



Warszawa, 25 października 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Natalii Pacochy

pt.: “High-throughput and precise methods for bacteria counting, identification and antibiotic susceptibility testing”,

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego oraz dr Ott Shelera
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Pani mgr Natalia Pacocha ukończyła studia licencjackie i magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Następnie swoją drogę kształcenia kontynuowała realizując program studiów podyplomowych na Politechnice Warszawskiej w zakresie inżynierii oraz technologii chemicznej i procesowej. Obecnie jest asystentem w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, a efektem jej badań prowadzonych w latach 2015-2021 jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt.: „**High-throughput and precise methods for bacteria counting, identification and antibiotic susceptibility testing**” wykonana pod opieką **prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego oraz dr. Ott Shelera**. Rozprawa doktorska Pani Natalii Pacochy napisana jest w języku angielskim i obejmuje dorobek naukowy, na który składają się trzy opublikowane artykuły naukowe w renomowanych czasopismach międzynarodowych. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej wiodący udział w powstawaniu tych prac. Jeden z artykułów, w którym Doktorantka będzie pierwszym autorem (także z zakresu ocenianej pracy doktorskiej) jest obecnie w przygotowaniu. Ponadto, Pani Natalia Pacocha jest również współautorką jednego artykułu spoza tematyki przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej. W czasie studiów doktoranckich Pani Pacocha prowadziła badania w ramach czterech projektów badawczych, odbyła trzy staże zagraniczne w renomowanych ośrodkach naukowych (Uniwersytet Harvarda, Uniwersytet we Florencji, Uniwersytet Wiedeński).

Recenzowana praca doktorska dotyczy opracowania, bądź udoskonalenia mikroprzepływowych technik analizy populacji bakterii z uwzględnieniem następujących operacji jednostkowych: zliczanie, identyfikacja, detekcja wzrostu oraz badanie wrażliwości na leki antybakteryjne. Doktorantka wykorzystywała w badaniach trzy typy mikrosystemów

przepływowych z układem generowania strumieni kropeł o nanolitrowych objętościach. Opracowane mikrosystemy wykonano w technologii hybrydowej (PDMS/szkło), wykorzystując technikę mikrofrezowania do wytwarzania form do replikacji mikrostruktur polimerowych z odpowiednimi geometriami mikrokanalów. Konstrukcje te wpisują się w obszar niezwykle szybko rozwijającej się i znajdującej zastosowanie np. w wysokoprzepustowej mikrobioanalityce - tzw. mikrofluidyki kroplowej (ang. *droplet microfluidics*), w której grupa prof. Garsteckiego jest niekwestionowanym liderem.

Rozprawa doktorska Pani Natalii Pacochy napisana jest w języku angielskim, obejmuje 117 stron, w obrębie których Doktorantka wyszczególniła cztery główne rozdziały. Po krótkich streszczeniach w języku polskim i angielskim, Autorka, wprowadza czytelnika w obszar biologii i badań bakterii, wyjaśnia i omawia sposoby zliczania bakterii, ich feno- i genotypowania oraz charakteryzuje różne techniki badania antybiotykooporności. Drugą część przeglądu literaturowego, przygotowanego przez Doktorantkę, stanowi zbiór informacji dotyczących podstaw mikrofluidyki kroplowej oraz wykorzystania mikroukładów kroplowych z różnymi technikami detekcji sygnału do badań bakterii, a w szczególności ich zliczenia, identyfikacji, antybiotykooporności i określenia heterooporności subpopulacji. Ten 35-cio stronicowy wstęp, oparty o 184 cytowane pozycje literaturowe, zawiera syntetyczne kompendium wiedzy z zakresu przygotowanej przez Doktorantkę rozprawy. Ułatwia to znacznie czytelnikowi późniejsze śledzenie wyników badań prowadzonych przez Autorkę w ramach czterech spójnych tematycznie projektów. Tą część pracy czyta się bardzo dobrze, a śledząc niektóre rysunki już na pierwszy rzut oka widać, że Doktorantka ma zamiłowanie także do rysunku. Wszystkie „odręcznie” przygotowane rysunki są czytelne i świetnie obrazują realizowane procedury eksperymentalne. Niestety szata graficzna recenzowanej rozprawy zarówno w części literaturowej, jak i w części przedstawiającej wyniki badań ma też swoją ciemną stronę. Na pozór sprytny pomysł Doktorantki, żeby część informacji i uzyskanych wyników zilustrować gotowymi rysunkami/wykresami z wybranych publikacji, okazał się nie do końca trafiony. Rozumiem, że młodzi badacze, także Pani Pacocha, z entuzjazmem podążają ze światowymi trendami, wśród których bez wątplenia można wskazać:

- **ekologię** – praca jest syntetyczna - to dobrze! ponieważ oszczędzamy papier, a przy okazji czas i oczy recenzentów;

