



Warszawa, 11 stycznia 2017

Nowy typ monitoringu dostarczy informacji o życiu... bakterii w mikrokroplach

W przyszłości testy nowych leków na bakteriach będzie można przeprowadzać znacznie wydajniej, za pomocą układów mikroprzepływowych. Każda z setek i tysięcy przemieszczających się mikrokanalikami kropelek może bowiem pełnić rolę odrębnego inkubatora. Dotychczas nie istniała jednak szybka i dokładna metoda oceny warunków tlenowych panujących w poszczególnych mikrokroplach. Tę kluczową przeszkodę pokonali naukowcy z Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

Nie rzędy wielkich zbiorników przemysłowych, nie półki zastawione probówkami i zlewkami. Przyszłość chemii i biologii jest dla oka ledwie widoczna: to setki i tysiące mikrokropelek, sunących cieniutkimi kanalikami układów mikroprzepływowych. Na świecie trwa wyścig ku technologiom pozwalającym prowadzić w mikrokroplach kontrolowane doświadczenia chemiczne i biologiczne. W Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (IChF PAN) w Warszawie po raz pierwszy zademonstrowano metodę zdalnej, a jednocześnie szybkiej i precyzyjnej oceny zużycia tlenu przez drobnoustroje żyjące w poszczególnych mikrokroplach.

„Układy do hodowania bakterii w mikrokroplach mają szansę zrewolucjonizować prace nad nowymi antybiotykami czy badania nad mechanizmami odpowiedzialnymi za nabywanie lekooporności przez bakterie. W jednym, małym układzie mikroprzepływowym można bowiem zmieścić kilkaset, a nawet kilka tysięcy mikrokropelek – i w każdej realizować inny eksperyment, np. z różnymi gatunkami drobnoustrojów i przy różnych stężeniach antybiotyku w każdej kropli”, opisuje prof. dr hab. Piotr Garstecki (IChF PAN), po czym wyjaśnia: „Żeby takie badania były możliwe, bakteriom trzeba zapewnić warunki do rozwoju nawet przez kilka tygodni. Niezwykle ważna staje się więc wiedza o przepływie tlenu do kropelek i tempie jego konsumpcji przez mikroorganizmy. W naszym najnowszym układzie demonstrujemy sposób na odczytywanie tej kluczowej informacji”.

Bioreaktory przyszłości to wodne kropelki z pożywką, unoszone w niemieszającej się z nimi cieczy nośnej (zwykle jest nią olej). W kanaliku układu mikroprzepływowego każda kropelka jest dłuższa niż szersza i niemal całkowicie wypełnia jego światło; tak dobrane rozmiary gwarantują, że krople nie zamieniają się w kanale miejscami i przez cały czas trwania eksperymentu można je będzie bez problemów identyfikować. Jednocześnie między każdą mikrokroplą a ściankami kanału trzeba cały czas zapewnić obecność cienkiej warstwy oleju. Bez niej bakterie miałyby bezpośredni kontakt ze ściankami kanału, mogłyby się na nich osadzać i przenosić z kropli do kropli. Niestety, gdy

mikrokropla jest nieruchoma, z czasem wypycha olej odgradzający ją od ścianek, co grozi ich kontaminacją. To dlatego krople muszą być utrzymywane w ciągłym ruchu – nawet tygodniami.

Rozwijające się bakterie potrzebują pożywki, a z ich otoczenia należy w odpowiednim tempie usuwać produkty przemiany materii. Informacja o przebiegu konsumpcji tlenu przez bakterie w poszczególnych kroplach ma więc kluczowe znaczenie dla działania mikrobioreaktorów.

„Od razu widać, w czym tkwi problem. W każdej z kilkuset znajdujących się w ruchu kropelek trzeba przeprowadzać pomiary z częstotliwością odpowiadającą częstotliwości podziałów bakterii lub większą, w praktyce przynajmniej raz na kwadrans. Dodatkowo pomiar nie może się wiązać z ingerencją w mikrokrople”, mówi doktorant Michał Horka (IChF PAN), jeden ze współautorów publikacji w czasopiśmie „Analytical Chemistry”.

Z pomocą warszawskim naukowcom pospieszyli chemicy z austriackiego Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry przy Graz University of Technology. Dostarczyli oni polimerowe nanocząstki z fosforyzującym barwnikiem, po pobudzeniu do świecenia emitujące światło tym dłużej, im większe jest stężenie tlenu w otaczającym je roztworze (nanocząstki te poddano w IChF PAN testom na bakteriach w celu ustalenia ich ewentualnej toksyczności, której nie stwierdzono).

Badania nad monitorowaniem zużycia tlenu w mikrokroplach rozpoczynano od przygotowania roztworu wodnego z bakteriami, pożywką i odpowiednią ilością nanocząstek. Mieszanie wstrzykiwano do układu mikroprzepływowego zbudowanego z wężyków połączonych za pomocą teflonowych kostek z odpowiednio ukształtowanymi kanalikami. Pierwsza kostka formowała krople o objętości ok. 4 mikrolitrów, które kierowano do nawiniętego na szpulę wężyka inkubacyjnego. W połowie jego długości umieszczono drugą kostkę, z detektorami do pomiaru tlenu i absorbancji.

