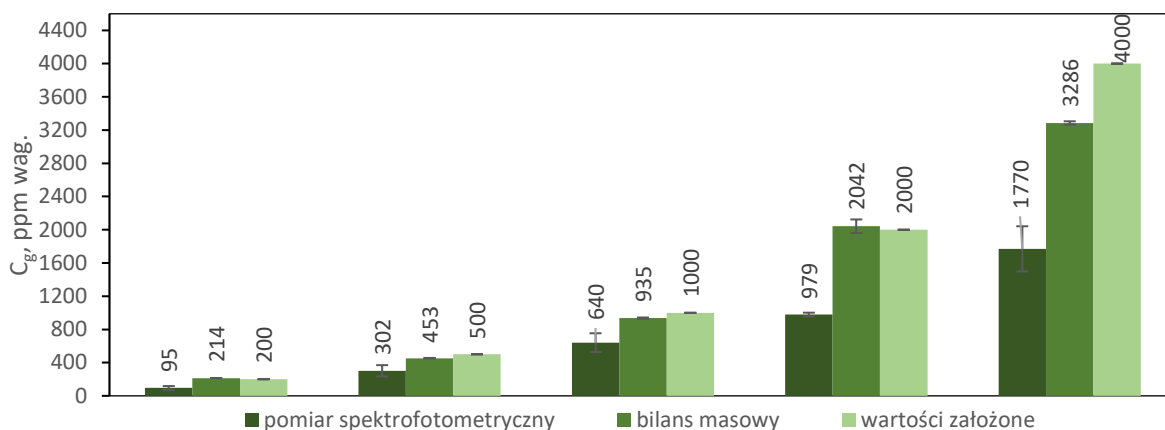
Na podstawie założonych stężeń gazowego ClO_2 y_i oraz obliczeń bilansu masowego w układzie badawczym do dezynfekcji masek ochronnych określono stężenie początkowe x_0 roztworu wprowadzanego do układu, przy stałej jego objętości $v_r = 100 \text{ mL}$ (Rysunek 47).



Rysunek 47. Wykres zależności stężenia początkowego roztworu od jego objętości oraz stężenia równowagowego ClO_2 w fazie gazowej $y_i = 200; 500; 1000; 2000$ oraz 4000 ppm wag. ClO_2 .

Oszacowanie drogą bilansu masowego stężenia gazowego ClO_2 w układzie badawczym, nie dało spodziewanych rezultatów w kontekście bezpośredniego pomiaru spektrofotometrycznego gazu. Metoda kalibracji opisana w pkt 6.4. polegająca na pomiarze spektrofotometrycznym fazy gazowej pozostającej w stanie bliskim równowagi z niewielką, znaną objętością roztworu ClO_2 w kuwecie pomiarowej, daje zadowalające wyniki. Jednak bezpośredni pomiar gazu w kuwecie, która umieszczona była w komorze badawczej, a następnie zabezpieczona korkiem i przeniesiona do spektrofotometru, obarczony jest bardzo dużym błędem (Rysunek 48). Uzyskane wartości są nawet o 50% mniejsze aniżeli założone teoretycznie bądź wyznaczone drogą bilansu masowego. Współczynnik zmienności CV sięgał 23%. Ze względu na to, że, jak dotąd, nie znaleziono lepszego rozwiązania w zakresie zbadania gazu w kuwecie pomiarowej, do wyznaczenia stężenia skutecznego dezynfekcji masek ochronnych wykorzystano bilans masowy.

Wartości stężeń gazowego ClO_2 wyznaczone na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego roztworu przed i po procesie dezynfekcji są zbliżone do wartości założonych teoretycznie. Stosunek stężeń uzyskanych z bilansu masowego i teoretycznych mieścił się w przedziale 0,82-1,07. Współczynniki zmienności CV dla pomiarów wyznaczonych drogą bilansu masowego nie przekroczyły 4% (Rysunek 48).



Rysunek 48. Porównanie wartości stężeń gazowego ClO₂ w komorze dekontaminacyjnej uzyskanych empirycznie i założonych teoretycznie.

Badania mikrobiologiczne

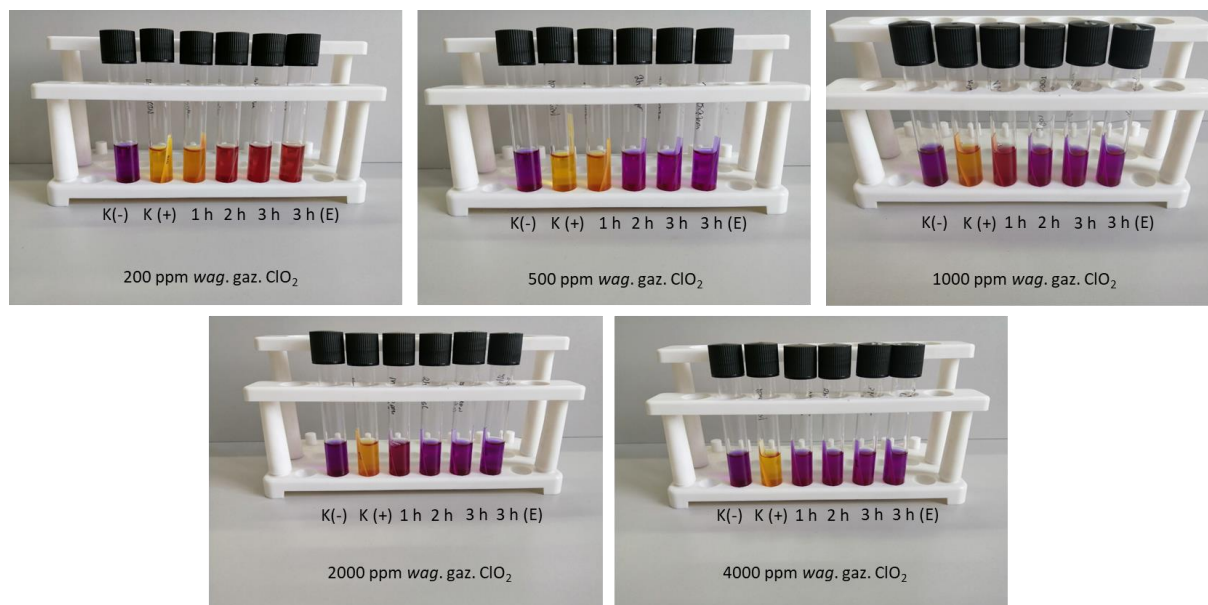
Wykazano skuteczność gazowego ClO₂ wobec spor *Bacillus atrophaeus* umieszczonych na paskach wskaźnikowych wewnątrz maseczki ochronnej. Skuteczny rezultat procesu dezynfekcji uzyskano dla stężenia ≥ 500 ppm wag. gazowego ClO₂ po 2 godzinach procesu. W przypadku stężenia 4000 ppm wag. ClO₂ skuteczność uzyskano już po 1 h procesu.

Stężenie 200 ppm wag. gazowego ClO₂ okazało się nieskuteczne w eliminacji spor *Bacillus atrophaeus*. W Tabeli 38 przedstawiono wyniki badań mikrobiologicznych dla poszczególnych stężeń i czasu prowadzenia procesu (w 3 powtórzeniach). Rysunek 49 przedstawia zmianę barwy pożywek po 7-dniowym czasie inkubacji dla pasków wskaźnikowych poddanych działaniu poszczególnym stężeniom gazu.

Tabela 38. Wyniki testów mikrobiologicznych dezynfekcji maseczek ochronnych prowadzonych na paskach wskaźnikowych.

Czas ekspozycji paska wskaźnikowego na gazowy ClO ₂	Stężenie gazowego ClO ₂ , ppm wag.				
	200	500	1000	2000	4000
Kontrola dodatnia	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)
Kontrola ujemna	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)
1 h (maseczka)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(-) (-) (+)	(-) (-) (-)
2 h (maseczka)	(+) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)
3 h (maseczka)	(+) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)
3 h (eksykator)	(+) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)

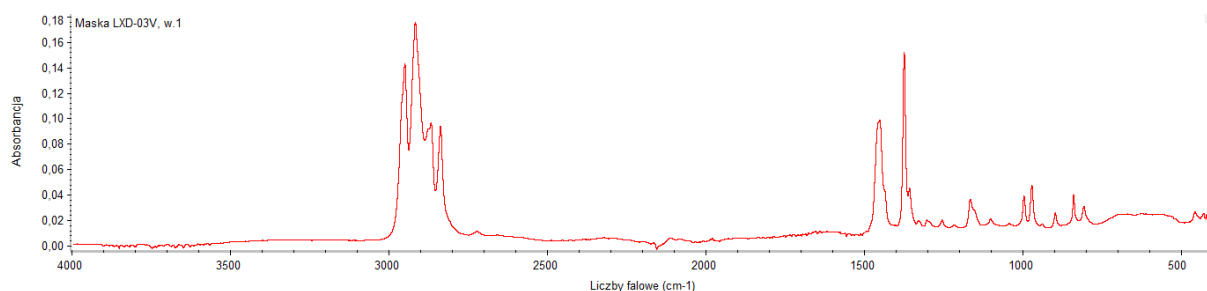
(+) – próbka pozytywna, wzrost mikroorganizmów, zmiana barwy pożywki i osad
 (-) – próbka negatywna, brak mikroorganizmów, niezmieniona barwa pożywki



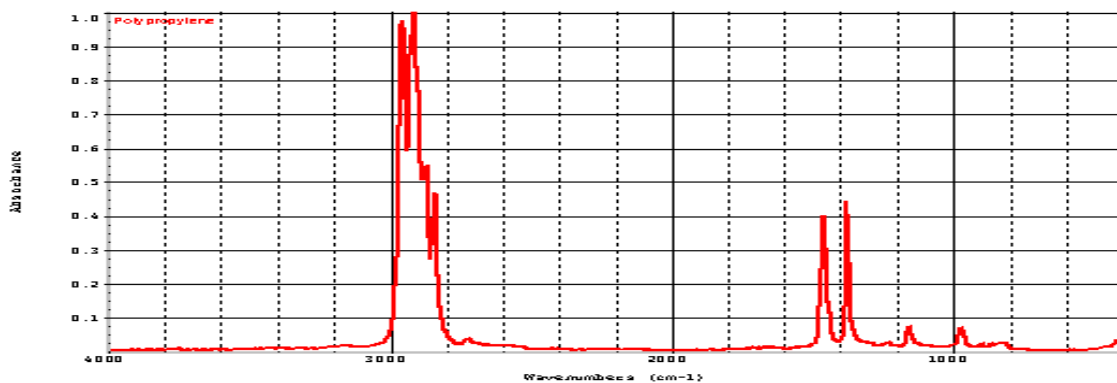
Rysunek 49. Obserwacja zmiany barwy pożywki w procesie dezynfekcji maseczek ochronnych dla stężenia 200-4000 ppm wag. ClO_2 w czasie. Oznaczenia: K(-) – kontrola ujemna, pożywka; K (+) – kontrola dodatnia, pasek wskaźnikowy nie poddany ekspozycji ClO_2 ; 1,2,3 h – paski upakowane w maseczkę i poddane ekspozycji gazu odpowiednio 1, 2 i 3 h; 3 h(E) – paski nieupakowane w maseczkę i poddane ekspozycji gazu przez 3h.

Badania odporności chemicznej maseczek na oddziaływanie gazowego ClO_2

Widma FTIR-ATR warstw maseczki nr 1, 3, 4 i 5 sporządzone z obu stron każdej warstwy, wykazują, iż wykonane są z identycznego materiału. Dla przykładu, na Rysunku 50 przedstawiono jedynie widmo warstwy nr 1 od strony zewnętrznej. Należy jednak zaznaczyć, że wszystkie otrzymane widma wykazują analogię z Rysunkiem 50 a tym samym dużą zgodność przebiegu pod względem liczb falowych oraz wartości transmitancji, odpowiadającym poszczególnym pasmom i pikom absorpcji. Porównanie uzyskanych widm z widmami odniesienia zawartymi w dostępnej bibliotece *Hummel Polymer Sample Library* wskazuje na zastosowanie tkaniny z włókna sztucznego, wykonanego z polipropylenu. Stopień dopasowania do widma odniesienia wynosi 89%. Uzyskane widmo porównano dodatkowo z widmem ze źródeł zewnętrznych (Rysunek 51) (Morent, et al., 2008; Nicodom IR Libraries, 2012). Wysoka zgodność zarejestrowanych widm z dostępnymi widmami referencyjnymi pozwala przyjąć, iż zastosowanym materiałem warstw 1, 3, 4, oraz 5 maseczki ochronnej jest tkanina z włókna polipropylenowego.

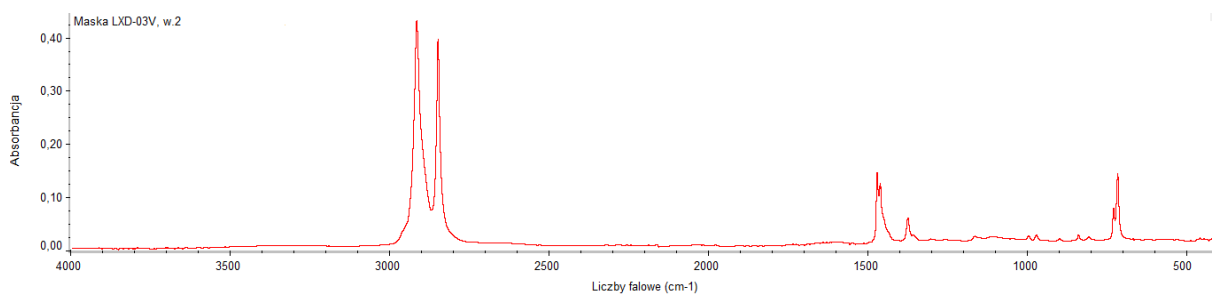


Rysunek 50. Widmo FTIR-ATR warstwy nr 1 maseczki ochronnej od strony zewnętrznej.

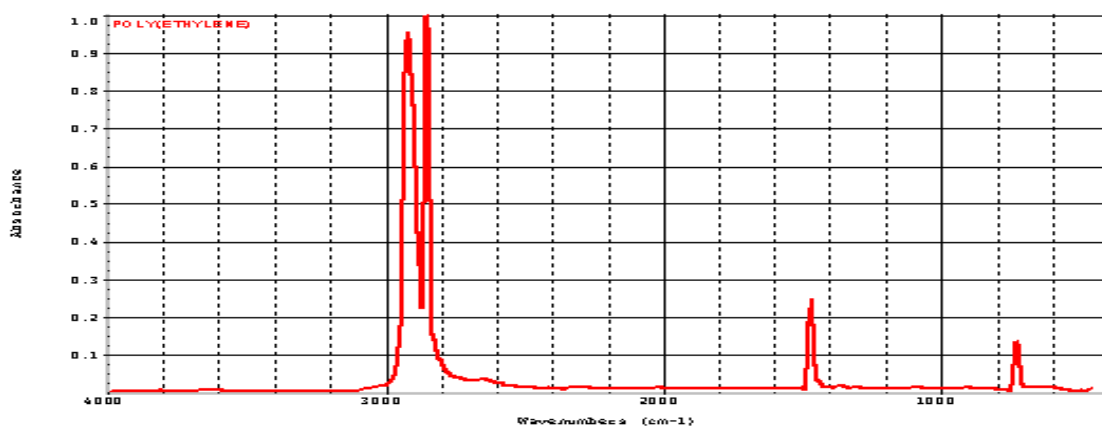


Rysunek 51. Widmo referencyjne polipropylenu (Nicodom IR Libraries, 2012).

Warstwa nr 2 maseczki stanowczo różniła się od pozostałych, co potwierdziła również analiza widma FTIR-ATR (Rysunek 52). Dostępna biblioteka *Hummel Polymer Sample Library* wskazuje na zastosowanie tworzywa polietylenowego. Z uwagi na stosunkowo niski stopień zgodności porównania widm (70%), uzyskane widmo poddano interpretacji, opierając się na wiedzy z zakresu spektroskopii oraz doniesieniach literaturowych dotyczących badań spektroskopowych polietylenu (Rysunek 53) (Gulmine, et al., 2002; Silverstein, et al., 2005; Nicodom IR Libraries, 2012).



Rysunek 52. Widmo FTIR-ATR warstwy nr 2 maseczki ochronnej od strony zewnętrznej.



