

Oponentský posudek k dizertační práci kandidáta Pavla Křepelky: Návrh optovláknového biosenzoru se spektrální analýzou v blízké infračervené oblasti

Shrnutí dizertační práce

Pavel Křepelka (PK) odevzdal dizertační práci k získání doktorského titulu (PhD) na Vysokém Učení Technické v Brně. Dizertační práce byla vypracována pod vedením doc. Ing. Jana Mikulky, Ph.D. Tato práce se skládá z 8 kapitol na 129. stranách a obsahuje 119 referencí. Je postavena na dvou publikovaných článcích, jednom článku v recenzním řízení a třech příspěvcích v konferenčních sbornících. Všechny představené příspěvky se zabývají analýzou bakteriálních spekter v blízké infračervené oblasti (NIR). Kapitoly 2 a 3 obsahují teoretický úvod práce, kapitola 4 cíle práce, kapitola 5 vlastní experimentální práci a kapitola 6 teoretický návrh biosenzoru.

Kapitola 2 je rozdělena na tři významnější podkapitoly a seznamuje čtenáře se současným stavem problematiky. V kapitole 2.1 PK shrnuje současný stav NIR spektroskopie v mikrobiologii a uvádí také dobré a kompletní přehledy identifikovaných NIR peaků a jejich interpretaci k atomovým vazbám a bakteriálním druhům. Kapitoly 2.2 a 2.3 obsahují úvod do optovláknových biosenzorů. Tento přehled je kratší a chybí mi zde významnější zmínka o biologické části biosenzorů. Také struktura této části je méně přehledná než předchozí kapitola. Částí problému je trochu nešťastné rozdělení teoretického úvodu o kavitně zesílené absorpční spektroskopie na dvě podkapitoly – 2.3 a 3.5.

Kapitola 3 obsahuje přehled zabývající se analýzou NIR spekter. Kapitola je kompletní a dobře napsaná. Osobně bych doporučil zde také zařadit přílohu 2, které vysvětluje naprostou většinu zmiňovaných operací. To platí dvojnásob pro přílohu 2.7 – Validace modelů v NIR spektroskopii, bez které je velmi obtížné sledovat matematické procesy uvedené v této kapitole.

V kapitole 4 definoval PK 3 hlavní cíle: (i) interpretovat NIR bakteriální spektrum, (ii) najít nejdůležitější peaky korelující s bakteriální identifikací a (iii) zvýšit citlivost NIR analýzy bakterií.

Kapitoly 5 a 6 představují nejvýznamnější přínosy PK a budou diskutovány podrobněji níže.

Celkový formát dizertační práce je v pořádku. Přesto jsou zde drobné chyby: neúplná rovnice 7 na straně 41; chybějící reference na stranách 57 a 62, nízké rozlišení tabulky 17 na straně 81 a zbytečné používání podkapitol v kapitole 5 (i.e. 5.1.1. místo 5.1).

Originální přínos dizertační práce

Kapitola 5.1.1 Testování klasifikačních modelů pro identifikace NIR spekter bakteriálních kmenů

První experiment se zabývá identifikací bakteriálních kmenů *L. acidophilus*, *S. epidermidis* a *E. durans* pomocí NIR spekter. Pomocí PLS modelu se podařilo klasifikovat *S. epidermidis* a *E. durans*. Zbývající kmeny *L. acidophilus* a *E. coli* tvoří jeden kompaktní cluster. Výsledky této práce byly prezentovány na konferenci PIERS 2013.

U tohoto experimentu mi schází hlubší diskuze vysvětlující design experimentu. Proč byly zvoleny zrovna tyto bakteriální kmeny a metoda L00 křížové validace? Výsledky jsou velmi zajímavé, ale chybí mi k nim trochu podrobnější diskuze. Z Obrázku č. 33 vyplývá důležitost peaku okolo 1150 nm. Co přesně tato vlnová délka reprezentuje? Co mají společného *L. acidophilus* a *E. coli*, že spadají do společného clusteru?

Kapitola 5.1.2 Porovnání přesnosti vybraných klasifikačních modelů kalibrovaných na hydratovaných a dehydratovaných bakteriálních vzorcích

Druhý experiment pokračuje v klasifikaci bakteriálních kmenů. Tentokrát je zaměřen na bakteriální kmeny: *L. ivanovii*, *E. coli*, *S. enterica*. Vzorky jsou před měřením dehydratovány a paralelně zpracovány s hydratovaným vzorkem. Jsou testovány různé algoritmy klasifikačních modelů a největší přesnost klasifikace je pozorována u dehydratovaných vzorků. Výsledky této práce byly prezentovány na konferenci IIPhDW 2014 a publikované v časopise IAPGOŠ.

