



UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii

**Technika laserowej desorpcji/ionizacji wspomagana matrycą jako
kluczowe narzędzie w bioanalityce**

Autoreferat

dr Michał Złoch

Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych

Dyscyplina nauki chemiczne

Toruń 2024

Poniższy autoreferat został przygotowany w oparciu o wzór dokumentu zamieszczony na stronie Rady Doskonałości Naukowej, w zakładce Postępowanie habilitacyjne/Wymagania dokumentacyjne wniosków w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego (<https://www.rdn.gov.pl/postepowaniehabilitacyjne.wymagania-dokumentacyjne-wnioskow-w-sprawie-nadania-stopnia-doktora-habilitowanego.html>, dostęp z dnia 24 czerwca 2024 roku).

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	4
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2 Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe	4
4.3 Finansowanie i współpraca.....	7
4.4 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2b ustawy.	8
4.4.1 Wprowadzenie.....	8
4.4.2 Cele naukowe pracy.	18
4.4.3 Omówienie wyników badań.	22
4.4.4 Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego.....	42
4.4.5 Perspektywy badawcze.....	44
4.4.6 Bibliografia.....	47
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	59
5.1 Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.....	59
5.2 Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.....	60
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	62
6.1 Działalność dydaktyczna.....	62
6.2 Działalność organizacyjna oraz popularyzująca naukę i sztukę.....	63
7. Pozostałe informacje.....	65

1. Imię i nazwisko.

Michał Złoch

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2011-2016 - Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie Matematyczno-Przyrodnicze na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska oraz Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu- dyscyplina główna: biologia, dyscyplina dodatkowa: chemia; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Wybrane aspekty mikrobiologicznie wspomaganej fitoremediacji metali ciężkich*” (doktor nauk biologicznych w zakresie biologii), stopień naukowy nadany 14.10.2016 r. – promotorzy: dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz, dr hab. Tomasz Kowalkowski;

2009-2011 - Studia stacjonarne II stopnia (magisterium) na kierunku biologia, specjalizacja biologia ogólna i molekularna; praca realizowana w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy magisterskiej: „*Ekstrakcja i wstępna ocena egzopolisacharydów (EPS) i liposacharydów (LPS) wytwarzanych przez mikrosymbionty brodawkowe Robinia pseudoacacia (L.)*”, promotor: prof. dr hab. Hanna Dahm;

2006-2009 – Studia stacjonarne I stopnia (licencjat) na kierunku biologia; praca realizowana w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; tytuł pracy licencjackiej: „*Nanomikrobiologia, nanobakterie, nanobiomateriały*”, promotor: promotor: prof. dr hab. Hanna Dahm.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Okres zatrudnienia	Stanowisko i miejsce zatrudnienia
I 2022 - obecnie	adiunkt Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
X 2021 - IX 2023	specjalista inżynierjno-techniczny Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii
X 2018 - IX 2021	adiunkt Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii

XI 2016

adiunkt

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Ilustracją mojego osiągnięcia naukowego, uzyskanego po otrzymaniu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych i stanowiących istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki chemiczne w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, jest cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pod wspólnym tytułem:

Technika laserowej desorpcji/ionizacji wspomagana matrycą jako kluczowe narzędzie w bioanalityce

4.2 Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe

Na osiągnięcie naukowe składa się:

- cykl 6 publikacji (**H1-H6**),

H1 **Złoch, M.***, Maślak, E., Kupczyk, W., Jackowski, M., Pomastowski, P., Buszewski, B. *Culturomics Approach to Identify Diabetic Foot Infection Bacteria*, International Journal of Molecular Sciences, vol. 22, nr. 17, numer artykułu: 9574, 2021, s. 1-13, DOI:10.3390/ijms22179574.

IF=6,208; MNiSW=140; liczba cytowań(bez autocytowań)= 12(10)/ 12(10)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań; doborze metodologii badawczej - podłożu hodowlanych, doborze parametrów analizy MALDI; ocenie jakości uzyskiwanych wyników analiz (walidacja metody); przeprowadzeniu zaplanowanych eksperymentów naukowych włączając w to hodowlę i izolację bakterii, ich identyfikację metodą MALDI oraz klasyfikację sygnałów białkowych w bazie UniProt; sporządzeniu tabel i rysunków (wizualizacja wyników); przeprowadzeniu przeglądu literaturowego; interpretacji uzyskanych wyników oraz sporządzeniu wstępnej wersji manuskryptu; korekcie zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach; administrowanie realizacją badań. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu, którego byłem kierownikiem.

H2 **Złoch, M.***, Maślak, E., Kupczyk, W., Pomastowski, P. *Multi-Instrumental Analysis Toward Exploring the Diabetic Foot Infection Microbiota*, Current Microbiology, vol. 80, nr. 8, numer artykułu: 271, 2023, s. 1-15, DOI:10.1007/s00284-023-03384-z.

IF= 2,3; MNiSW=40; liczba cytowań(bez autocytowań)= 0(0)/0(0)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, doborze metodologii badawczej - opracowanie parametrów analizy MALDI, PCR, testów paskowych w zakresie zarówno identyfikacji mikroorganizmów jak i detekcji antybiotykooporności; zebraniu wyników badań; analizie uzyskanych wyników identyfikacji za pomocą techniki MALDI i technik biologii molekularnej (obróbka sekwencji nukleotydowych regionu 16S rRNA bakterii, złożenie sekwencji w GenBank, analiza filo-proteomiczna i –genetyczna bakterii, analiza porównawcza obu metod – wyznaczenie parametru spójności gatunkowej i rodzajowej); stworzeniu tabel i rysunków (wizualizacja wyników); przeprowadzeniu przeglądu literaturowego; interpretacji wyników; sporządzeniu wstępnej wersji manuskryptu; redakcji całości pracy; administrowanie realizacją badań. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu, którego byłem kierownikiem.

H3 **Złoch, M.***, Rodzik, A., Pryshchepa, O., Pauter, K., Szultka-Mlynska, M., Rogowska, A., Kupczyk, W., Pomastowski, P., Buszewski, B. *Problems with identifying and distinguishing salivary streptococci: A multi-instrumental approach*, Future Microbiology, vol. 15, nr. 12, 2020, s. 1157–1171, DOI:10.1007/s00253-023-12371-0.

IF= 3,165; MNiSW=100; liczba cytowań(bez autocytowań)= 6(3)/7(4)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań, doborze metodologii badawczej - opracowanie parametrów analizy MALDI bakterii ślinowych w podejściu proteomicznym oraz lipidomicznym, dobór warunków analizy PCR (selekcja starterów, opracowanie parametrów programu temperaturowego); przeprowadzeniu analizy filo-proteomicznej i –genetycznej bakterii; obróbki sekwencji regionu 16S rRNA z ich zdeponowaniem w bazie GenBank; sporządzeniu tabel i rysunków (wizualizacja wyników); przeprowadzeniu przeglądu literaturowego; interpretacji wyników; sporządzeniu wstępnej wersji manuskryptu; redakcji całości pracy; korekcie zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach.

H4 **Złoch, M.***, Pomastowski, P., Peer, M., Sparbier, K., Kostrzewa, M., Buszewski, B. *Study on carbapenemase-producing bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization approach*, PLoS One, vol. 16, nr. 3, numer artykułu: e0247369, 2021, s. 1-19, DOI: 10.1371/journal.pone.0247369.

IF= 3,752; MNiSW=100; liczba cytowań(bez autocytowań)= 7(5)/7(5)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na stworzeniu koncepcji badań; przygotowaniu próbek i ich analizie; zebraniu wyników analiz; przeprowadzeniu analiz statystycznych; sporządzeniu tabel i rysunków (wizualizacja wyników); przeprowadzeniu przeglądu literaturowego; interpretacji wyników; sporządzeniu wstępnej wersji manuskryptu; korekcie zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach; administrowanie realizacją badań. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu, którego byłem kierownikiem.

H5 Pomastowski, P., **Złoch, M.**, Rodzik, A., Ligor, M., Kostrzewa, M., Buszewski, B. *Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique*, PLoS One, vol. 14, numer artykułu: e0217078, 2019, s. 1-20, DOI:10.1007/s00253-023-12371-0.

IF= 2,740; MNiSW=100; liczba cytowań(bez autocytowań)= 55(46)/50(41)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w koncepcji badań; opracowaniu metodologii badań, w tym selekcji warunków hodowli, izolacji i identyfikacji bakterii z miodów za pomocą analizy MALDI i sekwencjonowania regionu 16S rRNA; zebraniu i katologowaniu wyników analiz; przeprowadzeniu analiz filo-proteomicznych i – genetycznych; obróbka sekwencji nukleotydowych bakterii z ich zdeponowaniem w bazie GenBank; przeprowadzeniu analiz statystycznych (analiza głównych składowych), współudziale w sporządzeniu tabel i rysunków (wizualizacja wyników); współudziale w interpretacji wyników; współudziale w sporządzeniu wstępnej wersji manuskryptu; korekcie zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach.

H6 Czeszewska-Rosiak, G., **Złoch, M.***, Radosińska, M., Florkiewicz, A., Tretyn, A., Pomastowski, P. *The usefulness of the MALDI-TOF MS technique in the determination of dairy samples' microbial composition: comparison of the new EXS 2600 system with MALDI Biotyper platform*, Archives of Microbiology, vol. 206, nr. 172, 2024, DOI: 10.1007/s00203-024-03885-w.

IF=2.8; MNiSW=70; liczba cytowań(bez autocytowań)= 0(0)/0(0)**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współudziale w koncepcji badań; współudziale w opracowaniu metodologii badań; analizie i interpretacji wyników (w tym analizie statystycznej i porównawczej); współudziale w sporządzeniu tabeli i rysunków (wizualizacja wyników); współudziale w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu; redakcji całości pracy; korekcie zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach.

***autor do korespondencji**

**** w oparciu o bazę Scopus/Web of Science**

Podsumowanie

IF sumaryczny: **20,965**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **550**

Sumaryczna liczba cytowań na podstawie Scopus: **80**

Sumaryczna liczba cytowań (bez autocytowań) na podstawie Scopus: **64**

Sumaryczna liczba cytowań na podstawie Web of Science Core Collection: **76**

Sumaryczna liczba cytowań (bez autocytowań) na podstawie Web of Science Core Collection: **60**

4.3 Finansowanie i współpraca

Prowadzone przeze mnie badania naukowe (reprezentujące jednotematyczny cykl publikacji), stanowiące osiągnięcie naukowe ujęte w przewodzie habilitacyjnym, były finansowane przez:

- (1) Narodowe Centrum Nauki; projekt nr **2018/28/C/ST4/00434** (lata 2018-2022): „Wykorzystanie techniki MALDI-TOF/MS w monitorowaniu i szybkiej diagnostyce rozwoju zakażenia stopy cukrzycowej”
- (2) Narodowe Centrum Nauki; projekt nr **2016/21/B/ST4/02130** (2017–2020): „Nowe podejście w identyfikacji patogenów za pomocą sprzężonych technik separacyjnych (CE-LIF-MALDI-TOF-MS, LCxLC-MS/MS, GCxGC-Q-TOF) dla potrzeb spersonalizowanej diagnostyki medycznej”
- (3) Narodowe Centrum Nauki; projekt nr **2017/25/N/ST4/01079** (2017–2020): „Badanie metabolizmu mikroorganizmów poddanych działaniu nanocząstek metali, antybiotyków, jonów metali i ich połączeń za pomocą techniki MALDI-TOF MS i technik pokrewnych”
- (4) Narodowe Centrum Badań i Rozwoju; projekt nr **BIOSTRATEG2/298205/9/NCBR/2016** (2016-2019): „Rośliny uprawne oraz produkty naturalne jako źródła substancji biologicznie aktywnych przeznaczonych do produkcji preparatów kosmetycznych, farmaceutycznych i suplementów diety” (Plantarum)
- (5) Narodowe Centrum Badań i Rozwoju; projekt nr **TANGO-V-A/0014/2021** (2022-2023): „Nowe podejście w identyfikacji mikroorganizmów w matrycach środowiskowych i klinicznych dla rutynowych laboratoriów mikrobiologicznych”

W projekcie 1. pełniłem rolę **kierownika i głównego wykonawcy** prac badawczych, w projektach 2. i 4. pełniłem rolę **wykonawcy** prac badawczych, a w projekcie 5. wchodziłem w skład **kluczowego personelu badawczego** odpowiedzialnego za realizację prac badawczych. Szczegóły projektów znajdują się w Załączniku nr 4 (pkt II.5A).

Prowadzone przeze mnie badania miały charakter interdyscyplinarny i wymagały podjęcia współpracy z różnymi ośrodkami badawczymi w kraju i za granicą:

Dr Markus Kostrzewa, dr Katrin Sparbier, dr Markus Peer - Dział Rozwoju Bioanalityki i Klinicznej Spektrometrii Mas, Bruker Daltonik GmbH w Bremie (Niemcy)

Prof. dr hab. Marek Jackowski, dr Wojciech Kupczyk, - Katedra Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Onkologicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Prof. dr hab. Andrzej Tretyn, mgr Grażyna Czeszewska-Rosiak – Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Instytut Biologii, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

4.4 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2b ustawy.

4.4.1 Wprowadzenie.

MALDI-TOF MS jako narzędzie do analizy biomolekuł

Wprowadzenie pod koniec lat 80-tych XX wieku technik miękkiej jonizacji, takich jak jonizacja z desorpcją laserową (ang. *Laser Desorption/Ionization, LDI*) i jonizacja metodą elektrorozpylania (ang. *Electro Spray Ionization, ESI*), zrewolucjonizowało spektrometrię mas (MS) umożliwiając wytwarzanie jonów o niskiej fragmentacji z polimerów i dużych biomolekuł, a także cząsteczek nietlotnych czy labilnych (nie trwałych), co nie było możliwe w przypadku tradycyjnych technik jonizacji. Miało to kluczowe znaczenie dla rozwoju badań dotyczących analizy istotnych z punktu widzenia bioanalitik, której istotną część stanowią badania mikrobiologiczne, cząsteczek wchodzących w skład komórek organizmów żywych, takich jak peptydy, białka, węglowodany, lipidy i metabolity, czyniąc je użytecznymi obiektami badań do zastosowań w identyfikacji gatunków oraz oceny ich cech fenotypowych, np. aktywności enzymatycznej [1,2].

W kontekście wykorzystania spektrometrii mas do badań mikroorganizmów na szczególną uwagę zasługuje technika laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganej matrycą (ang. *Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI*) połączona z analizą czasu przelotu (ang. *Time-of-flight, TOF*), której adaptacja do aplikacji w laboratoriach diagnostycznych, a w szczególności mikrobiologicznych, jako szybka i wiarygodna metoda identyfikacji drobnoustrojów stanowi istotny przełom w bioanalizie [3]. Istotą techniki MALDI jest wykorzystanie nasyconych roztworów niskocząsteczkowych związków organicznych, zwanych matrycami, które po dodaniu do próbki przed lub po jej nałożeniu na płytkę (ang. *target*) do analiz MALDI pośredniczą w transferze energii ze światła lasera na cząsteczki próbki (analitu), ułatwiając ich jonizację i desorpcję [4]. Proces jonizacji w MALDI opiera się na zdolności matrycy do absorpcji energii lasera, przy czym optymalna wydajność osiągana jest, gdy długość fali lasera odpowiada wysokiemu pasmu absorpcji optycznej matrycy w fazie stałej. Jonizacja przebiega dwuetapowo: najpierw jonizowana jest matryca, a następnie zachodzi reakcja jon-molekuła prowadząca do powstania jonów analitu. Zaproponowano różne modele tego procesu, w tym mechanizm jonizacji fotochemicznej (i), jonizacji klastrowej (ii), model dysproporcjonowania indukowanego transferem energii (EDIT z ang. *energy transfer induced disproportionation*) (iii) oraz model "szczęśliwych ocalałych" (ang. *lucky survivors*) (iv). Każdy z tych modeli próbuje wyjaśnić obserwowane zjawiska, takie jak równa ilość jonów dodatnich i ujemnych dla dużych biomolekuł czy sposób powstawania jonów analitu – proces protonacji i deprotonacji w trakcie zderzania się analitu z jonami matrycy w fazie gazowej (i), desolwatacja matrycy z jonów klastra (ii), krótkodystansowy transfer energii z wzbudzonych cząsteczek matrycy do dimeru analitu prowadzący do powstania jednego protonowanego i jednego deprotonowanego jonu analitu (iii), czy pokonywanie oddziaływań jon-para przez energię lasera skutkujące uwalnianiem jonów analitu od ich odpowiednich przeciwjonów (iv)[5–7]. Niemniej jednak

pełne wyjaśnienie mechanizmu jonizacji za pomocą techniki MALDI jest wciąż kwestią otwartą.

Matryce stosowane w technice MALDI to substancje, które dobrze absorbują promieniowanie UV (zawierają grupy chromoforowe), łatwo sublimują, a po desorpcji dostarczają dużych ilości jonów (protonów) potrzebnych do jonizacji analitu. Ponadto powinny się one charakteryzować stabilnością w warunkach wysokiej próżni, dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach kompatybilnych z analizowaną próbką (zapewnienie efektywnego mieszania z analitem) oraz całkowitym brakiem jakiegokolwiek reaktywności chemicznej z badaną próbką w celu uniknięcia niepożądanych zmian lub degradacji związków zawartych w badanej próbce. Lista matryc powszechnie stosowanych do analizy biomolekuł metodą MALDI jest szeroka, a ich wybór zależy od typu substancji, które chcemy poddać analizie. Intensywne ogniskowanie wiązki laserowej na materiale próbki, zmieszany ze skryształizowaną matrycą, powoduje napromieniowanie laserem i szybkie nagrzewanie kryształów matrycy i próbki w wyniku absorpcji dużej ilości energii z wiązki. Pulsacja lasera doprowadza zarówno matrycę, jak i próbkę do szybkiej sublimacji z fazy stałej do fazy gazowej (bez przechodzenia przez fazę ciekłą), tworząc chmurę zawierającą jony zarówno matrycy, jak i badanych analitów. Ponieważ główna część energii cieplnej jest przekształcana w energię drgań wiązań chemicznych pochłanianą przez cząsteczki matrycy, chroni ona badaną substancję przed degradacją (fragmentacją). Dotyczy to w szczególności większych cząsteczek, takich jak białka, w których istnieje wiele możliwości wibracji i rotacji wiązań chemicznych, dzięki czemu zaabsorbowana energia jest rozpraszana bez ich zrywania [8–10].

Nie mniej ważnym elementem warunkującym dużą użyteczność metody MALDI jako techniki miękkiej jonizacji jest typ lasera i parametry jego pracy. W przypadku tej techniki wykorzystywane są lasery UV o różnej długości fali – najczęściej azotowe o $\lambda = 337$ nm lub znacznie rzadziej neodymowo-yagowe (Nd:YAG) o $\lambda = 355$ nm, których głównym zadaniem jest dostarczenie impulsów energii o wysokiej intensywności do analitu w określonym interwale czasowym i powierzchni, umożliwiając jego natychmiastową desorpcję i jonizację bez powodowania rozkładu termicznego. Parametry impulsu laserowego, takie jak czas trwania i jego energia, mają kluczowe znaczenie na skład powstającego w wyniku naświetlania próbki laserem tzw. pióropusza jonów (ang. *plume*). Symulacje dynamiki molekularnej wykazały, że długie (nanosekundowe) impulsy o niskiej energii powodują łagodną desorpcję materiału, ale o niskiej wydajności desorpcji, podczas gdy krótkie (piko- lub femtosekundowe) impulsy o wysokiej energii prowadzą do gwałtownej dezintegracji próbki, tworząc duże fragmenty skondensowanego materiału, co utrudnia jego pełne odparowanie i dalszą jonizację. Tak więc optymalizacja parametrów lasera jest kluczowa dla uzyskania odpowiedniej ilości jonów analitu i wysokiej jakości widm mas [11,12]. Istotną rolę w regulacji natężenia promieniowania laserowego definiowanego jako ilość energii na jednostkę powierzchni, pełni atenuator wiązki, który może być indywidualnie dostosowywany w zależności od rodzaju próbki już w trakcie trwania analizy, co przekłada się na dużą elastyczność metody MALDI w zakresie poszukiwania optymalnych parametrów jonizacji/desorpcji analitu [2].

Po bombardowaniu laserem jony generowane zarówno z matrycy, jak i badanego materiału muszą zostać przeanalizowane w celu określenia ich mas cząsteczkowych oraz

identyfikacji sygnałów, a więc muszą trafić do analizator mas. Istnieje wiele różnych analizatorów mas, a ich wybór zależy od celu prowadzonych badań. W przypadku techniki MALDI, w której to jak wskazałem wcześniej, wykorzystuje się impulsowe źródło jonizacji, najczęściej łączy się ją z analizatorem mas typu TOF, który wymaga, aby wszystkie jony wchodziły do rury przelotowej jednocześnie [13]. Wydaje się, że takie połączenie jest szczególnie korzystne ze względu na praktycznie nieograniczony zakres oznaczanych mas cząsteczkowych, co jest szczególnie istotne w przypadku techniki MALDI gdzie zazwyczaj powstają pojedynczo naładowane jony pseudo-molekularne, które mogą mieć wysoki stosunek masy do ładunku (m/z), jak ma to miejsce w przypadku analizy białek, będących najczęstszymi badanymi biomolekułami w kontekście analiz mikrobiologicznych [2]. Podobnie jak w przypadku lasera i parametrów jego pracy, czy też matrycy MALDI, mamy do wyboru różne tryby analizy TOF – liniowy lub z użyciem reflektoru. W trybie liniowym analizatora TOF w technice MALDI, jony o różnych masach docierają do detektora w różnym czasie, przy czym jony o większej masie potrzebują więcej czasu na dotarcie niż jony lżejsze, co skutkuje wyższymi wartościami m/z dla cięższych jonów. W praktyce, różnice w absorpcji energii laserowej przez jony o tej samej masie prowadzą do rozkładu energii kinetycznej, co zmniejsza rozdzielczość widma. Zastosowanie reflektoru, który składa się ze zwierciadeł jonowych z polem elektrycznym, pozwala na ponowne skupienie jonów o tej samej masie, poprawiając tym samym rozdzielczość analizy. Reflektor odpycha jony z powrotem do strefy dryfu w kierunku detektora, co kompensuje różnice w ich energiach kinetycznych [14]. Ta konfiguracja zwiększa rozdzielczość masową poprzez korygowanie początkowych rozkładów energii wśród jonów o tym samym stosunku m/z . Wydłużona droga lotu oraz efekt skupiania energii przez reflektor znacząco poprawiają ogólną wydajność spektrometru masowego MALDI-TOF, umożliwiając dokładniejsze pomiary masy oraz lepsze rozdzielenie blisko położonych sygnałów stanowiących obwiednie (rozkład izotopowy) na widmie mas. W przypadku analiz mikrobiologicznych, najczęściej stosowanym trybem analizy czasu przelotu jest tryb liniowy, w którym jony generowane ze źródła są przyspieszane pod wpływem impulsów elektrycznych do rury przelotowej (obszaru wolnego od pola), gdzie są rozdzielane zgodnie z ich prędkościami (zależnymi od ładunku i masy cząsteczkowej), zanim uderzą w detektor znajdujący się na drugim końcu rury przelotowej [15]. Liniowy TOF charakteryzuje się wysoką czułością i wydajnością, ale niską rozdzielczością - poszerzanie pików, które jest następstwem przestrzennego rozmieszczenia cząsteczek analitu oraz nierównomiernego rozkładu energii impulsu lasera skutkujące różną energią kinetyczną cząsteczek o tej samej wartości m/z . W przypadku trybu reflektrowego stosuje się układ soczewek na końcu instrumentu TOF, w których po przyłożeniu napięcia następuje zmiana trajektorii jonów zgodnie z zasadą - jony o wyższej energii kinetycznej penetrują reflektor głębiej niż te o niższej energii kinetycznej, co skutkuje wydłużeniem ich toru lotu, a w konsekwencji umożliwienie uśrednienia czasów przelotu i zmniejszenie zjawiska poszerzania pików – zwiększenie rozdzielczości. Choć zastosowanie trybu reflektrowego niesie istotną korzyść, jaką jest znaczna poprawa rozdzielczości w stosunku do standardowego trybu liniowego, to jednak wybór trybu pracy analizatora TOF w dużej mierze zależy od celu prowadzonych badań (porównywanie całych profili MS, np. do celów identyfikacyjnych czy też analiza celowana, w kierunku detekcji konkretnych sygnałów, np. biomarkerów) oraz rodzaju badanych

związków – głównie w kontekście ich wielkości. I tak w przypadku analizy związków niskocząsteczkowych (np. oligonukleotydy, peptydy, polimery, metabolity komórkowe) preferowanym trybem wydaje się zastosowanie reflektrometru, który zapewnia wyższą rozdzielczość, a tym samym umożliwia dokładniejszy pomiaru m/z oraz lepsze rozdzielenie blisko położonych sygnałów w widmie mas). Natomiast użycie trybu liniowej analizy TOF wydaje się być korzystniejsze w przypadkach, gdy zależy nam na przeprowadzeniu wielkoskalowych badań (zdolność do efektywnego przetwarzania dużej liczby próbek w krótkim czasie – wysoka przepustowość), profilowaniu złożonych mieszanin biologicznych (zdolność do radzenia sobie z wysoką zmiennością i złożonością próbek) oraz w przypadku analizy związków o dużych rozmiarach (masach cząsteczkowych), takich jak białka, u których przewidujemy, iż mogą one wykazywać ograniczoną stabilność w warunkach pracy z trybem reflektrometrycznym (zjawisko znacznej fragmentacji podczas przechodzenia przez pole reflektrometru, gdzie jony są najpierw zwalniane a następnie ponownie przyspieszane przez przyłożenie wysokiego pola elektrycznego [kV] w nanosekundowym przedziale czasowym), a tym samym ryzykiem drastycznego spadku czułości (możliwość ominięcia detektora reflektrometru przez jony fragmentacyjne o niskich masach) [2,16,17].