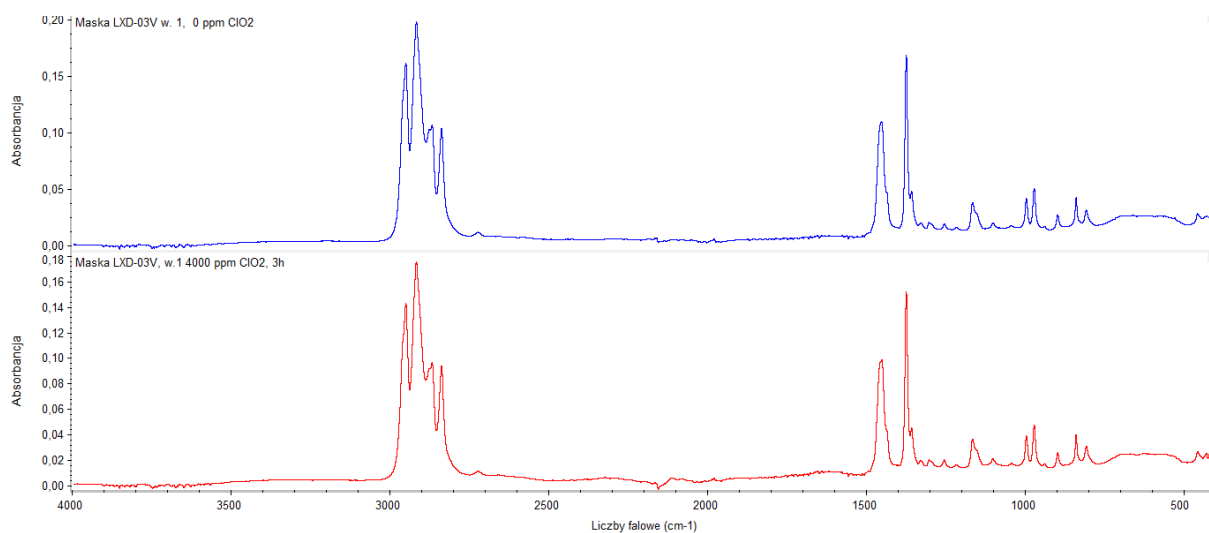
Rysunek 53. Widmo referencyjne polietylenu (Nicodom IR Libraries, 2012).

W Tabeli 39 przedstawiono opis interpretacyjny podstawowych sygnałów FTIR widm zaprezentowanych na Rysunkach 50 i 52.

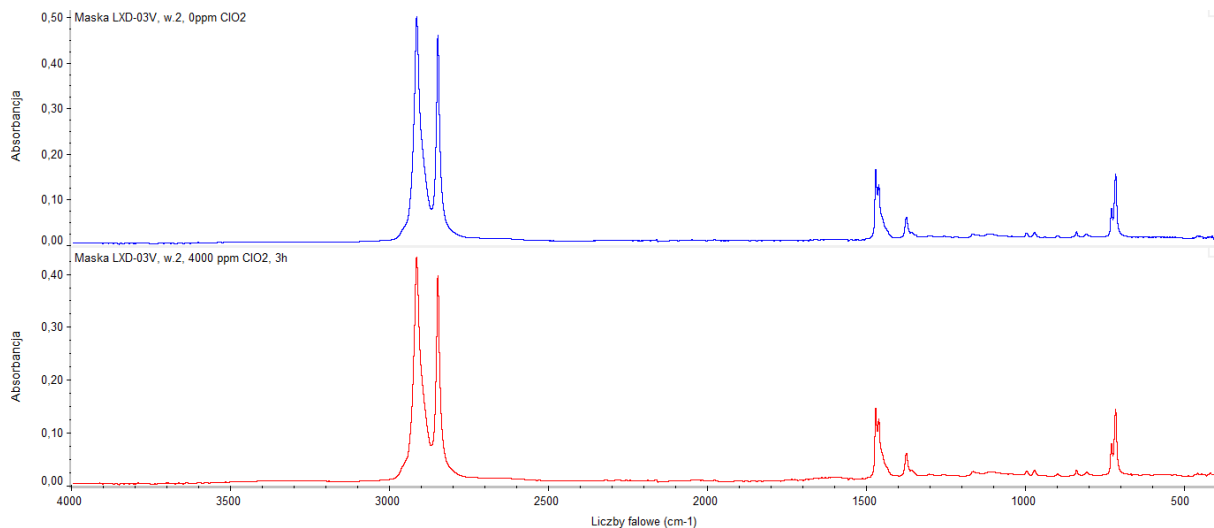
Tabela 39. Opis podstawowych sygnałów IR widm przedstawionych na Rysunkach 50 i 52.

Liczba falowa, cm^{-1}	Opis
Polipropylen (1, 3, 4, 5 warstwa maseczki)	
2949 i 2866	drgania rozciągające asymetryczne i symetryczne CH_3
2916 i 2836	drgania rozciągające asymetryczne i symetryczne CH_2
1453	drgania zginające asymetryczne CH_3
1375	drgania zginające symetryczne CH_3
1159	drgania deformacyjne wahadłowe (C – H) i kołyszące CH_3
988	drgania deformacyjne kołyszące CH_3
Polietylen (2 warstwa maseczki)	
2913	drgania rozciągające asymetryczne CH_2
2847	drgania rozciągające symetryczne CH_2
1471 i 1463	drgania zginające asymetryczne CH_2 i nożycowe CH_2
1377	drgania deformacyjne wahadłowe CH_2
731-720	drgania deformacyjne kołyszące CH_2

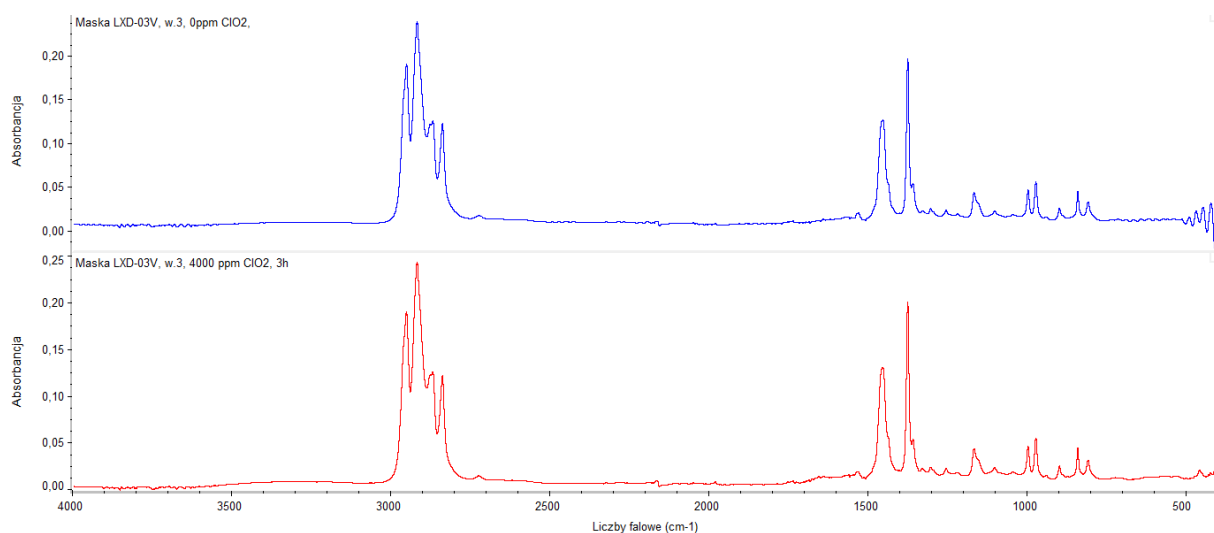
Na Rysunkach 54-58 przedstawiono widma FTIR-ATR próbek poszczególnych warstw materiału maseczek ochronnych poddanych działaniu gazowego ClO_2 w stężeniu 4000 ppm wag. w czasie 3 h. Wyniki porównano z widmami tkanin nie poddanych działaniu ClO_2 .



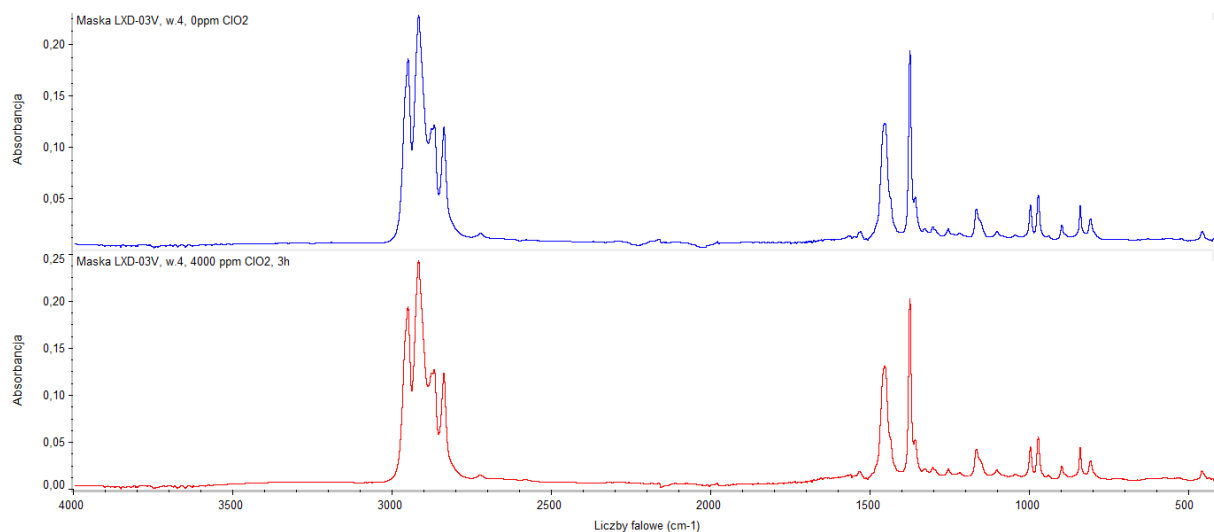
Rysunek 54. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 1 maseczki ochronnej:
 ----- tkanina nie poddawana działaniu ClO_2 , ----- 4000 ppm wag. ClO_2 , 3 h.



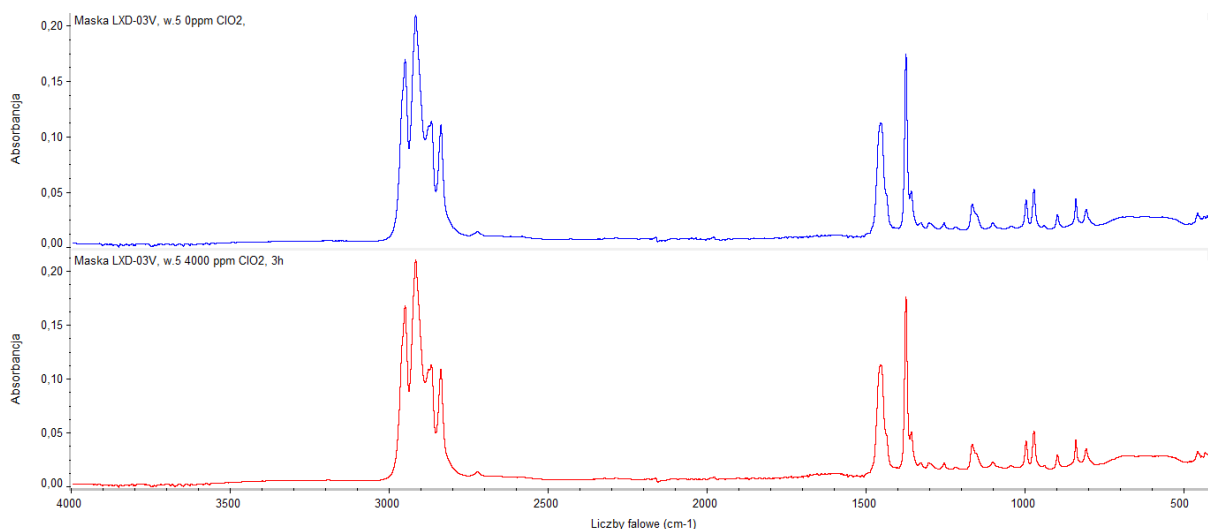
Rysunek 55. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 2 maseczki ochronnej:
 ---- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, - - - - 4000 ppm wag. ClO₂, 3 h.



Rysunek 56. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 3 maseczki ochronnej:
 ---- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, - - - - 4000 ppm wag. ClO₂, 3 h.



Rysunek 57. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 4 maseczki ochronnej:
 ---- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, - - - - 4000 ppm wag. ClO₂, 3 h.



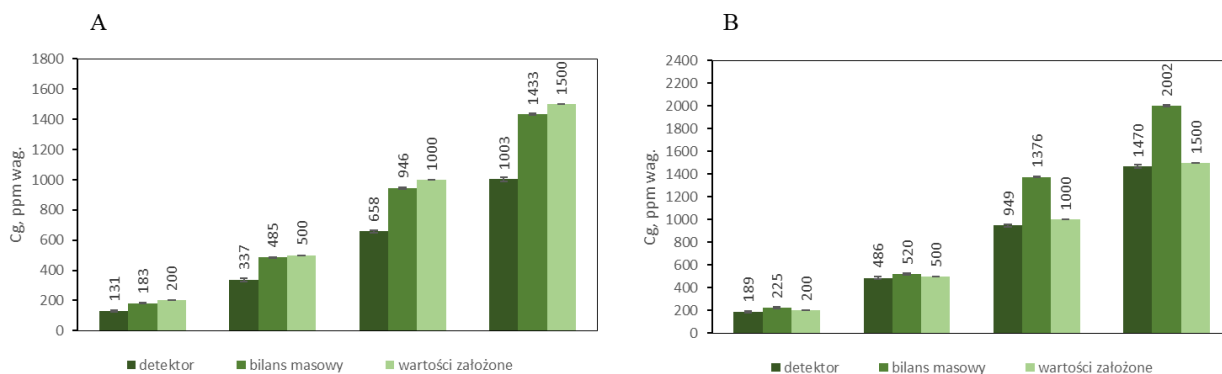
Rysunek 58. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 5 maseczki ochronnej: ----- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, ---
 ----4000 ppm wag. ClO₂, 3 h

Widma materiałów poszczególnych warstw maseczek: polipropylenowych (nr 1, 3, 4, 5) oraz polietylenowej (nr 2) poddanych działaniu atmosfery gazowego ClO₂ nie wykazują istotnych różnic względem widm tkanin nie poddanych działaniu ClO₂. Położenie oraz intensywność zidentyfikowanych pasm absorpcji, odpowiadających drganiom wiązań występujących w reaktywnych grupach funkcyjnych cząstek polimerów nie uległo zmianie. Powyższa obserwacja wskazuje na brak istotnych zmian struktury chemicznej badanych tkanin pod wpływem gazowego ClO₂ w zakresie czułości metody FTIR-ATR.

6.10. Dezynfekcja fartuchów rentgenowskich

Badanie stężenia ClO_2

W przypadku dezynfekcji fartuchów RTG, szacowanie stężenia ClO_2 w komorze dekontaminacyjnej na podstawie bilansu masowego nie dało spodziewanych wyników w odczytach detektora PortaSens III. W przeciwieństwie do oznaczeń wykonanych w pustej komorze (wg pkt. 6.5.), w obecności fartucha RTG wskazania detektora były o około 30% mniejsze. Wiązało się to najprawdopodobniej z sorpcją ClO_2 przez fartuch. W celu uzyskania wymaganych stężeń ClO_2 w komorze, zwiększono o 30% objętości zastosowanych roztworów. Dodatkowo, dla przypadku gdy obserwowano spadek stężenia ClO_2 w czasie, uruchamiano pompę komory na 1 min w celu desorpcji dodatkowej ilości ClO_2 z fazy ciekłej do fazy gazowej. Taka sytuacja miała miejsce jedynie w podczas dezynfekcji prowadzonej w stężeniu 1500 ppm wag. ClO_2 . W pozostałych przypadkach, pompę uruchamiano jedynie na początku procesu. Uśrednione wartości wskazań detektora w czasie były wówczas porównywalne do wartości założonych teoretycznie (Rysunek 59).



Rysunek 59. Porównanie wartości stężeń gazowego ClO_2 w komorze dekontaminacyjnej uzyskanych empirycznie i założonych teoretycznie. A – zastosowanie objętości roztworu obliczonej na podstawie bilansu masowego; B – zastosowanie objętości roztworu z uwzględnieniem 30% nadmiaru.

Badania mikrobiologiczne

W Tabeli 40 przedstawiono wyniki badań mikrobiologicznych dla poszczególnych stężeń ClO_2 (badania wykonano w 3 powtórzeniach). Skuteczny rezultat procesu dezynfekcji fartuchów RTG uzyskano dla stężeń ≥ 1000 ppm wag. gazowego ClO_2 w czasie 4 h. Stężenie 200 ppm wag. okazało się nieskuteczne aby wyeliminować spory *Bacillus atrophaeus* umieszczone na paskach wskaźnikowych w ilości 10^6 spor/pasek. Nie uzyskano zatem wymaganego stopnia redukcji log 6 badanych mikroorganizmów. Kluczową rolę odgrywa również czas prowadzenia procesu dezynfekcji. Dla stężenia 1500 ppm wag. gazowego ClO_2 w komorze i czasie kontaktu 2 h nie uzyskano wymaganej redukcji spor. W dwóch z trzech próbek w stężeniu 500 ppm wag. dla pasków wskaźnikowych umieszczonych po wewnętrznej lewej stronie fartucha, również nie uzyskano wymaganej skuteczności. Wzrost mikroorganizmów mógł być wynikiem przylegania do siebie poszczególnych warstw fartucha co zakłóciło prawidłową penetrację ClO_2 . Na Rysunku 60

przedstawiono zmiany barwy pożywek po 7-dniowym czasie inkubacji, dla pasków wskaźnikowych poddanych działaniu poszczególnych stężeń gazu.

Tabela 40. Wyniki testów mikrobiologicznych dezynfekcji fartuchów RTG prowadzonych na paskach wskaźnikowych.

