

Rzeszów, 19.6.2024

Prof. dr hab. inż. Tomasz Ruman
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Rzeszowska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Sibińskiej pt. „Istotność rozwoju metod spektrometrycznych w procesie identyfikacji mikroorganizmów”

Praca doktorska mgr Eweliny Sibińskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Pomastowskiego, prof. UMK oraz promotora pomocniczego dra Michała Złocha. Badania zrealizowano przede wszystkim w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK. Na rozprawę doktorską składa się osiem prac naukowych, z czego siedem jest opublikowanych w czasopismach naukowych a jedna - P8 – była w momencie składania pracy do dziekanatu w trakcie recenzji w czasopiśmie. Publikacje P1 do P7 Doktorantki opublikowano w czasopismach takich jak TrAC Trends in Analytical Chemistry (IF 14,9), Electrophoresis (IF 2,9), International Journal of Molecular Sciences (IF 6,2), Analytical Chemistry (IF 7,4), Diagnostic Microbiology and Infectious Disease (IF 2,9), Current Microbiology (IF 2,6) oraz Antibiotics (IF 4,8). Sumaryczny impact factor tych siedmiu prac jest bardzo wysoki i wynosi niemal 42.

Układ pracy, pomimo wybranej formy pracy typu „zszywka” jest dosyć podobny do układu tradycyjnej pracy doktorskiej ponieważ obejmuje dosyć szeroki i szczegółowy wstęp do tematyki badawczej – Doktorantka omawia elementy mikrobiologii, analityki mikrobiologicznej, spektrometrii mas i inne tematy pokrewne. Po wprowadzeniu sformułowano cel pracy, przedstawiono publikacje będące podstawą pracy doktorskiej a na końcu opisano zwięźle najważniejsze osiągnięcia i wnioski z prowadzonych badań. Realizacja

pracy doktorskiej była powiązana z realizacją kilku projektów grantowych NCN - SONATINA 2 oraz dwóch projektów NCN OPUS, a także projektu BioSep centrum doskonałości UMK „W kierunku medycyny spersonalizowanej”.

Tematem wiodącym pracy doktorskiej jest analityka instrumentalna układów mikrobiologicznych, oparta głównie o laserową spektrometrię mas. Bardzo blisko tej tematyki znajduje się diagnostyka mikrobiologiczna, której celem jest przede wszystkim identyfikacja drobnoustrojów mających znaczenie w medycynie, przemyśle spożywczym oraz szeroko rozumianej nauce. W najczęściej wykonywanych w kraju i za granicą badaniach identyfikacyjnych mikroorganizmów nadal stosuje się metody oparte o obserwacje mikroskopowe, hodowle na podłożach selektywnych oraz różnego rodzaju techniki oparte o interakcje mikroorganizmów z antybiotykami. Metody te są czasochłonne i nie dają całkowitej pewności identyfikacji. Metody nowej generacji oparte o spektrometry masowe z jonizacją typu MALDI pozwoliły dramatycznie rozszerzyć zakres identyfikacji mikroorganizmów, skrócić czas analizy i zminimalizować ryzyko nieprawidłowego wskazania. Praca w znacznej części opiera się o wspomniane nowe metody identyfikacji mikroorganizmów, Doktorantka jednak nie tylko je stosuje ale i pracuje nad ich rozwojem i nowymi wariantami opartymi o lipidomikę.

Praca P1 będąca częścią osiągnięcia naukowego Doktorantki jest pracą przeglądową na temat nowoczesnych technik w analizie mikroorganizmów i jest zogniskowana na zastosowaniu metod elektromigracyjnych w analizach kluczowych parametrów mikroorganizmów.

Publikacja P2 dotyczy badania szczepów istotnych klinicznie techniką elektroforezy kapilarnej. Doktorantka zastosowała równanie, które w oparciu o czas elektromigracji komórek pozwala określić odsetek komórek żywych i martwych. Zastosowała wspomniane podejście do określenia antybiotykooporności bakteryjnych wybranych izolatów klinicznych *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus*.

