



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Interdyscyplinarne Centrum  
Nowoczesnych Technologii

Toruń, dnia 03. września 2022r.

dr hab. Paweł Piotr Pomastowski, prof. UMK  
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

### Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Anny Mielko pt.: „*Badania metabolomiczne bakterii Pseudomonas aeruginosa*” przedstawionej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej w celu uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne

### Uwagi ogólne

Pani mgr inż. Karolina Anna Mielko wykonała pracę doktorską pod opieką dwóch promotorów: prof. dr hab. Piotra Młynarza z Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej oraz prof. dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza, Kierownika Zakładu Biotransformacji z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Tematyka recenzowanej pracy mieści się w zakresie prac badawczych prowadzonych w Zespole prof. prof. dr hab. Piotra Młynarza dotyczy wykorzystania spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w szerokopojętej bioanalityce oraz w zakresie obszarów badawczych realizowanych przez Grupę Badawczą prof. dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza z zakresu biotechnologii, mikrobiologii, mikrobiologii przemysłowej, mikologii i biologii molekularnej. Praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Anny Mielko wpisuje się w nurt badań związanych z aktualnym problemem narastającej lekooporności mikroorganizmów o znaczeniu klinicznym, poszukiwaniem nowych metod analitycznych stosowanych do charakterystyki przemian metabolicznych bakterii, profili molekularnych. Obiekt badawczy jakim jest Gram-ujemna pałeczka ropy błękitnej jest odpowiednim modelem badawczym to podjęcia tej tematyki.

Recenzowana rozprawa doktorska jest wynikiem czterech, recenzowanych prac badawczych opublikowanych w czterech czasopismach naukowych z listy JCR o zasięgu międzynarodowym, charakteryzujących się dobrym współczynnikiem oddziaływania IF (sumaryczny IF = 16,716, Suma punktów ministerialnych (PM) = 450). Pierwsza praca



opublikowana na łamach *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (IF = 2,477, PM = 70) jest pracą przeglądową, zaś pozostałe trzy opublikowane w czasopiśmie: *Scientific Reports* (IF = 4,380, PM = 140), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF = 3,935, PM = 100) oraz *International Journal of Molecular Science* (IF = 5,924, PM = 140) są oryginalnymi pracami badawczymi. Aktualny wskaźnik Hirscha Doktorantki wynosi 4 (baza Web of Science, 01 wrzesień 2022r.). Warto podkreślić, iż we wszystkich czterech wymienionych pracach, stanowiących cykl badawczy dysertacji, Doktorantka jest pierwszym Autorem. Ponadto, Doktorantka w ramach realizacji pracy doktorskiej dodatkowo opublikowała 11 prac, nie wchodzących w cykl dysertacji.

Po lekturze przedłożonej do oceny dysertacji, recenzent zyskał szansę na poznanie sposobu myślenia, wybranych dróg realizacji poszczególnych etapów pracy oraz podejścia do uzyskanych wyników i ich interpretacji, przekładającą się na ogólną wiedzę Doktorantki, co w przypadku analiz przy wykorzystaniu technik spektroskopowych takich jak spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego nie jest łatwe. Ten aspekt pracy oceniam wysoko, gdyż dysertacja została przygotowana z należytą starannością i stanowi dobry punkt wyjścia do dalszego rozwoju naukowego Doktorantki.

W ramach przedstawianej pracy doktorskiej przeprowadzono badania obejmujące wykorzystanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w charakterystyce metabolomicznej bakterii, w szczególności *Pseudomonas aeruginosa*.

#### Ocena formalna i merytoryczna pracy

Oceniana rozprawa doktorska bazuje na cyklu czterech prac, przedstawiona w formie zawierającej wszystkie niezbędne elementy pracy naukowej. Tytuł przedstawionej rozprawy jest poprawnie zdefiniowany i odpowiada stawianemu celowi oraz uzyskanym wynikom badań. Praca jest dobrze ustrukturyzowana w ramach określonego tematu pracy zagadnienia. Jest obszerna, obejmuje 121 stron tekstu i składa się z: wykazu stosowanych skrótów, streszczenia w wersji polskiej oraz angielskiej, wprowadzenia podzielonego na pięć podrozdziałów, celu pracy, metodologii podzielonej na cztery podrozdziały, bibliografii (część literaturowa).