Umieszczenie paska wskaźnikowego na fartuchu RTG	Stężenie gazowego ClO ₂ , ppm wag.				
	200 (4 h)	500 (4 h)	1000 (4 h)	1500 (4 h)	1500 (2 h)
Kontrola dodatnia	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)	(+) (+) (+)
Kontrola ujemna	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)
Zewnętrzna strona fartucha	(+) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(+) (+) (+)
Wewnętrzna prawa strona fartucha	(+) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(+) (+) (+)
Wewnętrzna lewa strona fartucha	(+) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(+) (+) (+)

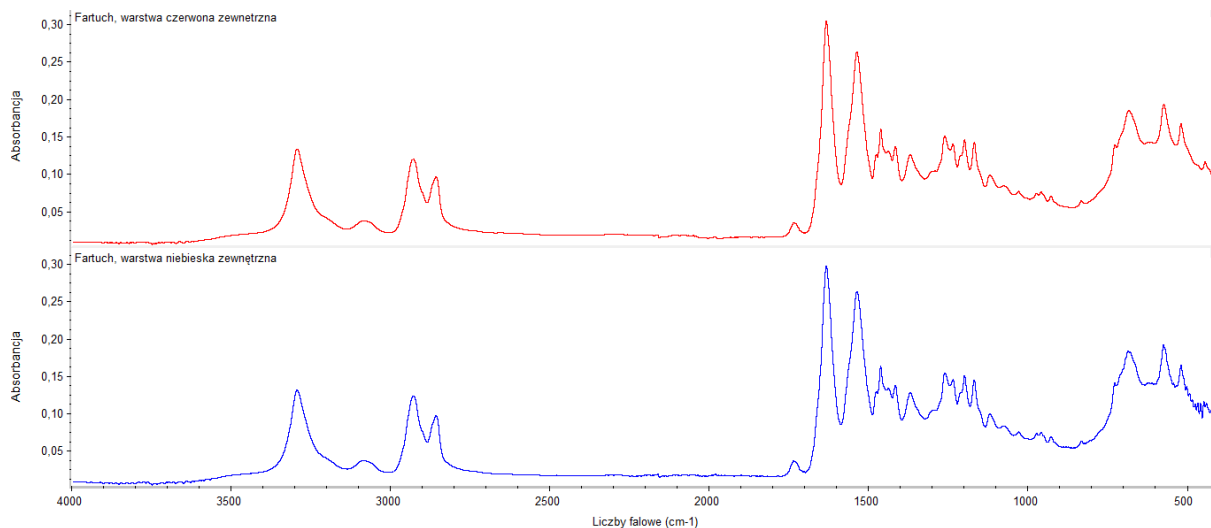
(+) – próbka pozytywna, wzrost mikroorganizmów, zmiana barwy pożywki i osad
 (-) – próbka negatywna, brak mikroorganizmów, niezmieniona barwa pożywki



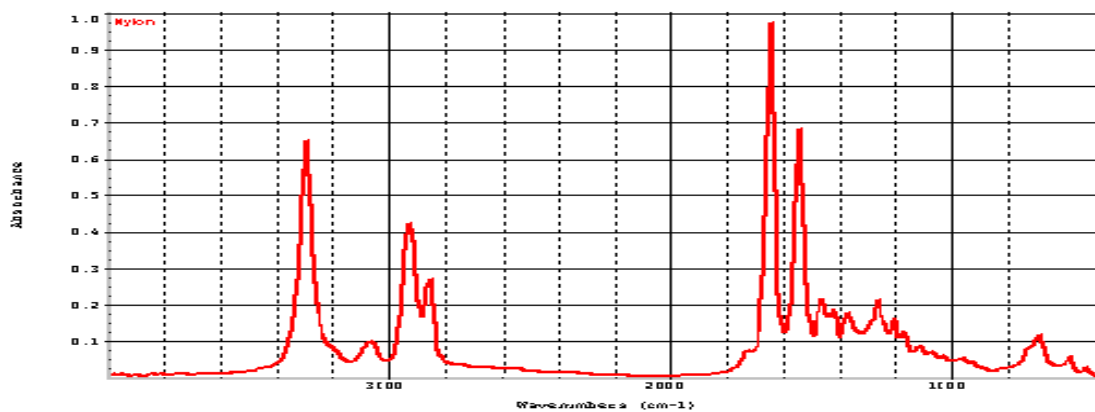
Rysunek 60. . Obserwacja zmiany barwy pożywki w procesie dezynfekcji fartuchów RTG dla stężeń 200 – 1000 ppm wag. ClO₂. Oznaczenia: K(-) – kontrola ujemna, pożywka; K (+) – kontrola dodatnia, wskaźnik nie poddany ekspozycji ClO₂; SZ – wskaźniki umieszczone na z zewnętrznej stronie fartucha; SWP – wskaźniki umieszczone na wewnętrznej prawej stronie fartucha; SWL – wskaźniki umieszczone na wewnętrznej lewej stronie fartucha.

Badanie odporności chemicznej materiału fartuchów na oddziaływanie gazowego ClO₂

Na Rysunku 61 przedstawiono widma FTIR-ATR próbek zewnętrznej warstwy materiału fartucha RTG (czerwony i niebieski). Oba widma wykazują dużą zgodność przebiegu, pod względem liczb falowych oraz wartości transmitancji odpowiadających poszczególnym pasmom i pikom absorpcji. Porównanie uzyskanych widm z widmami odniesienia zawartymi w dostępnej bibliotece *Hummel Polymer Sample Library* wskazuje na zastosowanie tkaniny z włókna sztucznego, wykonanego z polimeru POLIAMID 6. Z uwagi na stosunkowo niski (65%) stopień dopasowania do widma odniesienia znajdującego się w bazie biblioteczej, uzyskane widma porównano także z widmem Poliamidu 6, pozyskanego ze źródeł zewnętrznych (Rysunek 62). (Nicodom IR Libraries, 2012; Institute of Chemistry University of Tartu, 2023). W tym przypadku potwierdzono podobieństwo widm.

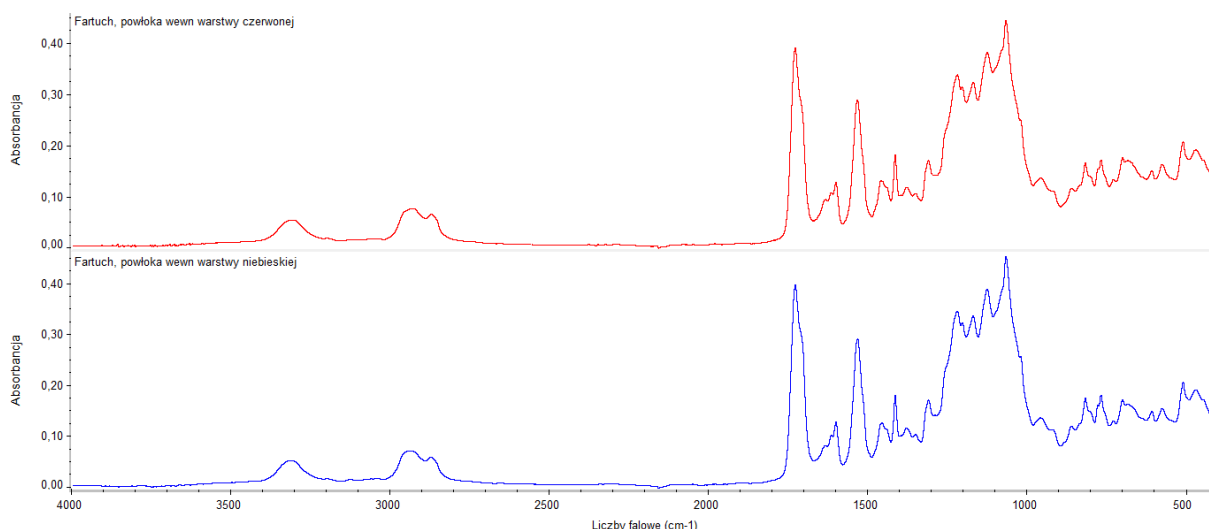


Rysunek 61. Widma FTIR-ATR zewnętrznej warstwy tkaninowej materiału badanego fartucha.
 ----- tkanina czerwona. ----- tkanina niebieska.



Rysunek 62. Widmo referencyjne Poliamidu 6 (Nicodom IR Libraries, 2012).

Zewnętrzna warstwa badanego materiału wykazywała cechy powlekania innym materiałem od strony wewnętrznej. Przeprowadzono pomiar widma FTIR-ATR powlekanej powierzchni. Uzyskane widma FTIR przedstawiono na Rysunku 63.



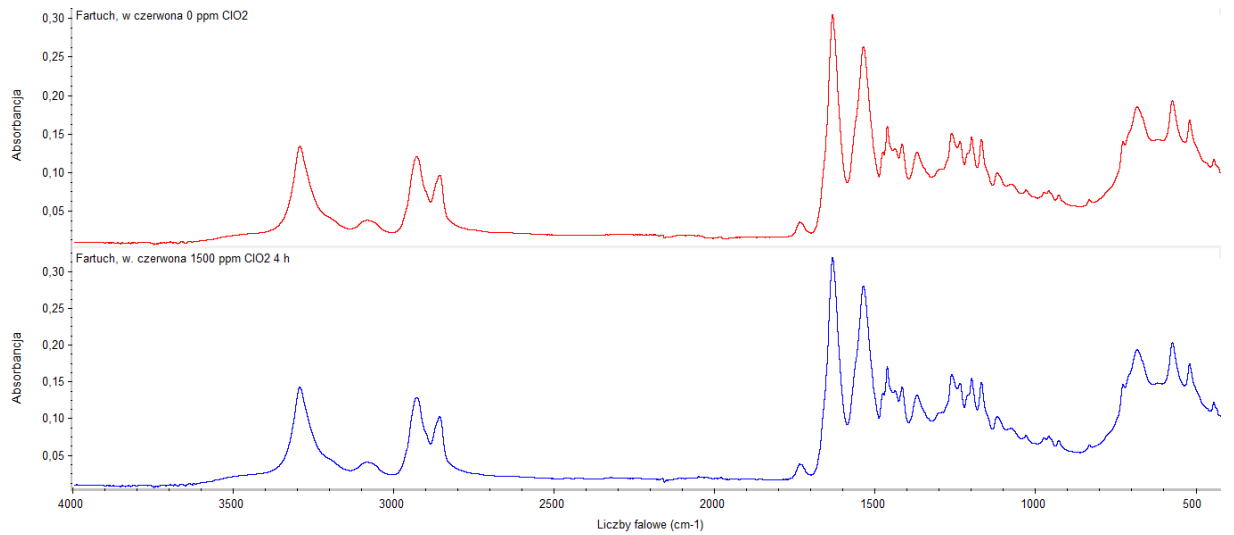
Rysunek 63. Widma FTIR-ATR materiału powłoki naniesionej na tkaninę czerwoną i niebieską od strony wewnętrznej. ----- tkanina czerwona. ----- tkanina niebieska.

Oba widma FTIR powłoki wykazują wysoką zgodność pod względem liczb falowych oraz wartości transmitancji odpowiadających poszczególnym pasmom absorpcji. Porównanie uzyskanych widm z widmami odniesienia zawartymi w dostępnej bibliotece wskazuje na zastosowanie tworzywa poliuretanowego. Z uwagi na stosunkowo niski stopień zgodności porównania widm (69%), uzyskane widma poddano interpretacji, opierając się na wiedzy z zakresu spektroskopii IR (Silverstein, et al., 2005; Pavia, et al., 2008) oraz doniesieniach literaturowych dotyczących badań spektroskopowych tworzyw poliuretanowych (Chen, et al., 2004; Salmah, et al., 2015). W Tabeli 41 przedstawiono opis interpretacyjny podstawowych sygnałów FTIR widm zaprezentowanych na Rysunkach 61 i 63.

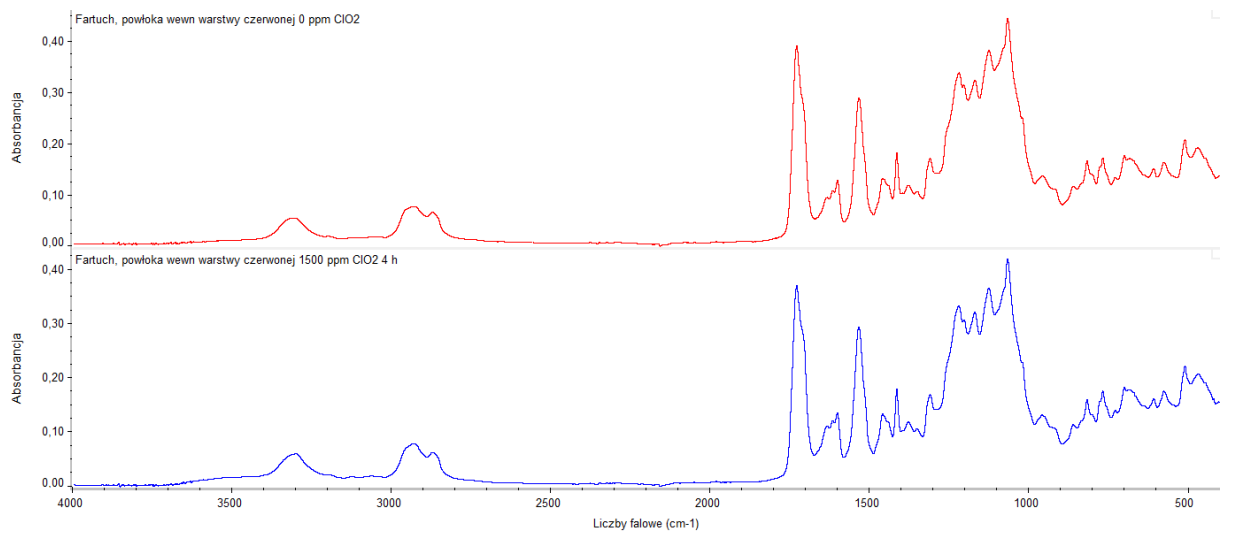
Tabela 41. Opis podstawowych sygnałów IR widm przedstawionych na Rysunkach 61 i 65.

Liczba falowa, cm ⁻¹	Opis
Poliamid 6 (Nylon)	
3291	drgania rozciągające (N – H)
2928	drgania rozciągające asymetryczne CH ₂
1632	drgania rozciągające I pasma amidowego (C=O)
1536	drgania rozciągające II pasma amidowego (N – H)
1461	drgania deformacyjne (N – H)
1217, 1124, 1066	drgania rozciągające wiązań eterowych (C – O – C)
573	drgania deformacyjne (C – C)
Poliuretan	
3338	drgania rozciągające (N – H)
2907 i 2860	drgania rozciągające asymetryczne i symetryczne CH ₂
1727	drgania rozciągające I pasma amidowego (C=O)
1532	drgania rozciągające II pasma amidowego (N – H)
1066	drgania rozciągające wiązań eterowych (C – O – C)

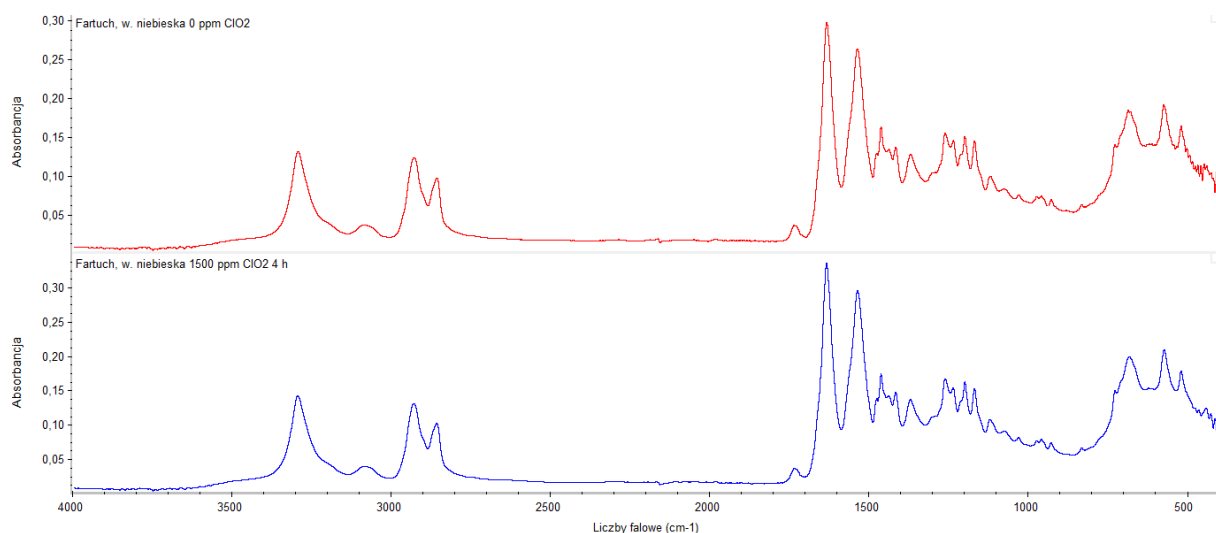
Na Rysunkach 64-67 przedstawiono widma FTIR próbek materiału fartucha RTG poddanych działaniu gazowego ClO₂ w stężeniu 1500 ppm wag. w czasie 4 h. Wyniki porównano z widmami tkanin niepoddanych działaniu ClO₂.