Wymienione powyżej charakterystyki techniki MALDI składają się na jej przewagę w porównaniu z popularną techniką ESI w kontekście badań próbek biologicznych w trzech istotnych obszarach analitycznych, a mianowicie skalowalności, szybkości oraz elastyczności w zakresie procedur przygotowania próbek. W przypadku ostatniego wymienionego obszaru – rozumianego jako możliwości dostosowania procedur przygotowania próbki celem zapewnienia optymalnych warunków jonizacji i wykrywania analitu, technika MALDI daje szeroki wachlarz modyfikacji, począwszy od możliwości analizy próbek bez wstępnego przygotowania (np. całych komórek mikroorganizmów) poprzez szereg rodzajów metod ekstrakcyjnych włączając w nie te przeprowadzane bezpośrednio na płytkach służących do analiz, a skończywszy na prostym doborze matrycy MALDI i sposobie jej nałożenia. Biorąc dodatkowo pod uwagę większą tolerancję techniki MALDI na obecność soli lub detergentów w próbkach, a więc brak konieczności wdrożenia dodatkowych procedur „oczyszczania” próbek, przekłada się to w rezultacie na dużo krótszy czas potrzebny do uzyskania wiarygodnego wyniku niż w przypadku techniki ESI, co w połączeniu z dużą szybkością generowania widm MS (związanej z wymienionymi wcześniej parametrami pracy lasera) daje w rezultacie doskonałe narzędzie do analizy biomolekularnej bardzo dużych zestawów próbek (skalowalność analiz). Powoduje to iż technika MALDI-TOF MS może być traktowana jako jedno z najbardziej wszechstronnych narzędzi do analizy składu biopolimerów komórkowych i szybko po jej wprowadzeniu w 1987 i 1988 roku przez Hillenkampa oraz Tanakę stała się obiektem szczególnego zainteresowania w obszarze badań mikrobiologicznych [4,8,18].

MALDI-TOF MS – rewolucja w identyfikacji mikrobiologicznej

Technika MALDI-TOF/MS reprezentuje proteomiczne podejście do identyfikacji mikroorganizmów, ponieważ opiera się przede wszystkim na detekcji białek. Zjonizowane formy białek są identyfikowane na podstawie ich stosunku masy do ładunku (m/z), a generowane widma masowe są unikatowe dla poszczególnych mikroorganizmów, ponieważ w ich skład wchodzi głównie silnie konserwowane ewolucyjnie białka rybosomalne (ok.

50%) [19,20]. W tym kontekście technika MALDI może być traktowana jako metoda komplementarna dla technik biologii molekularnej bazujących na sekwencjonowaniu regionu 16S rRNA (tzw. „złotego standardu identyfikacji”) wchodzących w skład małej podjednostki rybosomów organizmów prokariotycznych. Identyfikacja organizmu następuje poprzez porównanie otrzymanego profilu białkowego (specyficznego białkowego „odcisku palca” mikroorganizmu) z referencyjną bazą danych, a uzyskana korelacja zarówno pozycji jak i intensywności sygnału służy do generowania wartości dopasowania, którego wartość opisuje poziom ufności z jaką badany organizm został dopasowany do odpowiadającego mu mikroorganizmu referencyjnego. Wykorzystanie MALDI-TOF/MS w identyfikacji mikroorganizmów posiada szereg korzyści, które powodują, iż technika ta szybko staje się nowym złotym standardem diagnostyki mikrobiologicznej. Po pierwsze może być zastosowana do szerokiego wachlarza rodzajów mikroorganizmów bez konieczności wcześniejszego ich definiowania, jak ma to miejsce w przypadku technik bazujących na DNA (techniki biologii molekularnej – sekwencjonowanie kwasów nukleinowych). Po drugie analiza jest szybka, a gotowy wynik można otrzymać już w ciągu kilku minut. Dodatkowo metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością co powoduje, że do wiarygodnej analizy wymagana jest stosunkowo niewielka ilość materiału - $<10^4$ komórek mikroorganizmów. Niewątpliwym atutem tej techniki jest szeroki wachlarz metod przygotowania próbek, które charakteryzują się dużą prostotą procedur w stosunku do innych metod zaczynając od możliwości wykorzystania całych, natywnych komórek (ang. *intact/whole cells method*) poprzez prostą ekstrakcję na płytce (ang. *on-target extraction*) a skończywszy na pełnej ekstrakcji białek (ang. *in-tube/full extraction method*). Niemniej jednak należy pamiętać, że sposób nakładania matrycy (np. metoda kanapki (ang. *sandwich*), metoda suchej kropli (ang. *dry droplet*), metoda cienkiej warstwy (ang. *thin layer*)) oraz wybór matrycy (np. pochodne kwasu benzoowego lub cynamonowego, związki heterocykliczne) odgrywają również kluczową rolę w analizie MALDI. Czynniki te wpływają na jednorodność i proces krystalizacji mieszaniny próbki z matrycą, stopień desorpcji i jonizacji analitu oraz jego poziom fragmentacji. Ponadto, mają one wpływ na selektywność względem różnych typów analitów (np. polarne vs. niepolarne), poziom szumów tła oraz powtarzalność analiz. Matryce tworzące jednorodne struktury krystaliczne, takie jak kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy, sprzyjają wyższej odtwarzalności analiz w porównaniu do tych tworzących nieregularne struktury, takie jak igłowate kryształy kwasu 2,5-dihydroksybenzoowego [21–23].

Technika MALDI-TOF MS znalazła już zastosowanie w identyfikacji licznych grup mikroorganizmów, w tym bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, mykobakterii, czy też różnych rodzajów grzybów. Szybka analiza uzyskanych profili białkowych, w tym przede wszystkim ich porównywanie ze wzorcowymi widmami szczepów referencyjnych, nie byłaby możliwa bez wsparcia odpowiedniego oprogramowania. Obecnie najbardziej rozpowszechnionymi i jednocześnie wiodącymi na rynku platformami do identyfikacji mikroorganizmów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS są platformy MALDI Biotyper (Bruker) oraz Vitek MS System (Biomerieux). Oba systemy posiadają własne biblioteki widm referencyjnych i zapewniają dużą automatyzację procesu identyfikacji. Ich wysoka wiarygodność zaowocowała zatwierdzeniem przez amerykańską Agencję Żywności i

Leków (ang. *US Food and Drug Administration, FDA*) ich dopuszczenia do wykorzystania w rutynowych analizach przez kliniczne laboratoria mikrobiologiczne w Stanach Zjednoczonych do identyfikacji najważniejszych z medycznego punktu widzenia mikroorganizmów klinicznych [24–28]. Warto wspomnieć, iż ze względu na rosnącą popularność techniki MALDI w rutynowych laboratoriach bioanalitycznych, na rynku pojawia się coraz więcej nowoczesnych aparatów i systemów, głównie pochodzących z Chin, których skuteczność w analizie próbek mikrobiologicznych wciąż wymaga dalszych badań. Wśród takich systemów można wymienić system EXS 2600 firmy Zybio Inc., który, podobnie jak MALDI Biotyper czy Vitek MS, służy do automatycznej identyfikacji mikroorganizmów. Obecnie w Polsce znajduje się tylko jeden taki aparat, który jest zlokalizowany w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu, gdzie pod kierownictwem dr hab. Pawła Pomastowskiego i z moim udziałem, jest poddawany badaniom walidacyjnym w kierunku opracowania jego zastosowania do analiz próbek mikrobiologicznych do wdrożenia w polskich laboratoriach diagnostycznych sektora przemysłowego, w tym szczególnie związanego z przetwórstwem mleczarskim, przy współpracy z POLGEN MACHEJKO (Łódź, Polska) – polskim dystrybutorem instrumentu Zybio EXS 2600 w ramach współpracy międzynarodowej z Chińską Republiką Ludową.

Chociaż wprowadzenie techniki MALDI do praktyki pracy laboratoriów mikrobiologicznych można uznać za duży postęp w dziedzinie, ponieważ umożliwia ona identyfikację mikroorganizmów do rodzaju, gatunku, a nawet podgatunku z dokładnością i specyficzną porównywalną do wyników uzyskiwanych metodą sekwencjonowania DNA (na poziomie zgodności klasyfikacji taksonomicznej rzędu 90 - 100% w zależności od gatunku mikroorganizmu i/lub rodzaju próbki), to nadal nie może być ona uznawana za metodę kompletną ze względu na szereg ograniczeń i wyzwań wynikających z charakteru badań próbek mikrobiologicznych.

Kluczowe wyzwania poszerzania użyteczności techniki MALDI – TOF MS w rozwiązywaniu problemów skutecznej charakterystyki mikrobiologicznej matryc klinicznych i środowiskowych

W środowisku naturalnym, włączając w to organizm ludzki, mikroorganizmy rzadko występują w formie monokultur (występowanie pojedynczego typu/gatunku). Znacznie częściej tworzą one mniej lub bardziej złożone mieszaniny różnych gatunków mikroorganizmów, co sprawia, że dokładna i wiarygodna charakterystyka składu mikrobiologicznego badanej matrycy biologicznej stanowi duże wyzwanie zarówno dla badaczy, jak i personelu rutynowych laboratoriów diagnostycznych. Jednym z przykładów tego typu matryc są rany zakażenia stopy cukrzycowej (ZSC) – materiał biologiczny charakteryzujący się złożonym składem mikrobiologicznym podlegającym dynamicznym zmianom w czasie progresji schorzenia, u którego, podobnie jak w przypadku innych zakażeń ran skóry, istnieją trudności w określeniu patogenego charakteru występujących gatunków drobnoustrojów ze względu na obecność dużej liczby gatunków komensalnych, które jednak mogą stać się patogenne w odpowiednich warunkach (patogeny oportunistyczne) [29,30]. Wskazuje się, że obecność więcej niż jednego rodzaju komórek bakteryjnych w badanej próbce może prowadzić do braku lub błędnej identyfikacji taksonomicznej jako efekt

nakładania się widm MS pochodzących od obu bakterii. A więc zjawisko występowania wielu rodzajów bakterii w próbce jednocześnie, wymaga podjęcia odpowiednich procedur ich skutecznego rozdzielenia przed analizą MALDI celem uzyskania widm MS pochodzących od pojedynczych gatunków drobnoustrojów (czystych kultur). Do takich procedur należy zaliczyć hodowlę mikroorganizmów na podłożach stałych w zmiennych warunkach inkubacji, aczkolwiek jej zastosowanie wiąże się z koniecznością rozwiązania szeregu istotnych aspektów analitycznych, takich jak: (1) zmienne wymagania pokarmowe bakterii mogące skutkować faworyzowaniem tych o niskich wymaganiach pokarmowych; (2) różne tempo wzrostu bakterii prowadzące do dominacji gatunków szybko rosnących oraz (3) wpływie zastosowanych warunków hodowlanych, w tym przede wszystkim składu podłoża mikrobiologicznego, na metabolizm komórkowy bakterii a tym samym skład ich profili białkowych i generowanych widm MS [31,32]. Wiąże się to również z koniecznością dostosowania systemu do analizy szerokiego zakresu rodzajów komórek mikroorganizmów, które mogą znacząco różnić się składem chemicznym. Adaptacja ta obejmuje dobór parametrów analizy (zakres m/z , warunki pracy lasera, sposób zbierania widm), selekcję odpowiednich analiz statystycznych do porównywania uzyskiwanych widm MS (algorytmy klasyfikacji, metody obróbki surowych widm, takie jak wygładzanie, usuwanie linii bazowej i metody kalibracji), wybór trybu pracy analizatora mas (liniowy, reflektrometryczny) oraz sposób konstrukcji bazy widm referencyjnych [33–35].

Duża bioróżnorodność (złożoność gatunkowa) to nie jedyny problem analityczny związany z analizą mikrobiologiczną matryc biologicznych. Drugi, niezwykle istotny i często kluczowy element wiarygodnej diagnostyki mikrobiologicznej jest zdolność do rozróżniania komórek bakteryjnych reprezentujących odmienny gatunek, ale charakteryzujących się bardzo zbliżonym składem profili molekularnych, tzw. gatunków blisko spokrewnionych [19]. Ich poprawna klasyfikacja za pomocą powszechnie stosowanych metod hodowlanych (hodowla na podłożach różnicujących, mikroskopowa analiza cech morfologicznych komórek, szeregi biochemiczne) jest często niemożliwa, ponieważ metody te opierają się na badaniu różnic fenotypowych pomiędzy bakteriami, które w przypadku gatunków blisko spokrewnionych są na tyle małe, że nie mogą one być ujawnione podczas standardowych procedur identyfikacyjnych [3,36,37]. Znacznie wyższą moc dyskryminacyjną identyfikacji bakterii prezentują techniki biologii molekularnej oparte o analizę sekwencji nukleotydowej regionu 16S rRNA amplifikowanego za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) uważanej za „złoty standard” w identyfikacji drobnoustrojów. Niemniej jednak istnieją przypadki, gdzie zastosowanie sekwencjonowania 16S rRNA również nie przynosi rozwiązania problemu wiarygodnego rozróżnienia niektórych gatunków bakterii, np. *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus paracasei*, *Escherichia coli* i *Shigella* sp czy *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis*, ze względu na prezentowany przez nie wysoki stopień podobieństwa sekwencji nukleotydowej – znacznie przekraczający poziom 99%. Chociaż takie ograniczenie można przezwyciężyć stosując sekwencjonowanie dodatkowych genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), na przykład genu *sodA*, należy podkreślić, że takie podejście jest czasochłonne i nie znalazło jeszcze szerokiego zastosowania w rutynowych analizach ze względu na konieczność zaangażowania wyspecjalizowanego personelu [38–40]. Wspomniany problem analityczny dotyczy również badanej w niniejszej dysertacji techniki

MALDI-TOF MS, co wiąże się z faktem, iż w przypadku automatycznej identyfikacji bakterii z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych platform do identyfikacji mikroorganizmów za pomocą techniki MALDI, klasyfikacja następuje głównie na podstawie sygnałów pochodzących od białek rybosomalnych stanowiących ok 50% sumy wszystkich sygnałów znajdujących się w otrzymanywanym widmie MS, a te, jak wspomniano wcześniej, charakteryzują się w przypadku gatunków blisko spokrewnionych niskim stopniem wariancji. Jak pokazują liczne prace naukowe, takie wykorzystanie techniki MALDI jest wystarczające do uzyskiwania wyników klasyfikacji taksonomicznej na poziomie zbliżonym do wyników sekwencjonowania 16S rDNA, ale jednocześnie wiąże się z tymi samymi ograniczeniami w stosunku do szczepów blisko spokrewnionych[2,41].

Duży sukces wdrożenia techniki MALDI do identyfikacji mikroorganizmów w praktyce rutynowych laboratoriów klinicznych spowodowała, iż coraz częściej jest ona również przedmiotem zainteresowania badaczy zajmujących się problematyką analizy składu mikrobiologicznego różnego rodzaju próbek środowiskowych. Jak dotąd, można znaleźć przykłady zastosowania tej techniki jako precyzyjnego narzędzia do identyfikacji takich rodzajów bakterii środowiskowych, jak gatunki rozkładające zanieczyszczenia, bakterie fermentacyjne, patogeny przenoszone przez żywność, bakterie kwasu mlekowego, bakterie promujące wzrost roślin oraz takie o znaczeniu biotechnologicznym[41]. Jednocześnie, badania uwzględniające porównanie skuteczności metody MALDI w identyfikacji bakterii klinicznych i środowiskowych jasno wskazują na znaczący efekt środowiska życia bakterii na wiarygodność uzyskiwanych wyników identyfikacji. Prace dotyczące m. in. takich bakterii jak *Bacteroidetes fragilis* group, *Burkholderia cepacia* complex czy *Virgibacillus* sp. porównujące wpływ źródła pochodzenia izolatów (kliniczne vs środowiskowe) wskazują, iż dokładność przypisania taksonomicznego badanych izolatów bakterii pochodzących z materiału ludzkiego zawsze istotnie przewyższała tych pochodzących z innych, środowiskowych źródeł, np. ścieków, gleby, wody, osadów dennych itp.[42]. Wskazuje się, iż przedstawione zjawisko związane jest z faktem iż, bakterie występujące w różnych środowiskach mogą demonstrować różne, odmienne cechy fenotypowe, a zatem ich identyfikacja oparta na profilach białkowych za pomocą techniki MALDI-TOF MS może być utrudniona ze względu na obecność w otrzymanywanych widmach MS nie tylko sygnałów charakterystycznych dla danego gatunku bakterii (białek rybosomalnych), ale również tych pojawiających się w związku z mechanizmami adaptacyjnymi odpowiedzi bakterii na warunki stresowe.

Z drugiej strony należy pamiętać, iż platformy MALDI do identyfikacji drobnoustrojów przedstawiają podejście oparte o biblioteki widm MS (ang. *spectral library approach*), gdzie wyniki identyfikacji są bezpośrednio zależne od zgodności wzorca białkowego próbki z referencyjnymi widmami MS znajdującymi się w bazie danych. W takim podejściu, rozmiar bazy danych oraz reprezentacja gatunków w bibliotece znacząco wpływają na wynik klasyfikacji taksonomicznej[43]. Stąd u podstaw wyjaśnienia zjawiska różnej efektywności techniki MALDI w identyfikacji takich samych gatunków bakterii, ale różniących się pochodzeniem – kliniczne vs środowiskowe, leży również fakt, iż bazy widm referencyjnych platform do identyfikacji MALDI są optymalizowane głównie z uwzględnieniem izolatów klinicznych, co równa się większej liczbie ich widm

referencyjnych, a także fakt dalece wyższej bioróżnorodności gatunkowej próbek pochodzących z szeroko rozumianego środowiska w porównaniu do tych klinicznych [44,45]. Wspomniane czynniki powodują, iż zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji składu mikrobiologicznego próbek środowiskowych boryka się z głównym problemem jakim jest niewystarczająca reprezentacja szczepów środowiskowych w referencyjnych bazach danych co implikuje dużo większe znaczenie czynników mogących wpływać na odtwarzalność metody lub prowadzących do błędnej identyfikacji bakterii, w tym: (i) wybór odpowiedniej metody przygotowania próbki: warunki hodowli, w tym faza wzrostu bakterii = czas inkubacji (skład białek nierybosomalnych zależnych od statusu metabolicznego komórek); parametry ekstrakcji białek wpływające na zakres wykrywanych białek oraz obecność związków niebiałkowych (interferentów); dobór matrycy (wydajność i selektywność jonizacji analitów) oraz (ii) wielkość i struktura baz referencyjnych, w tym sposób przygotowania i wprowadzania widm szczepów wzorcowych.

Globalny kryzys systemu ochrony zdrowia człowieka związany głównie z wzrastającym odsetkiem infekcji wywoływanych przez bakterie oporne na antybiotyki, a w szczególności patogenów wielolekoopornych, powoduje stałą konieczność poszerzania wiedzy na temat mechanizmów oporności bakterii względem antybiotyków, która dalej umożliwiłaby stworzenie nowych narzędzi diagnostycznych pozwalających na szybką i wiarygodną identyfikację źródła zakażenia wraz z oceną poziomu lekooporności mikroorganizmów je wywołujących. Chociaż klinicyści powinni unikać niepotrzebnej antybiotykoterapii, skuteczne leczenie ciężkich zakażeń, zwłaszcza trudno gojących się i przewlekłych ran, wymaga podawania odpowiednich antybiotyków [46,47]. W obliczu zwiększonego wskaźnika izolacji patogenów opornych na antybiotyki, który można zaobserwować w ciągu ostatnich kilku dekad, wybór skutecznej terapii przeciwdrobnoustrojowej staje się większym wyzwaniem niż kiedykolwiek wcześniej [48]. Jest to głównie spowodowane stale rosnącą liczbą wielolekoopornych (ang. *multidrug-resistant bacteria*, MDR) gatunków bakterii Gram-ujemnych, takich jak te produkujące β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) lub karbapenemazy (CPB), a także wielolekooporne szczepy MDR *Pseudomonas aeruginosa*. Od lat 80-tych XX wieku szczepy ESBL są coraz częściej wykrywane u hospitalizowanych pacjentów i mają ogromne znaczenie kliniczne. Enzymy syntetyzowane przez bakterie ESBL są zdolne do hydrolizy powszechnie stosowanych antybiotyków β -laktamowych, takich jak penicyliny, monobaktamy czy też cefalosporyn trzeciej generacji. Do stosunkowo niedawna zakażenia bakteriami ESBL były z powodzeniem leczone innym typem antybiotyków β -laktamowych, a mianowicie karbapenemami, ale ich masowe stosowanie spowodowało pojawienie się i gwałtowne rozprzestrzenianie się drugiej ważnej grupy enzymów rozkładających antybiotyki - karbapenemaz. Karbapenemy są jednymi z najnowszych opracowanych antybiotyków β -laktamowych, które nadal posiadają szerokie spektrum działania bakteriobójczego, dlatego są często stosowane jako leki ostatniej szansy w leczeniu ciężkich zakażeń bakteryjnych [49–51]. W związku z tym globalny wzrost liczby bakterii wytwarzających karbapenemazy stanowi coraz większe zagrożenie dla systemu opieki zdrowotnej i bezpieczeństwa pacjentów i jest przedmiotem wielkiego niepokoju na całym świecie [52,53].

Wiele różnych metod wykrywania oporności/wrażliwości na antybiotyki znalazło zastosowanie w rutynowej praktyce klinicznej. Najczęściej stosowanymi technikami, oprócz badań przesiewowych z użyciem selektywnych podłoży chromogennych, są testy fenotypowe, takie jak test dyfuzji krążkowej lub połączone testy hamowania krążkowego, paski gradientowe MIC (wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego, ang. *minimal inhibitory concentration*, MIC) lub z nowszych rozwiązań- test inaktywacji β -laktamów (ang. *β -lactam Inactivation Assay*, CIM) [54,55]. Pomimo ich niskich kosztów i prostych procedur przygotowania, ich głównymi wadami są potrzeba prowadzenia dodatkowej inkubacji, która znacząco wydłuża czas oczekiwania na wynik (o 24 do 72 h) oraz stosunkowo niska specyficzność i selektywność. Zastosowanie metod molekularnych, takich jak ukierunkowane testy PCR, w tym testy multipleksowe (badające jednocześnie obecność kilku celów molekularnych- genów, w czasie trwania pojedynczej analizy), jest bardziej specyficzne i selektywne, a także umożliwia szybsze otrzymywanie wyników (nawet <4 godzin od rozpoczęcia analizy) [56,57]. Jednakże zastosowanie podejścia molekularnego jest bardzo często ograniczone, zwłaszcza w krajach rozwijających się, ze względu na wysokie koszty analiz, potrzebę wysoko wyszkolonego personelu lub dostępu do dedykowanego sprzętu i komercyjnych baz danych[27].

Jako rozwiązanie ograniczeń podejścia molekularnego podaje się technikę MALDI-TOF MS, która to, oprócz skuteczności w identyfikacji taksonomicznej patogenów klinicznych, okazała się również obiecującym narzędziem diagnostycznym ułatwiającym oznaczanie szerokiego zakresu bakterii produkujących β -laktamazy, w tym klinicznie istotne cefalosporynazy i karbapenemazy[58]. W dostępnej literaturze wykazano użyteczność tej techniki w, m.in. bezpośrednim wykrywaniu i klasyfikacji bakterii produkujących ESBL i AmpC izolowanych z dodatnich próbek krwi, w analizie poziomu degradacji cefalosporyn o szerokim spektrum działania przez enterobakterie posiadające gen OXA-48, czy w wykrywaniu aktywności karbapenemaz u gatunków należących do rodziny *Enterobacteriaceae*[59–61]. Wykazano również, że MALDI-TOF MS może skutecznie odróżniać wrażliwe i lekooporne patogeny poprzez wykrywanie specyficznych białek związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe. W związku z tym obecność małych peptydów rozpuszczalnej w fenolu moduliny PSM-mec (sygnał $2415 \pm 2,00$ m/z) może odróżnić opornego na metycylinę gronkowca złocistego (ang. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) od szczepu wrażliwego (ang. methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA), obecność sygnału $\sim 40\ 279$ m/z u *Acinetobacter baumannii* może wskazywać na oporność na karbapenemy, sygnał $11\ 109$ m/z u *Klebsiella pneumoniae* może być stosowany do rozróżniania szczepów wytwarzających KPC i nie wytwarzających KPC, podczas gdy zestaw przesunięć sygnałów w zakresie 4000 - 5500 m/z u *Bacteroides fragilis* może wskazywać na szczepy *cfiA*-ujemne lub -dodatnie)[62–65].