Tato druhá práce vypadá jako postup správným směrem a staví na výsledcích prvního experimentu. Dehydratace zvyšuje úspěšnost klasifikace až na 100%, což je výborný výsledek. Vypadá to, že hlavní klasifikační korelace mezi kmeny leží u dehydratovaných vzorků v oblasti lipidů. Mohl by autor komentovat rozdíly mezi analyzovanými kmeny z hlediska složení buněčné membrány? A proč byly vybrány jiné kmeny než v předchozím experimentu?

Kapitola 5.1.3 Prokládání NIR spekter bakteriálních buněk křivkou

Třetí experiment se věnuje hlubší analýze bakteriálních spekter. Jsou použity stejné bakteriální kmeny jako v předchozím experimentu a stejný postup akvizice NIR spektra. Spektra jsou potom dekomponována na jednotlivé peaky, které jsou na základě PLS2-DA klasifikace seřazeny dle důležitosti pro bakteriální identifikaci. Výsledek tohoto experimentu je publikován v časopise JNIRS.

Tento experiment představuje nejvýznamnější výsledek PK. Jsou zde interpretovány peaky hrající hlavní roli v identifikačním algoritmu. Také se zde nachází zmínka o nejsilnější korelaci ve vlnové délce 2310 nm – což odpovídá alifatickým skupinám lipidů. To je další důkaz o významu lipidů pro bakteriální identifikaci. V Obrázku č. 43, kde jsou znázorněny významné peaky pro identifikaci jsou v oblasti mezi 1900 a 200 nm tři peaky, avšak popsány jsou pouze dva – 1927 nm pro O-H kombinační mód vody a 1982 nm pro C=O vazby v amidech. Mohl by autor popsat co je třetí významný peak?

Kapitola 5.1.4 NIR-MIR korelace spekter bakteriálních buněk

Čtvrtý experiment doplňuje kapitulu 5.1.3 a objasňuje interpretaci NIR spektra bakterie a jejich korelaci k MIR. Nejvyšší korelace obsahu je ve vlnových délkách 1818 - 2500 nm, což odpovídá výsledkům předchozí práce. Majoritní peaky odpovídají základním biologickým polymerům (proteiny, lipidy i cukry). I když nemohlo být korelované celé MIR spektrum, zdá se že NIR oblast korelace je dostatečná pro bakteriální identifikaci. Článek, který publikuje tento výsledek, je momentálně v recenzním řízení v časopise JNIRS.

V tomto experimentu došlo k další změně použitých bakteriálních kmenů, bez dodatečného vysvětlení. V metodice je uvedeno, že byly použity vzorky z různých fází růstu bakterie, avšak toto není dále rozebráno. Předchozí výsledky ukázaly, že lipidy tvoří důležitou součást bakteriální identifikace a existují důkazy, že bakterie reguluje svou kompozici lipidů během růstu (Furse *et al.*, 2015, *FEBS Lett*; Furse *et al.*, 2017, *Scientific Reports*). Toto porovnání by mohlo být velmi zajímavé a je škoda že zde chybí.

Kapitola 6 Návrh širokopásmového optovláknového biosenzoru s evanescentním snímáním a kavitním zesílením

Kapitola 6 se zabývá teoretickým designem biosenzoru pro NIR bakteriální identifikaci. Je zde objasněno, proč je NIR spektrum atraktivnější pro design než MIR a dále se text věnuje evanescentnímu snímání a zesílení signálu pomocí kavity. Na závěr PK představuje finální model senzoru, jeho sestavení a možnosti analýzy nasbíraných dat.

Tato kapitola představuje další významný přínos dizertační práce. Design biosenzoru je kompletní a zdá se, že obsahuje všechny potřebné výpočty a je dobře modelován. Chybí mi pouze část věnovaná biologickému rozhraní biosenzoru. Pokud by PK použil selektivní biologickou vrstvu na povrchu

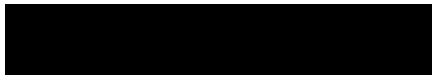


biosenzoru, vedlo by to k dalšímu zvýšení sensitivity detekce. Je v plánu biosenzor zkonstruovat? Jaká by byla cena výroby?

Celkové hodnocení

PK představil dizertační práci, která se věnuje aktuálnímu námětu – rychlé a levné detekci bakteriální kontaminace. Tato práce vylepšila metodiku pro NIR bakteriální identifikaci a představila zajímavý design biosenzoru. Tato práce obsahuje originální přínos pro vědeckou obec a její jádro je dostatečně publikováno v mezinárodních časopisech. Dizertační práce a seznam vědecké činnosti dokazuje vědeckou erudici kandidáta PK a odpovídá obecně uznávaným požadavkům k udělení akademického titulu.

V Bergenu 29. Listopadu, 2019



Martin Jakubec, PhD
Researcher
University of Bergen