Część literaturowa rozprawy doktorskiej stanowi łącznie 37 stron. Do jej opracowania Doktorantka wykorzystała 75 pozycji źródeł literaturowych dotyczących różnych aspektów omawianego tematu pracy, głównie artykułów naukowych i monografii. Dobór literatury wykorzystanej przy napisaniu pracy jest uzasadniony merytorycznie i świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w podejmowanej problematyce badawczej, dobrej wiedzy teoretycznej z zakresu nauk chemicznych.

Część rozprawy doktorskiej stanowiącej cykl czterech prac z zakresu wykorzystania NMR w charakterystyce metabolomicznej pałeczki ropy błękitnej został poprzedzony oświadczeniem współautora, Kandydata do stopnia doktora o wkładzie merytorycznym w przedstawionych publikacjach, przedłożonych Radzie Dyscypliny Naukowej: nauki chemicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Założenie formy oświadczenia, w której to Kandydat do stopnia doktora deklaruje wkład merytoryczny w powstałe publikacje, niepoprzedzone przez oświadczenia innych współautorów, jest inspirujące. Na podstawie wskazanego przez Doktorantkę dominującego udziału merytorycznego w powstanie przedmiotowych prac stanowiących cykl publikacyjny dysertacji, oceniam wysoko umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pani mgr inż. Karolina Anna Mielko zgromadziła i dokonała analizy literatury, niezbędnej do opracowania pracy przeglądowej. W pracach eksperymentalnych Doktorantka, współuczestniczyła w procesach koncepcyjnych, planowaniu i realizacji eksperymentów. W szczególności, Doktorantka była odpowiedzialna za wykonanie pomiarów NMR, hodowlę mikrobiologiczną oraz analizy statystyczne oraz chemometryczne uzyskanych danych pomiarowych. W każdej z prac przygotowywała pierwsze wersje manuskryptów, - przegląd literaturowy i przeprowadzała prace edytorskie. Na podkreślenie zasługuje wkład objętościowy pracy części eksperymentalnej. Część eksperymentalna stanowi blisko 70% objętości rozprawy doktorskiej. Każda z przedmiotowych publikacji została opatrzona przez Doktorantkę skrótowym omówieniem publikacji. Zwieńczeniem części eksperymentalnej jest rozdział 6 „Podsumowanie i wnioski”. W moim odczuciu zbyt uogólniony i niekrytyczny, np. która z przebadanych metod dezintegracji jest najodpowiedniejsza do badań spektroskopowych? Jakie warunki brzegowe winny być spełnione, aby postawić taki wniosek, np. uwzględniając selektywność stosowanych rozpuszczalników do ekstrakcji niskocząsteczkowych związków z lizatu bakteryjnego i ograniczenia wynikające z np. granic

+



detekcji NMR? Które ze zidentyfikowanych metabolitów pałeczki ropy błękitnej nie są artefaktami?

Na koniec pracy doktorskiej został dołączony dorobek naukowy Pani mgr inż. Karoli Anny Mielko obejmujący: 4 publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, 11 publikacji nie będących częścią rozprawy doktorskiej, zestawienie udziału Doktorantki w konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym, na których to wyniki swoich prac zostały zaprezentowane zarówno w formie „prezentacji ustnych” oraz „prezentacji plakatowych”. Doktorantka podczas swojej aktywności odbyła 2 staże naukowe oraz zdobyła 5 stypendiów oraz 2 nagrody. Na pierwszej stronie dysertacji oraz w podziękowaniach przedmiotowych publikacji znajduje się informacja, iż badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej były realizowane w ramach różnych projektów, np. współfinansowane przez Europejski Fundusz Społeczny. Informacje te nie zostały zawarte w dorobku naukowym Doktorantki. Dlaczego?

Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym w sposób przejrzysty, jednoznaczny i z zachowaniem spójności wypowiedzi. Trafnie ilustrowana wykresami, schematami i tabelami, które pomagają czytelnikowi lepiej się zorientować w treści prezentowanych wypowiedzi w tekście.

W streszczeniu, znajdującym się na początku dysertacji Doktorantka w klarowny sposób określa aktualność i potrzebę podejmowanej w pracy tematyki badawczej, związanej z charakterystyką metaboliczną pałeczki ropy błękitnej przy wykorzystaniu niekonwencjonalnego podejścia jakim jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. Doktorantka, w dalszej części streszczenia przedstawia cel dysertacji, zawartość merytoryczną prac wchodzących w cykl dysertacji. Na uwagę zasługują ostatni akapit streszczenia, w którym to Doktorantka podsumowuje „*potencjał NMR jako narzędzia do rozróżniania i identyfikacji odmiennych rodzajów bakterii*” wskazując tym samym przyszłą perspektywę rozwoju tego podejścia w analizach mikroorganizmów, w szczególności niskocząsteczkowych związków ekstrahowanych z lizatów komórek bakteryjnych. Streszczenie daje integralne przedstawienie zasadności podjętego problemu badawczego i struktury wykonanej pracy.