Z racji faktu, iż podejście opierające się o detekcję obecności specyficznych białek związanych z mechanizmem lekooporności (biomarkerów) charakteryzuje się jak dotąd niską czułością i specyficznością[66], jedynie wykrywanie aktywności hydrolitycznej β -laktamaz znalazło praktyczne zastosowanie w rutynowych laboratoriach diagnostycznych jako test MBT STAR-BL (dla szeroko rozumianej analizy antybiotyków β -laktamowych - ang. *MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance*) oraz MBT STAR-Carba i –Cepha dla

kolejno detekcji karbapenemaz oraz cefalosporynaz. Zasada działania metody opiera się na spektrometrycznej ocenie stopnia hydrolizy cząsteczki antybiotyku po krótkiej ko-inkubacji w zawiesinie badanego szczepu bakterii, którą wyznacza się na podstawie porównania masy zhydrolizowanych i niezhydrolizowanych form antybiotyku wyrażanej wartością $\log RQ$ [67,68]. Choć metoda ta charakteryzuje się dużą prostotą przygotowania próbek, krótkim czasem do uzyskania wyniku – 30 minut inkubacji i ok. 1 h do uzyskania końcowego wyniku dla enterobakterii, to przy zastosowania standardowych protokołów analitycznych pozwala ona jedynie na ocenę jakościową (obecność/brak enzymatycznego mechanizmu oporności na karbapenemy ocenianego na podstawie spadku intensywności sygnału pochodzącego od natywnej cząsteczki antybiotyku (imipenemu) – 300,2 m/z i jego adduktu z matrycą CHCA (489 m/z) oraz wzrostu intensywności sygnału dla cząsteczek zhydrolizowanych – 254,1 m/z) bez możliwości określenia rodzaju β -laktamaz odpowiedzialnych za oporność, a te, jak wiadomo z praktyki klinicznej, mogą znacząco wpływać na poziom wrażliwości bakterii na dawki antybiotyku (wartość MIC). Czynnikiem najbardziej limitującym możliwość wykorzystania wyników testu MBT STAR-BL do poszerzonej charakterystyki badanych bakterii antybiotykoopornych jest fakt iż do analizy wykorzystuje się bliżej nieokreśloną ilość biomasy komórkowej, a tym samym nie daje możliwości porównywania różnic w poziomie hydrolizy badanych antybiotyków (różna i zmienna liczba komórek bakteryjnych pomiędzy powtórzeniami, niemożność dokładnego określenia wpływu obecności substancji interferujących, np. składników pożywki).

4.4.2 Cele naukowe pracy.

Nadrzędnym celem podjętych przeze mnie w cyklu prac (**H1-H6**) [69–74] zadań badawczych było poszerzenie użyteczności techniki MALDI-TOF MS w analizie próbek klinicznych (**H1-H4**) [69–72] oraz środowiskowych (**H5-H6**) [73,74] poza rutynowo stosowane techniki przygotowywania próbek, warunki analiz oraz aparaturę badawczą w oparciu o niewykorzystany potencjał leżący u podstaw techniki oraz mając na względzie najważniejsze wyzwania analityczne towarzyszące analizom mikrobiologicznym. Implementację głównej koncepcji badawczej cyklu prac osiągnąłem poprzez realizację celów szczegółowych, które można podzielić na dwie główne kategorie: (A) poszerzanie wiedzy na temat wpływu zmiennych parametrów analizy MALDI na wynik charakterystyki mikroorganizmów; (B) adaptacja techniki MALDI do pogłębionej charakterystyki różnych próbek biologicznych – opracowywanie nowych procedur analitycznych.

Ad. 1

W ramach kategorii wyznaczyłem następujące cele badawcze:

- ocena zdolności różnych typów podłoży hodowlanych różniących się składem chemicznym na efektywność pozyskiwania różnych izolatów bakteryjnych (wolno/szybko rosnące; o wysokich/niskich wymaganiach pokarmowych; dominujące/w mniejszości) z próbek klinicznych charakteryzujących się dużą złożonością gatunkową z oceną wpływu zmiennego składu podłoża na skład profili molekularnych bakterii, a w konsekwencji na poziom wiarygodności identyfikacji (**H1, H2**) [69,70];

- ocena wpływu adaptacji spektrometru MALDI-TOF/TOF MS ultrafleXtreme II ze zmodyfikowanym laserem neodymowo-yagowy smartbeam-II, który nie jest używany do rutynowych oznaczeń mikrobiologicznych, na jakość uzyskiwanych wyników charakterystyki mikrobiologicznej w zakresie podstawowej analizy taksonomicznej bakterii (klasyfikacja do gatunku), rozróżniania blisko spokrewnionych szczepów (znaczenie detekcji białek nierybosomalnych) oraz oznaczania poziomu antybiotykooporności (detekcja związków niskocząsteczkowych) (**H1 –H3, H5**) [69–71,73];
- określenie potencjału lipidomicznej analizy MALDI w rozróżnianiu blisko spokrewnionych szczepów bakterii klinicznych z uwzględnieniem wpływu rodzaju hodowli (płynna vs stała) – zdolność techniki MALDI do generowania unikatowych profili lipidowych bakterii w tym zakres rodzaju identyfikowanych lipidów (**H3**) [71];
- porównanie skuteczności i ocena użyteczności rozróżniania blisko spokrewnionych szczepów bakterii klinicznych za pomocą analizy proteomicznej i lipidomicznej MALDI oraz analizy powierzchniowych grup funkcyjnych bakterii techniką spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR) (**H3**) [71];
- ocena skuteczności identyfikacji bakterii z różnych matryc klinicznych i środowiskowych za pomocą techniki MALDI na tle złotego standardu identyfikacji bakterii - sekwencjonowania 16S rRNA (**H2, H3, H5**) [70,71,73];
- ocena wpływu zmiennych warunków przygotowania próbki – gęstość zawiesiny komórkowej, czas inkubacji, dodatek inhibitora, na wynik detekcji antybiotykooporności warunkowanej obecnością enzymów hydrolizujących karbapenemy za pomocą techniki MALDI (testu MBT STAR-Carba) w trybie analizy liniowej TOF (zakres m/z 100-1000) i ich potencjalne znaczenie w ocenie wyników negatywnych bądź niepewnych oraz klasyfikacji rodzaju karbapenemaz (**H4**) [72];
- ocena konstrukcji bazy widm referencyjnych na wynik identyfikacji taksonomicznej MALDI złożonych próbek środowiskowych – ewaluacja skuteczności nowego na rynku systemu do automatycznej identyfikacji mikroorganizmów EXS2600 Zybio (**H6**) [74].

Ad. 2

W ramach kategorii wyznaczyłem następujące cele badawcze:

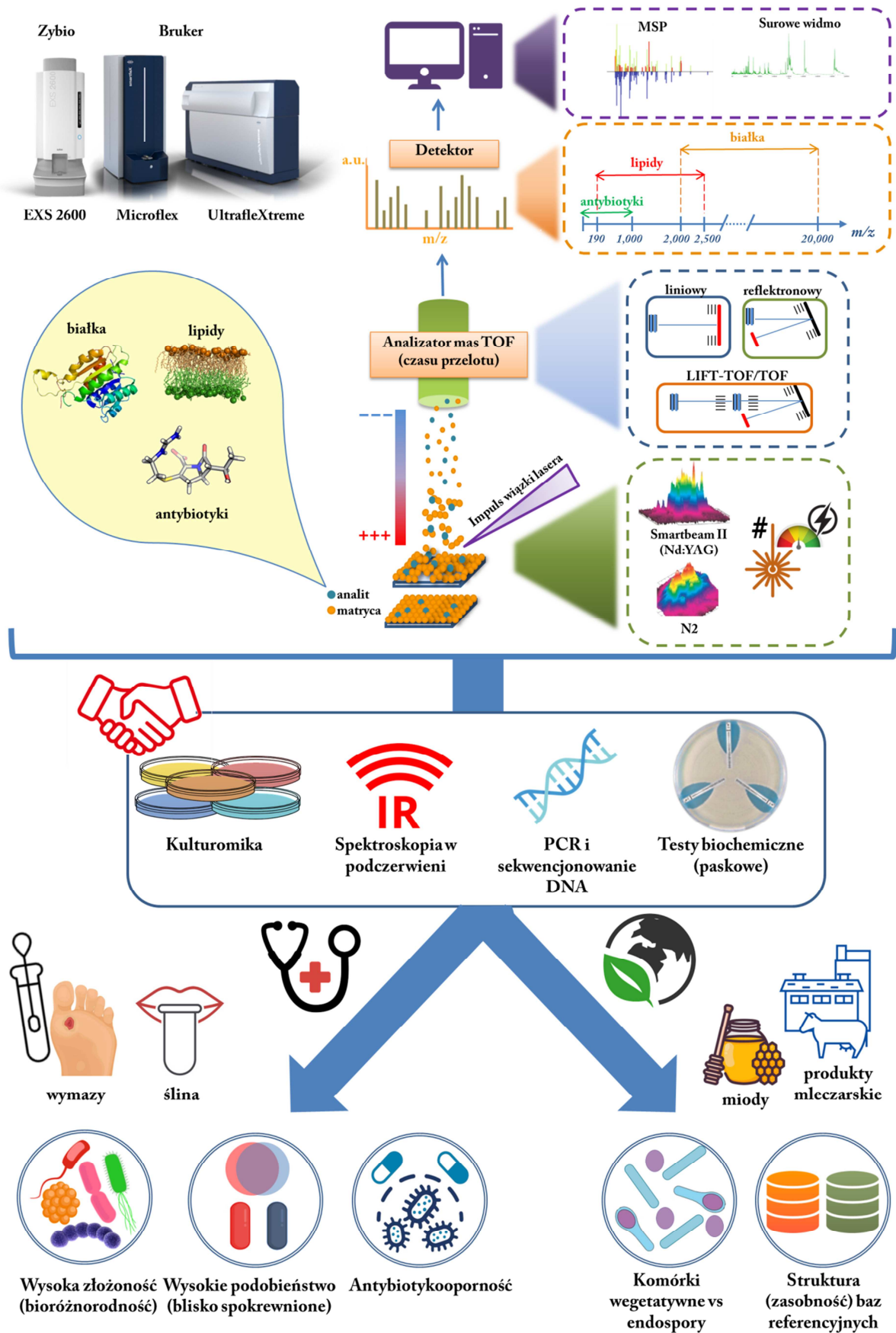
- opracowanie nowej metody określania składu mikrobiologicznego złożonych matryc klinicznych typu rany powierzchniowe ZSC przy wykorzystaniu analizy proteomicznej komórek bakteryjnych MALDI-TOF MS, podejścia kulturomicznego jako metody przygotowania próbki oraz oceny ich antybiotykooporności względem antybiotyków β -laktamowych przy wykorzystaniu techniki MALDI-TOF MS (test MBT STAR-BL) (**H1, H2**) [69,70];
- opracowanie multi-instrumentalnej (wielonarzędziowej) metody badania składu mikrobiologicznego próbek śliny użytecznej w rozwiązywaniu problemu rozróżniania blisko spokrewnionych gatunków paciorkowców ślinowych w oparciu o analizy proteomiczne i lipidomiczne MALDI oraz analizę powierzchniowych grup funkcyjnych techniką FTIR (**H3**) [71];
- opracowania nowego protokołu detekcji aktywności karbapenemaz przy wykorzystaniu testu MBT STAR-Carba w oparciu o gradient gęstości zawiesin komórkowych i zmiennych czasów

inkubacji oraz w warunkach dodatku inhibitorów metalo- β -laktamaz jako metody wstępnej charakterystyki bakterii pod względem wytwarzanych klas karbapenemaz oraz jako surogat testu MIC w analizie badania skuteczności inhibitorów metalo- β -laktamaz (**H4**) [72];

- opracowanie protokołu charakterystyki mikrobioty różnych typów miodów w oparciu o identyfikację bakterii techniką MALDI z zastosowaniem aparatury ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS zaadaptowanej do pracy z platformą MALDI Biotyper jako skutecznego narzędzie do klasyfikacji i rozróżniania bakterii przetrwalnikujących oraz oceny wpływu typu miodów i ich pochodzenia na skład mikrobiologiczny (**H5**) [73];

- opracowanie protokołu charakterystyki składu mikrobiologicznego różnych typów próbek mleczarskich w oparciu o technikę MALDI z wykorzystaniem nowego na rynku systemu do identyfikacji mikroorganizmów EXS 2600 Zybio z własną bazą widm referencyjnych (**H6**) [74].

Na Rys. 1 przedstawiam poglądowy schemat obrazujący najważniejsze elementy opracowywanych protokołów analizy próbek mikrobiologicznych w oparciu o technikę MALDI-TOF MS, które wykorzystałem podczas realizacji prac badawczych w cyklu prac **H1-H6**.



Rys. 1. Poglądowy schemat przedstawiający parametry opracowywanych podejść do zastosowań w badaniach mikrobiologicznych w oparciu o technikę MALDI-TOF MS wykorzystywanych w cyklu prac H1-H6.

4.4.3 Omówienie wyników badań.

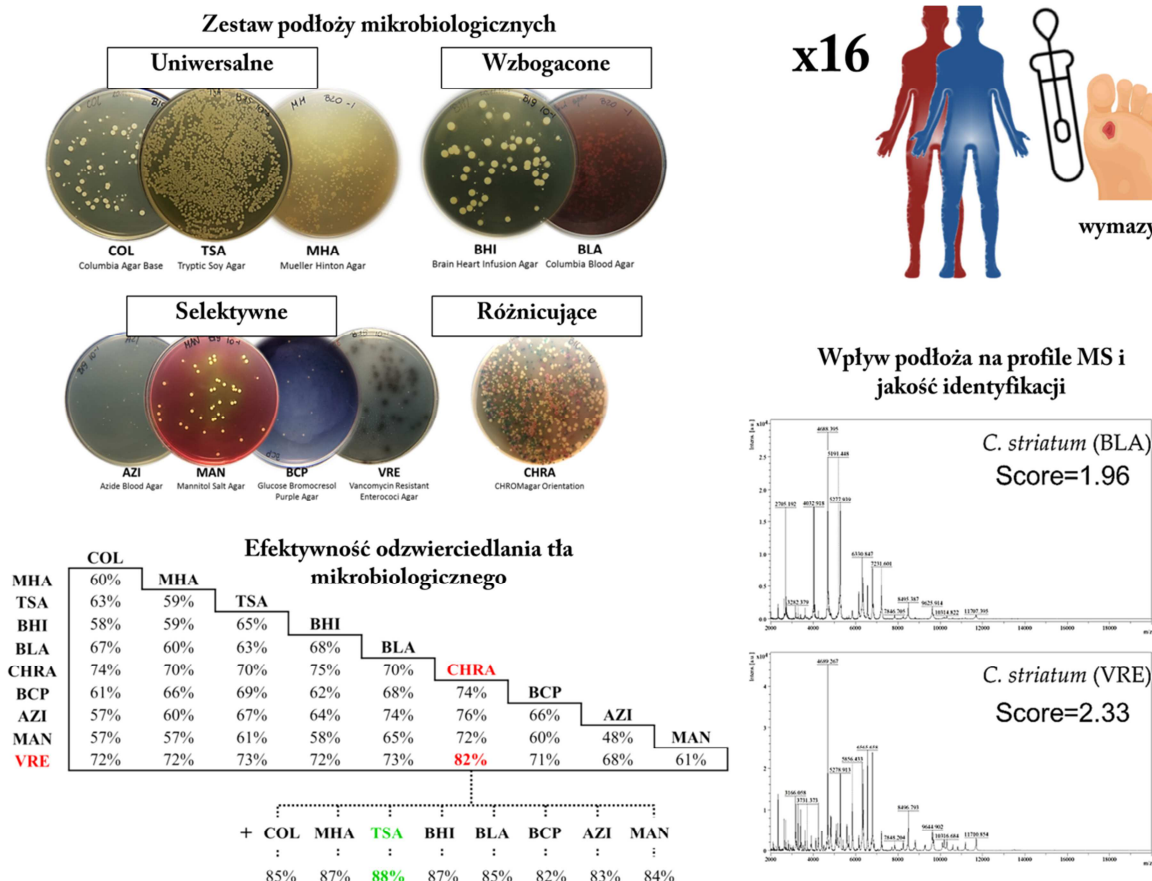
Adaptacja techniki MALDI do analizy złożonych matryc klinicznych – podejście kulturomiczne (H1, H2)

W publikacjach **H1** i **H2** [69,70] podjąłem się prac nad opracowaniem protokołu analitycznego wykorzystującego nowoczesne podejście kulturomiczne (ang. *modern culturomics approach*) - zastosowanie wielu warunków hodowlanych jako metody przygotowania próbki połączonej z szybką identyfikacją mikroorganizmów za pomocą analizy proteomicznej komórek bakteryjnych MALDI-TOF MS, jako nowego narzędzia analitycznego do rozwiązywania problemu wiarygodnej charakterystyki złożonych mikrobiologicznie próbek klinicznych. W badaniach wykorzystałem próbki wymazów z rany powierzchniowych pacjentów cierpiących na zakażenie stopy cukrzycowej (ZSC), jako dobry przykład złożonych mikrobiologicznie próbek klinicznych, gdzie udział w schorzeniu bierze wiele różnych rodzajów bakterii znacząco różniących się cechami fenotypowymi, a ponadto skład ten ulega dynamicznym zmianom w czasie, co dodatkowo utrudnia szybką i wiarygodną charakterystykę podłoża mikrobiologicznego zakażenia.

W badaniu wyszedłem z podstawowego i kluczowego założenia, iż u podstaw metody kulturomicznej leży dobór zestawu podłoży hodowlanych o zmiennym składzie chemicznym, które z zasady mają zapewnić odpowiedni wzrost dla różnych typów komórek bakteryjnych znajdujących się w próbce, a tym samym umożliwić pozyskanie odpowiednich ilości materiału do dalszych analiz MALDI z możliwie jak największej liczby rodzajów bakterii obecnych w próbce (w idealnym przypadku wszystkich). W większości dotychczasowych badań prowadzonych nad mikrobiotą ZSC warunki hodowlane nie były przedmiotem dyskusji, a ich wybór ograniczał się do powszechnie przyjętych zaleceń. Stąd istnieje duża zmienność w rodzaju stosowanych podłoży hodowlanych, np. Luria Bertani (LB), agar z krwią (BLA), tryptyczny agar sojowy (TSA), podłoże Chapmana, agar M17 i wiele innych, co przyczynia się do znacznych rozbieżności w uzyskiwanych wynikach identyfikacji bakterii, tym bardziej, że najczęściej są one stosowane pojedynczo [75–77]. Dlatego też w podjętym badaniu przeprowadziłem ocenę porównawczą zdolności różnych typów podłoży znacząco różniących się składem chemicznym (uniwersalne, selektywne, różnicujące, wzbogacone) na efektywność pozyskiwania różnych izolatów bakteryjnych z wymazów powierzchniowych ran pacjentów cierpiących na ZSC, w tym ich użyteczność jako składnik zestawów pożywek. Należy podkreślić, że przy projektowaniu badania zaplanowałem zanalizowanie 10 komercyjnie dostępnych podłoży hodowlanych mając na uwadze możliwość łatwego wdrożenia opracowanej metody do pracy rutynowych laboratoriów klinicznych (Rys. 2).

W wyniku hodowli na 10 badanych podłożach pozyskałem łącznie 204 różne izolaty bakteryjne. Dla wszystkich pozyskanych izolatów bakteryjnych udało się uzyskać widma MS mieszczące się w założonym zakresie m/z , tj. 2,000 – 20,000 m/z , aczkolwiek mierzone sygnały nie przekraczały wartości 12 000 Da. Dla blisko 80% próbek uzyskane profile molekularne komórek bakteryjnych pozwalały na identyfikację mikroorganizmów na poziomie gatunkowym. Co więcej, dla pozostałych próbek nie zanotowano poziomu identyfikacji poniżej wiarygodnej identyfikacji rodzajowej, co świadczy o dobrej jakości

generowanych widm MS bakterii. Przeprowadzenie identyfikacji zebranych profili białkowych bakterii z użyciem platformy MALDI Biotyper 4.1 i bazy widm referencyjnych v.1.0.16.0 (6903 MSP; 27.06.2017) ujawniła, iż reprezentowały one 18 różnych gatunków bakterii- głównie *Enterococcus faecalis* (63%) i *Staphylococcus aureus* (44%). Większość próbek (81%) miała charakter wielobakteryjny.



Rys. 2. Poglądowy schemat opracowywania nowego protokołu analizy składu mikrobiologicznego ran powierzchniowych osób cierpiących za ZSC w oparciu o identyfikację MALDI-TOF MS.

Analiza porównawcza badanych podłoży wskazała na znaczący wpływ rodzaju podłoża na różnice odnośnie identyfikowanej liczby gatunków, liczby izolowanych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz skuteczności odzwierciedlania składu mikrobiologicznego badanych próbek. Wykazałem, iż zastosowanie powszechnie zalecanego agaru z krwią pozwalało na ujawnienie jedynie 53% całkowitego składu mikrobiologicznego próbek ZSC, co było niższą wartością od zarówno podłoży różnicujących (chromagar orientation (CHRA) i agar bromokrezolowy z glukozą (BCP)), jak i agaru selektywnego vancomycin-resistant enterococi agar (VRE). Ujawniłem, iż zastosowanie podejścia kulturomicznego znacząco wpływa na skuteczność obrazowania składu gatunkowego próbek ZSC – zastosowanie standardowego agaru krwistego z dwoma dodatkowymi podłożami (CHRA i VRE) zwiększa odsetek oznaczanego składu o blisko jedną trzecią (32%). Wykazałem, że spośród badanych, komercyjnych podłoży hodowlanych, na szczególną uwagę zasługują podłoże różnicujące CHRA oraz selektywne VRE, które jak dotąd nie znalazły jeszcze szerokiego zastosowania w badaniu składu mikrobiologicznego ZSC, a wykazują one

wysoką przydatność do zastosowań w podejściu kulturomicznym przygotowywania próbek mikrobiologicznych.

Przy opracowywaniu koncepcji nowej metody badania tła mikrobiologicznego ZSC wziąłem pod uwagę również analizę wpływu zastosowanego rodzaju podłoża hodowlanego na skład profili molekularnych bakterii (widm MS), a tym samym efektu składu chemicznego podłoża na wiarygodność i poziom (rodzajowy/gatunkowy) uzyskiwanych wyników identyfikacji za pomocą techniki MALDI-TOF MS. Detekcja i charakterystykach sygnałów różnicujących badane próbki ze względu na rodzaj zastosowanego podłoża mikrobiologicznego wymaga zastosowania warunków analizy o odpowiednio wysokiej czułości i rozdzielczości – wyższej niż w przypadku standardowej procedury identyfikacji polegającej na przyrównywaniu całych profili białkowych bakterii ze wzorcami z referencyjnej bazy danych. Stąd do analizy profili białkowych izolowanych bakterii wykorzystałem spektrometr MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme II (Bruker Daltonik GmbH, Brema, Niemcy) wyposażony w zmodyfikowany laser neodymowo-yagowy smartbeam-II, który w stosunku do rutynowo stosowanych aparatów z laserem azotowym charakteryzuje się wyższą czułością (150:1 vs 50:1), rozdzielczością (25 000 vs 1000) oraz wyższą częstotliwością digitizera (2 GHz vs 0.5 GHz)[78]. W związku z tym, że uzyskiwane widma MS miały być wykorzystywane do identyfikacji bakterii za pomocą platformy Biotyper dedykowanej aparatom typu Microflex wyposażonym w inny typ lasera UV – azotowy, warunki pracy aparatu i lasera musiałem dostosować w taki sposób, aby generowane widma MS były kompatybilne z algorytmami klasyfikacji systemu opierającymi się na przekształceniu profili MS w główne widma (ang. *main spectra*, *MSPs*) i ich przyrównaniu z widmami znajdującymi się w referencyjnej bazie. W rezultacie, opracowałem nowe warunki pracy spektrometru MALDI TOF MS: 2500 impulsów lasera na spot (500 na pojedynczym widmo), zakres m/z = 2000 - 20 000, napięcie przyspieszające = 25 kV, global attenuator offset = 20% i attenuator offset = 34% i jego zakres = 34%, moc lasera = 40%). Aby zapewnić możliwie najwyższą wiarygodność zarówno wyników identyfikacji bakterii, jak i analizy składu ich profili proteomicznych, pozyskiwane widma poddałem procesowi wygładzania oraz korekty linii bazowej wybierając do tego celu (spośród szeregu dostępnych metod) odpowiednio: metodę Savitsky-Golay z zastosowaniem szerokości 2 m/z i 10 cyklach) oraz algorytm TopHat (ustalony próg stosunku sygnału do szumu = 2, wybrany algorytm detekcji sygnałów – centroidalny).

