

Warszawa, 26.05.2023r

Dr hab. Sławomir Jakiela, prof. SGGW  
e-mail: slawomir\_jakiela@sggw.edu.pl  
tel.: +48 22 59 38626

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Artura Ruszczaka pt. **„Improvement of microbial assays in water-in-oil droplets”** wykonanej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w ramach międzynarodowych studiów doktoranckich.

Promotorzy: Prof. Dr hab. Piotr Garstecki i Prof. Ott Scheler

Promotor pomocniczy: Dr Ladislav Derzsi

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z: czterech rozdziałów podzielonych na podrozdziały, spisu treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów stosowanych w pracy, bibliografii, oraz dorobku naukowego Doktoranta - liczy 113 stron. Napisana została w języku angielskim i ubogacona wykresami, kolorowymi schematami, i rysunkami, a także tabelami. Styl pracy jest dobry, nieliczne są literówki, czy błędy gramatyczne.

Tematyka rozdziałów przedstawionych w pracy doktorskiej podzielona została na cztery części: 1 - wstęp i przegląd literaturowy, 2 – część doświadczalna opisującą badanie transportu markerów metabolicznych opartych na rezorufinie pomiędzy mikrokroplami, 3 – część doświadczalna opisującą transport środków przeciwdrobnoustrojowych (głównie antybiotyków) pomiędzy mikrokroplami, 4 – zawierająca podsumowanie otrzymanych wyników. Tematyka pracy doktorskiej ma charakter monotematyczny i dotyczy głównie transferu molekularnego substancji chemicznych z mikrokropel

---

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii  
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa  
+48 22 59 38611  
kfb@sggw.edu.pl  
www.sggw.edu.pl  
www.kf.sggw.pl

wytworzonych w układzie mikroprzepływowym i przechowywanych w małych probówkach typu eppendorf.

Praca ma w zasadzie układ klasycznego doktoratu, tzn. Autor definiuje dwa cele pracy (niestety nie w osobnym rozdziale, a na końcu rozdziału pierwszego), a następnie opisuje przeprowadzone badania w rozdziałach drugim i trzecim, by przedstawić zwięzłe podsumowanie w rozdziale czwartym. Rozdziały drugi i trzeci mają strukturę artykułu. Doktorant opisuje w nich ponownie swój cel, metodykę badań, przedstawia i omawia wyniki, oraz wyciąga odpowiednie wnioski. Obok części doświadczalnej praca doktorska zawiera przegląd literatury. Autor odnosi się w nim do 136 pozycji, z których większość została opublikowana w ostatnich 20 latach.

Opisane badania Doktoranta są podstawą dwóch recenzowanych publikacji, które ukazały się w czasopiśmie: *Analytical Chemistry* i *ACS Applied Materials & Interfaces*, oba o wysokim współczynniku wpływu.

### **Odnosnie części pierwszej – wstęp i przegląd literaturowy**

Pierwsza część stanowi wprowadzenie do tematyki badań jaką zajmuje się Doktorant. Opisane w tej części zostały początki i podstawowe założenia techniki mikroprzepływów dwufazowych. Następnie dokonano przeglądu wspomnianych technik pod kątem zastosowań w mikrobiologii, kładąc największy nacisk na badania nad antybiotykoodpornością bakterii. W tej części Pan mgr Artur Ruszczak przedstawia podstawowe wymagania dotyczące biokompatybilności środków powierzchniowo czynnych oraz opisuje ich wytwarzanie dla technik opartych na mikroprzepływach kropelkowych. Wstęp teoretyczny porusza również problem transferu molekularnego pomiędzy kroplami w emulsjach.

Niestety, w tej części pracy znalazł się również podrozdział opisujący cele rozprawy doktorskiej. Według recenzenta, tak ważna część powinna być przesunięta do odrębnego rozdziału. Ponadto Autor dość pobieżnie charakteryzuje problem transferu molekularnego pomiędzy kroplami tzw. wycieku. Recenzentowi brakuje omówienia wpływu środowiska chemiczno-fizycznego (oleje, środki powierzchniowo czynne i ich stężenie) na transfer molekularny pomiędzy kroplami.

### **Odnosnie części drugiej – część doświadczalna opisującą badanie transportu markerów metabolicznych opartych na rezorufinie pomiędzy mikrokroplami**

W części tej Autor opisuje badania nad rezorufiną - barwnikiem markerowym, który jest szeroko stosowany w różnych dziedzinach mikrobiologii. Pan Artur Ruszczak wskazuje na główny problem związanym z rezorufiną w układach mikrokropelkowych jakim jest wyciek barwnika do fazy olejowej jak i sąsiednich kropeł. Wspomniany transfer zmniejsza wydajność testów z powodu

uśrednienie sygnału między kroplami zawierającymi bakterie, a kroplami pustymi. Jako rozwiązanie wspomnianego problemu Doktorant sugeruje użycie dodecylorezarufiny (C12R). Otrzymane wyniki pokazują kompatybilność C12R z bakteriami Gram ujemnymi *E. coli* i *E. aerogenes*. Autor pokazał również, że C12R jest przydatny w przypadku dłuższego czasu hodowli bakteryjnej, a także wyraźnie przewyższa rezorufinę pod względem czułości i specyficzności i ma wyższy stosunku sygnału do szumu podczas eksperymentu.

