UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Chemii

Prof. UAM dr hab.Bogumił Brycki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Chemii
ul. Umultowska 89b
61-614 Poznań
brycki@amu.edu.pl

Poznań, dnia 5 grudnia 2013 r.

Recenzja
pracy doktorskiej mgra Krzysztofa Langera
pt.: „Nanobiodetektor polianilinowy - detekcja i identyfikacja mikroorganizmów"
wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza pod kierunkiem
prof. UAM dra hab. Piotra Barczyńskiego

Drobnoustroje są najstarszymi i najpowszechniej występującymi organizmami w biosferze. Z uwagi na ich niewielkie rozmiary oraz niezwykłe zdolności adaptacyjne, mikroorganizmy są obecne we wszystkich środowiskach; w powietrzu, wodzie i glebie. Wpływ drobnoustrojów na środowisko jest ambiwalentny. Z jednej strony umożliwiają prawidłowy przebieg procesów życiowych organizmów wyższych, obieg pierwiastków w przyrodzie, utylizację odpadów, jak również otrzymywanie żywności i leków w procesach biotechnologicznych. Z drugiej natomiast strony, mikroorganizmy są przyczyną chorób, degradacji surowców i produktów roślinnych i zwierzęcych, jak również są odpowiedzialne za biodeterioracje materiałów technicznych. Biodeterioracja miękkich materiałów technicznych, obejmujących papier, skórę i drewno, oraz biodeterioracja twardych materiałów technicznych, takich jak szkło, ceramika, beton i stal, jest przyczyną strat, przekraczających w Polsce 5% PKB. Całkowite wyeliminowanie drobnoustrojów z otoczenia człowieka jest niemożliwe, nie tylko ze względów technicznych, ale jest przede wszystkim niedopuszczalne z uwagi na zagrożenie życia, wynikające z zachwianiasymbiotycznej równowagi pomiędzy organizmami wyższymi i drobnoustrojami. Dlatego też, optymalnym rozwiązaniem dla ludzi i zwierząt, jest ograniczenie populacji mikroorganizmów do poziomu nie stwarzającego zagrożenia w tych środowiskach, w których jest to konieczne. Bezpieczny poziom drobnoustrojów, nie stwarzający zagrożenia, jest bardzo zróżnicowany, i będzie inny w wytwórni szczepionek, inny będzie w muzeach i archiwach; inny też będzie w elektrowniach wykorzystujących biomasę jako surowiec energetyczny. Określenie stopnia zanieczyszczenia drobnoustrojami danego środowiska jest podstawowym zadaniem, na podstawie którego opracowuje się procedury dekontaminacji, prowadzące do ograniczenia populacji mikroorganizmów do poziomu nie stwarzającego zagrożenia. Istnieje wiele metod pozwalających na wykrycie, identyfikację oraz ilościowe określenie mikroorganizmów w danym środowisku. Klasyczne

metody mikrobiologiczne – metody posiewów - poszerzone o badania genetyczne, pozwalają na ustalenie nie tylko ogólnej liczby drobnoustrojów, ale również umożliwiają określenie rodziny, rodzaju, gatunku i szczepu. Metody te są bardzo precyzyjne, jakkolwiek wymagają długiego czasu. Skrócenie czasu analizy możliwe jest przy wykorzystaniu szybkich testów mikrobiologicznych obejmujących metody mikroskopowe i pochodne, w tym cytometrię stacjonarną i przepływową, metody związane z przemianą materii, obejmujące metody elektrochemiczne, impedymetrię i zmiany potencjału oksydoredukcyjnego lub pH, detekcję zmiany stężenia substratu lub produktu i bioluminescencję oraz metody oparte o reakcje immunologiczne. Metody powyższe pozwalają na skrócenie czasu analizy, ale niestety przy równoczesnym zmniejszeniu ilości informacji otrzymywanych z tych analiz. Metody bioluminescencyjne pozwalają na przykład na szybką ocenę ogólnej ilości drobnoustrojów wyrażoną w arbitralnych jednostkach, ale bez możliwości identyfikacji gatunków. Stąd też niezwykle cenne są działania zmierzające do opracowania szybkiej metody pozwalającej na wykrycie, analizę ilościową oraz identyfikację zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgra Krzysztofa Langera pt.: „Nanobiodetektor polianilinowy - detekcja i identyfikacja mikroorganizmów" stanowi istotny postęp w tym zakresie.