Badając efekt składu chemicznego podłoża hodowlanego wyszedłem od ogólnego założenia klasyfikacji mikroorganizmów za pomocą techniki MALDI u podstaw której leży porównywanie widm masowych reprezentujących specyficzne molekularne odciski palców mikroorganizmów, głównie białek (podejście proteomiczne w identyfikacji). W procesie identyfikacji nie wykorzystuje się metody bezpośredniego przyrównywania zarejestrowanych na detektorze widm MS, ale wygenerowanych na ich podstawie widm MSP, które to stanowią zbiór sygnałów składających się głównie z konserwowanych białek rybosomalnych stanowiących około 50% sumy wszystkich zarejestrowanych sygnałów[19,20]. Wysoki udział białek rybosomalnych jest odpowiedzialny za wysoką powtarzalność i wiarygodność identyfikacji gatunków bakterii techniką MALDI, co też zaobserwowałem w przeprowadzonym przeze mnie badaniu. Wyraźnie obrazują to przykłady bakterii, dla których

uzyskano najwyższe wartości Score (wartość stopnia przyrównania z widmem referencyjnym oznaczający stopień podobieństwa), np. *Morganella morganii* hodowanej na podłożu VRE (wartość Score = 2.48 ± 0.05), gdzie wykryłem duże intensywności dla sygnałów 5382.4 *m/z*, 6353.4 *m/z* oraz 7275.3 *m/z* reprezentujące różne białka rybosomalne (50S L34, L32 i L29, odpowiednio [zgodnie z bazą danych UniProt]). Jednakże, w generowanych profilach MS bakterii są obecne również sygnały reprezentujące inne, nierybosomalne białka, które w mniejszym lub większym stopniu są zależne od statusu metabolicznego komórek drobnoustrojów. Dlatego też zmiana składu chemicznego pożywki hodowlanej może prowadzić do zmian w ekspresji białek nierybosomalnych, a tym samym składu całych profili molekularnych. Zakłada się, że skala wpływu tego efektu na ostateczny wynik identyfikacji może zależeć zarówno od rodzaju badanego drobnoustroju jak i rodzaju zmian w składzie chemicznym podłoża i wynika z poziomu zmian w stosunku zawartości białek nierybosomalnych (metabolicznie zależnych) do konserwowanych ewolucyjnie białek rybosomalnych. W przeprowadzonym doświadczeniu największe różnice w poziomach identyfikacji zaobserwowałem dla gatunków *Corynebacterium striatum*, *Morganella morganii* oraz *Proteus mirabilis* hodowanych na agarze z dodatkiem krwi (BLA) i selektywnej pożywce VRE. Dla wszystkich wymienionych gatunków zastosowanie podłoża VRE dało znacznie wyższe wartości Score w porównaniu do agaru z krwią – zwiększenie wartości Score o wartość od 0.4 (*C. striatum*) do 0.7 (*M. morganii*). Analiza proteomiczna składu widm masowych za pomocą bazy danych UniProt ujawniła wiele różnic w obecności/braku specyficznych sygnałów u wymienionych gatunków bakterii w zależności od zastosowanego podłoża. Biorąc pod uwagę tylko białka zidentyfikowane przy użyciu bazy UniProt, analiza wykazała od 11 do 59 sygnałów różnicujących badane bakterie pod względem zastosowanych podłoży BLA i VRE. Zmiany te obejmowały sygnały zarówno z dolnego zakresu mas, np. 3094.3 *m/z* (Potassium-transporting ATPase subunit F), 5333.4 *m/z* (Heat shock protein J) czy 6232.5 *m/z* (Lysophospholipase)-*M. morganii*, jak i te o wyższych wartościach *m/z*, np. 11684.1 *m/z* (Protein translocase subunit SecE) czy 11707.4 *m/z* (DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing))- *C. striatum*. Zanotowane przeze mnie zjawisko może wynikać ze znacznie różniących się składów pożywek, takich jak obecność odwłóknionej krwi owczej i skrobi w przypadku podłoża BLA, a także ekstraktu drożdżowego, eskuliny, cytrynianu żelazowo-amonowego i azydku sodu w przypadku pożywki VRE. Podobne zjawisko odnotowałem w innej pracy niewchodzącej w skład cyklu publikacji Złoch i in. 2020 [19], gdzie wybór rodzaju podłoża znacząco wpływał na skład profili proteomicznych różnych szczepów *S. aureus*, prowadząc do dużej zmienności w skuteczności ich rozróżniania techniką MALDI. Wyniki obu prac mogą wskazywać na zachodzenie procesu indukcji różnych szlaków metabolicznych w komórkach bakterii w odpowiedzi na określone składniki podłoża, co znajduje odzwierciedlenie w różnicach rejestrowanych sygnałów w widmach MS. Dodatkowo, w przypadku pożywek zawierających krew zwierzęcą należy brać pod uwagę również ryzyko kontaminacji profili białkowych bakterii białkami pochodzącymi z dodawanej do podłoża krwi [79]. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują, że chociaż zastosowanie wszystkich badanych podłoży hodowlanych pozwala na wiarygodną identyfikację bakterii na poziomie gatunkowym, to jednak w przypadku niektórych gatunków bakterii dobór podłoża może znacząco poprawić jakość identyfikacji, co udowodniłem w przypadku *C. striatum*, *P.*

mirabilis i *M. morgani* hodowanych na podłożu VRE. Bazując na zanotowanych obserwacjach mogę zasugerować, aby podczas oceny przydatności podłoża hodowlanych do obrazowania tła mikrobiologicznego złożonych próbek biologicznych, takich jak wymazy z ran ZSC, oprócz selektywnych właściwości podłoża hodowlanych, brać pod uwagę również wpływ ich składu chemicznego na profile molekularne bakterii.

Opracowany protokół analityczny do opisu tła mikrobiologicznego złożonych próbek klinicznych typu wymazy z ran powierzchniowych ZSC poddałem dalszym badaniom z wykorzystaniem poszerzonego zestawu próbek rzeczywistych celem weryfikacji jej użyteczności w wiarygodnym i szybkim diagnozowaniu podłoża mikrobiologicznego próbek typu ZSC, która uwzględniała kluczowe aspekty skuteczności metody jako efektywnego narzędzia do badań składu mikrobiologicznego złożonych matryc biologicznych jakimi były: (a) zdolność do wykrywania zarówno mikrobioty dominującej (gatunki szybko rosnące których liczebność w próbce jest wysoka) jak i tej będącej w mniejszości (gatunki wolno rosnące o często wysokich wymaganiach pokarmowych) oraz (b) zapewnienie wysokiego poziomu wiarygodności uzyskiwanych wyników identyfikacji – porównanie ze złotym standardem identyfikacji mikroorganizmów, tj. metodą sekwencjonowania regionu 16S rRNA – techniki biologii molekularnej opartej o reakcje łańcuchową polimerazy (PCR) (**H2**) [70].

Należy wiedzieć, iż praktyka kliniczna diagnostyki ZSC opiera się głównie na metodach zależnych od hodowli, które wykazują tendencję do faworyzowania mikroorganizmów, które dobrze znoszą procedury izolacji i mają niskie wymagania pokarmowe - szybko rosną na stosowanych pożywkach laboratoryjnych. Dlatego często nie wykrywają gatunków wolno rosnących, o wysokich wymaganiach pokarmowych, czy też beztlenowych, co wpływa na opóźnienie podjęcia decyzji o odpowiednim leczeniu [31,80]. Potwierdzają to liczne doniesienia literaturowe badań wykorzystujących tradycyjną metodę hodowlaną, w których odsetek detekcji infekcji monobakteryjnych ZSC sięga 46-85%[81,82]. Obserwacje te stoją w sprzeczności z wynikami badań prowadzonych z wykorzystaniem zaawansowanych technik biologii molekularnej bazujących na analizie sekwencji regionu 16S rRNA bakterii, które jasno wskazują na przewagę wielobakteryjnego charakteru ZSC z obecnością złożonych populacji bakteryjnych utrudniających proces gojenia się ran[83–85]. Przeprowadzone przeze mnie badania z wykorzystaniem opracowanego wcześniej protokołu analizy składu mikrobiologicznego złożonych matryc klinicznych z analizą proteomiczną bakterii MALDI i kulturomiczną techniką przygotowania próbki udowodniły jej wysoką skuteczność w ujawnianiu wielobakteryjnego charakteru próbek ZSC (97% badanych próbek) i opisie różnorodności bakterii zaangażowanych w rozwój ZSC (identyfikacja 17 różnych rodzin i 19 rodzajów bakterii), w tym w wykrywaniu rzadko spotykanych gatunków reprezentujących takie rodziny jak *Pasteurellaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Planococaceae* i *Peptoniphilaceae*. Otrzymane wyniki wskazują, wbrew powszechnemu przekonaniu o wysokim odsetku wyników fałszywie ujemnych oraz niskiego odsetku odzwierciedlania całkowitej populacji drobnoustrojów w ranach (zwłaszcza pod względem obciążenia patogenami) przypisywanym metodom hodowlanym[86,87], że metody bazujące na kulturach bakteryjnych mogą nadal odgrywać istotną rolę w diagnostyce próbek klinicznych, pod warunkiem zastosowania nowoczesnego podejścia kulturomicznego z szybką identyfikacją drobnoustrojów za pomocą techniki MALDI. Jak wykazałem,

jednoczesne stosowanie wyselekcjonowanych zestawów podłoży o zróżnicowanym składzie chemicznym (uniwersalnych, selektywnych/różnicujących) pozwala na izolację szybko rosnących gatunków bakterii, jak również tych wybrednych, reprezentujących zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne, przy zachowaniu krótkiego czasu do uzyskania wyników analiz. Co istotne, opracowane w protokole analitycznym parametry analizy proteomicznej bakterii zapewniły wysoką pewność (wiarygodność) identyfikacji, odpowiednio 98% i 93% zgodność rodzajowa i gatunkowa porównując ze złotym standardem identyfikacji - sekwencjonowaniem 16S rRNA. Ponadto, opracowane podejście okazało się spełniać niezwykle istotny warunek dobrego narzędzia do diagnostyki mikrobiologicznej, a mianowicie pozwalało na detekcję gatunków stanowiących dominujące populacje w próbkach (głównie *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*), a także tych rzadziej spotykanych i stanowiących niski odsetek w próbce, takich jak beztlenowa *Finegoldia magna*. Zarówno w pracy **H1** jak i **H2** [69,70] dowiodłem, iż proponowana metoda opierająca się na kulturomicznym przygotowaniu próbek może stanowić skuteczne narzędzie pozwalające zaradzić ograniczeniom towarzyszącym konwencjonalnym techniką hodowlaną, tj. zwiększyć przepustowość identyfikacji (skrócenie czasu do uzyskania wyniku) i poszerzyć pokrycie gatunkowe (zakres wykrywanych typów bakterii), a także, co istotne, metoda ta może pełnić rolę uzupełniającą w stosunku do niehodowlanych metod molekularnych, których istotną wadą, oprócz wysokich kosztów, konieczności posiadania wysoko wyspecjalizowanego personelu i/lub braku dostępności do zaawansowanej aparatury, jest brak możliwości określenia statusu wykrywanych komórek bakteryjnych w próbce (wykrywane kwasy nukleinowe mogą pochodzić zarówno od żywych jak i martwych komórek – w przypadku opracowywanego podejścia kulturomicznego problem ten nie występuje, ponieważ do pozyskania materiału badawczego komórki bakteryjne trzeba namnożyć, a więc muszą one być żywe), niskiej skuteczności wykrywania populacji mniejszościowych oraz ograniczonej zdolności do wykrywania niektórych rodzajów bakterii do poziomu gatunku (bakterii charakteryzujących się dużym podobieństwem profili molekularnych, takich jak np. gatunki z rodzaju *Bacillus* czy *Streptococcus*) [27,88].

Potencjał techniki MALDI w klasyfikacji blisko spokrewnionych szczepów klinicznych – problem rozróżniania zbliżonych profili molekularnych bakterii (H3)

Uważa się, że badanie śliny może stanowić nieinwazyjną i stosunkowo tanią metodę monitorowania chorób we wczesnych stadiach ich rozwoju, ponieważ jest łatwa do pobrania i wygodna w przechowywaniu (szybka metoda przesiewowa). Niemniej jednak, postępy prac nad jej efektywnym zastosowaniem jako płynu diagnostycznego są wciąż na wczesnym etapie, ze względu na brak użytecznych metod, które rozwiązałyby problem poprawnej i szybkiej klasyfikacji gatunków bakterii charakteryzujących się zbliżonymi profilami molekularnymi[89]. Wśród złożonej mikroflory jamy ustnej paciorkowce są dominującym rodzajem bakterii, których wiarygodna identyfikacja wydaje się być bardzo ważna, ponieważ reprezentują one zarówno gatunki komensalne, jak i te zaliczane do patogenów oportunistycznych, a zmiany w ich składzie mogą być związane z wieloma chorobami zarówno samej jamy ustnej jak i zaburzeń ogólnoustrojowych, np. nawracające aftowe zapalenia jamy ustnej, halitoza, rak jamy ustnej i przewodu pokarmowego, choroby

przyzębia, choroby związane z nieprawidłową pracą układu krążenia, reumatoidalne zapalenie stawów i wiele innych[90–93]. Niestety, paciorkowce należą do bakterii charakteryzujących się wysokim stopniem podobieństwa genetycznego i taksonomicznego wśród których wyróżnić można wiele blisko spokrewnionych grup, takich jak *anginosus*, *mitis*, *mutans*, *bovis* czy *salivarius*, co powoduje, że ich poprawna identyfikacja na poziomie gatunkowym stanowi duże wyzwanie diagnostyczne. Wspomniany problem dotyczy również badanej w cyklu prac techniki MALDI-TOF MS, która pomimo dostępnych na rynku systemów zapewniających dokładną identyfikację wielu klinicznie istotnych gatunków paciorkowców, charakteryzując się stosunkowo wysokim odsetkiem (sięgającym blisko 50%) nieprawidłowych identyfikacji związanych głównie z ograniczoną zdolnością detekcji zmienności fenotypowej w obrębie szczepów i gatunków bakterii należących do rodzaju *Streptococcus* sp. [94,95]. Jak wspomniałem we wstępie, zjawisko to można powiązać z niskim stopniem wariacji paciorkowców w obrębie białek rybosomalnych stanowiących większość białek wchodzących w skład generowanych podczas analizy MALDI widm MS. Ponadto, większość rutynowych analiz MALDI wykorzystuje aparaturę wyposażoną w laser azotowy, która zapewnia odpowiednią szybkość analiz biopolimerów komórkowych kosztem uzyskiwanej rozdzielczości, co może mieć znaczenie w przypadku szukania subtelnych różnic w składzie widm MS. Wiedząc iż, zastosowanie techniki MALDI w proteomicznym podejściu do analizy komórek bakteryjnych daje również możliwość detekcji białek nierybosomalnych, a także stwarza możliwość analizy innych biopolimerów komórkowych, takich jak lipidy[96], podjąłem się badania mającego na celu opracowanie alternatywnego protokołu identyfikacji mikroorganizmów ślinowych, koncentrującego się na rozróżnianiu blisko spokrewnionych gatunków paciorkowców występujących w jamie ustnej przy użyciu profilowania zarówno białek, jak i lipidów techniką MALDI-TOF MS (podejście proteomiczno-lipidomiczne). Równolegle do analiz MALDI, przeprowadziłem identyfikację izolowanych bakterii ślinowych za pomocą techniki sekwencjonowania regionu 16S rRNA (złotego standardu identyfikacji bakterii) jako metody odniesienia, a także dodatkowo oceniłem użyteczność wykorzystania innej techniki identyfikacyjnej wchodzącej w zakres metod analiz instrumentalnych - spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR), opierającej się na charakterystyce grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni komórek bakteryjnych, w rozróżnianiu blisko spokrewnionych gatunków paciorkowców. Wykorzystanie spektrometru MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme II (Bruker Daltonik GmbH, Brema, Niemcy) z laserem smartbeam-II (zmodyfikowany laser neodymowo-yagowy) o parametrach zaadaptowanych do zautomatyzowanej identyfikacji za pomocą platformy MALDI Biotyper 3.0 umożliwiło zarówno zbieranie widm MS do analizy proteomicznej (profilowanie białkowe bakterii), jak i charakterystyki różnic składu lipidowego blisko spokrewnionych gatunków paciorkowców ślinowych (*Streptococcus salivarius* i *S. vestibularis*) przy wykorzystaniu trybu jonizacji dodatniej i ujemnej w zakresie mas 190–2500 m/z (analiza związków niskocząsteczkowych) z rejestracją widm fragmentacyjnych metodą LIFT (laserowa technologia jonizacji/fragmentacji, ang. *laser ionization/fragmentation technology*).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, iż zastosowanie opracowanego protokołu identyfikacji bakterii ślinowych w podejściu proteomicznym znacząco zwiększało

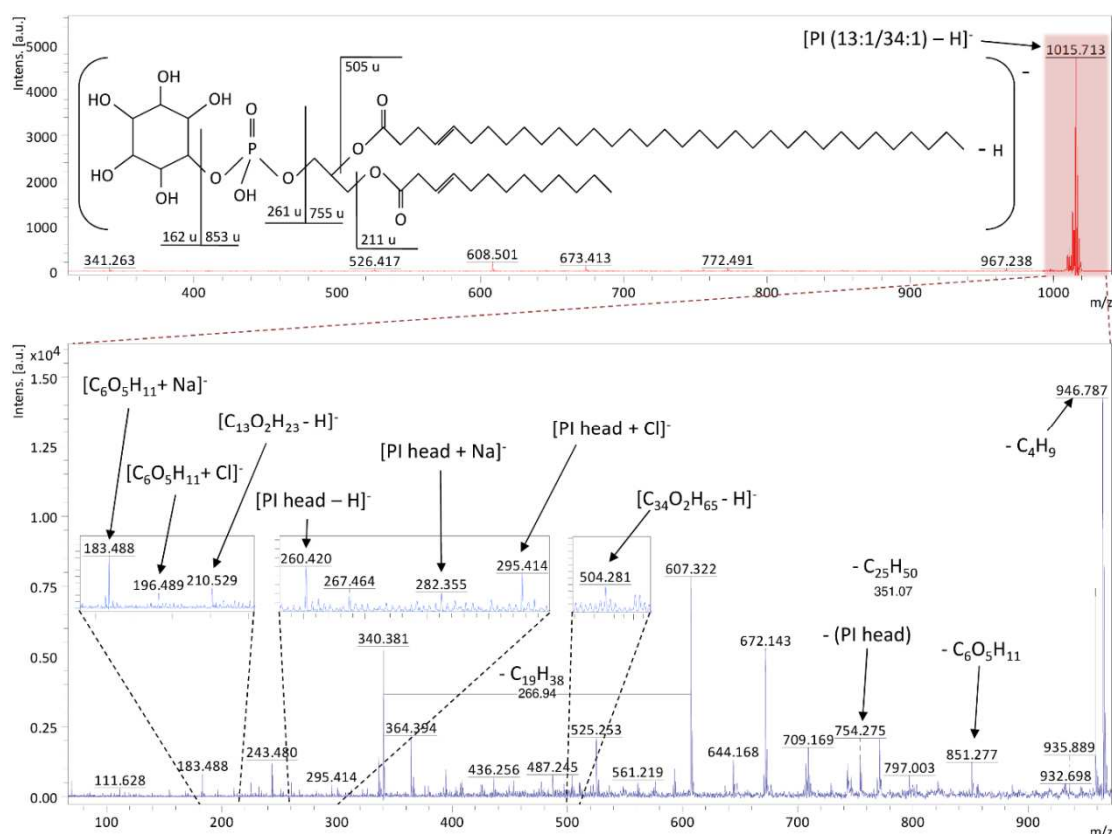
skuteczność klasyfikacji izolatów ślinowych – z 20% identyfikacji na poziomie gatunkowym w przypadku metody sekwencjonowania 16S rRNA do 64% (MSP) i 69% (surowe widma) w przypadku opracowanego protokołu MALDI. Co więcej, w przypadku paciorkowców, technika biologii molekularnej pozwoliła na wiarygodną identyfikację gatunkową jedynie 1 spośród 32 badanych szczepów bakterii – *S. sanguinis*, podczas gdy opracowany protokół analizy MALDI ujawnił obecność dodatkowo 3 innych gatunków paciorkowców – *S. parasanguinis*, *S. salivarius* oraz *S. vestibularis*. Wykazałem, iż w przypadku dwóch ostatnich bakterii reprezentujących gatunki blisko spokrewnione nierozróżnialne na podstawie sekwencji 16S rRNA, zastosowanie profilowania proteomicznego MALDI pozwala na uzyskanie poprawnych identyfikacji gatunkowych, których odsetek zależy od tego, czy zastosowano surowe widma czy wygenerowane na ich podstawie widma MSP. Zaobserwowany większy odsetek identyfikacji o wysokiej pewności gatunkowej w przypadku analizy surowych widm w stosunku do MSP (których głównym celem jest zawężenie profili proteomicznych do zakresu białek rybosomalnych celem usprawnienia standardowej procedury identyfikacji) wskazuje, iż za skuteczność opracowanej metody odpowiada głównie zdolność detekcji białek nierybosomalnych. Zdolność do rozróżniania blisko spokrewnionych gatunków paciorkowców ślinowych za pomocą opracowanego podejścia proteomicznego potwierdziłem analizując wzorcowe szczepy *S. salivarius* DSM 20560 oraz *S. vestibularis* DSM 5636, gdzie analiza wskaźnika korelacji złożonej (ang. *Composite correlation index*, CCI) różnic w składzie surowych widm obu bakterii wykazała znacznie wyższą (blisko dwukrotnie) wariancję międzygatunkową w porównaniu z wewnątrzgatunkową.

Opracowany protokół rozróżniania blisko spokrewnionych gatunków paciorkowców ślinowych za pomocą podejścia proteomicznego znacząco zwiększał zdolność klasyfikacji badanych bakterii, ale wciąż bez 100% efektywności. W związku z powyższym opracowywany protokół analityczny poszerzyłem o analizę innych biopolimerów komórkowych mogących znaleźć zastosowanie w rozróżnianiu gatunków bakterii o zbliżonych profilach molekularnych, a mianowicie o badanie składu profili lipidowych komórek bakteryjnych – podejście lipidomiczne w identyfikacji. Analiza lipidomiczna wydaje się być jedną z najbardziej obiecujących obecnie strategii zwiększania efektywności identyfikacji bakterii z wykorzystaniem techniki MALDI, ponieważ lipidy obok białek są głównymi składnikami komórkowymi, które pełnią szereg istotnych funkcji biologicznych - jako główny składnik błon komórkowych wpływają na jej płynność, kształt i przepuszczalność biorąc kluczowy udział we wszystkich rodzajach oddziaływań ze środowiskiem zewnątrzkomórkowym oraz są zaangażowane w procesy transportu i magazynowania energii, a także przekazywania sygnałów w komórce[96–98]. Jak wskazują badania, jakościowy i ilościowy skład lipidów komórkowych może być skorelowanych z różnymi cechami fenotypowymi mikroorganizmów. Co więcej, wskazuje się, że niektóre lipidy wykazują cechy specyficzne dla gatunku, dlatego też mogą być stosowane jako swoistego rodzaju chemiczny kod kreskowy bakterii podczas analizy MS i uzupełniać powszechne platformy identyfikacji drobnoustrojów oparte na analizie białek. W związku z powyższym lipidomika drobnoustrojów staje się nową metodą diagnostyczną opierającą się o wykorzystanie techniki MALDI-TOF MS, która ma potencjał, aby sprostać niektórym

wyzwaniom napotykanym przy stosowaniu podejścia proteomicznego (głównie zbliżone profile molekularne gatunków blisko spokrewnionych), a tym samym uzupełnić je w zakresie identyfikacji i klasyfikacji bakterii poprzez poszerzenie analizy o sygnały niezwiązane z białkami rybosomalnymi [99]. Pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się w analizie lipidów przy użyciu technik MS, np. skuteczna identyfikacja i rozróżnianie patogenów klinicznych z grupy ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp.) na podstawie analizy glikolipidów, nadal istnieje duża potrzeba ich dalszego rozwoju, w tym przygotowania próbek i optymalizacji warunków analizy (lipidy są znacznie bardziej zależne od warunków środowiskowych niż białka). W szczególności dotyczy to techniki MALDI-TOF MS, w przypadku której ogromny sukces jej adaptacji do rutynowych analiz mikrobiologicznych w podejściu proteomicznym spowodował jednocześnie opóźnienie prac prowadzonych nad rozwojem podejścia lipidomicznego [96,100].