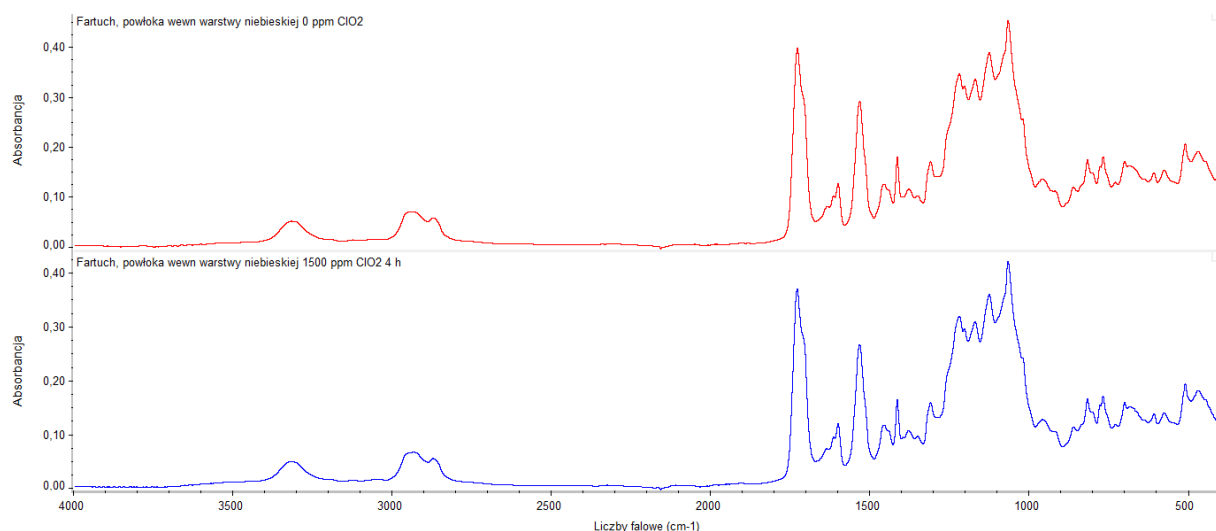
Rysunek 64. Zestawienie widm FTIR czerwonej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:
 ----- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, ----- 1500 ppm wag. ClO₂, 4 h.



Rysunek 65. Zestawienie widm FTIR poliuretanowej powłoki czerwonej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:
 ----- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, ----- 1500 ppm wag. ClO₂, 4 h.



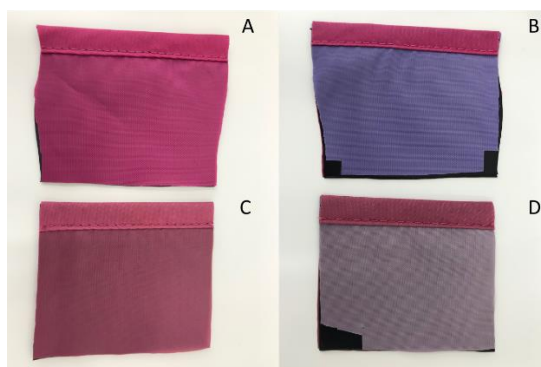
Rysunek 66. Zestawienie widm FTIR niebieskiej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:
 --- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, --- 1500 ppm wag. ClO₂, 4 h.



Rysunek 67. Zestawienie widm FTIR poliuretanowej powłoki niebieskiej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:
 --- tkanina nie poddawana działaniu ClO₂, --- 1500 ppm wag. ClO₂, 4 h.

Widma materiałów warstwy tkaninowej, jak również powłoki poliuretanowej fartucha RTG poddanego działaniu atmosfery gazowego ClO₂ nie wykazują istotnych różnic względem widm tkanin nie poddanych działaniu ClO₂. Położenie oraz intensywność zidentyfikowanych pasm absorpcji, odpowiadających drganiom wiązań występujących w reaktywnych grupach funkcyjnych cząstek polimerów (ugrupowania karbonylowe, amidowe) nie uległo zmianie. Powyższa obserwacja wskazuje na brak istotnych zmian struktury chemicznej badanych tkanin pod wpływem gazowego ClO₂ w zakresie czułości metody FTIR-ATR.

Zaobserwowano jednak wyraźną zmianę w barwie fartuch RTG pod wpływem ekspozycji na gazowy ClO₂ (Rysunek 68).



Rysunek 68. Zmiana barwy tkaniny fartucha RTG pod wpływem ekspozycji na gazowy ClO_2 (1500 ppm, 4 h). Oznaczenia: A, B – barwa fartucha przed procesem dezynfekcji; C, D – barwa fartucha po procesie dezynfekcji.

7. Dyskusja wyników

Unikalne właściwości ditlenku chloru, a w szczególności jego silne cechy utleniające sprawiają, że omawiany związek chemiczny jest szeroko stosowany w różnych gałęziach przemysłu, począwszy od produkcji papieru przez przemysł naftowy, do mycia i konserwowania owoców i warzyw. Jednym z podstawowych zastosowań jest dezynfekcja, w szczególności wody pitnej.

W związku z narastającymi problemami oporności mikroorganizmów na stosowane środki myjące i dezynfekujące, obserwuje się tendencję wzrastającą zakażeń. Powoduje to konieczność opracowywania nowych i zarazem skutecznych technologii dezynfekcji. O ile właściwości dezynfekujące ClO_2 znane są już od wielu lat, o tyle połączenie właściwości myjących i dezynfekujących w preparatach na bazie ClO_2 jest zagadnieniem znacznie trudniejszym i nie do końca poznanym. Oznaczanie ClO_2 w układach zawierających komponenty organiczne, jak również stabilność analitu w tych układach czy kinetyka aktywacji to tylko niektóre aspekty związane z projektowaniem nowych preparatów. Dodatkowo ważne jest aby produkty wykazywały skuteczność biobójczą w stosunku do najbardziej opornych czynników chorobotwórczych, w tym spor i wirusów bezotoczkowych i jednocześnie były przyjazne dla środowiska naturalnego.

7.1. Oznaczanie zawartości ClO_2

Zawartość ClO_2 w podstawowym roztworze wzorcowym ClO_2 oznaczona metodą woltamperometryczną wyniosła około **1502 ± 24,4 ppm wag** i odpowiadała wartości obliczonej stechiometrycznie. Uzyskane stopnie odzysku ClO_2 w obecności komponentów organicznych wykluczyły metodę woltamperometryczną w oznaczaniu analitu. Obecność w układzie surfaktantów w postaci m.in. alkoholi, amin czy betain prowadzi do powstawania dodatkowych układów redoks, które w znaczący sposób mogą utrudnić oznaczanie ClO_2 . Mechanizmy reakcji ClO_2 z różnymi związkami organicznymi (aminami, alkenami, aminokwasami, tiolami) opisano w (Rosenblatt, et al., 1967; Choshen, et al., 1986; Tan, et al., 1987; Yakupov, et al., 2001; Chruściel, et al., 2019). Końcowe stężenie ClO_2 w obecności komponentów organicznych nie może być zatem

dokładnie określone poprzez bilans stechiometryczny reakcji otrzymywania i jest trudne do oszacowania na podstawie przebiegu tej reakcji. Dodatkowo, obecność jonów miedzi i manganu, które mogą pojawić się w układzie jako zanieczyszczenia komponentów organicznych, w pH <4 mogą reagować z jonami jodkowymi. Następstwem powyższego mogą być zakłócenia w oznaczaniu stężenia jonów ClO_2^- , czyli pośrednio również ClO_2 (Gordon, 1983; Aieta, et al., 1984).

Przeprowadzona charakterystyka kalibracyjna ClO_2 w roztworze pozwoliła określić molowy współczynnik absorpcji. Jego wartość przy długości fali $\lambda_{max} = 358,5 \text{ nm}$ wyniosła $\epsilon = 1288 \pm 16,9 \frac{L}{mol \cdot cm}$. Otrzymany wynik znajduje swoje potwierdzenie w danych literaturowych.

Wg publikacji Gauw'a i wsp. molowy współczynnik absorpcji wynosi $\epsilon = 1255 \frac{L}{mol \cdot cm}$ przy $\lambda_{max} = 360,0 \text{ nm}$,

wg Kieffer'a i wsp.: $\epsilon = 1242 \frac{L}{mol \cdot cm}$ przy $\lambda_{max} = 360,0 \text{ nm}$ oraz $\epsilon = 1250 \frac{L}{mol \cdot cm}$ przy $\lambda_{max} = 358,5 \text{ nm}$,

natomiast wg Chen'a $\epsilon = 1260 \pm 30 \frac{L}{mol \cdot cm}$ (Chen, 1967; Kieffer & Gordon, 1968; Gauw, et al., 1999).

Sporządzone widma UV-VIS wybranych komponentów organicznych, potencjalnie wchodzących w skład preparatów myjąco-dezynfekujących, nie wykazały interferencji w maksimum absorbancji dla ClO_2 . Związki powierzchniowo czynne takie jak tlenki amin, betainy, alkohole, alkohole etoksyloowane itp. posiadają grupy chromoforowe, których sygnały absorpcji rejestrowane są przy długościach fal mniejszych niż 300 nm (Workman, 2000; Wuelfing, et al., 2006).

Oznaczanie zawartości ClO_2 wg metody woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej wykonano w roztworze ClO_2 z całkowicie przereagowanym $NaClO_2$. Dodatek do roztworu ClO_2 komponentów organicznych w postaci surfaktantów czy przyspieszaczy aktywacji wykluczył metodę woltamperometryczną w oznaczaniu docelowych produktów myjąco – dezynfekujących. Metoda spektrofotometryczna przez pomiar bezpośredni, ze względu na brak interferencji ze strony komponentów organicznych mogła być zastosowana w oznaczaniu zawartości ClO_2 w docelowych produktach myjąco – dezynfekujących. Jednakże, z racji niemożności pozyskania wzorca aktywnego ClO_2 niezbędna była bezwzględna metoda odniesienia, pozwalająca na stworzenie krzywej kalibracyjnej w pomiarach spektrofotometrycznych. Do tego celu posłużyła wspomniana metoda woltamperometryczna, która z dużą dokładnością pozwoliła oznaczyć zawartość ClO_2 . Potwierdzeniem jest wyznaczony molowy współczynnik absorpcji, który pokrywał się z danymi literaturowymi. Zatem, połączenie technik woltamperometrycznej i spektrofotometrycznej przez pomiar bezpośredni widma UV-VIS, pozwolił na oznaczenie zawartości ClO_2 w układach zawierających komponenty organiczne. Należy nadmienić, iż w literaturze szeroko opisywane są metody oznaczania zawartości ClO_2 , jednak służą one najczęściej do oznaczania analitu w wodzie.

Opracowano prosty sposób kalibracji oraz oznaczania gazowego ClO₂ w powietrzu metodą spektrofotometryczną. Sugerowana metoda polega na pomiarze absorbancji fazy gazowej pozostającej w stanie bliskim równowagowo z niewielką, znaną objętością roztworu ClO₂ znajdującego się w kuwecie poza wiązką pomiarową oraz pomiarze spektrofotometrycznym *in situ* roztworu przed i po desorpcji równowagowej. Sugerowany sposób postępowania stworzył możliwość bilansowego oznaczenia zdesorbowanego ClO₂ a tym samym wyznaczenia krzywej kalibracyjnej.

Charakterystyczną cechą widma ClO₂, bardziej widoczną w widmach w stanie gazowym, nieco mniej w roztworach, jest jego oscylacyjna struktura, uwidoczniona poprzez serie lokalnych maksimów absorpcji (widoczne zygzaki). Obserwowane pasmo absorpcji związane jest z przejściem elektronów walencyjnych cząsteczki ClO₂ ze stanu podstawowego \tilde{X}^2B_1 do stanu wzbudzonego \tilde{A}^2A_2 (Richard & Vaida, 1991; Esposito, et al., 1999; Sun, et al., 2005). Uzasadnienie powstawania struktury oscylacyjnej widma UV gazowego ClO₂ umożliwiły obliczenia prowadzone z wykorzystaniem modelu powierzchni energii potencjalnej. Przejścia wibroniczne w obserwowanym paśmie absorpcyjnym powiązane z drganiami wiązań w trójatomowej cząsteczce ClO₂. Duże piki absorpcji powstają w efekcie wzbudzeń wibronicznych poziomów energii drgań rozciągających symetrycznych. Obecność sygnałów o mniejszej intensywności, widocznych w obszarze niższych energii wzbudzenia, uzasadniona jest sprzężeniem symetrycznych drgań rozciągających z drganiami zginającymi oraz drgań rozciągających symetrycznych z drganiami rozciągającymi asymetrycznymi.

Wyznaczony molowy współczynnik absorpcji dla gazowego ClO₂ przy $\lambda_{max} 351 \text{ nm}$ wyniósł $\epsilon_g = 2430 \pm 140 \frac{L}{mol \cdot cm}$ oraz $\epsilon_g = 2520 \pm 210 \frac{L}{mol \cdot cm}$ w kuwecie pomiarowej o drodze optycznej $l = 1 \text{ cm}$ i czasie ustalenia równowagi odpowiednio $t = 10$ i 15 min oraz $\epsilon_g 2500 \pm 480 \frac{L}{mol \cdot cm}$ w kuwecie pomiarowej cylindrycznej o drodze optycznej $l = 10 \text{ cm}$ i czasie ustalenia równowagi $t = 15 \text{ min}$. Znaczna różnica pomiędzy uzyskanymi wartościami dla 10 i 15 min, może być wynikiem zbyt krótkiego czasu przeznaczanego dla ustalenia równowagi dla pierwszego przypadku. Zwiększenie drogi optycznej pozwoliło na podwyższenie czułości metody a tym samym zakresu oznaczalności. Pomiar w kuwecie o $l = 1 \text{ cm}$ pozwolił na oznaczenie zawartości ClO₂ powyżej 1000 ppm *wag.*, pomiar w kuwecie o $l = 10 \text{ cm}$ pozwolił na 10-krotne zwiększenie czułości metody.

Proponowana metoda spektrofotometryczna oznaczania gazowego ClO₂ nie została jak dotąd opisana w literaturze naukowej. Trudno tu zatem o bezpośrednie porównanie wartości z danymi literaturowymi. Dlatego też w celu odniesienia wyznaczonych wartości do danych literaturowych dokonano konwersji wartości molowego współczynnika absorpcji do wartości powierzchni przekroju czynnego cząsteczki ClO₂ na absorpcję promieniowania.

Obserwowane różnice pomiędzy wartościami przekrojów czynnych mogą wynikać ze sposobu generowania oraz pomiaru ditlenku chloru poddawanego badaniu spektrofotometrycznemu. W pracach (Wahner, et al., 1987; Kromminga, et al., 2003; Arango, et al., 2014), ale również (Derby, et al., 1953; Birks, et al., 1977) wykorzystano sposób wytwarzania ClO₂ polegający na utlenianiu NaClO₃ gazowym chlorem. W aparaturze badawczej w publikacjach Wahner'a i in. oraz Kromminga i in. (Wahner, et al., 1987; Kromminga, et al., 2003) wykorzystano niskotemperaturowe naczynia kondensacyjne do wydzielenia stałego ClO₂ oraz jego destylację w celce pomiarowej i pomiar *in situ*. Minimalizacja interwału czasowego, pomiędzy wygenerowaniem ClO₂ a pomiarem widma absorpcyjnego, w znaczący sposób wpłynęła na ograniczenie czynników zewnętrznych m.in. światła, a tym samym na stabilność stężenia ClO₂. W związku z tym wartości przekroju dla ww. zacytowanych przypadków były wyższe aniżeli te uzyskane w niniejszej pracy lub w publikacji Arango i wsp. (Arango, et al., 2014). W przypadku tej ostatniej również został zastosowany generator z fotometrycznym miernikiem ClO₂ (Czarneski & Lorcheim, 2005), ale czas pomiędzy wytworzeniem gazu a pomiarem jest stosunkowo długi. Wobec braku środków zapobiegających fotolizie ClO₂, mogło dojść do niewielkiego obniżenia zawartości gazu w stosunku do wartości założonej w obliczeniach. Podobny efekt mógł wystąpić w przypadku badań zaprezentowanych w niniejszej pracy.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy w aspekcie możliwości ich zastosowania w oznaczaniu ClO₂ w powietrzu są zadowalające. Podstawową zaletą proponowanego sposobu postępowania jest ominięcie konieczności stosowania złożonych układów generowania ClO₂ oraz potencjalnych źródeł błędów wzorcowania wynikających z konieczności stosowania dodatkowych urządzeń pomiarowych (mierniki przepływu, mierniki ciśnienia) wpływających na wynik analizy.

Porównano wartości stężenia gazowego ClO₂ będących wskazaniem detektora PortaSens II do wartości założonych teoretycznie i wyznaczonych na drodze bilansu masowego, poprzez pomiar spektrofotometryczny stężenia początkowego i końcowego roztworu. Na potrzeby badawcze w niniejszej pracy, uzyskano zadowalające wyniki. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy wartościami empirycznymi, a teoretycznymi. Stosunek stężeń uzyskanych z bilansu masowego i teoretycznych mieścił się w przedziale 0,91-0,97, zaś stosunek stężeń zmierzonych detektorem i teoretycznych w przedziale 0,93-0,96. Oba wyniki są zbliżone do jedności. Współczynniki zmienności CV dla wszystkich pomiarów empirycznych nie przekroczyły 5%.