Założonym przez Autora celem pracy było „zastosowanie nanomateriałów i nanotechnologii dla opracowania metody szybkiej detekcji i identyfikacji żywych komórek oraz mikroorganizmów" obejmujące „syntezę i charakterystykę fizykochemiczną odpowiednich nanomateriałów (nanowłókna, nanosieci), a także konstrukcję oraz testy detektora żywych komórek – nanobiodetektora (NBD) – opartego na wykorzystaniu ich niespecyficznych oddziaływań z nanostrukturami polianilinowymi".

Efektem pracy przeprowadzonej w ramach realizacji założonego celu jest opracowanie dwóch systemów pomiarowych, stacjonarnego i przepływowego. System stacjonarny umożliwia monitoring zmian zachodzących w płynnej hodowli bakterii, natomiast system przepływowy pozwala na wielokrotne, następujące kolejno po sobie, badania próbek zawierających drobnoustroje. Układy te umożliwiają wykrycie drobnoustrojów w czasie kilkudziesięciu sekund. Przepływowy układ nanobiodetekcyjny pozwala na dokonanie analizy w szerokim zakresie gęstości mikroorganizmów, od 10^2 do 10^9 w jednym mililitrze. Ponadto, Autor wykazał, że odpowiedzi zmian elektrycznych polianilinowej nanosieci detektora zależą nie tylko od gatunku bakterii, ale również pozwalają na rozróżnienie form wegetatywnych i przetrwalnikowych. Odpowiedź skonstruowanego nanodetektora jest również zależna od kształtu i wielkości bakterii, co pozwala na rozróżnienie ziarniaków, pałeczek i przecinkowców, oraz od zdolności poruszania się determinowanej obecnością rzęsek i wici. Przepływowy układ nanobiodetekcyjny pozwala również, w pewnym zakresie, na określenie składu mieszaniny bakterii, oraz, co jest bardzo istotne, na analizę jakościową i ilościową gatunków niehodowlanych. Szczególnie ważne z punktu widzenia potencjalnych zastosowań, jest konstrukcja czujnika o charakterze włącznika progowego na bazie nanorurek lub mikrowłókien polianilinowych, ulegającego aktywacji powyżej określonej ilości bakterii w jednostce objętości. Pozwala to na wykorzystanie tego typu detektora do zapewnienia

bezpieczeństwa mikrobiologicznego w środowisku pracy poprzez uruchomienie alarmu przy przekroczeniu najwyższych dopuszczalnych stężeń czynników szkodliwych dla zdrowia.

Praca doktorska Pana mgra Krzysztofa Langera napisana jest w układzie klasycznym (204 strony), obejmującym wstęp (3 strony), część literaturową (30 stron), cel pracy (1 strona), część eksperymentalną (50 stron), dyskusję wyników (85 stron), wnioski końcowe (3 strony), streszczenie (2 strony) i literaturę (243 pozycje).

W części literaturowej Autor, w oparciu o 195 dobrze dobranych pozycji literaturowych, dokładnie omawia właściwości polianiliny, metody jej otrzymywania oraz metody detekcji i identyfikacji mikroorganizmów. Dokonany przegląd literatury świadczy o dużej erudycji Autora, którego wiedza w zakresie chemii, fizyki i biologii, umożliwiła wykonanie niezmiernie ciekawej i ważnej z aplikacyjnego punktu widzenia pracy. Z uwagi na widoczne dążenie Autora do przedstawienia i omówienia bardzo wielu zagadnień, w tekście pojawiły się pewne niedociągnięcia, które jak sądzę pojawiły się wskutek nieuwagi. Dotyczy to między innymi używanych zwrotów: zakażenie, zarażenie, zanieczyszczenie mikroorganizmami, etc. Każde z powyższych sformułowań ma swoje ściśle określone znaczenie, dlatego też nie można używać zwrotu „zakażony pokarm". Również informacja o celowym wykorzystaniu śmiercionośnych mikroorganizmów w średniowieczu jest nieudokumentowana. Pandemia, która rozpoczęła się w 541 roku w Egipcie, i która objęła Afrykę Północną, Europę i Azję Południową, zabijając ponad 50% ówczesnej populacji ludzi, była wywołana naturalnym rozwojem flory patogennej. Podobnie jak pandemia „czarnej śmierci", dżumy, wywołanej przez *Yersinia pestis,* została zainicjowana w Azji środkowej, skąd, poprzez naturalną proliferację, jedwabnym szlakiem dotarła do Europy.