Przy opracowywaniu koncepcji zastosowania podejścia lipidomicznego w klasyfikacji blisko spokrewnionych paciorkowców ślinowych za pomocą techniki MALDI kierowałem się możliwością zastosowania dwóch podstawowych typów hodowli mikrobiologicznych stosowanych powszechnie w laboratoriach mikrobiologicznych (na podłożu stałym i płynnym), możliwie najprostszy sposób jednoczesnego wykorzystania z analizą proteomiczną (zastosowanie tej samej, powszechnie stosowanej matrycy MALDI – CHCA) oraz możliwie najprostszy sposób pozyskiwania ekstraktów lipidowych (powszechnie znana w chemii metoda Folcha). W wyniku przeprowadzonych badań dowiodłem, iż zastosowanie opracowanego podejścia lipidomicznej klasyfikacji blisko spokrewnionych gatunków bakterii z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS pozwala na rozróżnianie paciorkowców ślinowych o bardzo zbliżonych profilach molekularnych, takich jak *S. salivarius* i *S. vestibularis*. Analizę widm fragmentacyjnych sygnałów lipidowych przeprowadziłem wykorzystując tryb LIFT (ang. *laser ionisation fragmentation technology*) (analiza tandemowa LIFT TOF/TOF MS, Rys. 3), który, w odróżnieniu od metody CID (ang. *collision-induced dissociation*) polegającej na wywołaniu fragmentacji cząsteczek analitu poprzez zderzanie jonów z cząsteczkami gazu obojętnego (np. argonu) w komorze kolizyjnej, polega na bezkolizyjnej fragmentacji jonów prekursorowych przy wykorzystaniu energii lasera. Przeprowadzona analiza (w oparciu o lipidową bazę danych LIPID MAPS®) wskazała na obecność łącznie 50 sygnałów lipidowych różnicujących oba blisko spokrewnione szczepy – 22 charakterystyczne dla *S. salivarius* i 28 dla *S. vestibularis*. Warto wspomnieć, iż zakres identyfikowanych typów lipidów był szeroki obejmując zarówno różne klasy glicerofosfolipidów (np. glicerofosfoetanolaminy, glicerofosfoinozytol, kardiolipiny) jak i glicerolipidów. O ile zaobserwowanie istotnego wpływu rodzaju zastosowanej hodowli (płynna vs stała) oraz trybu jonizacji na skład uzyskiwanych profili lipidowych obu badanych bakterii nie było zaskakujące biorąc pod uwagę powszechnie panującą opinię o dużej wrażliwości składu lipidowego komórek bakteryjnych na wpływ zmiennych warunków środowiskowych takich jak temperatura, pH, skład pożywki czy też obecność różnego rodzaju stresorów [101–104], to fakt iż nie miało ono negatywnego wpływu na zdolność do rozróżniania blisko spokrewnionych gatunków *S. salivarius* i *S. vestibularis* wskazuje na wysoką użyteczność i uniwersalność opracowanej metody. Uzyskane wyniki potwierdzają

założoną przeze mnie koncepcję, iż sygnały lipidowe uzyskiwane podczas analizy MALDI nadają się do wykorzystania jako chemiczny odcisk palca (ang. *chemical fingerprint*) mikroorganizmów w procesie ich różnicowania. Istotną zaletą proponowanego podejścia MALDI, oprócz samego różnicowania bakterii, jest fakt, iż informacje o składzie kwasów tłuszczowych otrzymywane są bez konieczności stosowania wieloetapowych i żmudnych protokołów przygotowania próbki, jak ma to miejsce w przypadku stosowania techniki chromatografii gazowej (tradycyjnej i najdłużej stosowanej techniki analizy kwasów tłuszczowych), gdzie procedura przygotowania próbki obejmuje proces saponifikacji (zmydlania) komórek bakteryjnych wodorotlenkiem sodu, metylację kwasem solnym, ekstrakcję lipidów i płukanie w zasadowym pH, co zwykle zajmuje kilka godzin[105]. Późniejsze moje prace, nie wchodzące do prezentowanego cyklu prac, dotyczące rozwoju prezentowanego podejścia lipidomicznego potwierdziły jego wysoki potencjał i użyteczność w analizach bioanalitycznych zarówno w prezentowanym zastosowaniu do różnicowania blisko spokrewnionych mikroorganizmów (bakterie odporne – wrażliwe na antybiotyki)[106] jak i samej identyfikacji bakterii – charakterystyka mikrobiomu ran ZSC obejmująca również śledzenie ich fizjologicznej adaptacji w procesie interakcji gospodarz-patogen[99].



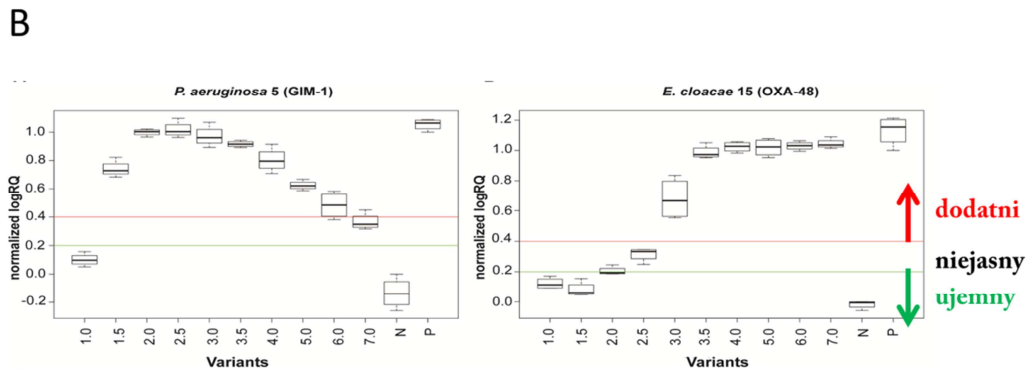
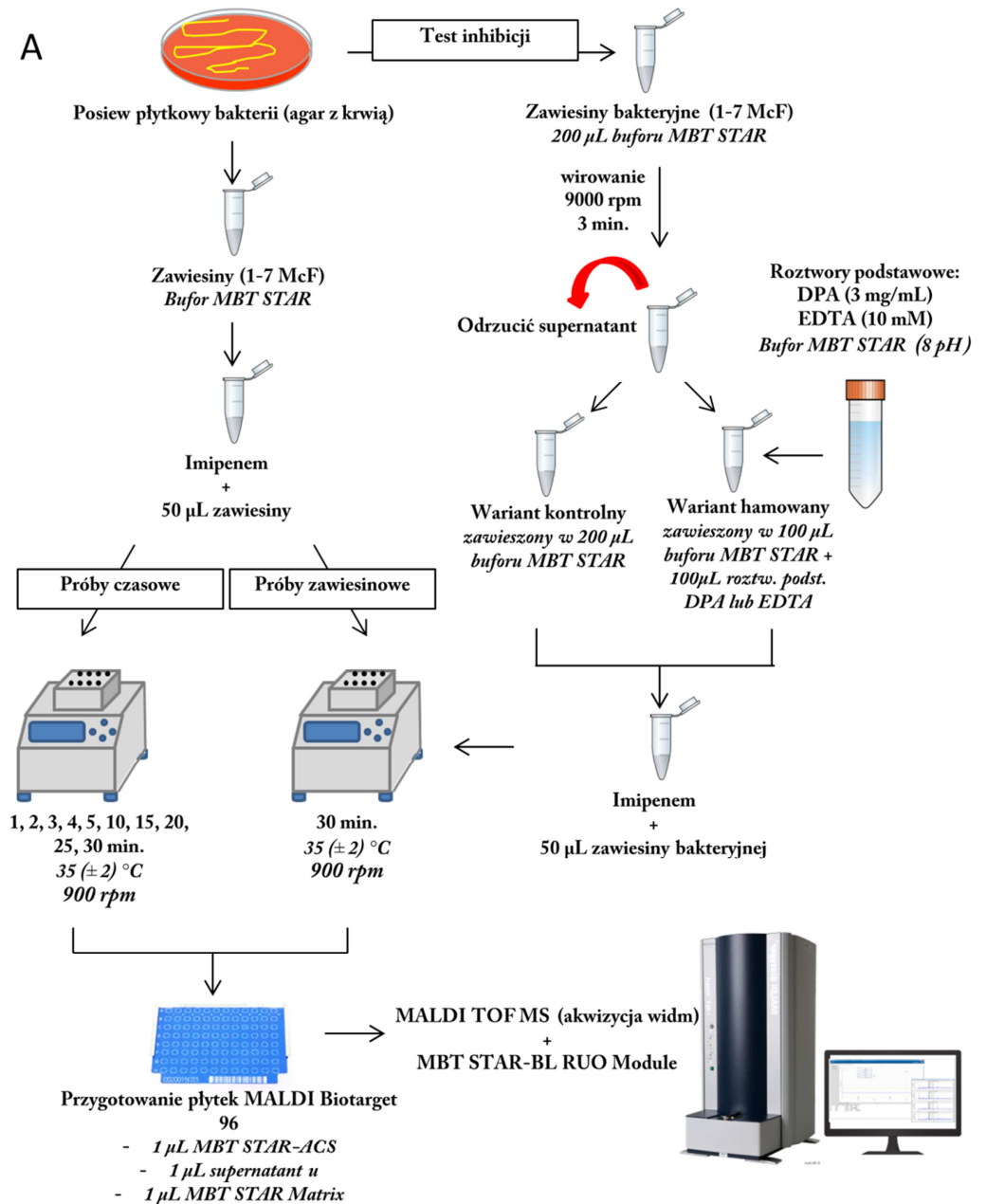
Rys. 3. Przykładowe widmo MS/MS i ścieżka fragmentacji [PI(13:1/34:1)-H]⁻ m/z 1015.713 uzyskana dla *S. vestibularis* DSM 5636 hodowanego na podłożu TSA w trybie jonizacji ujemnej.

Warto nadmienić, iż w koncepcji prezentowanego alternatywnego podejścia do badania mikrobiomu śliny uwzględniłem również zastosowanie analizy spektroskopowej FTIR, która jest znacznie rzadziej zestawiana z techniką MALDI niż sekwencjonowanie regionu 16S rRNA. Metoda ta wykorzystywana jest do identyfikacji powierzchniowych grup

funkcyjnych mikroorganizmów wchodzących w skład białek, glikopeptydów, lipidów, kwasów teichojowych, polisacharydów i polifosforanów. Wyznaczenie obecności grup funkcyjnych w widmach FTIR komórek mikroorganizmów daje w rezultacie wysoce specyficzne sygnatury spektralne, które pozwalają na różnicowanie i klasyfikację bardzo zróżnicowanych gatunków i szczepów drobnoustrojów[107]. W rezultacie przeprowadzonych analiz zaobserwowałem przesunięcia w rejestrowanych pasmach widm FTIR obu bakterii: przesunięcie z 1655 cm^{-1} (*S. salivarius*) do 1639 cm^{-1} (*S. vestibularis*) w zakresie charakterystycznym dla amidów I i II rzędowych białek bakteryjnych ($1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$); przesunięcie z 1057 cm^{-1} (*S. salivarius*) do 1081 cm^{-1} (*S. vestibularis*) w zakresie charakterystycznym dla zarówno związków przenoszących fosforany oraz różnych oligo- i polisacharydów ścian komórkowych ($950\text{--}1275\text{ cm}^{-1}$) jak i grup hydroksylowych ($950\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$), co utrudnia wiarygodną i jasną identyfikację sygnałów. Ponadto udało mi się zarejestrować sygnały charakterystyczne dla grup -CH_2 powszechnie występujących w peptydoglikanie, kwasach teichojowych, lipopolisacharydach oraz fosfolipidach (1450 cm^{-1}), dla grup funkcyjnych karboksylanów (1400 cm^{-1}), dla grup funkcyjnych obecnych w kwasach tłuszczowych ($2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) oraz grup aminowych i hydroksylowych w zakresie $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$. Chociaż zastosowana metoda FTIR charakteryzowała się prostą procedurą przygotowania próbki (analizowane są całe komórki bakterii) oraz prawidłowym rozróżnieniem między *S. salivarius* i *S. vestibularis*, to interpretacja uzyskanych widm była czasochłonna i skomplikowana, dlatego jej potencjalne włączenie do pracy rutynowych laboratoriów będzie wymagało dobrze doświadczonego personelu, co wydaje się być największą wadą tego podejścia. Niemniej jednak biorąc pod uwagę fakt pojawienia się na rynku komercyjnych platform do zautomatyzowanej klasyfikacji szczepów mikroorganizmów, takich jak IR Biotyper (Bruker Daltonics)[108,109], zaproponowane podejście, podobnie jak w przypadku techniki MALDI, może znaleźć swoje zastosowanie do szybkich oznaczeń podczas rutynowych analiz, aczkolwiek wykracza to poza ramy prezentowanej dysertacji.

W kierunku szybkiej i wiarygodnej detekcji lekooporności (H2, H4)

W celu zwiększenia użyteczności techniki MALDI w szybkiej detekcji oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe podjąłem się opracowania protokołu detekcji aktywności karbapenemaz przy wykorzystaniu testu MBT STAR-Carba w oparciu o gradient gęstości zawiesin komórkowych i zmiennych czasów inkubacji oraz w warunkach dodatku inhibitorów metalo- β -laktamaz (chelatorów metali, w tym przypadku EDTA oraz DPA). Dla zaprojektowanego protokołu oceniłem możliwość wykorzystania go jako metody wstępnej charakterystyki szczepów należących do *Enterobacterales* oraz szczepów *P. aeruginosa* pod względem wytwarzanych klas karbapenemaz z wykorzystaniem klasyfikacji szczepów metodą analizy głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA), a także możliwość zastosowania jako surogatu testu MIC w analizie badania skuteczności inhibitorów metalo- β -laktamaz (MBL). Schemat opracowywanego protokołu przedstawiono na Rys. 4.



Rys. 4. Schemat opracowywanego protokołu charakterystyki oporności bakterii na karbapenemy w oparciu o test MBT-STAR-Carba (A) oraz przykładowe wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu próby zawiesinowej (B).

Wyniki badań wskazały iż śledzenie różnic w poziomie aktywności na podstawie znormalizowanych wartości logRQ pozwala nie tylko na rozróżnienie różnych gatunków bakterii, ale także na ich klasyfikację ze względu na klasę karbapenemaz. Ponadto okazało się, że zastosowanie określonej gęstości zawiesiny daje możliwość skrócenia czasu inkubacji (z 30 do nawet 1 minuty), a tym samym całkowitego czasu do uzyskania wyniku oraz dalszego poszerzenia wiedzy o różnicach w poziomie hydrolizy antybiotyków i wrażliwości na dodatek inhibitora. Opracowany nowy protokół wykrywania aktywności karbapenemaz za pomocą techniki MBT STAR-Carba w oparciu o gradient gęstości zawiesin bakteryjnych i czasów inkubacji może być z powodzeniem wykorzystany do częściowej klasyfikacji bakterii ze względu na rodzaj posiadanych genów oporności na karbapenemy oraz może być przydatny do pogłębionej analizy i charakterystyki metalo- β -laktamaz (MBL) poprzez zastosowanie testów inhibicji (z dodatkiem inhibitora MBL). Jak wykazałem, stopień działania hamującego związków chelatujących jony Zn^{2+} zależy zarówno od rodzaju użytego związku, jak i rodzaju metalo- β -laktamazy. W pracy dowiodłem, iż wyniki uzyskiwane podczas testu MBT STAR-Carba mogą nie tylko służyć do prostej detekcji obecności/braku enzymów hydrolizujących karbapenemy, ale przy zastosowaniu odpowiednich protokołów analitycznych, mogą okazać się użyteczne we wstępnej klasyfikacji rodzaju karbapenemaz, a także służyć jako swoistego rodzaju testu na lekowrażliwość, a uzyskiwane za jego pośrednictwem wyniki mogą być wysoce użyteczne podczas wstępnej adaptacji do właściwej antybiotykoterapii, a także podczas opracowywania nowych inhibitorów MBL.

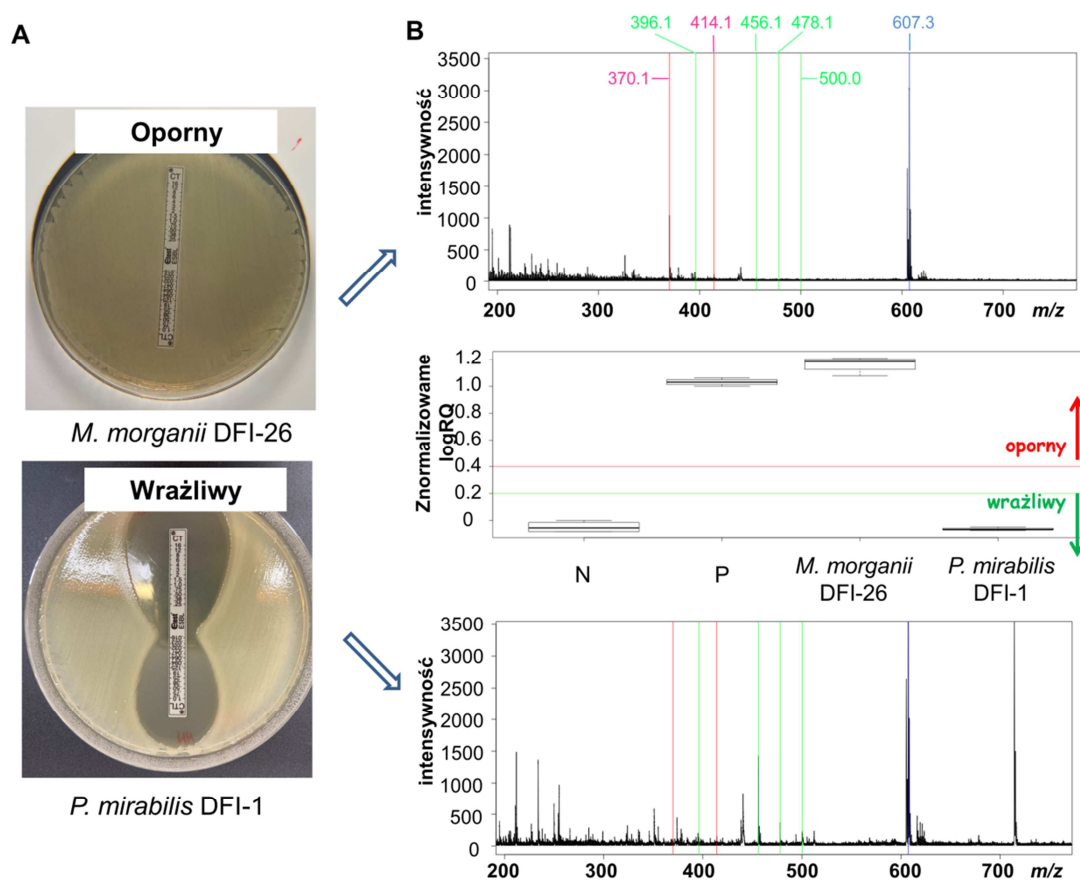
Co więcej, zastosowanie przeze mnie opracowanego protokołu analitycznego pozwoliło na poszerzenie wiedzy na temat efektów mogących istotnie wpływać na jakość uzyskiwanych wyników podczas stosowania rutynowej procedury detekcji aktywności karbapenemaz testem MBT STAR-Carba. Da się wyraźnie zauważyć, iż użycie rutynowej procedury pobierania biomasy komórkowej do analizy nie pozwala na uchwycenie różnic w typie karbapenemaz w obrębie gatunków enterobakterii, inaczej niż w przypadku porównywania poziomu aktywności pomiędzy enterobakteriami a szczepami należącymi do gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, gdzie te ostatnie charakteryzowały się niższymi wartościami logRQ, co jest typowym zjawiskiem notowanym podczas aplikacji testu MBT STAR-Carba. Jak wskazałem w badaniu, przyczyna tego zjawiska związana jest ze sposobem pobierania biomasy, co tłumaczą otrzymane wykresy zależności zmierzonej aktywności hydrolitycznej od zastosowanej gęstości zawiesiny komórkowej. W przypadku enterobakterii, dla których obserwowano stopniowy wzrost wartości logRQ (miara stopnia hydrolizy antybiotyku = poziomowi aktywności enzymatycznej) wraz ze wzrostem gęstości zawiesiny bakteryjnej, wskazałem, iż ilość pobieranej biomasy komórkowej za pomocą standardowej procedury znajduje się w optymalnym zakresie stężeń do czułej detekcji obecności karbapenemaz - w większości przypadków wartości logRQ dla wariantu 7 McF były zbliżone do tych uzyskanych przy użyciu 1 μ L ezy inokulacyjnej, co sugeruje przeniesienie podobnej liczby komórek. Rzeczywiście, gęstość zawiesiny 7 McF odpowiada ok. 3×10^8 jednostek tworzących kolonie (jtk), a teoretyczne stężenie w 1 μ L oczku ezy inokulacyjnej wynosi $3-6 \times 10^8$ jtk/mL zgodnie z wytycznymi producenta. Zależności tej nie zaobserwowałem dla bakterii należących do gatunku *P. aeruginosa*, gdzie maksymalne wartości logRQ uzyskałem przy zastosowaniu niższych gęstości zawiesin komórkowych. Co więcej, przy stosowaniu

wyższych stężeń zawiesin komórkowych zbliżających się do wartości prezentowanej przy użyciu 1 µL ezy inokulacyjnej zaobserwowałem stopniowy spadek wartości logRQ, co może tłumaczyć opisywaną w literaturze niższą aktywność hydrolityczną szczepów *P. aeruginosa* w porównaniu do *Enterobacterales*, co przypisuje się niższej jakości widm MS generowanych podczas analizy pierwszego z wymienionych typów bakterii[110]. Jak sugerują wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań, głównym źródłem tego zjawiska może być nie jakość pozyskiwanych widma, ale raczej odmienna charakterystyka fenotypowa bakterii *P. aeruginosa* obejmująca: (a) wielotorową, wrodzoną oporność na karbapenemy (oprócz enzymatycznej degradacji antybiotyków także effluks zewnątrzkomórkowy oraz zmiana przepuszczalność błon komórkowych); (b) zdolność do syntezy sideroforów wykazujących powinowactwo do jonów Zn^{2+} będących kofaktorem metalo-β-laktamaz (zmniejszenie dostępności dla enzymu) a także (c) charakterystyczna wysoka zdolność do tworzenia wielokomórkowych agregatów komórkowych z wydzielaniem licznych zewnątrzkomórkowe substancji polimerowych (ang. *Extracellular polymeric substances*, EPS), co powoduje wytworzenie mechanicznej bariery dla penetracji antybiotyku do środowiska wewnątrzkomórkowego, a tym samym dostępu do enzymu[111–115].

W zakresie poszerzania możliwości wykorzystania techniki MALDI w szybkiej i wiarygodnej detekcji lekooporności u bakterii podjąłem się również badań dotyczących adaptacji testu MBT STAR-BL do opisywanej wcześniej i opracowywanej przeze mnie metody określania składu mikrobiologicznego złożonych matryc klinicznych typu rany powierzchniowe ZSC przy wykorzystaniu analizy proteomicznej komórek bakteryjnych MALDI-TOF MS oraz podejścia kulturomicznego jako metody przygotowania próbki. Prezentowane połączenie daje możliwość poszerzenia uzyskiwanych wyników oceny bioróżnorodności taksonomicznej próbek o informacje dotyczące występowania zjawiska lekooporności i prezentowane jest w literaturze po raz pierwszy. Jako że opracowywana metoda opiera się o wykorzystanie spektrometru typu ultrafleXtreme, wymagała więc dostosowania warunków analizy MBT STAR-BL do sprzętu charakteryzującego się istotnie odmiennymi parametrami pracy warunkowanymi przede wszystkim stosowaniem innego typu lasera UV oraz inną budową analizatora czasu przelotu (możliwość wydłużenia drogi przelotu dzięki reflektromowi). W badaniu wykorzystałem tryb reflektromowy z jonizacją dodatnią, matrycę CHCA z dodatkiem standardu wewnętrznego wykorzystywanego do pomiaru spadku zawartości cząsteczek natywnego antybiotyku oraz automatyczny tryb zbierania widm. Analizy detekcji zjawiska hydrolizy antybiotyków β-laktamowych dla wyizolowanych z ran powierzchniowych ZSC bakterii Gram-ujemnych przeprowadziłem dla antybiotyków należących do cefalosporyn (cefotaksym, ceftriakson, ceftazydym), karbapenemów (imipenem, meropenem) oraz penicylin (ampicylina, piperacylina), a jako metody odniesienia zastosowałem analizy paskowe (Etest) oraz molekularne (metoda multipleks PCR z elektroforezą żelową produktów amplifikacji).

Jak pokazała analiza wyników, zastosowane warunki analizy MALDI pozwalały na detekcję aktywności hydrolitycznej wobec wszystkich rodzajów badanych antybiotyków (Rys. 5). Pozyskiwane widma MS były analizowane w zakresie pojawiających się sygnałów pochodzących zarówno od natywnych cząsteczek badanych antybiotyków (nie ulegających enzymatycznej hydrolizie) oraz od cząsteczek zhydrolizowanych, których liczba zależała od

rodzaju badanego antybiotyku. Na przykład, w przypadku ampicyliny (masa monoizotopowa 349,1 g/mol) pojawienie się sygnałów 350,1 $[M+H]^+$, 372,1 $[M+Na]^+$ oraz/lub 394,1 $[M+2Na]^+$ świadczyło o braku zajścia hydrolizy – bakteria wrażliwa na dodatek ampicyliny. Natomiast detekcja takich sygnałów jak 368,1 $[M_h+H]^+$, 390,1 $[M_h+Na]^+$, 412,1 $[M_h+2Na]^+$ i 324,1 $[M_{h/d}+H]^+$ oznaczała zajście enzymatycznej degradacji cząsteczek ampicyliny – bakteria antybiotykooporna, gdzie h i d oznaczają kolejno - cząsteczka zhydrolizowana, cząsteczka zdekarboksylowana. Ze względu na możliwą zmienność w stosunku i ilości pojawiających się sygnałów pochodzących od natywnych i zdegradowanych cząsteczek antybiotyków (nie wynikającej z różnic w aktywności enzymatycznej badanych mikroorganizmów, ale z charakterystyki analizy MALDI) – w szczególności ich adduktów sodowych i/lub potasowych, podczas analiz stosowałem standard wewnętrzny o masie 607,3 dodawany do matrycy, co pozwoliło mi na ustandaryzowanie uzyskiwanych wyników.