7.2. Skuteczność biobójcza

Określono skuteczność biobójczą dla 5 uzyskanych preparatów na bazie ditlenku chloru wg metod zawiesinowych i nośnikowych.

Dla produktu **Armex 2000 Ultraczysty** przeprowadzono badania zawiesinowe wobec bakterii, grzybów, drożdży, prątków, spor i wirusów oraz badania nośnikowe bez udziału czynnika

mechanicznego wobec bakterii, grzybów, drożdży i wirusów w warunkach czystych, w czasie kontaktu 5 min i stężeniach 25, 50 oraz 100 ppm *wag.* ClO₂. Nie uzyskano wymaganej skuteczności log 5 dla bakterii oraz log 4 dla pozostałych patogenów chorobotwórczych w badaniach wg norm nośnikowych EN 17387 oraz EN 16777. W badaniach zawiesinowych brak skuteczności biobójczej stwierdzono jedynie wobec spor *B. subtilis* i *B. cereus* w stężeniu 25 ppm *wag.* ClO₂ oraz wobec spor *C. difficile* w stężeniach 25-100 ppm *wag.*

Wadą badań zawiesinowych w określaniu skuteczności biobójczej jest to, że patogeny są zawieszane w dużej objętości środka biobójczego. Badania nośnikowe natomiast odzwierciedlają warunki rzeczywiste, co skutkuje niejednokrotnie tym, że stężenia skuteczne określone metodami zawiesinowymi, nie wykazują skuteczności w badaniach nośnikowych (Tarka, et al., 2017; Moorman, et al., 2017). Nanoszenie zawiesiny na nośnik a następnie poddanie powierzchni całkowitemu wysuszeniu ogranicza bowiem dostęp środka dezynfekującego do patogenu. Wiązania hydrofobowe i wiązania van der Waalsa mogą sprzyjać adhezji patogenów do powierzchni, utrudniając kontakt ze środkiem biobójczym (Park, et al., 2007; Samandoulgou, et al., 2015).

Wg piramidy oporności patogenów na biocydy (Mc Donnell & Burke, 2011) bakterie Gramm dodatnie są mniej odporne aniżeli bakterie Gramm ujemne, co zostało potwierdzone w zaprezentowanych wynikach w produkcie Armex 2000 Ultraczysty. Logarytmy redukcji bakterii *S. aureus* i *E. hirae* są niższe, aniżeli bakterii *P. areuginosa* oraz *E. coli*.

Na szczycie piramidy oporności, obok prionów, znajdują się spory bakteryjne. *C. difficile* o rybotypie R027 uważa się za najbardziej odporny szczep chorobotwórczy, wytwarzający kilkunastokrotnie więcej toksyn TcdA oraz TcdB od pozostałych szczepów. Odpowiedzialny jest za ponad połowę przypadków zakażeń w placówkach opieki medycznej (Gonçalves, et al., 2004; Warny, et al., 2005; Schoyer & Hall, 2020). Wartość stopni redukcji w badaniach zawiesinowych w produkcie Armex 2000 Ultraczysty potwierdziły najwyższą oporność *C. difficile* spośród wszystkich zbadanych patogenów.

Literatura naukowa dotycząca skuteczności ClO₂ wobec spor nie jest nadmiernie bogata. W artykule Foegedinga i wsp. przedstawiono wyniki badań wpływu ClO₂ na przeżywalność spor *B. cereus* T, *B. stearothermophilus* ATCC 1518 oraz *C. perfringens* NCTC 8798, w stężeniach 20-80 ppm *wag.* Przy stężeniu 50 ppm *wag.*, poziom redukcji log 4 osiągnięto w pH 4,5 po czasie 15 min dla spor *B. cereus*, 20 minut dla *B. stearothermophilus* oraz 80 min dla *C. perfringens*. Ten sam poziom redukcji przy pH 8,5 osiągnięto po 45 min w przypadku *C. perfringens* (Foegeding, et al., 1986).

Friedline i wsp. przedstawili wyniki skuteczności biobójczej wobec spor *B. pumilus* SAFR-032 oraz *B. subtilis* ATCC 6051 w warunkach czystych, w roztworach wodnych ClO₂. o stężeniu 47 ppm *wag.* oraz czasów kontaktu 10 i 60 min. Uzyskano poziomy redukcji odpowiednio log 1 oraz log 2. Całkowita redukcja log 4 została uzyskana dopiero po 24 h. Podwyższenie stężenia ClO₂ do 187 ppm *wag.* pozwoliło osiągnąć całkowitą redukcję spor w czasie 10 min (Friedline, et al., 2015).

Wykazano również, że roztwór ClO₂ o stężeniu 600 ppm *wag.* redukuje przetrwalniki *C. difficile* do poziomu log 6 w czasie 15-30 min w zależności od szczepu i kondycji mikroorganizmu. Badania prowadzono w warunkach czystych z wykorzystaniem krążków stalowych (Perez, et al., 2005). Z kolei wg publikacji Hartmann, redukcję *C. difficile* na poziomie log 2,48 i log 2,65 osiągnięto dla stężenia 1600 ppm *wag.* ClO₂, w czasie 10 min bez obciążenia organicznego na sterylnych szklanych nośnikach (Hartman, 2015).

Przedstawione dane literaturowe wskazują na duże rozbieżności w wyznaczaniu skuteczności wobec spor. W niniejszej pracy wymaganą skuteczność log 4 wobec spor *Bacillus* osiągnięto już w czasie kontaktu 5 min i stężeniu 50 ppm *wag.* W badaniach zawiesinowych opisanych przez Foegeding i wsp. oraz Friedline i wsp. (Foegeding, et al., 1986; Friedline, et al., 2015) wymagane czasy kontaktu były znacznie dłuższe.

Obecność w układzie związków powierzchniowo czynnych w znaczący sposób poprawia skuteczność biobójczą produktu. Preparat **Armex 5 MD** po aktywacji różni się od omówionego Armexu 2000 Ultraczysty zasadniczo tylko tym, że posiada w składzie surfaktanty. Ze względu na swoje właściwości zwilżające oddziałują one z powierzchnią testową oraz z powierzchniami patogenów, zwiększając ich dostępność dla ClO₂.

Stężenie 100 ppm *wag.* ClO₂ wobec *C.difficile* w badaniach zawiesinowych, było wystarczające na uzyskanie wymaganego stopnia redukcji. Dowodzi to, że ClO₂ wykazuje działanie synergistyczne z surfaktantami. Jednak analogiczne stężenie nie było wystarczające do uzyskania skuteczności wobec spor w badaniach z czynnikiem mechanicznym. Dopiero wydłużenie czasu kontaktu z 5 do 15 min pozwoliło na uzyskanie zadowalających rezultatów przy stężeniach 50 i 100 ppm *wag.* ClO₂. Warto nadmienić, że norma EN 16615 z działaniem czynnika mechanicznego, przez przecieranie powierzchni chusteczką, dedykowana jest jedynie testom z bakteriami i drożdżami. W niniejszej pracy, badania rozszerzono o prątki spory i wirusy. W literaturze naukowej opisano badania skuteczności wg normy EN 16615 wobec: *C. difficile* dla aldehydu glutarowego i kwasu nadoctowego (Gemein, et al., 2019), wirusów – dla kwasu nadoctowego i czwartorzędowej soli amoniowej (Becker, et al., 2019) oraz drożdży – dla środków dezynfekujących na bazie alkoholu i czwartorzędowych soli amoniowych (Muller, et al., 2020).

Najwyższe stopnie redukcji > log 7 osiągnięto dla produktu Armex 5 MD w warunkach czystych już w czasie kontaktu 30 s wobec koronawirusa ludzkiego 229E. Znajduje to swoje potwierdzenie w literaturze: wirusy otoczkowe uznaje się za patogeny najbardziej wrażliwe na działanie środków biobójczych (Russel, 1999; Rutala & Weber, 2008).

Najbardziej opornym wirusem, w badaniach dla produktu Armex 5 MD okazał się norowirus myszy, tarktowany jako surogat norowirusa ludzkiego (Sattar, et al., 2011). W normie nośnikowej 4 połowej nie osiągnięto wymaganego stopnia redukcji log 4 dla 50 ppm *wag.* ClO₂, zarówno w warunkach czystych, jak i brudnych. Może to wynikać z faktu, iż punkt izoelektryczny,

w którym następuje agregacja norowirusa osiągany jest przy pH 4, który jednocześnie odpowiada pH produktu Armex 5 MD w stężeniach 25, 50 i 100 ppm wag. ClO₂ (Samandoulgou, et al., 2015). Agregacja wirusów natomiast to naturalny proces, który pomaga im przetrwać w niekorzystnym środowisku i chroni przed działaniem produktów biobójczych (Andreu-Moreno & Sanjuán, 2018; Pradhan, et al., 2022).

Istotną obserwacją jest to, że w badaniach nośnikowych w warunkach brudnych dla produktu Armex 5 MD bez użycia czynnika mechanicznego uzyskano większy stopień redukcji wirusów, aniżeli w badaniach z użyciem czynnika mechanicznego. W teorii, dodatkowy czynnik, w postaci przecierania chusteczką, powinien działać na niekorzyść patogenów. Różnice mogą wynikać przede wszystkim ze sposobu aplikacji. W normie EN 16777 produkt наносzony jest bezpośrednio na zainfekowaną powierzchnię krążka, w normie EN 16615 pośrednio na chusteczkę, a dopiero potem na powierzchnię, przy czym, cała objętość preparatu może nie być przeniesiona z chusteczki na powierzchnię. Innym czynnikiem mogącym mieć wpływ na obserwowane zjawisko jest ilość produktu przypadającego na 1 m² powierzchni. W normie EN 16615 ilość produktu wynosi 160 $\frac{mL}{m^2}$ (EN 16615, 2015), w normie EN 16777 – dwukrotnie więcej 318 $\frac{mL}{m^2}$ (EN 16777, 2019). Dodatkowo na skuteczność preparatu może wpływać rodzaj użytego nośnika. Materiał PVC stosowany w metodzie 4 – polowej jest najtrudniejszym materiałem do dezynfekcji (Werner, et al., 2018).

W badaniach zawiesinowych produktów Armex 2000 ultraczysty oraz Armex 5 MD, zaobserwowano spadek poziomu redukcji wirusów przy stężeniu 100 ppm wag. ClO₂. Jak już wspomniano w kontekście norowirusa, może mieć to związek ze zmianą pH roztworu, a tym samym z agregacją patogenów (Samandoulgou, et al., 2015).

Produkty gotowe do użycia **Armex 5 foam** oraz **Armex 5 WC** poprzez zmieszanie prekursora i aktywatora w stosunku (50% : 50%) charakteryzują się wysokim stężeniem ClO₂ – 1500 ppm wag. i przeznaczone są do dezynfekcji odpowiednio małych powierzchni często dotykanych oraz powierzchni sanitarnych. Uzyskano wymagane poziomy redukcji dla wszystkich badanych patogenów w poszczególnych metodach badania.

Badania dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną z wykorzystaniem produktu **Armex 5 vH** wykazały, iż kluczowym parametrem badań jest oprócz stężenia i stopnia obciążenia organicznego również wilgotność. Poziom redukcji gronkowca złocistego *S. aureus* poddanego działaniu gazowego ClO₂ w stęż 100-300 ppmv w czasie kontaktu 60 min, wynosił log 2,5 przy wilgotności 55-58% i log 5,7 przy wilgotności >70%. Gordon i wsp. (Gordon, et al., 2012) w pracy przeglądowej, potwierdzili, że wilgotność komory odkażającej ma wpływ na skuteczność gazowego ClO₂. Zwiększenie wilgotności powietrza z 50% na 80% skutkowało znacznie krótszymi czasami skutecznej ekspozycji spor *Bacillus* spp. na gazowy ClO₂. W badaniach właściwych wymagany poziom redukcji log 4 dla spor uzyskano w stężeniu 250 ppmv (585 ppm wag.) po czasie kontaktu 60 min oraz dla bakterii, grzybów, prątków i wirusów w stężeniu 50 ppmv (117 ppm wag.) po takim

samym czasie kontaktu. W publikacji Pottage i wsp. (Pottage, et al., 2012) wykazano, że stopień redukcji log 5 spor *Bacillus atrophaeus* oraz *Geobacillus stearothermophilus* osiągnięto po 60 min ekspozycji na stężenie 396 ppm wag. ClO₂.

Przeprowadzone badania aplikacyjne z wykorzystaniem gazowego ClO₂ wykazały, że z dużym powodzeniem może on być stosowany do dezynfekcji maseczek ochronnych, fartuchów RTG oraz potencjalnie innych skomplikowanych przyrządów i układów, których higiena, z racji struktury bądź masy jest trudna do utrzymania. Stężenie skuteczne dezynfekcji masek wobec spor *B. atrophaeus* umieszczonych na paskach wskaźnikowych w czasie 2 h wynosiło 500 ppm wag. ClO₂ i w czasie 1 h wynosiło 4000 ppm wag. ClO₂. Uzyskano poziom redukcji log 6. W literaturze opisano proces dezynfekcji maseczek ochronnych z wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego (Kierat, et al., 2020). Skuteczność dezynfekcji fartuchów RTG na poziomie log 6 osiągnięto w czasie 4 h i w stężeniu 1000 ppm wag. ClO₂. W literaturze naukowej nie znaleziono informacji dotyczących dezynfekcji fartuchów RTG z wykorzystaniem ClO₂. Zaproponowano jednak aplikację dezynfekcji endoskopów (Yi, et al., 2016), czy też karetek pogotowia z zastosowaniem tej metody (Lowe, et al., 2013).

7.3. Toksyczność i ekotoksyczność

Analiza szacunkowa toksyczności i ekotoksyczności otrzymanych produktów na bazie ClO₂ nie zaklasyfikowała żadnego z nich w klasie toksyczności ostrej i klasie toksyczności przewlekłej w stosunku do środowiska wodnego. Świadczy to o tym, że nowo zaprojektowane preparaty można bezpiecznie stosować w przemyśle, gospodarstwach domowych, przetwórstwie żywności oraz placówkach ochrony zdrowia i nie będzie się to wiązało z zagrożeniem dla środowiska.

W literaturze naukowej zaproponowano aplikacje ClO₂ do bezpośredniego kontaktu z organizmem człowieka w postaci płynów do płukania nosa, jako alternatywnej terapii leczenia chorób zakaźnych dróg oddechowych, w szczególności COVID-19 (Cao, et al., 2022), płynów do płukania jamy ustnej (Kerémi, et al., 2020) czy też płynów do dezynfekcji ran (Noszticzius, et al., 2013).

8. Wnioski

1. Połączenie miareczkowania woltamperometrycznego oraz techniki spektrofotometrycznej UV-VIS opartej na pomiarze specyficznego widma ditlenku chloru, pozwoliło na opracowanie metodyki oznaczania zawartości ClO₂ nie tylko w wodzie, ale również w bardziej złożonych układach zawierających organiczne środki myjące.
2. Metody analityczne oznaczania ClO₂, których chemizm oparty jest na reakcjach redoks (metody jodometryczne i spektrofotometryczne z wykorzystaniem barwników), nie mogą zostać w bezpośredni sposób wykorzystane do oznaczania ClO₂ w roztworach zawierających matrycę organiczną. Surfaktanty i przyspieszacze aktywacji tworzą dodatkowe układy redoks, które zakłócają przebieg reakcji analitycznych wpływając na wynik oznaczania zawartości ClO₂.
3. Opracowanie metody kalibracji spektrofotometrycznej metody oznaczania zawartości gazowego ClO₂ w powietrzu, z wykorzystaniem pomiaru widma ditlenku chloru w fazie gazowej pozostającej w stanie bliskim równowagi z roztworem ClO₂, w znaczny sposób może uprościć oznaczanie zawartości ClO₂ w powietrzu, pozwalając na ominięcie konieczności stosowania złożonych układów generowania ClO₂ oraz źródeł potencjalnych błędów wzorcowania wynikających ze stosowania dodatkowych urządzeń pomiarowych.
4. Zastosowanie w składzie opracowanych preparatów prekursora i aktywatora oraz wykorzystanie techniki aktywacji *in situ* pozwala na stabilne i bezpieczne przechowywanie tych preparatów do momentu ich wykorzystania.
5. Opracowana technika aktywacji ClO₂ *in situ* pozwala w kontrolowany sposób osiągnąć zadane stężenie ClO₂ w określonym czasie. Osiągnięty czas aktywacji ClO₂ w otrzymanych produktach wynosi 1 min i stanowi postęp w stosunku do stanu techniki.
6. Stężenia biobójcze wyznaczone na drodze badań zawieszinowych nie są skuteczne w badaniach nośnikowych, symulujących warunki rzeczywiste. Wykazano, że zawiesina patogenów poddana działaniu dużej ilości produktu biobójczego, nie odzwierciedla w praktyce jego zastosowania w dezynfekcji lub myciu i dezynfekcji powierzchni.
7. Obecność w układach związków powierzchniowo czynnych, przyczynia się do poprawy zwilżalności, zarówno dezynfekowanych powierzchni, jak i błon zewnętrznych / ścian komórkowych / otoczek patogenów i zwiększa ich podatność na działanie biobójcze ClO₂.
8. Sposób aplikacji oraz ilość środka dezynfekującego na jednostkę powierzchni, zastosowana w nośnikowym badaniu skuteczności wpływa na poziom redukcji liczebności patogenów.

