

Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Pacochy
pt. High-throughput and precise methods for bacteria counting,
identification and antibiotic susceptibility testing
wykonanej w Instytucie Chemii Fizycznej PAN,
pod kierunkiem:
Promotor - Prof. dr hab. Piotr Garstecki
Promotor pomocniczy - dr Ott Scheller

Przedstawiona przez mgr Natalię Pacochę praca doktorska dotyczy wykorzystania mikroprzepływowych technik kropelkowych do badań mikrobiologicznych. W ramach przygotowania rozprawy powstały cztery artykuły, z których trzy zostały już opublikowane w renomowanych pismach o zasięgu globalnym, gdzie Pani Pacocha jest głównym (3 artykuły) lub drugim autorem (1 artykuł). Ponadto dorobek naukowy Doktorantki wzbogaca dodatkowy artykuł powiązany tematycznie z dysertacją, ale nie uwzględniony w niniejszej pracy. W trakcie realizacji badań Doktorantka uczestniczyła w dwóch projektach badawczych finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Praca dotyczy niezwykle istotnego zagadnienia związanego z zagrożeniem, jakie stanowią bakterie dla zdrowia człowieka. Szybkie rozprzestrzenianie się patogenów i nabywanie lekooporności stały się globalnym problemem. W grupie Prof. Garsteckiego od lat rozwijane są metody badawcze i diagnostyczne, które mogłyby być odpowiedzią na zagrożenia wywołane niebezpiecznymi bakteriami. Niniejsza praca czerpie z poprzednich doświadczeń, jednocześnie proponując oryginalne i nowatorskie systemy do „cyfrowej mikrobiologii”.

Jednym z głównych problemów w walce z bakteriami jest zbyt mała dostępność do szybkiej diagnostyki, która pozwoliłaby na wczesnym etapie zidentyfikować patogen i odpowiednio dostosować terapię tak, aby zoptymalizować użycie leków. Jest to istotne, aby zminimalizować skutki uboczne dla pacjenta oraz ograniczyć ryzyko rozwinięcia przez bakterie lekooporności.

Niniejsza praca wykorzystuje zalety kroplowych mikroprzepływów do ulepszenia lub stworzenia nowych metod pozwalających na liczenie, identyfikację, detekcję wzrostu oraz oznaczanie wrażliwości na leki. Zastosowanie wyrafinowanych technik enkapsulacji pojedynczych bakterii w pikolitrowych kroplach pozwoliło na zwiększenie przepustowości, a statystyczne algorytmy do analizy danych umożliwiły analizę populacji bakterii na poziomie pojedynczych komórek i badanie subpopulacji o zmiennej oporności.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z pięciu rozdziałów i liczy 117 stron.

Pierwszy rozdział zawierający wprowadzenie i przegląd literatury zawiera obszerny przegląd technik stosowanych w mikrobiologii oraz wyjaśnia najważniejsze pojęcia i koncepcje związane z charakterystyką bakterii. Oprócz tego omówione zostały również zastosowania układów mikroprzepływowych w badaniach bakterii.

Rozdział drugi opisuje materiały, sposób fabrykacji układów, użyte w pracy techniki pomiarowe oraz metody analizy danych.

Trzeci rozdział stanowi główną część pracy i opisane zostały w nim cztery projekty poświęcone czterem mikroprzepływowym rozwiązaniom realizującym analitykę mikrobiologiczną.

W pierwszym projekcie autorka zaproponowała usprawnioną metodę szacowania ilości bakterii w próbce. Dzięki zastosowaniu bibliotek kropelek z różnymi rozcieńczeniami próbki możliwe było zwiększenie zakresu dynamicznego i zmniejszenie liczby kropelek potrzebnych do analizy. Dzięki temu procedura liczenia bakterii została znacznie skrócona i zmniejszona została jej pracochłonność. Nowa metoda została porównana do standardowego zliczania bakterii na podstawie hodowli szalkowych. Otrzymane wyniki są porównywalne, chociaż Doktorantka zauważyła też pewne systematyczne odchylenie. Mimo że przyczyna tego odchylenia nie została definitywnie wyjaśniona, nie wpływa to na bardzo wysoką ocenę rozwijanej technologii, która wydaje się bardzo obiecująca. Doktorantka pokazała również, że powyżej opisana metoda zliczania

bakterii może być efektywnie użyta do określania, jak zmienia się liczba bakterii w czasie po podaniu substancji antybakteryjnej (tzw. Time Kill Analysis).

Drugi projekt poświęcony jest metodzie pozwalającej na jednoczesne liczenie oraz identyfikację bakterii. Zostało to osiągnięte dzięki zastosowaniu technologii „droplet digital PCR” do enkapsulowanych w kropelkach bakterii, a następnie zliczaniu kropel z wysokim i niskim sygnałem fluorescencji. Dzięki temu w odróżnieniu od standardowych metod nie trzeba było izolować materiału genetycznego ani kalibrować systemu. Porównanie ze standardową metodą polegającą na hodowli szalkowej wykazało bardzo dobrą zbieżność wyników. Ponadto ulepszona metoda wyróżnia się wysokim zakresem dynamicznym.