W części eksperymentalnej Autor szczegółowo dokumentuje otrzymywanie polianiliny, konstrukcje nanobiodetektorów oraz przygotowanie hodowli drobnoustrojów. Morfologia nanowłókien polianilinowych w istotny sposób zależy od warunków prowadzenia zarówno elektropolimeryzacji jak i elektroprzędzenia. Ponieważ odpowiedź nanodetektora na zanieczyszczenie mikrobiologiczne zależy od morfologii nanowłókien, stąd też, moim zdaniem należałoby w każdym przypadku zamieścić obrazy SEM, zwłaszcza, że były one wykonane. Właściwości fizykochemiczne nanowłókien analizowano za pomocą EPR, FT-IR i analizy elementarnej. W pracy, w przypadku FT-IR, Autor podaje tylko częstości pasm, bez określenia ich intensywności i bez przypisania określonym drganiom. Jest to informacja niepełna, która ogranicza możliwość analizy otrzymanego polimeru. Podobnie jest z analizą elementarną, w przypadku której podane są tylko wyniki eksperymentalne, bez jakiegokolwiek odniesienia do założonego modelu.

Najistotniejszą częścią pracy jest dyskusja wyników. Autor w bardzo rzetelny sposób przedstawia rezultaty badań oraz interpretację otrzymanych wyników. W przypadku skonstruowanego polianilinowego nanodetektora stacjonarnego, materiał biologiczny ma długi czas kontaktu z nano- i mikrowłóknami, a zmiany przewodnictwa elektrycznego zapisywane są za pomocą interfejsu pomiarowego i pozwalają na analizy w powtarzalnych warunkach środowiskowych o podobnych parametrach fizykochemicznych. Z kolei nanobiodetektor przepływowy działa analogicznie do HPLC. W układzie tym badana próbka

jest wprowadzana do przepływającej neutralnej cieczy nośnej, i wraz z nią przemieszcza się w rejon detekcyjny urządzenia. W metodzie tej zostały określone profile czasowe odpowiedzi elektrycznej nanobiodetektora pozwalające na identyfikacje mikroorganizmów. Porównanie czasów retencji umożliwia określenie wielkości oraz budowy ściany komórkowej bakterii. Szczegółowe rozróżnianie mikroorganizmów możliwe jest dzięki analizie szerokości połówkowej sygnału, co pozwala na systematykę komórek. Autor przeanalizował również wpływ rozpuszczalników oraz związków chemicznych na odpowiedź elektryczną nanobiodetekcyjnego układu przepływowego. Sposób dyskusji oraz podany mechanizm uzyskiwania odpowiedzi elektrycznej nanowłókien na kontakt z komórkami mikroorganizmów jest bardzo przekonujący. Opracowane konstrukcje nanobiodetektorów polianilinowych oraz uzyskane wyniki dotyczące detekcji i identyfikacji mikroorganizmów są niezwykle cenne i stwarzają duże możliwości aplikacyjne.

W ramach dyskusji prosiłbym Autora o ustosunkowanie się podczas publicznej obrony pracy doktorskiej do: (1) możliwości wykorzystania opracowanego nanobiodetektora do analizy biofilmu, w którym poszczególne komórki tworzą powiązane ze sobą konglomeraty i nie występują w formie planktonicznej, (2) analizy środowiskowych konsorcjów bakteryjnych, zwłaszcza w obecności grzybów, oraz (3) możliwości detekcji i identyfikacji specyficznych gatunków bakterii, tzw. gigantów, o wymiarach rzędu 750 μm, jak ma to miejsce w przypadku *Thiomargarita namibiensis.*

Dotychczasowe wyniki badań mgra Krzysztofa Langera zostały przedstawione w 4 publikacjach naukowych, 20 komunikatach oraz zaprezentowane w 6 wykładach na zaproszenie.

Mgr Krzysztof Langer jest pasjonatem nauki, o bardzo szerokich horyzontach intelektualnych, posiadającym dużą wiedzę z zakresu chemii, fizyki i biologii, co stanowiło doskonałą podstawę do przeprowadzenia bardzo interesujących badań, których rezultaty mają duży potencjał aplikacyjny.

Rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Langera pt.: „Nanobiodetektor polianilinowy - detekcja i identyfikacja mikroorganizmów" spełnia wszystkie wymogi określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Na tej podstawie wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Krzysztofa Langera do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.