

Data: 12/04/23

Autor: mgr Artur Ruszczak

Promotorzy: Prof. dr hab. Piotr Garstecki, Dr Ott Scheler

Promotor pomocniczy: Dr Ladislav Dersi

Tytuł: Usprawnienie testów mikrobiologicznych prowadzonych w kropelkach wody w oleju

W ciągu ostatnich 20 lat, wiele eksperymentów mikrobiologicznych zostało przeprowadzonych z zastosowaniem mikroprzepływów kropelkowych. Narzędzia, które stały się możliwe dzięki technikom mikroprzepływowym, otworzyły nowe sposoby szybkiego wykrywania infekcji, określania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, charakteryzowania populacji bakterii na poziomie pojedynczych komórek, zwiększania bogactwa taksonomicznego poprzez unikanie konkurencji między gatunkami lub badania oddziaływań bakterii w złożonych konsorcjach.

Podstawowym założeniem mikroprzepływów kropelkowych jest to, że każdą kroplę można traktować jako niezależny i izolowany bioreaktor. Łatwość generowania wielu mikroreaktorów w krótkim czasie pozwoliła na efektywne prowadzenie wielu niezależnych reakcji jednocześnie. Ta cecha jest szczególnie przydatna podczas badania populacji bakterii, ponieważ liczne reaktory zapewniają doskonałe statystyki i pozwalają na analizę pojedynczych komórek bakteryjnych.

Jednym ze ścisłych wymagań technicznych mikroreaktorów kropelkowych jest to, by ich powierzchnia stanowiła barierę dla transportu składników chemicznych między kropelkami. Wiarygodna ocena wzrostu kolonii bakteryjnych w pojedynczej kropli, ma miejsce wtedy, gdy barwniki stosowane do wykrywania wzrostu drobnoustrojów nie mogą migrować między kropelkami. Podobnie jest z badaniem środków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które wpływają na wzrost bakterii. Takie substancje muszą pozostać wewnątrz kropelek w stałym stężeniu, aby nie zakłócać wyników eksperymentu.

Niemniej jednak ostatnie badania naukowe donoszą o transporcie molekularnym między kropelkami, co rodzi bardzo istotne pytania dotyczące zgodności systemów opartych na kropelkach w zastosowaniach biologicznych. W niniejszej pracy przedstawiono problem transferu molekularnego w monodispersyjnych emulsjach na przykładzie śledzenia wycieku fluorescencyjnych barwników metabolicznych i niefluorescencyjnych antybiotyków.

Markery metaboliczne, to substancje powszechnie stosowane do szybkiej wizualizacji żywych bakterii w kropelkach. Jeden z najbardziej popularnych fluoroforów – resorufina posiada ograniczenia związane z jej szybkim wyciekiem z kropelek, co w konsekwencji zakłóca dokładny odczyt eksperymentu. Dodecylorozorufina (C12R) jest obiecującą alternatywą jako marker metaboliczny, ponieważ wykazuje mniejszy wyciek między kropelkami. Sygnał fluorescencyjny C12R jest bardziej stabilny w czasie, a stosunek sygnału do szumu jest wyższy. Eksperymenty

z zastosowaniem C12R wykazują większą dokładność, a odsetek wyników prawdziwie dodatnich i prawdziwie ujemnych jest wyższy niż w przypadku resorufiny. Dzięki większej precyzji testy kropelkowe C12R stwarzają nowe perspektywy do wysokowydajnych badań przesiewowych i badań mikrobiologicznych.

Transport molekularny między kropelkami można łatwo śledzić za pomocą modelowych fluoroforów. Niemniej jednak określenie wycieku substancji przeciwdrobnoustrojowych jest trudne do wykonania, przede wszystkim ze względu na ich słabą fluorescencję. W drugiej części pracy podjęto próbę znalezienia czynników chemicznych, które przyspieszają ucieczkę antybiotyków z kropelek. Model fizykochemiczny zaproponowany w tym badaniu przewiduje retencję antybiotyku w kropelkach na podstawie ich współczynnika podziału (X_{logP}) i ułamkowego polarnego pola powierzchni (fractional polar surface area). Model zweryfikowano przez monitorowanie hamowania wzrostu przez sąsiadujące kropelki z antybiotykiem. W wyniku tych badań lepsze zrozumienie, w jaki sposób drobne związki są zatrzymywane w emulsjach typu woda w oleju, pomoże w przyszłości zaprojektować kropelkowe testy antybiotykowe.