Powinno to znaleźć odzwierciedlenie w doborze metody badania skuteczności, adekwatnej do warunków rzeczywistych.

9. Stężenie skuteczne gazowego ClO₂ i uzyskanie wymaganego poziomu redukcji liczebności patogenów zależy od wilgotności powietrza w układzie badawczym. Poziom wilgotności wpływa bezpośrednio na wymagany czas kontaktu patogenu z produktem biobójczym. Optymalna wilgotność względna w układzie badawczym i w warunkach stosowania dezynfekcji gazowym ClO₂ powinna wynosić >70%.
10. Wykazano skuteczność dezynfekcji maseczek ochronnych z wykorzystaniem gazowego ClO₂ o stężeniu 500 ppm *wag.* Ditlenek chloru nie wykazuje właściwości destrukcyjnych w materiale maseczki, co potwierdza analiza spektrometryczna FTIR. Stwarza to możliwość regeneracji i ponownego bezpiecznego wykorzystania maseczek FFP3.
11. Udokumentowano skuteczność dezynfekcji ciężkich i obszernych fartuchów RTG w komorze dekontaminacyjnej w atmosferze gazowego ClO₂ o stężeniu 1000 ppm *wag.* Ditlenek chloru nie wykazuje właściwości destrukcyjnych w stosunku do materiału fartucha, co potwierdziła analiza spektrometryczna FTIR.
12. Otrzymane produkty na bazie ClO₂ nie wykazują cech toksycznych w stosunku do człowieka oraz środowiska wodnego. Szacowanie toksyczności przeprowadzono dla najgorszego możliwego przypadku, czyli całkowitego przereagowania reagentów podczas aktywacji *in situ*.

PODSUMOWANIE

W ramach badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej utworzono receptury 5 produktów dezynfekujących i myjąco – dezynfekujących na bazie ditlenku chloru jako składnika biobójczego. Formy użytkowe omawianych produktów, tj. koncentraty, pianka czy żel są ściśle dostosowane do obszarów aplikacji, w których ich stosowanie jest rekomendowane. Cechą znaną otrzymanych produktów jest stabilność produktu w trakcie przechowywania, którą osiągnięto poprzez technikę generowania ClO₂ *in situ* oraz szybki czas aktywacji ClO₂, gdzie rekomendowane stężenia ClO₂ osiągnięto po 1 min od zastosowania.

Zakres prac obejmował opracowanie metod analitycznych oznaczania ClO₂ w roztworach i powietrzu, badania preparatywne oraz badania skuteczności biobójczej z wykorzystaniem metod zawiesinowych i nośnikowych. Dodatkowo, oszacowano właściwości toksykologiczne i ekotoksykologiczne otrzymanych preparatów. Przedstawiono wyniki badań aplikacyjnych dezynfekcji fartuchów rentgenowskich i maseczek ochronnych uzyskane w procesie dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną z użyciem gazowego ClO₂.

Nowością w rozprawie doktorskiej jest opracowanie metod analitycznych oznaczania zawartości ClO₂ w układach innych niż woda, tj. zawierających komponenty organiczne oraz opracowanie metody prostego sposobu kalibracji i oznaczania zawartości ClO₂ w powietrzu metodą spektrofotometryczną. Ponadto, literatura naukowa dotycząca skuteczności biobójczej ClO₂ w aspekcie patogenów chorobotwórczych na powierzchniach (w szczególności spor i prątków) nie należy do bardzo obszernych. Badania wykonywane wg przedstawionych norm, a przede wszystkim porównanie wyników testów przeprowadzonych na ich podstawie, można zatem uznać za nowość naukową. Warto zwrócić uwagę na fakt, iż metody nośnikowe EN 16777, EN 17272, oraz EN 17387, ale również norma zawiesinowa wobec spor EN 17126 zostały zatwierdzone i wprowadzone do użytku ogólnego w trakcie realizacji studiów doktoranckich, tj. po 2018 roku. W rozprawie doktorskiej przedstawiono zależności w określaniu skuteczności biobójczej, wynikające z rodzaju stosowanych metod i warunków oznaczania.

Rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinarny z dużym potencjałem wdrożeniowym. Przeprowadzone badania są ważną częścią uzupełniającą dla projektu badawczego NCBiR nr POIR 01.01.01-00-1104/17-00 pt. *Technologia wytwarzania oraz stosowania preparatów dezynfekcyjnych na bazie ditlenku chloru do zwalczania ognisk epidemicznych drobnoustrojów chorobotwórczych, o wysokiej oporności na dezynfekcję chemiczną*, realizowanego w firmie MEXEO w Kędzierzynie – Koźlu.

Wartość użytkowa pracy polega zatem na wykorzystaniu wyników badań do wdrożenia kompletnej technologii produkcji i stosowania preparatów myjąco-dezynfekujących w obszarach medycznych, ale również spożywczych, instytucjonalnych i domowych. Uzyskane wyniki były również podstawą do zaplanowania i przeprowadzenia badań w warunkach klinicznych.

W ramach komercjalizacji przewidziane jest skompletowanie dokumentów i rejestracja uzyskanych produktów w procedurze narodowej w Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URPLW MiPB). W późniejszym czasie planuje się rejestrację produktów w procedurze europejskiej. Nastąpi to w momencie gdy procedura europejska dla ditlenku chloru zacznie obowiązywać.

Praca badawcza została zrealizowana w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy, przy współpracy firmy MEXEO z Kędzierzyna-Koźla oraz Politechniki Śląskiej. W pełni wykorzystano kompetencje wymienionych podmiotów dla osiągnięcia stawianych celów naukowych i wdrożeniowych.

BIBLIOGRAFIA

9. Spis wykorzystanych publikacji

- Aieta, E. M. i Berg, J. D., 1986. A Review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *American Water Works Association Journal*, 78(6), pp. 62-72.
- Aieta, E. M., Roberts, P. V. i Hernandez, M., 1984. Determination of chlorine dioxide, chlorine, chlorite and chlorate in water. *AWWA Research and Technology*, pp. 64-70.
- Aminzadeh, A. i inni, 2020. Detoxification of toxin A and toxin B by copper ion-catalyzed oxidation in production of a toxoid-based vaccine against *Clostridioides difficile*. *Free Radical Biology and Medicine*, Tom 160, pp. 433-446.
- Ammar, T. A., Abid, K. Y., El-Bidnary, A. A. i El-Sonbati, A. Z., 2015. Comparison of commercial analytical techniques for measuring chlorine dioxide in urban desalinated drinking water. *Journal of Water and Health*, pp. 970-984.
- Andreu-Moreno, I. i Sanjuán, R., 2018. Collective infection of cells by viral aggregates promotes early viral proliferation and reveals a cellular-level allee effect. *Current Biology*, Tom 28, pp. 3212-3219.
- Andrews, L. S. i inni, 2002. Chlorine dioxide wash of shrimp and crawfish an alternative to aqueous chlorine. *Food Microbiology*, 19(4), pp. 261-267.
- APHA Method 4500 ClO₂E, 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition.
- Arango, J. i inni, 2014. In situ quantification of chlorine dioxide gas consumption by fresh produce using UV-visible spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, Tom 131, pp. 75-81.
- Augustyn, W. i inni, 2022. Inactivation of Spores and Vegetative Forms of *Clostridioides difficile* by Chemical Biocides: Mechanisms of Biocidal Activity, Methods of Evaluation, and of Biocidal Activity, Methods of Evaluation, and Environmental Aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(750), pp. 1-17.
- Axegard, P., 2019. The effect of the transition from elemental chlorine bleaching to chlorine dioxide bleaching in the pulp industry on the formation of PCDD/Fs. *Chemosphere*, Tom 236, p. 124386.
- Bakhmutova-Albert, E., Margerum, D. W., Aure, J. G. i Applegate, B. M., 2008. Chlorine Dioxide Oxidation of Dihyronicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *Inorganic Chemistry*, Tom 47, pp. 2205-2211.

-
- Barbolini, E., Piccardi, G. i Pantani, F., 1981. Potentiometric titration of chlorine and its oxy compounds in water. *Analytica Chimica Acta*, Tom 132, pp. 223-228.
- Barbut, F., Jones, G. i Eckert, C., 2011. Epidemiology and control of *Clostridium difficile* infections in healthcare settings: an update. *Current Opinion in Infectious Diseases*, Tom 24, pp. 370-376.
- Becker, B. i inni, 2019. Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(121), pp. 1-8.
- Birks, J. W. i inni, 1977. Studies of reactions of importance in the stratosphere. II. Reactions involving chlorine nitrate and chlorine dioxide. Tom 66, p. 4591.
- Black and Veatch Corporation, 2010. *Whites Handbok of chlorination and alternative disinfectants*. 5 red. Online: John Wiley and Sons, Inc.
- Cao, J. i inni, 2022. Can nasal irrigation with chlorine dioxide be considered as a potential alternative therapy for respiratory infectious diseases? The example of COVID-19. *BioScience Trends*, 16(6), pp. 447-450.
- Chen, C.-C. i inni, 2004. Morphology and ionic conductivity of thermoplastic polyurethane electrolytes. *Journal of Applied Polymer Science*, Tom 91, pp. 1154-1167.
- Chen, T., 1967. Spectrophotometric determination of microquantities of chlorate, chlorite, hypochlorite and chloride in perchlorate. *Analytical Chemistry*, 39(7), pp. 804-813.
- Chiswell, B. i O'Halloran, K. R., 1991. Use of Lissamine green B as a spectrophotometric reagent for the determination of low residuals of chlorine dioxide. *Analasyt*, Tom 116, pp. 657-661.
- Choshen, E., Elits, R. i Rav-Acha, C., 1986. The formation of cation-radicals by the action of chlorine dioxide on p-substituted styrenes and other alkenes. *Tetrahedron Letters*, 27(49), pp. 5989-5992.
- Chruściel, A., Hreczuch, W., Piontek, W. i Szumigaj-Tarnowska, J., 2019. Chemical stability of chlorine dioxide in the presence of prochloraz manganese. *Plant Protection Science*, 55(3), pp. 222-227.
- CIOP-PIB, 2023. *Centralny Instytut Ochrony Pracy - Państwowy Instytut Badawczy*. [Online] Available at:
https://www.ciop.pl/CIOPPortalWAR/appmanager/ciop/pl?_nfpb=true&_pageLabel=P27600224401410431343241&id_czynn_chem=206
[Data uzyskania dostępu: 17 09 2023].
- Czarneski, M. A. i Lorcheim, P., 2005. Isolatr decontamination using chlorine dioxide gas. *Pharmaceutical Technology*.

Derby, R. I., Hutchinson, W. S., Dexter, T. H. i Naughton, J. M., 1953. Chlorine (IV) oxide. W: *Inorganic Synthesis*. brak miejsca: McGraw-Hill Book Company Inc., pp. 152-158.

Deshwal, B. R. i Lee, H. K., 2004. Kinetics and mechanism of chloride based chlorine dioxide generation process from acidic sodium chlorate. *Journal of Hazardous Materials*, Tom B108, pp. 173-182.

Deshwal, B. R. i Lee, H. K., 2005. Manufacture of chlorine dioxide from sodium chlorate: state of the art. Review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 11(3), pp. 330-346.

ECHA, 2004. *European Chemicals Agency*. [Online]

Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15450/7/3/1>

[Data uzyskania dostępu: 15 08 2023].

ECHA, 2023. *Guidance on the Biocidal Products*, Helsinki: brak nazwiska

Emmert, G. L. i inni, 2000. Studies of selectivity in amaranth method for chlorine dioxide. *Talanta*, Tom 50, pp. 879-888.

EN 13624, 2013. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).

EN 13697, 2015. Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements without mechanical action phase2 step2.

EN 13704, 2018. Chemical disinfectants - Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements (phase 2, step 1).

EN 13727, 2015. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).

EN 14348, 2005. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).

EN 14349, 2012. Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area on non-porous surfaces without mechanical action - Test method and requirements (phase 2, step 2).

EN 14476, 2019. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).

EN 14885, 2022. Chemical disinfectants and antiseptics - Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics.

EN 16615, 2015. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal and yeasticida activity on non-porous surfaces with mechanical action employing wipes in the medical area (4-field test) - Test method and requirements (phase 2, step 2).

EN 16777, 2019. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 2).

EN 17126, 2018. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1).

EN 17272, 2020. Chemical disinfectants and antiseptics - Methods of airborne room disinfection by automated process - Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and phagocidal activities.

EN 17387, 2021. Quantitative test for the evaluation of bactericidal and yeasticidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants in the medical area on non-porous surfaces without mechanical action - Test method and requirements (phase 2, step 2).

Esposito, A. P. i inni, 1999. Absorption and resonance raman study of the 2B1(X)-2A2(A) transition of chlorine dioxide in the gas phase. *The Journal of Physical Chemistry A*, Tom 103, pp. 1748-1757.

Firma Viroxy Labs, 2022. *Viroxy Labs*. [Online]

Available at: <https://www.viroxylabs.com/microbiological-testing-services/disinfectant-efficacy-testing/en-144762013-a22019/>

[Data uzyskania dostępu: 10 9 2023].

Fletcher, I. J. i Hemmings, P., 1985. Determination of chlorine dioxide in potable waters using chlorophenol red. *Analyst*, Tom 110, pp. 695-699.

Foegeding, P. M., Hemstapad, V. i Giesbrecht, F. G., 1986. Chlorine Dioxide Inactivation of Bacillus and Clostridium Spores. *Journal of Food Science and Technology*, Tom 51, pp. 197-201.

Friedline, A. i inni, 2015. Sterilization of hydrogen peroxide resistant bacterial spores with stabilized chlorine dioxide. *AMB Express*, 5(24), pp. 1-6.

-
- Gauw, R. D., Emmert, G. L., Bubnis, B. i Gordon, G., 1999. High resolution spectrophotometry for identification of chlorine dioxide in concentrated chlorine solutions. *Talanta*, Tom 50, pp. 1073-1078.
- Gemein, S. i inni, 2019. Interlaboratory reproducibility of a test method following 4-field test methodology to evaluate the susceptibility of *Clostridium difficile* spores. *Journal of Hospital Infection*, Tom 103, pp. 78-84.
- GIS, 2023. *Stan sanitarny kraju w 2022 roku*, Warszawa: Główny Inspektorat Sanitarny.
- GMI, 2021. *Global Market Insights*. [Online]
Available at: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/chlorine-dioxide-market>
[Data uzyskania dostępu: 17 09 2023].
- Gonçalves, C. i inni, 2004. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) form *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), pp. 1933-1939.
- Gordon, D., Carruthers, B.-A. i Theriault, S., 2012. Gaseous Decontamination Methods in High-containment Laboratories. *Applied Biosafety*, 17(1), pp. 31-39.
- Gordon, G., 1983. Improved methods of analysis for chlorate, chlorite and hypochlorite ions at the sub-mg/L level. *Proceedings – AWWA Water Quality Technology Conference*, pp. 175-189.
- Gordon, G., Kieffer, R. G. i Rosenblatt, D. H., 1972. *The chemistry of chlorine dioxide*. In *Progress in Inorganic Chemistry*. Nowy Jork: John Wiley & Sons, Inc.
- Gui, Y. i inni, 2019. Gas sensing of graphene and graphene oxide nanoplatelets to ClO₂. *Superlattices and Microstructures*, Tom 135, p. 106248.
- Gulmine, J. V., Janissek, P. R., Heise, H. M. i Akcelrud, L., 2002. Polyethylene characterization by FTIR. *Polymer Testing*, Tom 21, pp. 557-563.
- Haller, J. F. i Listek, S. S., 1948. Determination of chlorine dioxide and other active chlorine compounds in water. *Analytical Chemistry*, pp. 639-642.
- Hartman, L., 2015. *The sporicidal effect of Chlorine dioxide against Clostridium Difficile spores with and without presence of organic material*, Örebro: Örebro University .
- Hofmann, R., Andrews, R. C. i Ye, Q., 1998. Comparison of spectrophotometric methods for measuring chlorine dioxide in drinking water. *Environmental Technology*, Tom 19, pp. 761-773.
- Hoigne, J. i Bader, H. L., 1982. Kinetik typischer Reaktionen von Chlordioxid mit Wasserinhaltsstoffen. *Vom Wasser*, Tom 59, pp. 253-267.

Hoigne, J. i Tratnyek, P. G., 1994. Kinetics of reactions of chlorine dioxide (OCIO) in water—II. Quantitative structure-activity relationships for phenolic compounds. *Water Research*, Tom 28, pp. 57-66.

Hollowell, D. A., Gord, J. R., Gordon, G. i Pacey, G. E., 1986. Selective chlorine dioxide determination using gas-diffusion flow-injection analysis with chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry*, Tom 58, pp. 1524-1527.

Insignares-Carrione, E. i inni, 2021. Determination of the effectiveness of chlorine dioxide in the treatment of COVID 19. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 15(S1).