Rys. 5. Przykładowe wyniki wykrywania oporności na antybiotyki przy użyciu pasków Etest (A) i metody MBT STAR BL (B) uzyskane dla cefotaksymu. N - kontrola ujemna, P - kontrola dodatnia, zielone linie (396,1, 456,1, 478,1, 500,0) - sygnały dla niezhydrolizowanego antybiotyku (natywnego i adduktów z jonami sodowymi i potasowymi); czerwone linie (370,1 i 414,1) - sygnały dla zhydrolizowanego antybiotyku, niebieska linia (607,3) – standard wewnętrzny.

Choć w przypadku penicylin (ampicylina i piperacylina) odsetek pozytywnych próbek w stosunku do testów paskowych był niższy, to w przypadku najistotniejszych z punktu widzenia klinicznego karbapenemów oraz cefalosporyn zanotowałem zjawisko odwrotne –

wyższy odsetek zidentyfikowanych izolatów ESBL i CPB w przypadku techniki MALDI. Co więcej, zaproponowany protokół charakteryzował się istotnie niższym odsetkiem wyników niepewnych (1 przypadek) w stosunku do testu paskowego (15). Warto dodać, iż pomimo zastosowania kilku różnych zestawów starterów dedykowanych detekcji szerokiego zakresu genów oporności, to jedynie w przypadku niewielkiej puli badanych szczepów bakterii Gram-ujemnych (10/42) udało się wykryć oporność na badane antybiotyki, gdzie tylko w jednym przypadku opracowany protokół analizy MALDI dawał wynik negatywny. Uzyskane przeze mnie wyniki badań wskazują, iż opracowany protokół, jak i ogólnie wykorzystanie techniki MALDI może wykazywać wyższą użyteczność w rutynowym wykrywaniu oporności na antybiotyki β -laktamowe wśród bakterii izolowanych z ZSC niż techniki molekularne, takie jak technika multiplex PCR, ponieważ ta druga wymaga rozszerzonej wiedzy na temat przynależności taksonomicznej izolatów w celu zaprojektowania odpowiedniego, dedykowanego zestawu starterów, co zwiększa koszty analiz, wydłuża czas (konieczność zaprojektowania starterów i pozyskanie informacji o przynależności taksonomicznej). Tymczasem zastosowanie opracowanego protokołu detekcji antybiotykooporności za pomocą techniki MALDI i zaadaptowanych warunków testu MBT STAR-BL w praktyce wymaga jedynie informacji na temat typu grama bakterii, co można w łatwy sposób uzyskać wykonując rutynową identyfikację za pomocą tego samego aparatu uzyskując wiarygodny wynik w przeciągu kilku minut licząc od chwili rozpoczęcia analizy.

Co istotne, włączenie detekcji antybiotykooporności za pomocą zaproponowanego protokołu MALDI pozwoliło na ujawnienie wpływu podejmowanej antybiotykoterapii na obraz mikrobiologiczny próbek powierzchniowych ran ZSC. Jak pokazały wyniki, stosowanie antybiotykoterapii przez pacjentów wywołuje nie tylko zmiany w składzie drobnoustrojów, w tym częstości występowania poszczególnych gatunków i typów bakterii (Gram-ujemnych/dodatnich), ale również ma istotny wpływ na częstość występowania lekooporności – odsetek zidentyfikowanych bakterii Gram-ujemnych u pacjentów podejmujących antybiotykoterapię zmniejszał się w stosunku do tych bez podawania antybiotyków, przy jednoczesnym wzroście wskaźnika lekooporności. Największy zakres zmian zanotowano dla pacjentów leczonych terapią skojarzoną (z zastosowaniem więcej niż jednego typu antybiotyków), gdzie próbki charakteryzowały się największą liczbą unikalnych gatunków bakterii i jednocześnie najwyższym odsetkiem lekoopornych izolatów bakteryjnych.

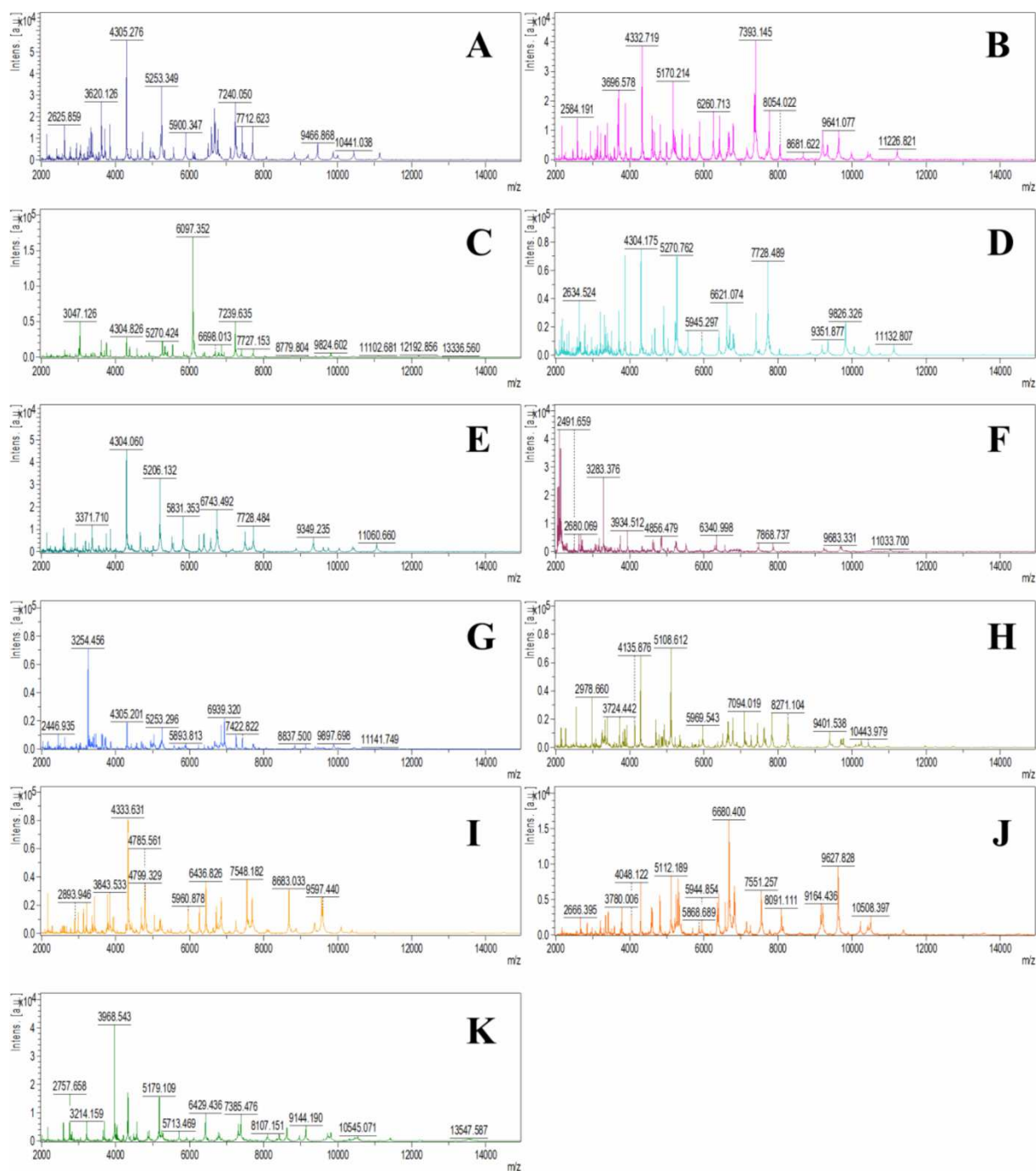
Adaptacja techniki MALDI do analizy mikrobiologicznej próbek środowiskowych (H5, H6)

Uważa się, że przyszłe postępy w rozwijaniu potencjału techniki MALDI-TOF MS w dziedzinie mikrobiologii środowiskowej zależą od zarówno poszerzania istniejących baz widm referencyjnych, jak i metod przygotowania próbek, które będą uwzględniać napotykaną problem złożoności próbek środowiskowych oraz wysoką różnorodność mikroorganizmów je zasiedlających, co pozwoli na wdrożenie tej techniki jako rutynowej metody identyfikacji w laboratoriach środowiskowych, ostatecznie zastępując metody konwencjonalne[2,41]. W związku z powyższym w pracach **H5** i **H6** [73,74] podjąłem się badań mających na celu adaptację techniki MALDI-TOF MS do badania złożonych matryc środowiskowych, którymi były różne typy miodów (**H5**) oraz próbki mleczarskie (**H6**).

Do badań wybrałem różne typy miodów ponieważ, ze względu na szereg unikatowych właściwości fizykochemicznych, stanowią one niezwykle interesujący i zarazem wymagający rodzaj matrycy środowiskowej. Z jednej strony wysoka zawartość cukrów (głównie glukozy i fruktozy) wiąże się z jego hiperosmotycznym charakterem, wysoką lepkością i niską zawartością wody, co w konsekwencji uniemożliwia wzrost, a nawet przetrwanie większości wegetatywnych komórek mikroorganizmów na skutek odwodnienia, a także poprzez ograniczoną penetrację tlenu atmosferycznego. Antybakteryjny charakter miodów potęgowany jest dodatkowo przez kwasowe pH, zdolność do wytwarzania nadtlenu wodoru oraz obecność szeregu związków pochodzenia roślinnego takich jak fenole, terpeny czy flawonoidy[116–120]. Z drugiej strony miód nie może być uważany za sterylną matrycę, ponieważ wiele badań dowiodło, że podlega on zanieczyszczeniom bakteryjnym i grzybiczym[121–123]. Biorąc pod uwagę, iż mikroorganizmy występujące w miodzie muszą wykazać się zdolnością do przetrwania w niesprzyjających do wzrostu warunkach środowiskowych, dlatego też w większości przypadków występują one jako formy utajone (uśpione), czyli jako endospory (przetrwalniki)[116]. Zjawisko to powoduje, iż charakterystyka mikrobiologiczna miodów stanowi duże wyzwanie. Biorąc samą technikę MALDI jako metodę identyfikacji bakterii, obecność przetrwalników w dwojaki sposób może wpływać na jakość klasyfikacji taksonomicznej. Po pierwsze, ekspresja białek w przetrwalnikach różni się od tej w komórkach wegetatywnych bakterii, głównie ze względu na dużą ilość małych białek rozpuszczalnych w kwasach (ang. *small acid-soluble proteins*, SASPs), które odgrywają kluczową rolę w tworzeniu endospor, a ich masy cząsteczkowe wchodzą w zakres wykorzystywany do standardowej procedury identyfikacji uzyskanych profili białkowych bakterii ($> 3000\ m/z$). Stąd stosunek ilości komórek wegetatywnych do przetrwalników ma bezpośredni wpływ na wynik identyfikacji bakterii, a przewidzenie jego skali jest tym trudniejsze iż, zawartość białek SASP w endosporach różnych typów bakterii nie jest stała (od 8 do 20%)[124–126]. Po drugie, gruba ściana komórkowa przetrwalników, która zapewnia ich niezwykłą odporność na ekstremalne warunki środowiskowe, utrudnia uwalnianie białek wewnątrzkomórkowych podczas procedur przygotowania próbek. Wpływ obu czynników na końcowy wynik identyfikacji bakterii przetrwalnikujących jest trudny do przewidzenia, ponieważ z jednej strony wysoka liczba endospor w próbce może powodować spadek ogólnej liczby otrzymywanych sygnałów podczas analizy MS[127], jako rezultat niskiej wydajności ekstrakcji białek z form przetrwalnych, a z drugiej strony wyższa skuteczność ekstrakcji białek z komórek wegetatywnych może sprawiać, iż udział sygnałów pochodzących od białek SASPs interferujących z białkami rybosomalnymi podczas procesu identyfikacji może być nieznaczny.

W przeciwieństwie do analiz właściwości fizykochemicznych, skład mikrobiologiczny miodów nie był do tej pory obiektem pogłębionych badań[128]. Co więcej, zaproponowana przeze mnie możliwość wykorzystania techniki MALDI-TOF MS do pogłębionej charakterystyki składu mikrobiologicznego różnych typów miodów w zależności od ich właściwości fizykochemicznych i miejsca pochodzenia została przedstawiona w literaturze po raz pierwszy. Przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły, iż miody, bez względu na pochodzenie geograficzne i botaniczne, były zdominowane przez bakterie wytwarzające przetrwalniki – głównie reprezentujące mikroorganizmy należące do grupy blisko

spokrewnionych gatunków *Bacillus subtilis* oraz gatunków *B. cereus* co stwarzało duże problemy z ich identyfikacją do poziomu gatunku za pomocą techniki sekwencjonowania 16S rRNA, wykorzystanej jako metoda referencyjna. Wykorzystanie aparatu ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Brema, Niemcy) o zaadoptowanych parametrach umożliwiających wykorzystanie generowanych widm MS do automatycznej identyfikacji przy użyciu platformy MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Brema, Niemcy) pozwoliło na uzyskanie profili białkowych dla wszystkich badanych izolatów reprezentujących szeroki zakres gatunkowy – od nieprzetrwalikujących gronkowców i ziarniaków, po wytwarzające endospory gatunki *Bacillus*, takie jak *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, czy *B. pumilus* (Rys. 6). Analizy wykazały, że zastosowanie metody MALDI może znacząco zwiększyć jakość identyfikacji gatunkowej składu mikrobiologicznego próbek miodów – w moim przypadku trzykrotnie, co pozwala na uniknięcie konieczności przeprowadzania dodatkowych testów, np. sekwencjonowania dodatkowych genów metabolizmu podstawowego w przypadku technik molekularnych. Odnosnie problemu wpływu obecności form przetrwalnych na jakość dopasowania uzyskanych profili białkowych zaobserwowałem istotną różnicę pomiędzy dwoma dominującymi gatunkami należącymi do rodzaju *Bacillus* – *B. subtilis* oraz *B. cereus*. Wymienione gatunki bakterii charakteryzują się różnym czasem sporulacji (przemiany zarodników w formy wegetatywne) oraz strukturą produkowanych endospor, co, jak wskazałem, może mieć równie istotny wpływ na jakość pozyskiwanych widm MS, co sam fakt zdolności do produkcji zarodników. Zanotowaną obserwację potwierdziłem w innej pracy, gdzie pogłębione analizy różnych gatunków bakterii przetrwalikujących uwzględniające szereg czasów inkubacji i różnych metod przygotowanie próbek wskazały na istotne powiązanie jakości identyfikacji z czasem inkubacji, a tym samym produkcją endospor, co znajdowało odzwierciedlenie w ilości sygnałów w generowanych widmach i różniło się w zależności od badanego gatunku bakterii[127]. Tak więc sugerowana przez wielu badaczy potrzeba dążenia do stworzenia uniwersalnego protokołu przygotowania próbek do analizy MALDI jako remedium na przewycięzenie problemów z błędną identyfikacją mikroorganizmów środowiskowych[41] w świetle uzyskanych przeze mnie wyników badań powinna być raczej zastąpiona strategią skupioną na dążeniu do stworzenia różnych procedur przygotowania próbek dopasowanych do charakteru badanego materiału, np. obecności/braku występowania form przetrwalnych i ich rodzaju. Pomimo zaobserwowanego wpływu obecności przetrwalników w badanych próbkach, stworzony protokół identyfikacji MALDI okazał się dalece bardziej użyteczny od standardowo używanej metody sekwencjonowania 16S rRNA i pozwolił na ukazanie istotnego wpływu zarówno pochodzenia geograficznego jak i rodzaju rośliny na skład mikrobiologiczny miodów, co powinno być przedmiotem dalszych badań w kontekście zarówno kontroli bezpieczeństwa żywności (w tym przypadku miodów), jak i poszukiwania szczepów mikroorganizmów do zastosowań biotechnologicznych – miód jako źródło bakterii zdolnych do przetrwania w trudnych warunkach środowiskowych, takich jak stres osmotyczny.



Rys. 6. Przykładowe widma MS uzyskane dla szczepów bakteryjnych zidentyfikowanych jako różne gatunki – sporujące (A-I) oraz nie wytwarzające endospor (J, K).. A- *B. subtilis*; B- *B. cereus*; C- *B. pumilus*; D- *B. altitudinis*; E- *B. megaterium*; F- *B. circulans*; G- *B. licheniformis*; H- *P. alvei*; I- *L. boronitolerans*; J- *S. epidermidis*; K- *M. luteus*.

Choć wskazuje się, że poprawna klasyfikacja gatunkowa bakterii środowiskowych jest znacznie bardziej utrudniona w stosunku do izolatów klinicznych, niemniej jednak zaadoptowanie aparatu MALDI-TOF MS, charakteryzującego się wyższą rozdzielczością od standardowo stosowanych aparatów do identyfikacji mikroorganizmów, zaowocowała

wysoką efektywnością metody w identyfikacji grup bakterii charakteryzujących się wysokim podobieństwem genetycznym – *B. cereus* complex oraz *B. subtilis* group. Wskazuje to, iż użytecznym sposobem zwiększania efektywności identyfikacji i rozróżniania bakterii środowiskowych może być już sama poprawa jakości generowanych widm MS bakterii poprzez zastosowanie bardziej zaawansowanej technologicznie aparatury.

Jak wspominałem we wstępie, wiarygodność identyfikacji MALDI-TOF MS ściśle zależy od zasobu dostępnych baz danych mikroorganizmów, które są stale aktualizowane i rozszerzane (do tej pory kilka tysięcy rozpoznanych i potwierdzonych gatunków mikroorganizmów). W tym kontekście, zwiększanie skuteczności i użyteczności tej metody w analizie próbek środowiskowych należy upatrywać nie tylko w rozbudowywaniu istniejących na rynku od wielu lat systemów, takich jak MALDI Biotyper (Bruker, Niemcy), czy VITEK MS SARAMIS (Biomerieux, Francja), ale również za przyczyną pojawiania się nowych platform z własną bazą widm referencyjnych, takich jak najnowszy system do identyfikacji mikroorganizmów za pomocą techniki MALDI – EXS 2600 firmy Zybio Inc. (Chiny). Jak dotąd, skuteczność tego systemu oceniono tylko w dwóch opublikowanych pracach naukowych, przy czym badania te koncentrowały się jedynie na materiale klinicznym [129,130]. Wskazuje to na istnienie luki w wiedzy dotyczącej walidacji przydatności i wydajności systemu EXS 2600 w analizie mikrobiologicznej próbek środowiskowych. Wiedząc iż system opiera się na bazie referencyjnej widm MS skonstruowanej przy wykorzystaniu własnej kolekcji izolatów mikroorganizmów (pozyskanych głównie z terenu Chin), założyłem, iż zaadoptowanie tego systemu do charakterystyki składu mikrobiologicznego próbek środowiskowych w podejściu MALDI może być korzystne - zwiększanie zasobności bibliotek widm mikroorganizmów i reprezentacji gatunków środowiskowych. W tym zakresie włączyłem się do prac prowadzonych przez zespół ICNT UMK w Toruniu (pod kierownictwem dr hab. Pawła Pomastowskiego, prof. UMK) przy współpracy z działem R&D firmy Zybio Inc. z Chin (Angela Zhang, Jason Huang) mającego na celu adaptację systemu EXS 2600 do badań bioanalitycznych w zakresie mikrobiologii środowiskowej, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości aplikacji w przemyśle spożywczym (kontrola jakości).

W badaniu wykorzystałem różne produkty mleczarskie (śmietanka, mleko, serwatka, maślanka), w tym próbki ścieków mleczarskich, jako że matryce te znane są z dużej bioróżnorodności gatunkowej, której skład jest niezwykle wrażliwy na zmiany parametrów środowiskowych, takich jak zmiana temperatury, dostępności tlenu, pH itp., a więc dobrze odzwierciedlają charakterystykę próbek środowiskowych, jako złożonych mikrobiologicznie matryc biologicznych. W rezultacie, nie tylko po raz pierwszy w literaturze scharakteryzowałem wydajności nowego systemu EXS 2600 Zybio Inc. w analizie mikrobiologicznej próbek środowiskowych na tle znanego od wielu lat systemu MALDI Biotyper, ale również zaobserwowałem szereg zjawisk, które mogą być kluczowe w kontekście poprawy użyteczności metody MALDI w identyfikacji mikroorganizmów w matrycach środowiskowych. Po pierwsze, nowy system EXS 2600 wykazał wysoką zgodność rodzajową bakterii (99%) z szeroko zbadaną w literaturze platformą Biotyper, wskazując iż na poziomie rodzajowym wpływ konstrukcji bazy referencyjnych widm MS jest niewielki. Natomiast analizując identyfikację na poziomie gatunkowym, zgodność wyników uzyskanych

za pomocą dwóch badanych systemów spada do poziomu 74% i dotyczy głównie gatunków blisko spokrewnionych, a więc takich charakteryzujących się bardzo zbliżonymi profilami molekularnymi - *Pseudomonas fluorescens* complex, *Citrobacter freundii* complex, czy też bakterie należące do rodzaju *Aeromonas*. Biorąc pod uwagę fakt, iż jedynie w kilku przypadkach rozbieżności w identyfikacji można wytłumaczyć brakiem odpowiedniego widma MS w referencyjnej bazie danych jednego z badanych systemów, za przyczynę tego zjawiska w dużej mierze można wskazywać różne pochodzenie izolatów bakteryjnych używanych do tworzenia obu baz widm referencyjnych. Wielu badaczy wskazuje, że poprawę rozróżniania i klasyfikacji blisko spokrewnionych gatunków przy użyciu techniki MALDI-TOF MS nie należy upatrywać jedynie w rozszerzaniu pokrycia gatunkowego baz danych, ale również poprzez sposób ich konstruowania, m. in. rodzaj stosowanych algorytmów tworzenia i porównywania widm[131]. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników badań, potencjalnie użyteczną strategią może być tworzenia baz danych składających się z tak zwanych super widm (ang. *SuperSpectra*) opracowanych przez Shimadzu w bazie danych SARAMIS™, w której to widma referencyjne są tworzone na podstawie wielu widm MS danego gatunku bakterii, ale uzyskanych w różnych warunkach hodowlanych (różne czasy inkubacji i podłoża hodowlane) – strategia ta zapewnia rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków poprzez zmniejszenie podobieństwa tła[132]. W tym kontekście, do konstrukcji widm referencyjnych można by użyć widm MS bakterii tego samego gatunku zebranych z różnych regionów geograficznych i dodatkowo hodowanych w różnych warunkach inkubacji. Taka strategia wydaje się być obiecującym narzędziem do niwelowania różnic pomiędzy różnymi systemami do identyfikacji mikroorganizmów techniką MALDI, oraz stanowi odpowiedź na sugestię badaczy iż w kontekście analizy składu mikrobiologicznego próbek mleczarskich główną wadą techniki MALDI-TOF MS jest brak super widm bakterii w referencyjnych bazach danych[45].

W przeprowadzonych badaniach dowiodłem, iż zastosowanie obu platform do identyfikacji mikroorganizmów techniką MALDI stanowi niezwykle użyteczne narzędzie do analizy próbek środowiskowych takich jak próbki mleczarskie. Podejście to może z powodzeniem zastąpić tradycyjnie stosowane w mleczarstwie metody biochemiczne, które pomimo wprowadzenia automatycznych i półautomatycznych systemów takich jak testy API, BBL Crystal, BBL Phoenix Systems, Vitek, Sensitire AP80, czy Biolog™ nadal charakteryzują się niską odtwarzalnością, trudnością w określaniu zróżnicowania fenotypowego wybranych gatunków bakterii oraz znacznie bardziej ograniczonymi bazami danych w stosunku do tych w platformach do identyfikacji MALDI[37,133,134], a więc ich zastosowanie nie pozwoliło by na wiarygodne rozstrzygnięcie zaobserwowanych przeze mnie rozbieżności w identyfikacji blisko spokrewnionych gatunków bakterii środowiskowych.

4.4.4 Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego.

Wyniki badań przedstawione w monotematycznym cyklu publikacji **H1-H6** [69–74] pozwalają na następujące podsumowanie osiągnięcia naukowego:

(1) Opracowano nowy protokół szybkiej diagnostyki obrazowania złożonego tła mikrobiologicznego próbek klinicznych typu rany ZSC opierającej się o profilowanie proteomiczne techniką MALDI-TOF MS i identyfikację izolatów przy użyciu platformy MALDI Biotyper połączonej z przygotowaniem komórek bakteryjnych w podejściu kulturomicznym oraz analizą lekooporności w podejściu MALDI – zmodyfikowany test MBT STAR-BL. Metoda opiera się o wykorzystanie aparatury (aparat ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS) charakteryzującej się wyższą rozdzielczością w stosunku do rutynowo wykorzystywanych spektrometrów (typu Microflex), co w połączeniu z opracowanymi przeze mnie warunkami analizy daje możliwość nie tylko przeprowadzania rutynowej identyfikacji drobnoustrojów (adaptacja metody do wymogów platformy MALDI Biotyper), ale również poszerza jej zastosowanie o śledzenie subtelnych zmian w profilach molekularnych bakterii pod wpływem zmiennych warunków środowiskowych, np. składu podłoża hodowlanego oraz okazuje się skuteczna w ocenie lekooporności bakterii względem antybiotyków β -laktamowych (głównie w detekcji wielolekoopornych bakterii ESBL i CPB). Opracowane podejście analityczne może być z łatwością dostosowane do wymogów pracy rutynowych laboratoriów mikrobiologicznych posiadających standardową aparaturę MALDI (typu Microflex), ponieważ w badaniu zastosowałem warunki zaadaptowane do wymogów komercyjnie dostępnej platformy do identyfikacji mikroorganizmów MALDI Biotyper kompatybilnej z wymienioną aparaturą, aczkolwiek z ograniczoną możliwością pogłębionej analizy zmian profili molekularnych w zmiennych warunkach hodowli. Zaproponowane podejście zostało przedstawione w dostępnej literaturze po raz pierwszy.