- oraz **miniaturyzację**, tu niektórzy (w tym także Doktorantka) zapędzają się trochę za daleko. Miniaturyzacja może bowiem dotyczyć tylko uzasadnionych konstrukcji, procedur, narzędzi badawczych, lecz nie powinna obejmować elementów graficznych takich jak czcionki, schematy, czy wykresy, co w przypadku pracy Doktorantki miało niestety miejsce. I tak, z racji funkcji recenzenta, muszę wskazać na rysunki nr 9a, 14, 21b, 32b i c, 45a, 48a, które są praktycznie nieczytelne oraz wszystkie geometrie mikroukładów przepływowych, na których z trudem można zauważyć interesujące niuansy konstrukcji. Rozwiązania problemu czytelności mikroczonek i

mikrowykresów zamieszczonych przez Autorkę, w pracy z zakresu nomen omen miniaturyzacji, można zaproponować dwa. Pierwsze, niestety wbrew ekologii, powiększyć rysunki, co wiązało by się z byciem „nieeko”, po drugie - opracować, kolejny, być może miniaturowy system powiększający rysunki z pracy, który stanowiłby jej integralną część, na co, jak rozumiem, nie starczyło czasu Doktorantce. Zatem, do obserwacji szczegółów na wymienionych rysunkach posłużyłem się, znanym od lat, przyrządem optycznym w skali makro – mianowicie lupą.

W dalszej części pracy (po wprowadzeniu literaturowym) spodziewałem się podsumowania, z którego wynikałyby logiczne cele i tezy przygotowywanej pracy uwzględniające elementy nowości prowadzonych badań i opracowywanych przez Autorkę procedur usprawniających badania materiału biologicznego jakim są bakterie. Niestety takiej części/fragmentu czy rozdziału w recenzowanej pracy nie znalazłem. W związku z tym na publicznej obronie tej rozprawy oczekiwałem od Pani Natalli Pacochy wyraźnego sformułowania celów i tez swojej rozprawy oraz w końcowej części prezentacji wskazania również najważniejszych elementów nowości naukowej, które zawiera praca. Ułatwi to w znacznym stopniu prace komisji ds. postępowania w przewodzie doktorskim Kandydatki.

Kolejną część pracy stanowi rozdział poświęcony wykorzystanym materiałom, aparaturze i procedurom eksperymentalnym wykorzystywanym przez Doktorantkę. Mimo swojego kompaktowego i zwięzłego charakteru, rozdział ten zawiera elementy, które wymagałyby jednak bardziej precyzyjnego wyjaśnienia. Doktorantka dość lakonicznie przedstawia szczegóły konstrukcyjne stosowanych mikrosystemów, będących przecież jej podstawowym narzędziem umożliwiającym wysokoprzepustowe badania bakterii. Nie precyzuje czy to ona była autorką projektów geometrii tych konstrukcji, nie podaje informacji dlaczego poszczególne elementy struktur mikroprzepływowych miały określone wymiary, nie komentuje co by się stało gdyby te wymiary były inne niż podane w pracy.... Informacji tych nie znalazłem również w części poświęconej dyskusji otrzymanych wyników. W związku z tym poprosiłem Doktorantkę o komentarz w tej sprawie w czasie obrony pracy. W rozdziale tym brakuje także informacji na temat zaprojektowanych sekwencji wyszczególnionych primerów i sond stosowanych w reakcji PCR – czy odczynniki te były zaprojektowane przez Doktorantkę?

W rozdziale 3 Pani Pacocha omawia wyniki uzyskane w ramach czterech projektów badawczych w których brała udział oraz wskazuje artykuły naukowe, w których były one opublikowane, co niewątpliwie jest wygodne dla dociekliwych czytelników. Przedstawiając wyniki badań, Autorka używa pierwszej osoby liczby mnogiej: opracowaliśmy, zaprojektowaliśmy, przeprowadziliśmy pomiary etc. O ile do końcowego raportu z projektu badawczego, lub publikacji naukowej zabieg ten jest w pełni uzasadniony, to w przypadku pracy doktorskiej, która ma tak naprawdę pokazać czego dokonał doktorant w czasie wielu lat swojej ciężkiej pracy, forma ta sprawia swoisty kłopot (szczególnie recenzentowi) w ocenie wkładu pracy Doktorantki w realizację tych projektów. W trakcie publicznej obrony pracy oczekiwałem więc od Autorki doprecyzowania