Problematyka hodowli mikroorganizmów i jej wpływ na proces identyfikacji metodą MALDI była tematem publikacji P3. Doktorantka zidentyfikowała mikroorganizmy

odpowiedzialne za infekcje tzw. stopy cukrzycowej - nie tylko gatunki typowo spotykane w tego typu infekcjach, ale również te wolno rosnące o wysokich wymaganiach pokarmowych.

W pracy P4 przedstawiono profile lipidowe bakterii uzyskane metodą MALDI i dyskutowano możliwość ich zastosowania do identyfikacji gatunku. Zbadała charakterystykę profili lipidowych 39 izolatów bakterii uzyskanych z próbek ran osób cierpiących na infekcje stopy cukrzycowej. Recenzent prosi o wyjaśnienie, czy identyfikacja lipidów była wspomagana widmami fragmentacyjnymi? Jakie błędy m/z sygnałów uznano za dopuszczalne do przypisania sygnałów do konkretnych związków chemicznych? Czy sprawdzano poprawność rozkładu izotopowego (obwiedni izotopowej)?

W pracy P5 porównywano dwa systemy oparte o spektrometr MALDI wraz z oprogramowaniem do identyfikacji mikroorganizmów - Bruker BioTyper i Zybco EXS2600 w celu wykonania szybkiej identyfikacji izolatów bakteryjnych z próbek moczu pacjentów z rakiem prostaty.

Zastosowanie MALDI do szybkiej identyfikacji i detekcji antybiotykooporności bakterii z próbek klinicznych było tematem pracy P6. Przedmiot badań stanowiły szczepy, które wyizolowała z wymazów z ran osób cierpiących na infekcje stopy cukrzycowej. Uzyskane wyniki porównała metodami szeroko wykorzystywanymi do tego samego celu takimi jak PCR oraz testy paskowe.

Istotną częścią pracy, która jest jednocześnie najbardziej interesująca dla recenzenta, była praca nad rozwojem rozwiązań bezmatrycowych do celów analityki metabolitów drobnoustrojów. W ramach współpracy ze specjalistami Doktorantka zastosowała technikę CVD do pokrycia powierzchni płytek-targetów LDI MS nanostrukturami srebra co opisują prace P7 oraz P8. Uzyskane układy wykorzystała do badania profili lipidowych bakterii istotnych klinicznie oraz sprawdziła też możliwości wykonywania analiz ilościowych z użyciem opisanych wyżej rozwiązań. Co ciekawe, profile lipidowe pozwoliły na rozróżnienie dwóch blisko spokrewnionych szczepów *E. coli*, co nie było możliwe w oparciu o profilowanie MALDI. Wyniki te sugerują, że być może rozwiązania komercyjne do identyfikacji mikroorganizmów powinny być rozszerzone także o niższy zakres m/z gdzie znajdują się sygnały lipidowe. Jednakże, recenzent nie znalazł ani w pracy doktorskiej, ani w

publikacjach P7/P8, ani też w cytowanych w nich pracach informacji o reaktorze CVD zastosowanym do pokrywania płytek nanostrukturami. Brakuje tutaj schematu lub rysunku takiego reaktora, jego wymiarów, kształtu oraz innych istotnych szczegółów konstrukcyjnych (obszar roboczy, jednorodność pokrycia powierzchni itd.), które pozwoliłyby na odtworzenie wyników badań. Recenzent prosi Doktorantkę o wyjaśnienie tych kwestii. Ponadto, jest kwestią dyskusyjną czy można nazywać uzyskane warstwy nanostrukturalne nanocząstkami – recenzent chętnie pozna opinię Doktorantki na ten temat.