W części literaturowej Pani mgr inż. Karolina Anna Mielko przedstawia autorski sposób zagadnienia określonego tematu. W pierwszym podrozdziale Doktorantka omawia



właściwości pałeczki ropy błękitnej, z uwzględnieniem taksonomii, występowania i chorobotwórczości oraz antybiotykoodporności. Doktorantka, wskazuje, iż „*niektóre szczepy pałeczki ropy błękitnej są bardzo odporne na antybiotyki*”. Z punktu widzenia problematyki badawczej zdanie to jest kluczowe w kontekście dalszych omawianych zagadnień. Kolejno, Doktorantka opisuje podstawy biologii systemowej, przechodząc płynnie do charakterystyki metabolomiki jako obszaru badawczego stanowiącego przedmiot rozprawy doktorskiej. Podrozdział 1.3. pt: „*Techniki analityczne stosowane w metabolomice*” w moim odczuciu jest zbyt lapidarny. Poza technikami chromatograficznymi w badaniach metabolicznych stosowane są również techniki elektroforetyczne, np. strefowa elektroforeza kapilarna, elektrochromatografia. Spektrometria mas, w szczególności wysokorozdzielcza czy układy LDI (bez układów separacyjnych) również są wykorzystywane w charakterystyce metabolomicznej układów bakteryjnych. Jakie zdanie na ten temat ma Doktorantka? W kolejnej części literaturowej dysertacji zostały omówione przez Doktorantkę podstawowe zagadnienia dotyczące spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, przygotowanie danych  $^1\text{H}$  NMR do analizy metabolomicznej, oraz postępowania analityczno-operacyjne: korekcja linii bazowej, korekta sygnałów rezonansowych, normalizacja danych, identyfikacja metabolitów, analiza danych, analizy statystyczne, chemometryczne. Cześć ta, została opisana przez Panią mgr inż. Karolinę Annę Milko z punktu widzenia eksperymentatora stosującego technikę NMR, w badanym wariacie, z minimalizmem krytycznym. Jakim zdaniem Doktorantki są ograniczenia stosowanego rozwiązania w analizie metabolitów bakteryjnych, będących mieszaniną na różnym poziomie stężeń? Jakim wpływ na identyfikację i interpretację uzyskanych danych, w szczególności w kontekście szlaków metabolomicznych bakterii mają ograniczenia jednowymiarowych technik NMR? (Odnosnie uzyskanych danych eksperymentalnych). Pytania te nie zmieniają faktu, że przedstawiony do recenzji wstęp literaturowy jest dobrym wprowadzeniem do podejmowanej w pracy tematyki badawczej tworząc szerokie kompetentne informacyjne tło dla badań eksperymentalnych i świadczy o dokonanej przez Doktoranta rzetelnej analizie doniesień literaturowych, w obrębie stosowanego podejścia w omawianym obszarze badawczym.

W kolejnej części pracy został sformułowany cel i główne zadania badawcze pracy doktorskiej. Celem nadrzędnym rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Anny Mielko było „*zastosowanie badań metabolomicznych do charakterystyki różnych szczepów Gram-*



ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*”. Doktorantka winna zaznaczyć, za pomocą jakiego podejścia, gdyż zastosowanie techniki NMR w charakterystyce metabolitów pałeczki ropy błękitnej jest niekonwencjonalne i przez to świadczy o oryginalności przedsięwziętego rozwiązania w kontekście stawianego problemu badawczego.

Zgodnie z wytycznymi z 2022r. Rady Doskonałości Naukowej dot. warunków stawianym rozprawom doktorskim odnośnie oceny i uzasadniania wiedzy ogólnej Kandydata do stopnia doktora, umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz oryginalności rozwiązania w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej sprecyzowanie podejścia analitycznego jest kluczowe. W mojej ocenie, zastosowanie techniki NMR do charakterystyki metabolicznej bakterii o znaczeniu klinicznym spełnia wymogi oryginalności podejścia analitycznego.