tych informacji. Nie mniej jednak, wszystkie cztery projekty, które we współpracy z innymi naukowcami zrealizowała Pani Natalia Pacocha uważam za niezwykle ciekawe i wartościowe z punktu widzenia nowoczesnej mikrobioanalitiky i badań lekooporności bakterii, która staje się przyczyną coraz większej ilości zgonów na świecie oraz pozostaje ogromnym wyzwaniem dla ośrodków naukowych opracowujących nowe leki przeciwbakteryjne. Na każdym etapie pracy Doktorantki dostrzec można bardzo pomysłowe i innowacyjne podejście do rozwiązania problemu czasochłonności konwencjonalnych badań prowadzonych na bakteriach. I tak zarówno dla mikroukładu/techniki ddCFU, jak i dddPCR oraz mikrosystemu z podwójnym układem detekcji optycznej, który uważam za najciekawszy w recenzowanej pracy, wskazać można parametry (czas analizy, precyzję, powtarzalność, selektywność względem konkretnego szczepu bakterii), które są praktycznie nie do osiągnięcia z wykorzystaniem konwencjonalnych procedur. Na uwagę zasługują m.in.: (i) szeroki zakres dynamiczny, w którym za pomocą techniki ddCFU można zliczać bakterie; (ii) jednoczesne liczenie i identyfikacja bakterii bez izolowania konkretnych szczepów (system dddPCR);(iii) brak konieczności stosowania znaczników fluorescencyjnych do śledzenia wzrostu bakterii i określenie subpopulacji tych samych szczepów, które wykazują zwiększoną lekooporność (system z podwójnym układem detekcji); (iv) wysoką przepustowość badań – ponad 1200 kropeł/s w przypadku śledzenia wzrostu bakterii w objętościach rzędu nl. Jako niezwykle wartościowe w tej części rozprawy uważam krytyczne podejście Doktorantki do poszczególnych konstrukcji. W każdym przypadku Autorka pisze także o ograniczeniach opracowanej metodyki/procedury: np. konieczności stosowania kilku dodatkowych operacji w przypadku mniejszych stężeń bakterii, konieczności projektowania primerów i sond dedykowanych poszczególnym szczepom bakterii, wymogu precyzyjnego ogniskowania światła laserowego w trzecim mikrosystemie, dla którego ograniczeniem jest także stosowanie bakterii trudnych w hodowli i charakteryzujących się nitkowatym fenotypem. Pani Pacocha trafnie komentuje również niższą precyzję wyników pomiarów heterogeniczności subpopulacji dla *S. aureus* SH1000, wynikającą z mniejszej stabilności zawiesiny kropli, która najprawdopodobniej spowodowana jest tendencją tego szczepu do tworzenia agregatów i ich charakterystycznego fenotypu.

Za bardzo interesujące uważam zaproponowanie modyfikacji profilu i cykli temperaturowych dla reakcji PCR, która przyniosła niezwykłą poprawę w jakości uzyskiwanych wyników. Ciekawy jestem dlaczego miało to tak znaczący wpływ? Zachęcałbym także Doktorantkę do pochwalenia się na obronie wynikami pomiarów uzyskanych za pomocą mikrosystemu z podwójnym optycznym układem detekcji, w którym w trybie bezznacznikowym, jak i odbiciowym z bardzo dobrą korelacją zliczać można krople „pozytywne” i „negatywne” z bardzo wysoką częstotliwością. Na „mikrowykresach” tego zupełnie nie widać Moja ostatnia krytyczna uwaga dotyczy właściwie większości studentów i doktorantów, a tym samym niestety także Pani Natalii Pacochy. Młodzi badacze ulegają niepohamowanej pokusie łączenia punktów pomiarowych na wykresach liniami prostymi - w przypadku recenzowanej pracy są to wykresy 45c, 46b, 47, 48 b,c,d oraz 49c. Nie

skupiając się na szczegółach badań których one dotyczą, takie łączenie punktów liniami prostymi sugeruje liniowe zależności między parami punktów, co jest oczywiście błędne i znacznie utrudnia wnioskowanie o ogólnym charakterze wyznaczanych zależności.

Rozdział 4 to systematyczne podsumowanie zrealizowanych projektów – dobrze napisany, uwzględniający najważniejsze zalety opracowanych, bądź udoskonalonych technik, bardzo przydatny w śledzeniu ewolucji pomysłów Zespołu na zastosowanie systemów mikrokropelkowych w badaniach bakterii. Niestety analizując treść tego rozdziału recenzent także nie jest w stanie w pełni ocenić zakres prac za który odpowiedzialna była Doktorantka. A może wynika to po prostu z wrodzonej skromności Pani Natalii?

Poza wymienionymi niedociągnięciami, praca Pani Natalii Pacochy pod względem edycyjnym i językowym napisana jest bardzo dobrze. Znalazłem jedynie nieliczne przypadkowe powtórzenia i kilka literówek, wynikających najprawdopodobniej z tzw. „opatrzenia” się z przygotowywanym opracowaniem.

Podsumowując stwierdzam, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani Natalii Pacochy reprezentuje wysoki poziom naukowy, czego dowodem są artykuły opublikowane w czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) zawierające wyniki badań prowadzonych przez Doktorantkę. Stwierdzam także, że recenzowana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dn. 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r poz.1668 ze zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Natalii Pacochy do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Michał Chudy