„W części inkubacyjnej w jednej fazie cyklu kropelki płynęły w jedną stronę, w drugiej – w drugą, sterowane elektronicznie za pomocą odpowiednich zaworów elektromagnetycznych. Wszystko to wygląda na pozór dość prosto, ale w praktyce jednym z największych wyzwań było zapewnienie tak gładkiego przejścia między kostką detekcyjną a wężykiem, aby na połączeniach nie dochodziło do zanieczyszczenia bakteriami”, wyjaśnia doktorant Horka.

W trakcie podróży przez kostkę detekcyjną mikrokropelki przepływały pod czujnikiem optycznym mierzącym tzw. gęstość optyczną, czyli standardowy parametr służący do oceny liczby komórek (im więcej bakterii w kropli, tym mniej światła przez nią przechodzi). Z kolei pomiar czasu świecenia nanocząstek, pozwalający ocenić stężenie tlenu w mikrokropeli, realizowano za pomocą detektora optycznego Piccolo2, dostarczonego przez grupę austriacką. Detektor ten, wyglądem przypominający dużego pendrajwa, był podłączany bezpośrednio do złącza USB w komputerze sterującym. Zestawiając informacje z obu czujników badacze z IChF PAN wykazali, że skonstruowany przez nich układ mikroprzepływowy pozwala regularnie i szybko monitorować aktywność metaboliczną bakterii w poszczególnych mikrokroplach.

„Nasze testy przeprowadziliśmy zarówno z bakteriami pływającymi w wodzie pojedynczo – tak zachowują się popularne bakterie *Escherichia coli* – jak i z mającymi tendencję do zlepiania się w grudki – jak to jest w przypadku prątków gruźlicy czy należących do tej samej rodziny, a badanych przez nas *Mycobacterium smegmatis*. Ocena tempa konsumpcji tlenu przez oba gatunki drobnoustrojów okazała się nie tylko możliwa, ale i wiarygodna”, podkreśla doktorant Artur Ruszczak (IChF PAN).

Wyniki badań, finansowanych z europejskich grantów ERC Starting Grant (strona polska) i Marii Skłodowskiej-Curie (strona austriacka), to ważny etap w procesie budowy w pełni funkcjonalnych układów mikroprzepływowych do prowadzenia wielotygodniowych eksperymentów biologicznych. Układ do hodowli bakterii w mikrokroplach powstał w IChF PAN już kilka lat temu, był jednak wykonany w płytce poliwęglanowej. Maksymalne rozmiary płytki nie przekraczały tu 10 cm, co znacznie ograniczało liczbę kropelek; na dodatek wskutek oddziaływania z poliwęglanem już po czterech dniach dochodziło do zanieczyszczenia kanałów bakteriami. Układy z kostek teflonowych i wężyków byłyby pozbawione tych wad i nadawałyby się już do praktycznych zastosowań.

Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk (<http://www.ichf.edu.pl/>) został powołany w 1955 roku jako jeden z pierwszych instytutów chemicznych PAN. Profil naukowy Instytutu jest silnie powiązany z najnowszymi światowymi kierunkami rozwoju chemii fizycznej i fizyki chemicznej. Badania naukowe są prowadzone w dziewięciu zakładach naukowych. Działający w ramach Instytutu Zakład Doświadczalny CHEMIPAN wdraża, produkuje i komercjalizuje specjalistyczne związki chemiczne do zastosowań m.in. w rolnictwie i farmacji. Instytut publikuje około 200 oryginalnych prac badawczych rocznie.

KONTAKT:

prof. dr hab. **Piotr Garstecki**
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie
tel.: +48 22 3432233
email: pgarstecki@ichf.edu.pl

PUBLIKACJE NAUKOWE:

„Lifetime of phosphorescence from nanoparticles yields accurate measurement of concentration of oxygen in microdroplets and allows to monitor the metabolism of bacteria”; M. Horka, S. Sun, A. Ruszczak, P. Garstecki, T. Mayr; Analytical Chemistry, 2016;
DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03758

POWIĄZANE STRONY WWW:

<http://www.ichf.edu.pl/>
Strona Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

<http://www.ichf.edu.pl/press/>
Serwis prasowy Instytutu Chemii Fizycznej PAN.

<http://www.ichfdlafirm.pl/>
Oferta Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk skierowana do przedsiębiorców i przemysłu.

MATERIAŁY GRAFICZNE:

ICHF170111b_fot01s.jpg HR: http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170111b_fot01.jpg
W Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie zademonstrowano metodę szybkiej i precyzyjnej oceny zużycia tlenu przez drobnoustroje w mikrokroplach. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)

ICHF170111b_fot02s.jpg HR: http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170111b_fot02.jpg
Fragment układu mikroprzepływowego zbudowanego z wężyków i kostek teflonowych. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)

ICHF170111b_fot03s.jpg HR: http://ichf.edu.pl/press/2017/01/ICHF170111b_fot03.jpg
Potencjalnie każda mikrokropla płynąca kanałkami układu mikroprzepływowego może pracować jako odrębny bioreaktor. (Źródło: IChF PAN, Grzegorz Krzyżewski)