W dalszej części pracy Doktoranta opisuje stosowaną metodologię, uwzględniając „*Bakterie wykorzystane do eksperymentów*”, izolowane od pacjentów chorych na mukowiscydozę i ze „środowiska”. Jaka była motywacja wyboru źródła izolacji przez Doktorantkę? W dalszej części zostały przedstawione pozostałe mikroorganizmy, procedury hodowli oraz metody przygotowania próbek do pomiarów (ekstrakcja). Czym był podyktowany wybór podłoża hodowlanego oraz ekstrahenta woda : metanol : chloroform (5:5:8 v/v?). W pracy załączonej w rozdziale 5.3. stosowana była mieszanina rozpuszczalników metanol : woda (1:1 v/v). Dlaczego już nie chloroform?

Prace stanowiące cykl czterech publikacji, były już recenzowane przez ekspertów dziedzinowych. Cykl publikacyjny jest spójny i proponowane podejście analityczne w charakterystyce metabolomicznej pałeczki ropy błękitnej jest oryginalne. Praca przeglądowa dotyczy możliwości aplikacyjnych metabolomiki, ze wskazaniem krytycznego podejścia jakim jest konieczność rozbudowy i dalszych prac nad bazami danych z możliwością komplementaryzacji repozytoriów z innymi technikami analitycznymi w tym spektrometrią mas. Jakie jest zdanie Doktorantki na temat wielowymiarowych technik, uwzględniając ortogonalność analityczną, ograniczenia techniczne stosowanego rozwiązania (LOD, selektywność, rozdzielczość) w analizie metabolitów bakteryjnych?



Prace eksperymentalne dotyczą wykorzystania protonowej spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego w analizie ekstrahowanych metabolitów pałeczki ropy błękitnej (Rozdz. 5.3) przy wykorzystaniu 3 metod dezintegracji komórek bakteryjnych. Doktorantka dokonała identyfikacji 42 metabolitów oraz analizy statystycznej porównując metabolity pałeczki ropy błękitnej z *E.coli*, *K.pneumoniae*, *E.faecalis*, *B.cereus* i *C.glutamicum*. Zastosowane podejście umożliwiło identyfikację i wskazanie różnicujących metabolitów dla pałeczki ropy błękitnej na uzyskanym poziomie stężeń [Mm]. W kolejnej pracy przedstawiono wyniki analizy porównawczej szczepów pałeczki ropy błękitnej izolowanych z matryc środowiskowych (rzeki, jeziora, owoce) oraz matryc klinicznych (plwocina). Łącznie zidentyfikowano za pomocą MALDI TOF MS 29 szczepów oraz - 1D  $^1\text{H}$  NMR 31 metabolitów. Wyniki poddano kompleksowym analizom statystycznym. W ostatniej pracy zamykającej cykl dysertacji przeprowadzono analizy porównawcze profili metabolomicznych szczepów klinicznych izolowanych „od dzieci chorych na mukowiscydozę” tzn.? Stosując 1D  $^1\text{H}$  NMR zidentyfikowano 39 metabolitów, gdzie 19 było wspólnych dla pożywki i komórek, 13 zidentyfikowano jako metabolity wewnątrzkomórkowe, 8 pozostałych zostały przypisane do pożywki. Jakie jest ryzyko uzyskania artefaktów i fałszywie pozytywnych wyników? Uzyskane dane poddano następnie kompleksowym analizom statystycznym. Czy zdaniem Doktorantki uzyskana liczba metabolitów bakteryjnych w przedmiotowych pracach jest wadą czy zaletą stosowanego podejścia, np. porównując wyniki prac w analogicznym zakresie przy wykorzystaniu wysokorozdzielczych spektrometrów mas?

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny od strony merytorycznej i edytorskiej. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników oraz wnioski. Cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane. Doktorantka prezentuje dobry poziom wiedzy ogólnej dot. dyscypliny nauk ścisłych i przyrodniczych, dziedzina nauki chemiczne, wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia interdyscyplinarnej pracy naukowej, zaś podjęte prace przy wykorzystaniu techniki NMR w analizie metabolitów bakteryjnych stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Rozprawa doktorska spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022r.



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Interdyscyplinarne Centrum  
Nowoczesnych Technologii

poz. 574 z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Karolina Anna Mielko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na ponadprzeciętny dorobek publikacyjny oraz wysoki potencjał aplikacyjny opracowanych metod NMR jako metod przesiewowych i komplementarnych do konwencjonalnych metod identyfikacji bakterii i ich metabolitów, wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauk Chemicznych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr inż. Karoliny Anny Mielko.

*dr hab. Paweł Piotr Pomastowski, prof. UMK*