(2) Opracowano nowy protokół analityczny badania składu mikrobiologicznego śliny opierający się na wykorzystaniu analizy proteomicznej i lipidomicznej MALDI oraz analizy powierzchniowych grup funkcyjnych techniką FTIR. Opracowane podejście pozwala na wiarygodną charakterystykę dominujących i kluczowych w przypadku badań mikrobioty jamy ustnej gatunków paciorkowców znacznie poszerzając użyteczność technik hodowlanych oraz zwiększając znaczenie śliny, jako płynu diagnostycznego. Zaproponowane podejście zostało przedstawione w dostępnej literaturze po raz pierwszy.

(3) Opracowano nowy protokół wykrywania aktywności karbapenemaz za pomocą techniki MBT STAR-Carba w oparciu o zakres różnych gęstości zawiesin bakteryjnych i czasów inkubacji oraz dodatku inhibitorów. Opracowany protokół może być z powodzeniem wykorzystany do częściowej klasyfikacji bakterii ze względu na rodzaj posiadanych genów oporności na karbapenemy, może być przydatny w ocenie wrażliwości bakterii na rodzaje stosowanych inhibitorów – alternatywa dla standardowych testów MIC, metoda poszukiwania skutecznych związków jako potencjalnych inhibitorów karbapenemaz, wskazuje na możliwość znacznego skrócenie czasu inkubacji dla wybranych rodzajów bakterii (nawet do 1 minuty), a także może być pomocny w poprawnej ocenie uzyskiwanych wyników negatywnych i wątpliwych. Zaproponowane podejście zostało przedstawione w dostępnej literaturze po raz pierwszy.

(4) Opracowano nowy protokół analizy składu mikrobiologicznego próbek miodów w oparciu o szybką identyfikację bakterii techniką MALDI z wykorzystaniem aparatury ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS zaadaptowanej do platformy MALDI Biotyper. Stworzony protokół pozwala na wiarygodną identyfikację bakterii przetrwalnikujących, w tym poprawną

klasyfikację gatunków blisko spokrewnionych należących do grup *Bacillus subtilis* oraz *Bacillus cereus*, oraz okazał się skuteczny w analizie wpływu typu miodów oraz pochodzenia na ich skład gatunkowy. Opracowane podejście zostało opisane po raz pierwszy w literaturze w kontekście badania wpływu pochodzenia geograficznego i botanicznego miodów na ich skład mikrobiologiczny.

(5) Po raz pierwszy w literaturze zastosowano nową platformę identyfikacji mikroorganizmów techniką MALDI – EXS 2600 Zybio Inc., do badania próbek środowiskowych (różnych próbek mleczarskich). Uzyskane wyniki pozwoliły na poszerzenie obecnego stanu wiedzy na temat wpływu konstrukcji baz widm referencyjnych na skuteczność identyfikacji bakterii – wskazanie wpływu pochodzenia geograficznego izolatów używanych do tworzenia widm referencyjnych jako istotnego parametru rozróżniania gatunków blisko spokrewnionych, co powinno być uwzględniane podczas poszerzania dostępnych bibliotek widm, a także wskazanie możliwości wykorzystania izolatów o różnym pochodzeniu geograficznym w tworzenia tzw. super widm, jako potencjalnie skutecznego rozwiązania problemu skutecznej identyfikacji bakterii środowiskowych należących do blisko spokrewnionych grup mikroorganizmów. Ponadto, uzyskane wyniki badań zostały wykorzystane podczas walidacji metody mającej na celu jej zaadoptowanie do przemysłu spożywczego, w szczególności mleczarskiego (kontrola jakości).

4.4.5 Perspektywy badawcze

Moje dalsze plany **naukowo-badawcze** można podzielić na kilka głównych kierunków:

(1) Rozwijanie **nowoczesnego podejścia kulturomicznego** do pogłębionej charakterystyki składu mikrobiologicznego różnych matryc klinicznych. Podjęte działania zaowocowały już współpracą z ośrodkiem naukowym **Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach** z którym w ramach projektu Opus „*Nowe podejście do obrazowania i szybkiej identyfikacji mikrobiomu w ocenie skutków radioterapii*” (2020/39/B/NZ7/02733) podjąłem się prac mających na celu opracowanie podejścia analitycznego do charakterystyki zmian zachodzących w składzie mikrobioty moczu pacjentów cierpiących na raka prostaty przechodzących radioterapię w oparciu o podejście kulturomiczne. Mocz jako matryca biologiczna stanowi duże wyzwania analityczne, ponieważ przez długi czas był uważany za materiał sterylny – wolny od obecności mikroorganizmów, za wyjątkiem przypadków infekcji gatunkami patogennymi. Podjęte przeze mnie prace – zarówno te już opublikowane [135] jak i będące w trakcie recenzji [136](preprint), dowodzą iż dzięki opracowaniu odpowiednich narzędzi do charakterystyki składu mikrobiologicznego moczu, takich jak nowoczesne podejście kulturomiczne, możliwa jest detekcja obecności bakterii w trudnych matrycach klinicznych, takich jak mocz. Co więcej, wyniki wskazują, że opracowywane podejście kulturomiczne pozwala nie tylko na identyfikację bakterii patogennych odpowiedzialnych za stany zapalne i infekcje dróg moczowo-płciowych, ale również na charakterystykę mikrobioty komensalnej – zasiedlającej drogi moczowo-płciowe, badanie zmian w jej składzie pod wpływem różnych czynników zewnętrznych, np. ekspozycji na promieniowanie radiacyjne, a także na opis korelacji z

parametrami zdrowotnymi pacjentów (np. poziomem cukru w krwi i moczu). W ramach przedstawianego kierunku planowanych badań mam zamiar również opracować podejście kulturomiczne do śledzenia zmian w mikrobiocie moczowej oraz jelitowej pod wpływem suplementacji probiotykami co, jak wskazują dotychczas zebrane wyniki badań, może być korzystne w przypadku pacjentów podejmujących radioterapię;

(2) Zwiększanie użyteczności techniki MALDI-TOF MS do zastosowań w laboratoriach mikrobiologicznych w zakresie **zwiększania wiarygodności identyfikacji i rozróżniania blisko spokrewnionych szczepów bakterii**. W tym kontekście planuję szereg badań mających na celu **opracowanie protokołów analitycznych opierających się o analizę lipidomiczną bakterii** obejmujące opracowanie różnych strategii ekstrakcji lipidów komórkowych bakterii (całkowita vs celowana) w oparciu o metody ekstrakcji ciecz-ciecz (np. metoda Folcha, Bligh-Dyer, Matyash) i ekstrakcji/mikroekstrakcji do fazy stałej (SPE/SPME) oraz opracowanie warunków analizy MALDI-TOF MS, w tym: (a) dobór matryc MALDI do analizy w trybie jonizacji dodatniej i ujemnej, a także selekcja podłoży o charakterze nanostruktur w wariancie bezmatrycowym, (b) selekcja sposobu nakładania matryc MALDI [np. metoda suchej kropli (ang. *dry droplet*), kanapki (ang. *sandwich*), czy też metoda automatycznego rozpylania (ang. *automatic sprayer method*)], (c) dobór optymalnych parametrów jonizacji/desorpcji i generowania widm - selekcja warunków pracy lasera (moc, częstotliwość, liczba strzałów) w trybie jonizacji dodatniej/ujemnej z użyciem reflektoru → adaptacja do trybu liniowego oraz (d) opracowanie sposobu analizy statystycznej i klasyfikacji danych (m.in. tworzenie własnych referencyjnych baz profili lipidowych, klasyfikacja z wykorzystaniem oprogramowania MALDI Biotyper/EXS2600, klasyfikacja z wykorzystaniem wielowymiarowych analiz statystycznych, np. hierarchicznej analizy skupień (ang. *hierarchical cluster analysis*, HCA), analizy głównych składowych (PCA), czy też analizy dyskryminacyjnej metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. *partial least squares - discriminant analysis*, PLS-DA). Planowane prace mają na celu stworzenie nowych protokołów analitycznych pozwalających na pozyskiwanie profili lipidowych bakterii użytecznych w rozróżniania typów bakterii (Gram-dodatnie vs Gram-ujemne), gatunków (pozyskiwanie widm MS lipidów gatunkowo specyficznych), czy też szczepów blisko spokrewnionych trudnych do rozróżnienia na podstawie sekwencji 16S rRNA lub profili proteomicznych (np. *Escherichia coli* – *Shigella* sp.), a także umożliwiających badanie zmian zachodzących w aktywności metabolicznej bakterii pod wpływem zmiennych warunków zewnętrznych (np. pod wpływem antybiotyków, zmiennych parametrów biochemicznych gospodarza (pacjenta)). Jak dotąd, w ramach realizacji planów badawczych, udało się określić wpływ różnych matryc MALDI, metod ekstrakcji oraz trybów jonizacji na skład lipidowych profili MS wybranych 4 gatunkach bakterii reprezentujących oba główne typy (Gram-dodatnie i –ujemne) [137], ocenić użyteczność techniki MALDI i jej odpowiednika bezmatrycowego (NALDI) w rozróżnianiu szczepów *E. coli* różniących się opornością na antybiotyki β -laktamowe [106] oraz ocenić użyteczność analizy lipidomicznej MALDI w identyfikacji bakterii biorących udział w rozwoju ZSC [99]. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki potencjał inkorporacji analizy lipidomicznej bakterii za pomocą techniki MALDI-TOF MS w procesie identyfikacji mikrobiologicznej próbek biologicznych, stąd w

opisywanym obszarze planowanych działań naukowo-badawczych zamierzam również przeprowadzić badania w kierunku poszukiwania lipidowych determinantów wielolekooporności u patogenów klinicznych;

(3) Prace nad poszerzaniem użyteczności **detekcji oporności na karbapenemy za pomocą techniki MALDI-TOF MS i testu aktywności hydrolitycznej karbapenemaz MBT STAR-Carba jako alternatywy standardowego testu MIC** (minimalnego stężenia hamującego) do oceny skuteczności nowych terapeutyków do eradykacji wielolekoopornych patogenów klinicznych – kombinacji *karbapenemy – inhibitory karbapenemaz*. W ramach dotychczas podjętych działań wraz z **zespołem badawczym firmy Bruker Daltonik GmbH (Brema, Niemcy) – dr Markus Kostrzewa, dr Katrin Sparbier, dr Oliver Drews**, oraz mgr Ewelina Sibińską (Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu) oraz mgr Dominiką Błońską (Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii UMK w Toruniu), przeprowadziłem pilotażowe badania oceniające skuteczność testu MBT STAR-Carba w szybkim identyfikowaniu wrażliwości różnych wielolekoopornych szczepów bakterii Gram-ujemnych na kombinacje imipenem + avibactam lub relebactam w odniesieniu do rekomendowanej przez Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości EUCAST (ang. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) metody oznaczania wartości MIC metoda mikrorozcieńczeń w bulionie (ang. *broth microdilution*, BMD) oraz metody multipleks PCR – wstępne wyniki badań zostały zaprezentowane w formie posteru naukowego na największej międzynarodowej konferencji poświęconej tematyce mikrobiologii klinicznej – European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (33rd ECCMID, Kopenhaga, Dania, 15-18 kwietnia 2023 r.) (Załącznik nr 4, pkt.II.3A, pozycja 6 w Poster/E-poster) Obecnie trwają prace nad manuskryptem. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką użyteczność metody jako metody szybkiej oceny skuteczności kombinacji antybiotyków + inhibitor karbapenemaz oraz mogą być w przyszłości wykorzystane również jako metoda wstępnej klasyfikacji rodzaju karbapenemaz – zgodnie z założeniami i mechanizmem działania badanych inhibitorów test poprawnie wskazywał wrażliwość bakterii posiadających geny *KPC* na obecność relebactamu przy braku spadku aktywności u bakterii posiadających metalo- β -laktamazy;

(4) W związku z faktem, iż duża część moich badań wchodzi w obszar dotyczący **poszukiwania nowych metod oceny lekooporności**, a w tym kontekście, oprócz standardowych metod analizy stopnia wrażliwości/oporności bakterii prowadzonych na tzw. komórkach planktonicznych (wolnożyjących pojedynczych komórkach – standardowe zawiesiny komórkowe), niezwykle istotnym parametrem jest możliwość występowania bakterii w formie biofilmów (drastyczny wzrost stopnia oporności względem substancji bakteriobójczych i bakteriostatycznych), **planuję zaadoptować opracowywane protokoły analizy mikroorganizmów za pomocą techniki MALDI-TOF MS** (podejście lipidomiczne, testy MBT STAR-Carba) **do badania biofilmów bakteryjnych w oparciu o obrazowanie MALDI** (ang. *MALDI imaging*). Do tej pory technika obrazowania MALDI była szeroko stosowana do obrazowania zmian zachodzących w komórkach eukariotycznych (roślinne, zwierzęce w tym ludzkie), natomiast badania biofilmów bakteryjnych pozostają wciąż

obszarem w dużej mierze nieznanym. Zakładam, iż opracowanie wiarygodnej i prostej metody analizy zmian zachodzących w komórkach bakteryjnych tworzących biofilm pozwoli na skuteczniejszą ocenę efektywności projektowanych terapii antybakteryjnych (warunki zbliżone do rzeczywistych). Tak nowatorskie badania będą wymagały szeroko zakrojonej współpracy z ekspertami z dziedziny analizy i przygotowywania biofilmów bakteryjnych, które sprostają wymaganiom stawianym próbkom nadającym się do obrazowania techniką MALDI. W związku z powyższym, w opisywanym kierunku planowanych badań **podjąłem współpracę z ośrodkiem naukowym Uniwersytetu Nawarry w Pampelunie (Hiszpania) – Katedra Mikrobiologii i Parazytologii, Wydział Lekarski, gdzie zaplanowałem odbycie 6 miesięcznego stażu w ramach programu Bekker NAWA pod opieką dr Guillermo Martinez-de-Tejada** (planowany początek wrzesień 2025 r.) podczas którego będę m.in. doskonalił warsztat z przygotowywania biofilmów bakteryjnych, ze szczególnym naciskiem na możliwości wykorzystania reaktora do tworzenia biofilmów w warunkach dynamicznych (ang. *Center for Disease Control Biofilm Reactor*, CBR);

(5) Część moich dotychczasowych działań naukowo-badawczych dotyczy analizy próbek środowiskowych. W tym zakresie planuję **dalszy rozwój opracowywanych protokołów analitycznych MALDI do identyfikacji mikroorganizmów środowiskowych** pochodzących z różnych źródeł skupiając się na takich matrycach jak produkty mleczarskie, próbki związane z przetwórstwem paliw czy też materiał roślinny wykorzystywany do produkcji pasz, **co wynika z podjętych przeze mnie współprac z obszarem gospodarczym (Polmlek Grudziądz, PKN Orlen, Smart Agro Solutions)**. Badania będą dotyczyć zarówno identyfikacji taksonomicznej (charakterystyka składu gatunkowego, w tym poszerzanie bibliotek widm referencyjnych platform do identyfikacji MALDI), jak i pogłębionej charakterystyki zdolności metabolicznych (aktywności enzymatycznej) izolowanych bakterii – potencjał do wykorzystania w zakresie m. in. zwiększania bezpieczeństwa i użyteczności pasz do skarmiania zwierząt gospodarczych, polepszania jakości produktów mleczarskich (np. zwiększania zawartości witamin z grupy B i witaminy D, zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych), degradacja odpadów ropopochodnych, ochrona paliw przed negatywnym wpływem mikroorganizmów środowiskowych w warunkach długotrwałego przechowywania itp. W opisywanym kierunku badań moje działania będą skupione przede wszystkim na tworzeniu nowych procedur analitycznych, które będą charakteryzować się prostą metodą przygotowywania próbek i krótkim czasem do uzyskania wiarygodnego wyniku.

4.4.6 Bibliografia

1. Torres-sangiao, E.; Leal Rodriguez, C.; García-riestra, C. Application and perspectives of maldi-tof mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. *Microorganisms* 2021, 9, 1539.
2. Clark, A.E.; Kaleta, E.J.; Arora, A.; Wolk, D.M. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, 26, 547–603.

3. Buszewski, B.; Rogowska, A.; Pomastowski, P.; Złoch, M.; Railean-Plugaru, V. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *J. AOAC Int.* **2017**, *100*, 1607–1623.
4. Topić Popović, N.; Kazazić, S.P.; Bojanić, K.; Strunjak-Perović, I.; Čož-Rakovac, R. Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass Spectrom. Rev.* **2023**, *42*, 1589–1603.
5. Lai, Y.-H.; Wang, Y.-S. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Mechanistic Studies and Methods for Improving the Structural Identification of Carbohydrates. *Mass Spectrom.* **2017**, *6*, S0072–S0072.
6. Chang, W.C.; Huang, L.C.L.; Wang, Y.S.; Peng, W.P.; Chang, H.C.; Hsu, N.Y.; Yang, W. Bin; Chen, C.H. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *582*, 1–9.
7. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization process. Ehring, H., Karas, M. & Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization process. Ehring, H., Karas, M. & Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in i. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 472–480.
8. Pomastowski, P.; Buszewski, B. Complementarity of matrix- and nanostructure-assisted laser desorption/ionization approaches. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 260.
9. Bae, Y.J.; Kim, M.S. A Thermal Mechanism of Ion Formation in MALDI. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2015**, *8*, 41–60.
10. Molin, L.; Seraglia, R.; Czarnocki, Z.; Maurin, J.K.; Pluciński, F.A.; Traldi, P. On the primary ionization mechanism(s) in matrix-assisted laser desorption ionization. *J. Anal. Methods Chem.* **2012**, *1*, 161865.
11. Knochenmuss, R. Chapter 1. An Introduction to MALDI Ionization Mechanisms for Users of Mass Spectrometry Imaging. In; **2021**; pp. 1–19.
12. Paltauf, G.; Dyer, P.E. Photomechanical processes and effects in ablation. Paltauf, G. & Dyer, P. E. Photomechanical processes and effects in ablation. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 487–518.
13. J. Cotter, R. Laser mass spectrometry: an overview of techniques, instruments and applications. *Anal. Chim. Acta* **1987**, *195*, 45–59.
14. Hosseini, S.; Martinez-Chapa, S.O. Principles and mechanism of MALDI-ToF-MS analysis. In *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*; Springer Verlag, **2017**; pp. 1–19.
15. Haider, A.; Ringer, M.; Kotroczo, Z.; Mohácsi-Farkas, C.; Kocsis, T. The Current Level of MALDI-TOF MS Applications in the Detection of Microorganisms: A Short Review of Benefits and Limitations. *Microbiol. Res. (Pavia)*. **2023**, *14*, 80–90.
16. Hosseini, S.; Martinez-Chapa, S.O. Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis. **2017**.
17. Umer, A.A. Review on MALDI TOF MS: Modern Disease Diagnosis Approaches in

- Microbiology and its Mechanisms. *J. Microbiol. Mod.* **2023**, 7, 102.
18. Cramer, R. High-speed Analysis of Large Sample Sets – How Can This Key Aspect of the Omics Be Achieved? *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, 19, 1760–1766.
 19. Złoch, M.; Pomastowski, P.; Maślak, E.; Monedeiro, F.; Buszewski, B. Study on Molecular Profiles of Staphylococcus aureus Strains: Spectrometric Approach. *Molecules* **2020**, 25, 4894.
 20. Pomastowski, P.; Szultka, M.; Kupczyk, W.; Jackowski, M.; Buszewski, B. Evaluation of Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Capillary Electrophoresis Detection of Controlled Bacterial Clumping. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2015**, 6, 1-.
 21. Fuchs, B.; Schiller, J. Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Apolar Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2009**, 13, 1664–1681.
 22. Fuchs, B.; Süß, R.; Schiller, J. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog. Lipid Res.* 2010, 49, 450–475.
 23. Leopold, J.; Popkova, Y.; Engel, K.M.; Schiller, J. Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. *Biomolecules* 2018, 8, 173.
 24. Angeletti, S.; Ciccozzi, M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. *Infect. Genet. Evol.* 2019, 76, 104063.
 25. Croxatto, A.; Prod'homme, G.; Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 380–407.
 26. Nomura, F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2015, 1854, 528–537.
 27. Buszewski, B.; Maślak, E.; Złoch, M.; Railean-Plugaru, V.; Kłodzińska, E.; Pomastowski, P. A new approach to identifying pathogens, with particular regard to viruses, based on capillary electrophoresis and other analytical techniques. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2021, 139, 116250.
 28. Van Belkum, A.; Welker, M.; Pincus, D.; Charrier, J.P.; Girard, V. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: What are the current issues? *Ann. Lab. Med.* 2017, 37, 475–483.
 29. Fournier, P.E.; Raoult, D.; Drancourt, M. Republication of «New Species Announcement», a new format to prompt the description of new human microbial species. *Hum. Microbiome J.* 2016, 1, A1–A2.
 30. Jneid, J.; Lavigne, J.P.; La Scola, B.; Cassir, N. The diabetic foot microbiota: A review.

Hum. Microbiome J. 2017, 5–6, 1–6.

31. Oates, A.; Bowling, F.L.; Boulton, A.J.M.; McBaina, A.J. Molecular and culture-based assessment of the microbial diversity of diabetic chronic foot wounds and contralateral skin sites. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2263–2271.
32. Anderson, N.W.; Buchan, B.W.; Riebe, K.M.; Parsons, L.N.; Gnacinski, S.; Ledebøer, N.A. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1008–1013.
33. Vrioni, G.; Tsiamis, C.; Oikonomidis, G.; Theodoridou, K.; Kapsimali, V.; Tsakris, A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6*, 240–240.
34. Calderaro, A.; Chezzi, C. MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. *Microorg. 2024, Vol. 12, Page 322* **2024**, *12*, 322.
35. Mortier, T.; Wieme, A.D.; Vandamme, P.; Waegeman, W. Bacterial species identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning techniques: A large-scale benchmarking study. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 6157–6168.
36. Wilson, D.J.; Middleton, J.R.; Adkins, P.R.F.; Goodell, G.M. Test agreement among biochemical methods, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry, and 16S rRNA sequencing for identification of microorganisms isolated from bovine milk. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*.
37. Wragg, P.; Randall, L.; Whatmore, A.M. Comparison of Biolog GEN III MicroStation semi-automated bacterial identification system with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16S ribosomal RNA gene sequencing for the identification of bacteria of veterina. *J. Microbiol. Methods* **2014**, *105*, 16–21.
38. Janda, J.M.; Abbott, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 2007, *45*, 2761–2764.
39. Anderson, A.C.; Sanunu, M.; Schneider, C.; Clad, A.; Karygianni, L.; Hellwig, E.; Al-Ahmad, A. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*.
40. Kumar Chaudhary, D.; Dahal, R.H.; Chaudhary, D.K. Cronicon EC MICROBIOLOGY Mini Review DNA Bar-Code for Identification of Microbial Communities: A Mini-Review. **2017**, *6*, 219–224.
41. Santos, I.C.; Hildenbrand, Z.L.; Schug, K.A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 2016, *141*, 2827–2837.
42. Ashfaq, M.Y.; Da'na, D.A.; Al-Ghouti, M.A. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *J. Environ. Manage.* 2022, *305*,

114359.