Institute of Chemistry University of Tartu, 2023. *Database of ATR-FT-IR spectra of various materials*. [Online]

Available at: <https://spectra.cs.ut.ee/textile-fibres/polyamide/>

[Data uzyskania dostępu: 30 lipiec 2023].

ISO 11138-1:2017, 2017. Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 1: General requirements. International Organization for Standardization.

Ison, A., Odeh, I. N. i Margerum, D. W., 2006. Kinetics and Mechanisms of Chlorine Dioxide and Chlorite Oxidations of Cysteine and Glutathione. *Inorganic Chemistry*, Tom 45, pp. 8768-8775.

Kály-Kullai, K., Wittmann, M., Noszticzus, Z. i Rosivall, L., 2020. Can chlorine dioxide prevent the spreading of coronavirus or other viral infections? Medical hypotheses. *Physiology International*, 107(1), pp. 1-11.

Karber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol*, Tom 162, pp. 480-483.

Kaur, D., Bhardwaj, N. K. i Lohchab, R. K., 2018. A study on pulping of rice straw and impact of incorporation of chlorine dioxide during bleaching on pulp properties and effluents characteristics. *Journal of Cleaner Production*, Tom 170, pp. 174-182.

Kerémi, B. i inni, 2020. Effects of Chlorine Dioxide on Oral Hygiene - A Systematic Review and Metaanalysis. *Current Pharmaceutical Design*, 26(11), pp. 3015-3025.

Kieffer, R. G. i Gordon, G., 1968. Disproportionation of chlorous acid. I. Stoichiometry. *Inorganic Chemistry*, 7(2), pp. 235-239.

Kierat, W. i inni, 2020. The Use of UVC Irradiation to Sterilize Filtering Facepiece Masks Limiting Airborne Cross-Infection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Tom 17, pp. 1-14.

-
- Kromminga, H. i inni, 2003. New measurements of OClO absorption cross-section in the 325-435 nm region and their temperature dependence between 213 and 293 K. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Tom 157, pp. 149-160.
- Li, X. J., Jiang, D. D. i Zhang, Y. J., 2013. Kinetics of the reaction for generation of chlorine dioxide from sodium chlorate and hydrochloric acid. *Advanced Materials Research*, Tom 1, pp. 546-550.
- Lowe, J. J. i inni, 2013. Decontamination of a Hospital Room Using Gaseous Chlorine Dioxide: Bacillus anthracis, Francisella tularensis, and Yersinia pestis. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 10(10), pp. 533-539.
- Lowe, J. J. i inni, 2013. Evaluation of ambulance decontamination using gaseous chlorine dioxide. *Prehospital Emergency Care*, 17(3), pp. 401-408.
- Masschelein, W., 1967. Preparation of pure chlorine dioxide. Reactions of chlorine or sodium hypochlorite with sodium chlorite in the presence of acetic anhydride. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 6(2), pp. 137-142.
- Masschelein, W. J., 1984. Experience with chlorine dioxide in brussels, Part 2: methods for controlling chlorine dioxide operation. *American Water Works Association*, pp. 80-82.
- Mc Donnell, G. i Burke, P., 2011. Disinfection: is it time to reconsider Spaulding?. *Journal of Hospital Infection*, Tom 78, pp. 163-170.
- Moorman, E., Montazeri, N. i Jaykus, L.-A., 2017. Efficacy of Neutral Electrolyzed Water for Inactivation of Human Norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(16), pp. e00653-17.
- Morent, R. i inni, 2008. Comparison between XPS- and FTIR-analysis of plasma-treated polypropylene film surfaces. *Surface and interface analysis*, Tom 40, pp. 597-600.
- Mo, Z., Hu, S. i Hu, D., 2015. Kinetics of the preparation of chlorine dioxide by sodium chlorite and hydrochloric acid at low concentration. *Chemical Engineering Transactions*, Tom 46, pp. 49-54.
- Muller, P. i inni, 2020. Investigation of the susceptibility of Candida auris and Candida albicans to chemical disinfectants using European Standards EN 13624 and EN 16615. *Journal of Hospital Infection*, Tom 105, pp. 648-656.
- Nadupali, S., Koorbanally, N. i Jonnalagadda, S. B., 2011. Chlorine dioxide – Facilitated oxidation of the azo dye amaranth. *The Journal of Physical Chemistry*, Tom 115, pp. 11682-11688.
- Navalon, S., Alvaro, M. i Garcia, H., 2009. Chlorine dioxide reaction with selected amino acids in water. *Journal of Hazardous Materials*, Tom 164, pp. 1089-1097.

Nicodom IR Libraries, 2012. *FTIR Spectra of Polymers*. [Online]

Available at: <http://www.ftir-polymers.com/soon.htm>

[Data uzyskania dostępu: 27 sierpień 2023].

Noszticzus, Z. i inni, 2013. Chlorine Dioxide Is a Size-Selective Antimicrobial Agent. *Plon One*, 8(11), p. e79157.

Obvintseva, L. A. i Gubanova, D. P., 2004. Determination of chlorine and chlorine dioxide. *Journal of Analytical Chemistry*, 59(8), pp. 780-784.

Ogata, N., 2007. Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*, Tom 46, pp. 4898-4977.

Oikawa, K., Hoshi, S., Imizumi, N. i Furuya, E., 1992. Determination of ClO₂ using ClO₂ selective electrode. *Chemistry Letters*, pp. 2459-2462.

Oliveira, E. A., Nogueira, N. G. P., Innocentini, M. D. M. i Pisani, R., 2010. Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste. *Waste Management*. 30(11), pp. 2327-2335.

Padhi, R. K., Subramanian, S. i Satpathy, K. K., 2019. Formation, distribution, and speciation of DBPs (THMs, HAAs, ClO₂- and ClO₃-) during treatment of different source water with chlorine and chlorine dioxide. *Chemosphere*, Tom 218, pp. 540-550.

Park, G. W. i inni, 2007. Evaluation of liquid- and fog-based application of Sterilox hypochlorous acid solution for surface inactivation of human norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, Tom 73, p. 4463-4468.

Pauling, L., 1988. W: *General Chemistry*. Nowy Jork: Dover Publications Inc., p. 264.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. i Vyvyan, J. A., 2008. *Introduction to spectroscopy*. 4 red. Boston: Cengage Learning.

Pepich, B. V. i inni, 2007. An improved colorimetric method for chlorine dioxide and chlorite ion in drinking water using lissamine green B and horseradish peroxidase. *Analytica Chimica Acta*, Tom 596, pp. 37-45.

Perez, J., Springthorpe, S. i Sattar, S. A., 2005. Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control. *American Journal of Infection Control*, 33(6), pp. 320-325.

PN -C-04541, 1978. Oznaczenie suchej pozostałości, pozostałości po prażeniu, straty przy prażeniu oraz substancji rozpuszczonych, substancji rozpuszczonych mineralnych i substancji rozpuszczonych lotnych.

-
- PN-74/C-04600/13, 1975. Woda i ścieki. Badania zawartości chloru i jego związków oraz zapotrzebowania chloru. Oznaczanie dwutlenku chloru w wodzie metodą miareczkową jodometryczną.
- PN-EN 1262, 2004. Środki powierzchniowo czynne. Oznaczanie pH roztworów i dyspersji środków powierzchniowo czynnych.
- PN-EN 1278, 2001. Środki powierzchniowo czynne - Oznaczanie zdolności pianotwórczych - Metoda wytwarzania piny perforowanym krążkiem.
- Pottage, T., Mackenm, K. G., Walker, J. T. i Bennett, A. M., 2012. Low-Temperature Decontamination with Hydrogen Peroxide or Chlorine Dioxide for Space Applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), pp. 4169-4174.
- Pradhan, S. i inni, 2022. Viral aggregation: the knowns and unknowns. *Viruses*, p. 438.
- Pruitt, R. N. i inni, 2009. Structure-function analysis of inositolhexakisphosphate-induced autoprocessing in Clostridium difficile toxin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(30), pp. 21934-21940.
- Qian, Y., Chen, Y., Jiang, Y. B. i Ji, H. B., 2004. Reaction mechanism and dynamics of H₂O₂-based chlorine dioxide production. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 55(10), pp. 1719-1722.
- Quentel, F., Elleouet, C. i Madec, C., 1994. Electrochemical determination of low levels of residual chlorine dioxide in tap water. *Analytica Chimica Acta*, Tom 295, pp. 85-91.
- Ramakrishnan, M. A., 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of W J Virology*, 5(2), pp. 85-86.
- Raports and Data, ..., 2023. *Top 10 Surface Disinfrctant Companies in the world*. [Online] Available at: <https://www.reportsanddata.com/blog/top-surface-disinfectant-companies-in-the-world>
[Data uzyskania dostępu: 15 09 2023].
- Richard, E. C. i Vaida, V., 1991. The direct near ultraviolet absorption spectrum of the 2AB-2B1 transition of jet-cooled chlorine dioxide. *The Journal of Chemical Physics*, 94(1), pp. 153-162.
- Roberts, P. V., Aieta, E. M., Berg, J. D. i Chow, B., 1980. *Chlorine Dioxide for Wastewater Disinfection: a Feasibility Evaluation*, Standford: Palo Alto, CA.
- Rosenblatt, D. H. i inni, 1967. Oxidations of amines. II. Substituent effects in chlorine dioxide oxidations. *Journal of the American Chemical Society*, Tom 89, pp. 1158-1163.
- Rozporządzenie Nr 1272/2008, 2008. Rozporządzenie (WE) Nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin.

-
- Russel, A. D., 1999. Bacterial resistance to disinfectants: Present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, Tom 43, pp. 57-68.
- Rutala, W. A. i Weber, D. J., 2008. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*; Centers for Disease, Chicago: Centers for Disease Control and Prevention.
- Salmaih, I., Azizan, A. i Nor Sabirin, M., 2015. Characterization of novel castor oil-based polyurethane polymer electrolytes. *Polymers*, Tom 7, pp. 747-759.
- Samandoulgou, I., Fliss, I. i Jean, J., 2015. Zeta potential and aggregation of virus-like particle of human norovirus and feline calicivirus under different physicochemical conditions. *Food and Environmental Virology*, Tom 7, pp. 249-260.
- Sattar, S. A., Ali, M. i Tetro, J. A., 2011. In Vivo Comparison of Two Human Norovirus Surrogates for Testing Ethanol-Based Handrubs: The Mouse Chasing the Cat!. *Plos One*, 6(2), p. e17340.
- Schinköthe, J. i inni, 2021. Airborne Disinfection by Dry Fogging Efficiently Inactivates Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARSCoV-2), Mycobacteria, and Bacterial Spores and Shows Limitations of Commercial Spore Carriers. *Environmental Microbiology*, 87(3), pp. e02019-20.
- Schöneich, C., 2008. Mechanisms of Protein Damage Induced by Cysteine Thiyl Radical Formation. *Chemical Research in Toxicology*, Tom 21, pp. 1175-1179.
- Schoyer, E. i Hall, K., 2020. Environmental cleaning and decontamination to prevent *Clostridioides difficile* infection in health care settings: a systematic review. *Journal Patient Safety*, 16(3), pp. 12-15.
- Sensidyne, 2023. *Sensidyne Industrial Health & Safety Instrumentation*. [Online] Available at: <https://www.sensidyne.com/colorimetric-gas-detector-tubes/detector-tubes/116-chlorine-dioxide.php> [Data uzyskania dostępu: 17 09 2023].
- Shin, H. S. i Jung, D. G., 2006. Determination of chlorine dioxide in water by gas chromatography-mass spectrometry, 2006, 37. Shin H.S., Jung D.G.: Determination of chlorine dioxide in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Tom 1123, pp. 92-97.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X. i Kiemle, D. J., 2005. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7 red. Nowy Jork: John Wiley and Sons Inc..
- Singh, S., Maji, P. K., Lee, Y. S. i Gajkwad, K. K., 2021. Applications of gaseous chlorine dioxide for antimicrobial food packaging: a review. *Environmental Chemistry Letters*, Tom 19, pp. 253-270.

-
- Smith, A. J., Bagg, J. i Hood, J., 2001. Use of chlorine dioxide to disinfect dental unit waterlines. *Journal of Hospital Infection*, 49(4), pp. 285-288.
- Spearman, C., 1908. The Method of "Right and Wrong Cases" (Constant Stimuli) without Gauss's Formula. *British Journal of Psychology*, Tom 2, pp. 227-242.
- Sun, X., Baldwin, E. i Bai, J., 2019. Applications of gaseous chlorine dioxide on postharvest handling and storage of fruits and vegetables – A review. *Food Control*, Tom 95, pp. 18-26.
- Sun, Z., Lou, N. i Nyman, G., 2005. A2A2-X2B1 absorption and raman spectra of the OClO molecule: A three-dimensional time-dependent wave packet study. *The Journal of Chemical Physics*, Tom 122, p. 054316.
- Surawicz, C. M. i inni, 2013. Guidelines for diagnosis, treatment and prevention of *Clostridium difficile* infections. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(4), pp. 478-498.
- Tan, H., Wheeler, W. B. i Wei, C., 1987. Reaction of chlorine dioxide with amino acids and peptides: kinetics and mutagenicity studies. *Mutation Research*, Tom 188, pp. 259-266.
- Tarka, P. i inni, 2017. Ocena aktywności bójczej preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej bielizy szpitalnej w świetle nowej normy europejskiej PN-EN 16616: 2015-10. Dezynfekcja chemiczno - termiczna tekstyliów. *Postępy Mikrobiologii*, 56(1), pp. 113-119.
- Tarka, P. i Nitsch-Osuch, A., 2021. Evaluating the virucidal activity of disinfectants according to european union standards. *Viruses*, 13(534).
- The Business Research Company, ..., 2023. *Disinfectants global market report 2023*, Londyn: The Business Research Company.
- Tinoco, R., Hernandez-Saavedra, D., Ochoa, J. L. i Vasquez-Duhalt, R., 1996. Biochemical method for chlorine dioxide determination. *Analytical Biochemistry*, Tom 241, pp. 18-22.
- Tyski, S., Bocian, E. i Laudy, A. E., 2022. Application of normative documents for determination of biocidal activity of disinfectants and antiseptics dedicated to the medical area: a narrative review. *Journal of Hospital Infection*, Tom 125, pp. 75-91.
- Tzanavaras, P. D., Themelis, D. G. i Kika, F. S., 2007. Review of analytical methods for the determination of chlorine dioxide. *Central European Journal of Chemistry*, 5(1), pp. 1-12.
- Ulenikov, O. N. i inni, 2021. High resolution ro-vibrational analysis of molecules in doublet electronic states: the ν_1 fundamental of chlorine dioxide ($^{16}\text{O} \ ^{35}\text{Cl} \ ^{16}\text{O}$) in the X2B1 electronic ground state. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Tom 23, pp. 4580-4596.
- Vaid, R., Linton, R. H. i Morgan, M. T., 2010. Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food Microbiology*, 27(8), pp. 979-984.

-
- Voet, D. i Voet, J. G., 2011. Biochemistry, 4rd ed.. W: brak miejsca: J. Wiley & Sons, p. Rozdział 16.
- Wahner, A., Tyndall, G. S. i Rayishankra, A. R., 1987. Absorption cross sections for OCIO as function of temperature in the wavelength range 240-280 nm. *The Journal of Physical Chemistry A*, 91(11), pp. 2734-2738.
- Warny, M. i inni, 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*, Tom 366, pp. 1079-1084.
- Watanabe, T., Idehara, T., Yoshimura, Y. i Nakazawa, H., 1998. Simultaneous determination of chlorine dioxide and hypochlorite in water by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Tom 796, pp. 397-400.
- Werner, S., Naujox, K., Rehm, M. E. i Brückner, E., 2018. Method for assessment of the range efficacy of presoaked sin-gle-use wipes for surface disinfection. *Hygiene & Medizin*, Tom 43, pp. E93-E99.
- Wheeler, G. L. i Lott, P. F., 1978. A rapid microdetermination of chlorine dioxide in the presence of active chlorine dioxide compounds. *Microchemical Journal*, Tom 23, pp. 160-164.
- Workman, J., 2000. Handbookk of organic compounds. W: *Methods and interpretations*. Nowy Jork: Academic Press, pp. 49-77.
- Wuelfing, W. P. i inni, 2006. Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics – defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), pp. 774-782.
- Yakupov, M. Z., Shereshovets, V. V., Imashev, U. B. i Ismagilov, F. R., 2011. Liquid-phase oxidation of thiols with chlorine dioxide. *Russian Chemical Bulletin*, Tom 50, pp. 2352-2355.
- Yi, Y. i inni, 2016. A pilot study on using chlorine dioxide gas for disinfection of gastrointestinal endoscopes. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(7), pp. 526-536.
- Young, C. L., 1983. Sulfur dioxide, chlorine, fluorine and chlorine oxides. W: *Solubility Data Series*. brak miejsca:Pergamon Press.