Trzeci projekt poświęcony był ulepszeniu detekcji bakterii w kropelkach poprzez wykorzystanie światła rozproszonego. Jest to o tyle istotne, że używanie fluorescencji wymaga odpowiedniego znakowania komórek, co ogranicza zakres bakterii, które mogą być w ten sposób wykrywane. Zaproponowana w pracy detekcja światła rozproszonego oraz autofluorescencji okazała się bardzo wszechstronną techniką. Użyty tutaj system pozwalał na jednoczesny pomiar sygnału fluorescencji oraz światła rozproszonego pod kątem 90 stopni względem wiązki wzbudzającej. System opisany w tej rozprawie pozwala na wykrywanie nieznakowanych bakterii w kropelkach z dużymi prędkościami (do 1.2 kHz). Układ został przetestowany na różnych szczepach bakterii, wykazując wysoką skuteczność, jak również przydatność do monitorowania wzrostu bakterii w kropelkach. Podobny system został z sukcesem użyty w kolejnym projekcie.

Czwarty, ostatni projekt został poświęcony charakteryzowaniu populacji bakterii z wysoką rozdzielczością. W tym celu zaproponowano analizę minimalnego stężenia inhibitującego pojedynczą komórkę przy użyciu wcześniej opracowanego detektora światła rozproszonego i fluorescencji. Wykonano szereg ciekawych badań, izolując wcześniej ze szczepu *Staphylococcus aureus* SH1000 subpopulację wyróżniającą się zmniejszoną wrażliwością na gentamicynę. Zastosowanie wcześniej opisanych metod kropelkowych pozwoliło na stworzenie charakterystyki reakcji pojedynczych bakterii na rosnące stężenie antybiotyku. Porównanie tych charakterystyk dla różnych subpopulacji wykazało znaczne różnice inhibitującego stężenia minimalnego. Co interesujące, jak pokazano w pracy, zastosowanie wcześniej opisanego detektora może być użyte do niezależnego zliczania dwóch gatunków bakterii w zmieszanej próbce. Wykorzystano tutaj w ciekawy sposób dwa kanały detekcyjne – dla światła rozproszonego i dla autofluorescencji oraz inną charakterystykę optyczną dwóch gatunków bakterii.

W czwartym rozdziale pracy opisano wnioski z dysertacji. Doktorantka opisała tutaj niewątpliwe atuty zaproponowanych metod analitycznych, ale pokazała też pewne braki i ograniczenia.

Praca jest sprawnie napisana. Na uwagę zasługują klarowne ilustracje. Dysertacja posiada również pewne mankamenty. Na przykład brak jest wstępnego akapitu opisującego cel i motywację w bardziej ogólnym kontekście. Pewne elementy zostały zbyt skrótowo opisane jak na przykład metodologia pomiarów intensywności przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Cenna byłaby również bardziej wnikliwa analiza wpływu agregacji bakterii na pomiary oraz na wspomnianą w pracy stabilność kropelek. W pracy razi zbyt częste używanie zaimka osobowego w formie mnogiej. O ile taka forma jest jak najbardziej właściwa w pracach zbiorowych, w dysertacji autor powinien skupić się na własnej działalności. Jak sugerują publikacje, w których Doktorantka jest głównym autorem, to ona była niewątpliwie wiodącym autorem wyników powstałych w ramach projektów, jednak bardziej właściwe byłoby jasne zadeklarowanie osobistego wkładu. Niemniej, efektywna praca jako wiodącego wykonawcy w interdyscyplinarnych grupach jest niewątpliwym atutem świadczącym o osiągnięciu odpowiedniego doświadczenia naukowego i organizacyjnego niezbędnego do kontynuacji bardziej samodzielnej działalności naukowej.

Pomimo pewnych mniej istotnych mankamentów, których część wskazałem powyżej, stwierdzam wysoki poziom naukowy zaprezentowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Pacochy. Dysertacja stanowi spójny opis, wieloetapowej pracy nad rozwijaniem szerokoprzepustowych systemów mikroprzepływowych do analizy mikrobiologicznej. Na wysoką ocenę pracy składa się również jej interdyscyplinarność polegająca na połączeniu między innymi zagadnień inżynierii mikroprzepływów, biotechnologii, analizy statystycznej. Ponadto na uwagę zasługuje fakt podjęcia się przez Doktorantkę tematyki oporności bakterii na antybiotyki, która jest obecnie niezwykle istotnym wyzwaniem globalnym.

Należy również zwrócić uwagę, że o oryginalności i nowatorstwie proponowanych rozwiązań oraz wysokiej wartości prezentowanej pracy świadczy przyjęcie jej rezultatów do publikacji w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr Natalii Pacochy, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora, określone w w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.).

W związku z przedstawioną wyżej pozytywną oceną całej pracy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o dopuszczenie mgr Natalii Pacochy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

PM Korczyński