Nieścisłości/pytania jakie pojawiają się w/do części drugiej:

- W rozdziale tym Autor nie jest spójny w swoich wnioskach. Najpierw pisze, że: „C12R is characterized by improved retention in droplets, which is ...” (str.50) , a następnie używa przeciwnego sformułowania by uzasadnić dłuższy czas potrzebny na inkubację bakterii w kroplach: „Moreover, dodecyloresazurin, with its strong nonpolar nature, can dissolve in a continuous phase, leading to its local decrease in the droplets. After escaping to the oil phase, dodecyloresazurin loses its fluorescent activity, so it can't be visualized.” (str.53)
- Również przy stwierdzeniu: „There were no significant differences in bacterial growth between the two tested molecules, as shown by a consistent rise in the GFP signal in droplets over time (Fig.18). Hence the negative impact of C12R on bacterial viability was ruled out.” (str.54) – oczekiwałbym, że Autor pokaże wykresy przeżywalności, bądź szybkości wzrostu bakterii, np. dla różnych stężeń rezorufiny i dodecylorezarufiny, i tak uzasadni wniosek o braku wpływu C12R na rozwój kolonii bakteryjnej. Doktorant pokazuje, że C12R ma inną czułość niż rezorufina, a także inną szybkość „ucieczki” z kropli (nie wiadomo jak zmienia się ona w czasie), ponadto kolonia bakterii wymaga dłuższego czasu inkubacji, dlatego trudno wyciągnąć taki wniosek tylko na podstawie znormalizowanej fluorescencji.
- Przy analizie przedstawionych wyników, nasuwa się również pytanie jak na transfer barwnika pomiędzy kroplami wpływa odległość pomiędzy nimi, a także wykorzystany w eksperymencie surfaktant? Czy w takim układzie – barwnik z kolonią bakteryjną w kropli – może występować zjawisko tworzenia się dwuwarstwy lipidowej pomiędzy kroplami?
- Zwykle stosunek sygnału do szumu (SNR) definiuje się jako stosunek amplitud lub mocy sygnału do szumu. Skąd pomysł, by przedstawić ten parametr jako stosunek median? Może lepiej definiować to jako stosunek median, zwłaszcza, że Pan mgr Artur Ruszczak nie pokazał, że sygnał definiowany jako tło zachowuje się jak szum – co w tym przypadku wydaje się Recenzentowi za mało prawdopodobne.

### **Odnosnie części trzeciej – część doświadczalna opisującą transport środków przeciwdrobnoustrojowych (głównie antybiotyków) pomiędzy kroplami**

Pan mgr Artur Ruszczak przedstawia w tej części rozprawy doktorskiej sposób pomiaru „ucieczki” antybiotyków z kropelek wytworzonych w układach dwufazowych. W przeprowadzonych eksperymentach krople z antybiotykami i koloniami bakteryjnymi były zbierane do probówek typu eppendorf na czas inkubacji. Analizę przeprowadzano ponownie w układzie mikroprzepływowym umieszczanym pod mikroskopem konfokalnym.

W eksperymencie wykorzystano współinkubację dwóch równych populacji kropelek, z których pierwsza zawierała kolonię bakterii i zadane stężenie antybiotyku, a druga tylko kolonie bakterii. Dla rozróżnienia obu populacji stosowano znakowanie markerami fluorescencyjnymi. Wykorzystano antybiotyki z różnych grup: i) aminoglikozydy, ii) beta-laktamy, iii) tetracykliny, iv) fluorochinolony oraz v) inne antybiotyki często wykorzystywane jak np.: chloramfenikol. W trakcie pomiarów monitorowano szybkość rozwoju kolonii bakteryjnej.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że transfer antybiotyków między kroplami zależy od liczebności populacji kropelek jak i od odległości pomiędzy nimi. Ponadto, doktorant przeanalizował 36 deskryptorów fizykochemicznych dla przyjętego modelu hydrofilowości/hydrofobowości powierzchni badanych związków chemicznych. Dużym osiągnięciem naukowym jest pokazanie, że współczynnik podziału i ułamkowa powierzchnia polarna są kluczowymi parametrami fizykochemicznymi, które przewidują retencję antybiotyków w kroplach. Ma to bezpośredni wpływ na planowane testy antybiotykowe jak i daje istotne informacje na temat wpływu substancji w emulsjach typu woda-olej.

Nieścisłości/pytania jakie pojawiają się w/do części trzeciej:

- Recenzentowi brakuje analizy transportu przedstawionych substancji w czasie. Możliwość takiego pomiaru dają antybiotyki, które z natury są fluoroforami jak np. doksyrybicylina, tetracyklina, olivomycyna, czy mithramycyna. Dlaczego nie pokazano takich eksperymentów bezpośrednio przez pomiar fluorescencji m.in. dla wymienionych antybiotyków?

### **Odnosnie części czwartej – podsumowanie otrzymanych wyników**

W tym rozdziale Doktorant zwięźle podsumowuje swoje wyniki pokazując jednocześnie realizację założonych wcześniej celów rozprawy i omawia ich możliwe zastosowanie.

### Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr. Artura Ruszczaka stwierdzam, że oceniana praca doktorska **spełnia kryteria** stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w art.13 ustawy z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Na podkreślenie zasługuje bardzo dobre: i) opanowanie i wykorzystanie przez Doktoranta szerokiego zakresu nowoczesnych metod badawczych, ii) opanowanie umiejętności opracowania i prezentacji wyników oraz iii) znajomość najnowszych prac i danych literatury światowej dotyczących problematyki podjętej w pracy doktorskiej. Obszar zainteresowań naukowych Pana mgr. Artura Ruszczaka jest bardzo szeroki i wchodzi w zakres wielu dziedzin, takich jak synteza chemiczna, mikrobiologia, farmakologia, czy mechanika mikroprzepływów.

W związku z przedstawioną pozytywną oceną całej pracy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN **o dopuszczenie Pana mgr. Artura Ruszczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Recenzent,



.....  
Dr hab. Sławomir Jakiela, prof. SGGW