10. Spis tabel

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne ditlenku chloru (Black and Veatch Corporation, 2010; CIOP-PIB, 2023).....	20
Tabela 2. Procedura miareczkowania amperometrycznego.....	35
Tabela 3. Rozcieńczenia podstawowego roztworu wzorcowego do pomiarów spektrofotometrycznych.....	39
Tabela 4. Skład utworzonych preparatów na bazie ClO ₂	46
Tabela 5. Założone stężenia ClO ₂ i sposób aktywacji opracowywanych produktów	47
Tabela 6. Wymagane stopnie redukcji i warunki obciążające w badaniach skuteczności biobójczej dla powierzchni w poszczególnych obszarach.....	52
Tabela 7. Normy i mikroorganizmy testowe wobec których przeprowadzono badania skuteczności biobójczej.....	53
Tabela 8. Charakterystyka podstawowych parametrów testowych.....	54
Tabela 9. Produkty badane zgodnie z normami zawiesinowymi.....	54
Tabela 10. Podłoża, inkubacja i metody zliczania mikroorganizmów w metodach zawiesinowych.....	56
Tabela 11. Produkty badane zgodnie z normą nośnikową EN 16615.....	59
Tabela 12. Produkty badane zgodnie z normami nośnikowymi EN 17387 oraz EN 16777.....	63
Tabela 13. Produkt badany zgodnie z normą nośnikową EN 17272.....	66
Tabela 14. Stężenia gazowego ClO ₂ i odpowiadające im masy prekursora i aktywatora użyte w procesie gazowania.....	66
Tabela 15. Kategorie klasyfikacji toksyczności ostrej wg wartości ATE _{mix} dla poszczególnych dróg narażenia.....	71
Tabela 16. Zasada wyznaczenia współczynnika M	73
Tabela 17. Klasyfikacja mieszaniny dla toksyczności przewlekłej oparta na regule addytywności – sumę zaklasyfikowanych składników	74
Tabela 18. Stężenia jonów ClO ₂ ⁻ oraz ClO ₂ w roztworach wzorcowych uzyskanych przez 1000-krotne rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego.....	83
Tabela 19. Charakterystyka krzywych przedstawionych na Rysunku 36.....	90

Tabela 20. Parametry zmienne oraz wartość molowego współczynnika absorpcji dla trzech przypadków doświadczalnych.....	93
Tabela 21. Porównanie otrzymanej wartości przekroju czynnego ClO_2 z wartościami przedstawionymi w literaturze.....	93
Tabela 22. Stabilność wybranych surfaktantów w środowisku NaClO_2 oraz kwasu cytrynowego.	96
Tabela 23. Stabilność wybranych zagęstników w środowisku NaClO_2 oraz kwasu cytrynowego.	97
Tabela 24. Porównanie założonych i rzeczywiście uzyskanych stężeń ClO_2 w roztworach otrzymanych produktów.....	98
Tabela 25. Parametry fizykochemiczne uzyskanych preparatów przed (aktywator i prekursor) i po aktywacji (wg Tabeli 24).....	99
Tabela 26. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 Ultraczystry w warunkach czystych w czasie kontaktu 5 min.....	103
Tabela 27. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 MD w warunkach czystych w czasie kontaktu 5 min.....	104
Tabela 28. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 MD w warunkach brudnych w czasie kontaktu 5 min.....	105
Tabela 29. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 foam w warunkach brudnych w czasie kontaktu 5 min.....	106
Tabela 30. Stopnie redukcji w badaniach skuteczności biobójczej dla produktu Armex 5 WC w warunkach brudnych w czasie kontaktu 5 min.....	107
Tabela 31. Limity dla prób kontrolnych w normach zawiesinowych (EN 13727, 2015; EN 14476, 2019).....	110
Tabela 32. Limity dla prób kontrolnych w normie nośnikowej z udziałem czynnika mechanicznego (EN 16615, 2015).	110
Tabela 33. Limity dla prób kontrolnych w normach nośnikowych bez udziału czynnika mechanicznego (EN 16777, 2019; EN 17387, 2021).....	111
Tabela 34. Limity dla prób kontrolnych w normie nośnikowej dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną (EN 17272, 2020).	111
Tabela 35. Parametry toksyczności dla ClO_2 udostępnione przez ECHA (ECHA, 2004).	112
Tabela 36. Wartości toksyczności ostrej ATE_{mix} dla uzyskanych preparatów na bazie ClO_2	113

Tabela 37. Wartości procentowe klasyfikacji w kategorii toksyczności ostrej oraz przewlekłej dla środowiska wodnego dla uzyskanych preparatów na bazie ClO ₂	113
Tabela 38. Wyniki testów mikrobiologicznych dezynfekcji maseczek ochronnych prowadzonych na paskach wskaźnikowych.	115
Tabela 39. Opis podstawowych sygnałów IR widm przedstawionych na Rysunkach 50 i 52.	118
Tabela 40. Wyniki testów mikrobiologicznych dezynfekcji fartuchów RTG prowadzonych na paskach wskaźnikowych.	122
Tabela 41. Opis podstawowych sygnałów IR widm przedstawionych na Rysunkach 61 i 65.	124

11. Spis rysunków

Rysunek 1. A – geometria cząsteczki ClO ₂ ; B – struktury rezonansowe ujawniające elektronem. Wykonanie własne na podst. (Insignares-Carrione, et al., 2021).	19
Rysunek 2. Przewidywana wartość rynkowa ditlenku chloru w wybranych obszarach zastosowania. Wykonanie własne na podst. (GMI, 2021).	21
Rysunek 3. Metody oznaczania ClO ₂	22
Rysunek 4. Rurki detekcyjne do oznaczania gazowego ClO ₂ . Wykonanie własne na podst. (Sensidyne, 2023).	24
Rysunek 5. Oporność patogenów na biocydy. Wykonanie własne na podst. (Mc Donnell & Burke, 2011).	25
Rysunek 6. Liczba ognisk zakażeń szpitalnych w latach 2006-2022. Wyniki bez zakażeń SARS-CoV-2 (GIS, 2023).	26
Rysunek 7. Procentowy udział wybranych patogenów wywołujących ogniska epidemiczne w 2022 roku (GIS, 2023).	26
Rysunek 8. Schemat zakresu prac wykonanych w ramach pracy doktorskiej.	32
Rysunek 9. Tytrator woltamperometryczny TitraLab AT 1000 Series.	34
Rysunek 10. Spektrofotometr UV-VIS U-2900.	37
Rysunek 11. Szkic układu pomiarowego.	39
Rysunek 12. A – komora dekontaminacyjna; B – detektor PortaSens III.	43
Rysunek 13. Schemat wiskozymetru kapilarnego Ubbelohde’a.	51
Rysunek 14. Schemat procedury badań zawiesinowych. Wykonanie własne na podst. (EN 13727, 2015).	55
Rysunek 15. Efekt cytotacyjny komórek gospodarza przed (A) i po (B) narażeniu na Poliowirusa. Własność firmy VIROXY Labs (Firma Viroxy Labs, 2022).	58
Rysunek 16. Powierzchnia do badania wg normy EN 16615. Wykonanie własne na podst. (EN 16615, 2015).	60
Rysunek 17. Schemat procedury badania wg normy 16615. Wykonanie własne na podst. (EN 16615, 2015).	61
Rysunek 18. Schemat procedury badania kontroli suszenia wg normy EN 16615. Wykonanie własne na podst. (EN 16615, 2015).	62

Rysunek 19. Dyski stalowe o średnicy $d=2$ cm, do badań nośnikowych bez udziału czynnika mechanicznego z naniesionym produktem do badania (EN 17387, 2021).	64
Rysunek 20. Generator gazowego ClO_2 typu MEX-5/10 firmy MEXEO.	67
Rysunek 21. Sposób rozmieszczenia nośników w pomieszczeniu badawczym podczas dezynfekcji powierzchni drogą powietrzną.	67
Rysunek 22. Schemat procedury badania wg normy E 17272. Wykonanie własne na podst. (EN 17272, 2020).	68
Rysunek 23. Spektrometr FTIR z przystawką ATR.	74
Rysunek 24. A – maseczka LXD-03V poddana badaniu; B – fragment rozciętej maseczki, w której umieszczono kopertę z paskiem wskaźnikowym; C – koperta z paskiem wskaźnikowym zawierającym spory <i>B. atrophaeus</i>	75
Rysunek 25. Układ badawczy z eksykatorem pełniący rolę komory dezynfekcyjnej.	75
Rysunek 26. Warstwy maseczki ochronnej poddane badaniu FTIR.	77
Rysunek 27. Sposób rozmieszczenia wskaźników biologicznych na powierzchni fartucha.	78
Rysunek 28. Zdjęcia fragmentu fartucha RTG z uwidocznionymi warstwami funkcjonalnymi	79
Rysunek 29. Procent odzysku ClO_2 oznaczonego metodą woltamperometryczną w obecności surfaktantów:.....	84
Rysunek 30. Procent odzysku ClO_2 oznaczonego metodą woltamperometryczną w obecności przyspieszaczy aktywacji.	84
Rysunek 31. Krzywa zależności absorbancji od stężenia serii roztworów ClO_2	85
Rysunek 32. Krzywa kalibracyjna spektrofotometrycznej metody oznaczania ClO_2 w roztworach wodnych poprzez pomiar bezpośredni przy $\lambda=358,5$ nm.	86
Rysunek 33. Widma absorpcyjne UV czystego roztworu ClO_2 oraz 1% roztworów przykładowych surfaktantów.	86
Rysunek 34. Widma absorpcyjne UV wodnego roztworu ClO_2 oraz 1% roztworów przykładowych przyspieszaczy aktywacji.	87
Rysunek 35. Wykres zależności stężenia ClO_2 w roztworze wodnym po desorpcji ClO_2 od stężenia początkowego ClO_2	89
Rysunek 36. Wykres zależności bilansowego stężenia ClO_2 w fazie gazowej od stężenia ClO_2 w fazie ciekłej (opis krzywych w tekście).	90
Rysunek 37. Widma UV fazy gazowej nad roztworami ClO_2	91

Rysunek 38. Krzywe zależności absorbancji fazy gazowej nad roztworem ClO ₂ ($\lambda = 351$ nm) od stężenia początkowego oraz końcowego ClO ₂	92
Rysunek 39. . Krzywa zależności absorbancji fazy gazowej nad roztworem ClO ₂ ($\lambda = 351$ nm) od bilansowego stężenia ClO ₂ w fazie gazowej.....	92
Rysunek 40. Wykres zależności stężenia początkowego roztworu od jego objętości oraz stężenia równowagowego ClO ₂ w fazie gazowej.....	94
Rysunek 41. Wykres zależności stężenia gazowego ClO ₂ (odczyt z detektora PortaSens III) w komorze dekontaminacyjnej od czasu.....	95
Rysunek 42. Porównanie wartości stężeń gazowego ClO ₂ w komorze dekontaminacyjnej uzyskanych empirycznie i założonych teoretycznie.....	95
Rysunek 43. Widma UV-VIS roztworów ClO ₂ otrzymanych produktów.....	98
Rysunek 44. Wykres zależności stopnia redukcji dla S. aureus od stężenia ClO ₂ w powietrzu przy wilgotności powietrza 55-58% i >70% w czasie kontaktu 60 min.....	108
Rysunek 45. Wyniki badań skuteczności wg normy EN 17272 dla produktu Armex 5 vH wobec bakterii, grzybów drożdży i wirusów	109
Rysunek 46. Wyniki badań skuteczności wg normy EN 17272 dla produktu Armex 5 vH wobec prątków i spor.....	109
Rysunek 47. Wykres zależności stężenia początkowego roztworu od jego objętości oraz stężenia równowagowego ClO ₂ w fazie gazowej.....	114
Rysunek 48. Porównanie wartości stężeń gazowego ClO ₂ w komorze dekontaminacyjnej uzyskanych empirycznie i założonych teoretycznie.....	115
Rysunek 49. Obserwacja zmiany barwy pożywki w procesie dezynfekcji maseczek ochronnych dla stężenia 200-4000 ppm wag. ClO ₂ w czasie.....	116
Rysunek 50. Widmo FTIR-ATR warstwy nr 1 maseczki ochronnej od strony zewnętrznej.	116
Rysunek 51. Widmo referencyjne polipropylenu (Nicodom IR Libraries, 2012).	117
Rysunek 52. Widmo FTIR-ATR warstwy nr 2 maseczki ochronnej od strony zewnętrznej.	117
Rysunek 53. Widmo referencyjne polietylenu (Nicodom IR Libraries, 2012).	117
Rysunek 54. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 1 maseczki ochronnej.....	118
Rysunek 55. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 2 maseczki ochronnej:	119
Rysunek 56. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 3 maseczki ochronnej:	119
Rysunek 57. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 4 maseczki ochronnej:	119
Rysunek 58. Zestawienie widm FTIR warstwy nr 5 maseczki ochronnej.....	120

Rysunek 59. Porównanie wartości stężeń gazowego ClO ₂ w komorze dekontaminacyjnej uzyskanych empirycznie i założonych.....	121
Rysunek 60. . Obserwacja zmiany barwy pożywki w procesie dezynfekcji fartuchów RTG dla stężenia 200 – 1000 ppm wag. ClO ₂	122
Rysunek 61. Widma FTIR-ATR zewnętrznej warstwy tkaninowej materiału badanego fartucha.	123
Rysunek 62. Widmo referencyjne Poliamidu 6 (Nicodom IR Libraries, 2012).....	123
Rysunek 63. Widma FTIR-ATR materiału powłoki naniesionej na tkaninę czerwoną i niebieską od strony wewnętrznej.	124
Rysunek 64. Zestawienie widm FTIR czerwonej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:..	125
Rysunek 65. Zestawienie widm FTIR poliuretanowej powłoki czerwonej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:	125
Rysunek 66. Zestawienie widm FTIR niebieskiej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:	126
Rysunek 67. Zestawienie widm FTIR poliuretanowej powłoki niebieskiej warstwy tkaninowej materiału fartucha RTG:	126
Rysunek 68. Zmiana barwy tkaniny fartucha RTG pod wpływem ekspozycji na gazowy ClO ₂ (1500 ppm, 4 h)..	127

ZAŁĄCZNIKI

Załączniki do rozprawy doktorskiej umieszczone są na nośniku pamięci CD.

ZAŁĄCZNIK 1:

Oznaczanie spektrofotometryczne ClO_2 w roztworach wodnych – barwniki spektrofotometryczne

DODATEK

Wykaz dorobku naukowego

Publikacje:

1. **Augustyn W.**, Chruściel A., Hreczuch W., Kalka J., Tarka P., Kierat W.: *Inactivation of spores and vegetative forms of Clostridioides difficile by chemical biocides: mechanisms of biocidal activity, methods of evaluation, and environmental aspects*, International Journal of Environmental Research and Public Health, Vol. 19, 2022, art. No 750: 1-17.
2. Kierat W., **Augustyn W.**, Koper P., Pawlyta M., Chruściel A., B. Wyrwol: *The use of UVC irradiation to sterilize filtering facepiece masks limiting airborne cross infection*, International Journal of Environmental Research and Public Health, Vol. 17, 2020, No 20.
3. Hreczuch W., Tarka P., Chruściel A., **Augustyn W.**: *Inaktywacja SARS-CoV-2 poprzez dezynfekcję powietrza gazowym ditlenkiem chloru w obecności ludzi*, Forum Zakażeń, Vol 11, 2020, No 4: 193-199.
4. Chruściel A., Hreczuch W., **Piontek W.**, Szumigaj-Tarnowska J.: *Chemical stability of chlorine dioxide in the presence of prochloraz manganese*, Plant Protection Science, Vol. 55, 2019, No 3: 222-227.
5. Fiutkowska A., **Piontek W.**, Janik J., Materna K.: *Aktywność powierzchniowa i właściwości zwilżające polioksyalkilenowanych pochodnych 2-etyloheksanolu*, Przemysł Chemiczny, Vol. 97, 2018, No 12: 2010-2013.

Wystąpienia konferencyjne:

1. **Augustyn W.**, Chruściel A., Kalka J., Hreczuch W.: XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2020, 24-27 września 2020, Lublin, Organizator: Fundacja Tygiel, Tytuł wystąpienia: *Ditlenek chloru w obliczu zakażeń szpitalnych – od pomysłu do wdrożenia*, Forma wystąpienia: abstrakt, referat.
2. **Augustyn W.**, Chruściel A., Kalka J., Hreczuch W.: XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2020, 24-27 września 2020, Lublin, Organizator: Fundacja Tygiel, Tytuł wystąpienia: *Specjacyjne metody oznaczania ditlenku chloru w roztworach wodnych*, Forma wystąpienia: abstrakt, poster.
3. **Piontek W.**, Kalka J., Chruściel A., Tarka P., Hreczuch W.: X Ogólnopolska Konferencja Hydromikrobiologiczna, Hydromicro 2019: 20 lat hydromikrobiologii – dokonania i perspektywy, 9-11 czerwca 2019, Toruń, Organizator: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Tytuł wystąpienia: *Perspektywy rozwoju metod kontroli środowiska dla najbardziej opornych mikroorganizmów patogennych w obszarach medycznych*, Forma wystąpienia: abstrakt; poster.

-
- 4. Piontek W., Kalka J., Chruściel A., Tarka P., Hreczuch W.:** Konferencja Młodych Naukowców nt. Nowe Wyzwania Dla Polskiej Nauki IV Edycja, 8 grudnia 2018, Wrocław. Organizator: Creativetime, Tytuł wystąpienia: *Ditlenek chloru w innowacyjnych układach funkcjonalnych w obszarze zastosowań dezynfekcyjnych*, Forma wystąpienia: abstrakt, referat. Uzyskanie wyróżnienia za wygłoszony referat.