W pracy P8 Doktorantka zbadała możliwość zastosowania nanostrukturalnego srebra do analizy jakościowej standardów lipidów oraz węglowodanów. Określiła występujące na widmie typy jonów oraz mechanizmy jonizacji. Wyniki z tabeli 2 i 3 sugerują, że najsilniejsze sygnały lipidów to addukty z Na^+ a tylko niektóre związki wykryto w formie adduktów z jonami Ag^+ . Co zaskakujące, sacharydy nie utworzyły spodziewanych adduktów z protonem lub kationami sodowym czy potasowym tylko srebrowym. Jak Doktorantka może zinterpretować te wyniki? Ponadto, w części publikacji dotyczącej interpretacji produktów fragmentacji lipidów – jakie były dopuszczalne błędy m/z wyrażone w częściach na milion (ppm)?

Zadaniem recenzenta było także wskazać drobne błędy, (które nie wymagają komentarza na obronie pracy):

- P8 S1 - wydaje się, że przedstawiono masy monoizotopowe a nie (tradycyjnie rozumiane) masy cząsteczkowe
- Skrót FA lepiej zarezerwować wyłącznie dla kwasów tłuszczowych, które pojawiają się licznie w tej pracy
- tert-butyłowy – tert piszemy kursywą
- „Większość systemów wykrywa m.in. dwutlenek węgla lub pH jako wskaźnik wzrostu drobnoustrojów” –chodzi oczywiście o wykrycie *zmiany* pH
- „W celu detekcji zajścia reakcji, metody immunologiczne często łączy się z innymi technikami takimi jak: rozdzielanie elektroforetyczne (tzw. Western Blot), mikroskop



fluorescencyjny oraz cytometr przepływowy [20], [21].” – wymieniając metody nie mieszamy ich z instrumentami.

- Ultrafiolet – proponuję stosować polskie pojęcie nadfiolet
- „Czasem spotyka się również wykorzystanie laserów z zakresu podczerwieni, takich jak Er:YAG $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$, CO₂ $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$, które mając niższą energię zmniejszają zjawisko fragmentacji,” – mając niższą energię *fotonu/fotonów* – ta korekta jest niezbędna ponieważ czytelnik może zinterpretować pojęcie energia jako energia impulsu lasera. Ponadto – „zmniejszają zjawisko fragmentacji” – powinno być tutaj raczej „zmniejszają stopień/wydajność fragmentacji”.
- „Pierwszy analizator masy TOF umożliwia selekcję jonów prekursorowych, które są następnie fragmentowane w komórce zderzeniowej”- w przypadku większości instrumentów ToF/ToF metody fragmentacji opierają się o procesy zachodzące już w źródle jonów.

Wskazane w niniejszej recenzji niewielkie uchybienia metodyczne czy nomenklaturowe zostały przedstawione ze względu na obowiązek recenzencki i służą doskonaleniu warsztatu Doktoranta. Recenzowana praca doktorska jest bardzo wartościowym źródłem wiedzy i ocena jest jednoznacznie pozytywna.

Jednocześnie rekomenduję jej wyróżnienie z następujących powodów:

1. Doktorantka podjęła się badania tematu o bardzo dużym znaczeniu, który ma potencjalne zastosowania zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych,
2. Współpracowała z producentami systemów stosowanych do identyfikacji mikroorganizmów, co przełoży się prawdopodobnie na ulepszenie tych rozwiązań dla nauki oraz medycyny, a w dalszej perspektywie wpłynie pozytywnie na stosowaną na świecie diagnostykę medyczną,
3. Opublikowała wyniki badań w prestiżowych oraz liczących się czasopismach naukowych o wysokich współczynnikach impact factor.

Podsumowanie:

Zdaniem recenzenta praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Wnoszę zatem, aby Wysoka Rada dopuściła mgr Ewelinę Sibińską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z przyjemnością stawiam też wniosek o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Sibińskiej.

Tomasz Ruman

.....

Prof. dr hab. inż. Tomasz Ruman