43. Tsuchida, S.; Nakayama, T. MALDI-Based Mass Spectrometry in Clinical Testing: Focus on Bacterial Identification. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 2814.
44. Martiny, D.; Busson, L.; Wybo, I.; Ait El Haj, R.; Dediste, A.; Vandenberg, O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1313–1325.
45. Jadhav, S.; Gulati, V.; Fox, E.M.; Karpe, A.; Beale, D.J.; Sevier, D.; Bhawe, M.; Palombo, E.A. Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *202*, 1–9.
46. Kwon, K.T.; Armstrong, D.G. Microbiology and Antimicrobial Therapy for Diabetic Foot Infections. *Infect. Chemother.* **2018**, *50*, 11.
47. Lipsky, B.A.; Berendt, A.R.; Cornia, P.B.; Pile, J.C.; Peters, E.J.G.; Armstrong, D.G.; Deery, H.G.; Embil, J.M.; Joseph, W.S.; Karchmer, A.W.; et al. 2012 infectious diseases society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54*, e132–e173.
48. Spichler, A.; Hurwitz, B.L.; Armstrong, D.G.; Lipsky, B.A. Microbiology of diabetic foot infections: From Louis Pasteur to “crime scene investigation.” *BMC Med.* **2015**, *13*, 2.
49. Nordmann, P.; Poirel, L.; Dortet, L. Rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1503–1507.
50. Bush, K. Carbapenemases: Partners in crime. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2013**, *1*, 7–16.
51. Monteferrante, C.G.; Sultan, S.; ten Kate, M.T.; Dekker, L.J.M.; Sparbier, K.; Peer, M.; Kostzrewa, M.; Luider, T.M.; Goessens, W.H.F.; Burgers, P.C. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2856–2867.
52. Albiger, B.; Glasner, C.; Struelens, M.J.; Grundmann, H.; Monnet, D.L. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Eurosurveillance* **2015**, *20*.
53. Anantharajah, A.; Tossens, B.; Olive, N.; Kabamba-Mukadi, B.; Rodriguez-Villalobos, H.; Verroken, A. Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*.
54. Girlich, D.; Halimi, D.; Zambardi, G.; Nordmann, P. Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *77*, 200–201.
55. Pierce, V.M.; Simner, P.J.; Lonsway, D.R.; Roe-Carpenter, D.E.; Johnson, J.K.; Brasso, W.B.; Bobenchik, A.M.; Lockett, Z.C.; Charnot-Katsikas, A.; Ferraro, M.J.; et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of

- carbapenemase production among enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2321–2333.
56. Dallenne, C.; Da Costa, A.; Decré, D.; Favier, C.; Arlet, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 490–495.
57. Poirel, L.; Walsh, T.R.; Cuvillier, V.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *70*, 119–123.
58. Oviaño, M.; Bou, G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*.
59. Oviaño, M.; Fernández, B.; Fernández, A.; Barba, M.J.; Mouriño, C.; Bou, G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 1146–1157.
60. Oviaño, M.; Rodicio, M.R.; Heinisch, J.J.; Rodicio, R.; Bou, G.; Fernández, J. Analysis of the Degradation of Broad-Spectrum Cephalosporins by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae Using MALDI-TOF MS. *Microorganisms* **2019**, *7*, 614.
61. Lasserre, C.; De Saint Martin, L.; Cuzon, G.; Bogaerts, P.; Lamar, E.; Glupczynski, Y.; Naas, T.; Tandé, D. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 2163–71.
62. Schuster, D.; Josten, M.; Janssen, K.; Bodenstein, I.; Albert, C.; Schallenberg, A.; Gajdiss, M.; Sib, E.; Szekat, C.; Kehl, K.; et al. Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci harboring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308*, 522–526.
63. Hu, Y.; Huang, Y.; Lizou, Y.; Li, J.; Zhang, R. Evaluation of staphylococcus aureus subtyping module for methicillin-resistant Staphylococcus aureus detection based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 473665.
64. Wang, H.-Y.; Lee, T.-Y.; Tseng, Y.-J.; Liu, T.-P.; Huang, K.-Y.; Chang, Y.-T.; Chen, C.-H.; Lu, J.-J. A new scheme for strain typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry by using machine learning approach. *PLoS One* **2018**, *13*, e0194289.
65. Gaibani, P.; Galea, A.; Fagioni, M.; Ambretti, S.; Sambri, V.; Landini, M.P. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of KPC-producing Klebsiella pneumoniae. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 2609–2613.
66. Chen, X.F.; Hou, X.; Xiao, M.; Zhang, L.; Cheng, J.W.; Zhou, M.L.; Huang, J.J.; Zhang, J.J.; Xu, Y.C.; Hsueh, P.R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (Maldi-tof ms) analysis for the identification of pathogenic

- microorganisms: A review. *Microorganisms* 2021, 9, 1536.
67. Cordovana, M.; Abdalla, M.; Ambretti, S. Evaluation of the MBT STAR-Carba Assay for the Detection of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and Hafniaceae with a Large Collection of Routine Isolates from Plate Cultures and Patient-Derived Positive Blood Cultures. *Microb. Drug Resist.* **2020**, 26, 1298–1306.
 68. Carvalhaes, C.G.; Cayo, R.; Visconde, M.F.; Barone, T.; Frigatto, E.A.M.; Okamoto, D.; Assis, D.M.; Juliano, L.; Machado, A.M.O.; Gales, A.C. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, 69, 2132–2136.
 69. Złoch, M.; Maślak, E.; Kupczyk, W.; Jackowski, M.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Culturomics approach to identify diabetic foot infection bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 9574.
 70. Złoch, M.; Maślak, E.; Kupczyk, W.; Pomastowski, P. Multi-Instrumental Analysis Toward Exploring the Diabetic Foot Infection Microbiota. *Curr. Microbiol.* **2023**, 80, 1–15.
 71. Złoch, M.; Rodzik, A.; Pryshchepa, O.; Pauter, K.; Szultka-Mlynska, M.; Rogowska, A.; Kupczyk, W.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Problems with identifying and distinguishing salivary streptococci: A multi-instrumental approach. *Future Microbiol.* **2020**, 15, 1157–1171.
 72. Złoch, M.; Pomastowski, P.; Peer, M.; Sparbier, K.; Kostrzewa, M.; Buszewski, B. Study on carbapenemase-producing bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization approach. *PLoS One* **2021**, 16, e0247369.
 73. Pomastowski, P.; Złoch, M.; Rodzik, A.; Ligor, M.; Kostrzewa, M.; Buszewski, B. Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique. *PLoS One* **2019**, 14, e0217078.
 74. Czeszewska-Rosiak, G.; Złoch, M.; Radosińska, M.; Florkiewicz, A.B.; Tretyn, A.; Pomastowski, P. The usefulness of the MALDI-TOF MS technique in the determination of dairy samples' microbial composition: comparison of the new EXS 2600 system with MALDI Biotyper platform. *Arch. Microbiol.* **2024**, 206, 1–11.
 75. Zehavi, T.; Probst, M.; Mizrahi, I. Insights into culturomics of the rumen microbiome. *Front. Microbiol.* **2018**, 9.
 76. Singh, S.K.; Gupta, K.; Tiwari, S.; Shahi, S.K.; Kumar, S.; Kumar, A.; Gupta, S.K. Detecting aerobic bacterial diversity in patients with diabetic foot wounds using ERIC-PCR: A preliminary communication. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2009**, 8, 203–208.
 77. Bouharkat, B.; Tir Touil, A.; Mullié, C.; Chelli, N.; Meddah, B. Bacterial ecology and antibiotic resistance mechanisms of isolated resistant strains from diabetic foot infections in the north west of Algeria. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2020**, 19, 1261–1271.

78. Cox, C.R.; Jensen, K.R.; Saichek, N.R.; Voorhees, K.J. Strain-level bacterial identification by CeO₂-catalyzed MALDI-TOF MS fatty acid analysis and comparison to commercial protein-based methods. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–13.
79. Dieckmann, R.; Helmuth, R.; Erhard, M.; Malorny, B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7767–7778.
80. Lagier, J.C.; Hugon, P.; Khelaifia, S.; Fournier, P.E.; La Scola, B.; Raoult, D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 237–264.
81. Lázaro-Martínez, J.L.; Aragón-Sánchez, J.; García-Morales, E. Antibiotics versus conservative surgery for treating diabetic foot osteomyelitis: A randomized comparative trial. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 789–795.
82. Lesens, O.; Desbiez, F.; Vidal, M.; Robin, F.; Descamps, S.; Beytout, J.; Laurichesse, H.; Tauveron, I. Culture of per-wound bone specimens: A simplified approach for the medical management of diabetic foot osteomyelitis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 285–291.
83. Pouget, C.; Dunyach-Remy, C.; Pantel, A.; Boutet-Dubois, A.; Schuldiner, S.; Sotto, A.; Lavigne, J.P.; Loubet, P. Alternative Approaches for the Management of Diabetic Foot Ulcers. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 747618.
84. Dowd, S.E.; Wolcott, R.D.; Sun, Y.; McKeenan, T.; Smith, E.; Rhoads, D. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS One* **2008**, *3*, e3326.
85. Heravi, F.S.; Zakrzewski, M.; Vickery, K.; Armstrong, D.G.; Hu, H. Bacterial diversity of diabetic foot ulcers: Current status and future perspectives. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*.
86. Smith, K.; Collier, A.; Townsend, E.M.; O'Donnell, L.E.; Bal, A.M.; Butcher, J.; MacKay, W.G.; Ramage, G.; Williams, C. One step closer to understanding the role of bacteria in diabetic foot ulcers: Characterising the microbiome of ulcers. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 1–12.
87. Gardner, S.E.; Hillis, S.L.; Heilmann, K.; Segre, J.A.; Grice, E.A. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. *Diabetes* **2013**, *62*, 923–930.
88. McLaren, M.R.; Willis, A.D.; Callahan, B.J. Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments. *Elife* **2019**, *8*.
89. Zhang, C.Z.; Cheng, X.Q.; Li, J.Y.; Zhang, P.; Yi, P.; Xu, X.; Zhou, X.D. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int. J. Oral Sci.* **2016**, *8*, 133–137.
90. Kreth, J.; Merritt, J.; Qi, F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol.* **2009**, *28*, 397–403.

91. Bernardi, S.; Continenza, M.A.; Al-Ahmad, A.; Karygianni, L.; Follo, M.; Filippi, A.; Macchiarelli, G. Streptococcus spp. And Fusobacterium nucleatum in tongue dorsum biofilm from halitosis patients: A fluorescence in situ hybridization (FISH) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) study. *New Microbiol.* **2019**, *42*, 108–113.
92. Kudo, Y.; Tada, H.; Fujiwara, N.; Tada, Y.; Tsunematsu, T.; Miyake, Y.; Ishimaru, N. Oral environment and cancer. In Proceedings of the Genes and Environment; BioMed Central Ltd., 2016; Vol. 38.
93. Klimesova, K.; Zakostelska, Z.J.; Tlaskalova-Hogenova, H. Oral bacterial and fungal microbiome impacts colorectal carcinogenesis. *Front. Microbiol.* 2018, *9*.
94. Kosecka-Strojek, M.; Wolska, M.; Żabicka, D.; Sadowy, E.; Międzobrodzki, J. Identification of clinically relevant streptococcus and enterococcus species based on biochemical methods and 16s rRNA, SODA, TUF, RPOB, and RECA gene sequencing. *Pathogens* **2020**, *9*, 1–21.
95. Public Health England UK Standards for Microbiology Investigations, Identification of Streptococcus species, Enterococcus species and Morphologically Similar Organisms. *Bacteriology* **2015**, *B 55*, 1–21.
96. Solntceva, V.; Kostrzewa, M.; Larrouy-Maumus, G. Detection of Species-Specific Lipids by Routine MALDI TOF Mass Spectrometry to Unlock the Challenges of Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021, *10*, 914.
97. Liang, T.; Leung, L.M.; Opene, B.; Fondrie, W.E.; Lee, Y.I.; Chandler, C.E.; Yoon, S.H.; Doi, Y.; Ernst, R.K.; Goodlett, D.R. Rapid Microbial Identification and Antibiotic Resistance Detection by Mass Spectrometric Analysis of Membrane Lipids. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1286–1294.
98. Kostrzewa, M.; Nagy, E.; Schröttner, P.; Pranada, A.B. How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria—the rare and the unknown. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2019, *19*, 667–682.
99. Walczak-Skierska, J.; Monedeiro, F.; Maślak, E.; Złoch, M. Lipidomics Characterization of the Microbiome in People with Diabetic Foot Infection Using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 16251–16262.
100. Appala, K.; Bimpeh, K.; Freeman, C.; Hines, K.M. Recent applications of mass spectrometry in bacterial lipidomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412*, 5935–5943.
101. Calvano, C.D.; Picca, R.A.; Bonerba, E.; Tantillo, G.; Cioffi, N.; Palmisano, F. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of proteins and lipids in Escherichia coli exposed to copper ions and nanoparticles. *J. Mass Spectrom.* **2016**, 828–840.
102. Gidden, J.; Denson, J.; Liyanage, R.; Ivey, D.M.; Lay, J.O. Lipid compositions in Escherichia coli and Bacillus subtilis during growth as determined by MALDI-TOF and TOF/TOF mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *283*, 178–184.

103. AlMasoud, N.; Xu, Y.; Trivedi, D.K.; Salivo, S.; Abban, T.; Rattray, N.J.W.; Szula, E.; AlRabiah, H.; Sayqal, A.; Goodacre, R. Classification of *Bacillus* and *Brevibacillus* species using rapid analysis of lipids by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 7865–7878.
104. Stübiger, G.; Wuczkowski, M.; Mancera, L.; Lopandic, K.; Sterflinger, K.; Belgacem, O. Characterization of Yeasts and Filamentous Fungi using MALDI Lipid Phenotyping. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *130*, 27–37.
105. Mosca, A.; Russo, F.; Miragliotta, L.; Iodice, M.A.; Miragliotta, G. Utility of gas chromatography for rapid identification of mycobacterial species frequently encountered in clinical laboratory. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *68*, 392–395.
106. Maślak, E.; Arendowski, A.; Złoch, M.; Walczak-Skierska, J.; Radtke, A.; Piszczek, P.; Pomastowski, P. Silver Nanoparticle Targets Fabricated Using Chemical Vapor Deposition Method for Differentiation of Bacteria Based on Lipidomic Profiles in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Antibiotics* **2023**, *12*, 874.
107. Naumann, D.; Keller, S.; Helm, D.; Schultz, C.; Schrader, B. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. *J. Mol. Struct.* **1995**, *347*, 399–405.
108. Cordovana, M.; Mauder, N.; Join-Lambert, O.; Gravey, F.; LeHello, S.; Auzou, M.; Pitti, M.; Zoppi, S.; Buhl, M.; Steinmann, J.; et al. Machine learning-based typing of *Salmonella enterica* O-serogroups by the Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy-based IR Biotyper system. *J. Microbiol. Methods* **2022**, *201*, 106564.
109. Hong, J.S.; Kim, D.; Jeong, S.H. Performance Evaluation of the IR Biotyper® System for Clinical Microbiology: Application for Detection of *Staphylococcus aureus* Sequence Type 8 Strains. *Antibiotics* **2022**, *11*, 909.
110. Hrabák, J.; Walková, R.; Studentová, V.; Chudácková, E.; Bergerová, T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3222–7.
111. Pachori, P.; Gothwal, R.; Gandhi, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* **2019**, *6*, 109–119.
112. Lambert, P.A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Proceedings of the Journal of the Royal Society of Medicine, Supplement*; Royal Society of Medicine Press, 2002; Vol. 95, pp. 22–26.
113. Potron, A.; Poirel, L.; Nordmann, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *45*, 568–585.
114. Miltgen, G.; Plésiat, P.; Mille, A.; Chatelain, P.; Fournier, D. Detection of carbapenemase activity in *Pseudomonas aeruginosa* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *J. Microbiol. Methods* **2018**, *145*, 66–68.

115. Braud, A.; Geoffroy, V.; Hoegy, F.; Mislin, G.L.A.; Schalk, I.J. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, 2, 419–425.
116. Olaitan, P.B.; Adeleke, O.E.; Ola, I.O. Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr. Health Sci.* **2007**, 7, 159–165.
117. Sinacori, M.; Francesca, N.; Alfonzo, A.; Cruciata, M.; Sannino, C.; Settanni, L.; Moschetti, G. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiol.* **2014**, 38, 284–294.
118. Molan, P.C. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2001, 2, 13–19.
119. Mahendran, S.; Kumarasamy, D. Antimicrobial Activity of some Honey Samples against Pathogenic Bacteria. *Int. Lett. Nat. Sci.* **2015**, 34, 15–20.
120. Iurlina, M.O.; Fritz, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, 105, 297–304.
121. Torres-González, A.; López-Rivera, P.; Duarte-Lisci, G.; López-Ramírez, Á.; Correa-Benítez, A.; Rivero-Cruz, J.F. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. *Nat. Prod. Res.* **2016**, 30, 237–240.
122. Madras-Majewska, B.; Rosiak, E.; Jaworska, D.; Kulesza, K.; Wasiak-Zys, G.; Teper, D. Comparison of selected quality characteristics of domestic and Thailand multifloral honeys. *Med. Weter.* **2016**, 72, 620–626.
123. Laredj, H.; Waffa, R. Microbiological and Physicochemical Characterization of Honeys from the Tiaret Region of Algeria. *Asian J. Pharm. Res. Heal. Care* **2017**, 9, 85.
124. Hathout, Y.; Demirev, P.A.; Ho, Y.P.; Bundy, J.L.; Ryzhov, V.; Sapp, L.; Stutler, J.; Jackman, J.; Fenselau, C. Identification of *Bacillus* spores by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 4313–4319.
125. Lasch, P.; Beyer, W.; Nattermann, H.; Stämmeler, M.; Siegbrecht, E.; Grunow, R.; Naumann, D. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 7229–7242.
126. Schulthess, B.; Brodner, K.; Bloemberg, G. V.; Zbinden, R.; Böttger, E.C.; Hombach, M. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, 51, 1834–1840.
127. Janiszewska, D.; Złoch, M.; Pomastowski, P.; Szultka-Młyńska, M. Implications of

- Sample Preparation Methods on the MALDI-TOF MS Identification of Spore-Forming *Bacillus* Species from Food Samples: A Closer Look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus mari*. *ACS Omega* **2023**, 8, 34982–34994.
128. Dümen, E.; Akkaya, H.; Öz, G.M.; Sezgin, F.H. Microbiological and parasitological quality of honey produced in Istanbul. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* **2013**, 37, 602–607.
129. Dichtl, K.; Klugherz, I.; Greimel, H.; Luxner, J.; Köberl, J.; Friedl, S.; Steinmetz, I.; Leitner, E. A head-to-head comparison of three MALDI-TOF mass spectrometry systems with 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **2023**, 61.
130. Sibińska, E.; Arendowski, A.; Fijałkowski, P.; Gabryś, D.; Pomastowski, P. Comparison of the Bruker Microflex LT and Zybion EXS2600 MALDI TOF MS systems for the identification of clinical microorganisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2024**, 108, 116150.
131. Rychert, J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *J. Infect.* **2019**, 2, 1–5.
132. MO348 v3 May 2015—SARAMIS knowledge database v. 4–13.
133. Chapin, K.C.; Musgnug, M.C. Evaluation of Sensititre Automated Reading and Incubation System for Automated Reading of Sensititre Broth Microdilution Susceptibility Plates. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, 42, 909–911.
134. Garcia-Garrote, F.; Cercenado, E.; Bouza, E. Evaluation of a New System, VITEK 2, for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, 38, 2108–2111.
135. Maślak, E.; Miśta, W.; Złoch, M.; Błońska, D.; Pomastowski, P.; Monedeiro, F.; Buszewski, B.; Mrochem-Kwarciak, J.; Bojarska, K.; Gabryś, D. A New Approach to Imaging and Rapid Microbiome Identification for Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Biomedicines* **2022**, 10, 1806.
136. Złoch, M.; Sibińska, E.; Monedeiro, F.; Miśta, W.; Arendowski, A.; Fijałkowski, P.; Pietrowska, M.; Mrochem-Kwarciak, J.; Jędrzejewska, A.; Telka, E.; et al. Urine microbiome changes during and after radiotherapy for prostate cancer. *bioRxiv* **2024**, 2024.04.15.589478.
137. Arendowski, A.; Sibińska, E.; Miśta, W.; Fijałkowski, P.; Złoch, M.; Gabryś, D.; Pomastowski, P. Study of sample preparation influence on bacterial lipids profile in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Lipids* **2024**, 59, 13–26.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Przedsięwzięcia naukowo-badawcze, które realizowałem przed i po uzyskaniu stopnia doktora, w instytucjach naukowych w kraju i za granicą, składają się na moje drugie osiągnięcie naukowe.

5.1 Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Działalność naukową rozpocząłem na II roku studiów stacjonarnych II stopnia (magisterium) na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pierwsza praca badawcza, którą podjąłem, dotyczyła analizy egzopolisacharydów (EPS) i liposacharydów (LPS) wytwarzanych przez mikrosymbionty brodawkowe *Robinia pseudoacacia* L.. Pracę zrealizowałem w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska pod ścisłym nadzorem prof. dr hab. Hanny Dahm (promotor pracy magisterskiej). Przed rozpoczęciem badań we wrześniu 2010 roku odbyłem miesięczny staż naukowy w Innowacyjno – Wdrożeniowym Laboratorium Biotechnologii i Ochrony Środowiska Pomorskiego Parku Naukowo – Technologicznego w Gdyni, który dotyczył poznania zasad diagnostyki molekularnej opartej o analizę DNA przy użyciu techniki PCR (Załącznik nr 4, pkt II.6B). Podczas stażu nabyłem wiedzę oraz praktyczne umiejętności z zakresu izolacji DNA i RNA oraz ich analizy techniką PCR, w tym metodą AS-PCR, PCR-RFLP oraz nested-PCR. Nabyte umiejętności wykorzystałem podczas realizacji pracy magisterskiej, gdzie jednym z założonych zadań badawczych była izolacja i detekcja obecności plazmidów.

Po obronie pracy magisterskiej w czerwcu 2011 roku dalej kontynuowałem prace badawcze w obszarze mikrobiologii środowiskowej w ramach podjętych studiów doktoranckich - Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie Matematyczno-Przyrodnicze (ISDM-P) na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu (lata 2011-2016). Prace badawcze realizowałem w Zakładzie Mikrobiologii (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) oraz w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitik (Wydział Chemii) pod ścisłym nadzorem dr hab. Katarzyny Hryniewicz oraz dr hab. Tomasza Kowalkowskiego (promotorzy pracy doktorskiej). Tematyka podjętych badań dotyczyła zbadania wybranych mechanizmów mogących podwyższać wydajność procesu mikrobiologicznie wspomaganą fitoremediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Prace obejmowały zarówno charakterystykę mikrobiologiczną terenów metalonośnych, jak i izolację puli szczepów metalotolerancyjnych z oceną ich wpływu na wydajność procesu oczyszczania gleb z metali ciężkich. W realizowanych badaniach naukowych wykorzystywałem zarówno techniki wykorzystywane w laboratoriach mikrobiologicznych - m.in. posiewy na podłożach stałych i płynnych, analizy aktywności metabolicznej na podstawie profili wykorzystywanych źródeł węgla, identyfikacja molekularna na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA, doświadczenia *in vitro* na kulturach tkankowych roślin, doświadczenia donicowe, wyznaczanie liczebności mikroorganizmów

metodą liczenia jednostek tworzących kolonie – jtk, jak i te wchodzące w zakres chemii analitycznej – m.in. wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), spektrometria mas, atomowa spektrometria absorpcyjna (AAS), skaningowo-transmisyjna mikroskopia elektronowa ze spektroskopią dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (STEM-EDX). Realizowane prace badawcze były finansowane przez grant naukowy otrzymany przeze mnie w konkursie Preludium 4 z Narodowego Centrum Nauki (2012/07/N/NZ9/01608) noszący tytuł „*Molekularne i biochemiczne mechanizmy towarzyszące mikrobiologicznie wspomaganej fitoekstrakcji metali ciężkich*” oraz Grant indywidualny Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pt. „*Jakościowa i ilościowa analiza sideroforów syntetyzowanych przez grzyby w warunkach ekspozycji na wysokie stężenia metali ciężkich*”, których byłem kierownikiem (Załącznik nr 4, pkt II.5B). Realizacja projektu Preludium 4 zaowocowała 6 publikacjami, z czego w 5 byłem współautorem (Załącznik nr 4, pkt II.2A pozycja 34, pkt II.2B pozycje 1,4,5,7).

W trakcie trwania studiów doktoranckich wziąłem udział w wieloosrodkowych badaniach naukowych: (1) we współpracy z dr Christel Baum z Wydziału Nauk Rolniczych i Środowiskowych Uniwersytetu w Rostoku (Niemcy) przeprowadziłem badanie dotyczące analizy stopnia bioakumulacji i wewnątrzkomórkowej dystrybucji jonów kadmu u bakterii wyizolowanych z ryzosfery, ektomikoryzy i owocników grzybów ektomikoryzowych oraz brałem udział w analizie profili metabolicznych mikroorganizmów towarzyszących halofilnej roślinie Soliród zielny (Załącznik nr 4, pkt II.2B. pozycje 5, 6) oraz (2) brałem udział w badaniu potencjału metabolicznego oraz bioróżnorodności populacji bakterii endofitycznych i ryzosferowych rośliny halofilnej Aster polny we współpracy z prof. Zofią Piotrowską-Seget i dr Tomasza Płociniczaka z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach oraz z dr Silke Ruppel z Instytut Uprawy Warzyw i Roślin Ozdobnych w Grossbeeren (Niemcy) (Załącznik nr 4, pkt II.2B. pozycja 2).

W dniu 7 października 2016 roku obroniłem z wyróżnieniem rozprawę doktorską pt: „Wybrane aspekty mikrobiologicznie wspomaganej fitoremediacji metali ciężkich” uzyskując stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany w dniu 14 października 2016 roku uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK.

5.2 Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora dalszy rozwój kariery naukowej związałem z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (dołączenie do zespołu Katedry Chemii Środowiska i Bioanalityki od listopada 2016 do końca września 2023 roku), a z październikiem 2018 roku również z Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Podjęta współpraca miała różny charakter od pracy na umowy zlecenie/dzieło jako wykonawca grantów naukowych (Załącznik nr 4, pkt. II.5A.) po pracę w ramach umowy o pracę (patrz pkt. 3).

W rozpoczętych przeze mnie badaniach naukowych skupiłem się przede wszystkim na rozwoju różnych technik chemii analitycznej do celów pogłębionej charakterystyki

mikroorganizmów pochodzących z różnych matryc biologicznych, co zapoczątkowałem już w trakcie studiów doktoranckich, podczas których miałem możliwość realizacji badań na dwóch wydziałach (oprócz Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska również na Wydziale Chemii). W pracy badawczej zajmuję się takimi aspektami naukowymi jak: (a) rozwijanie i opracowywanie metod szybkiej detekcji i identyfikacji mikroorganizmów w materiale klinicznym i środowiskowym z wykorzystaniem różnych narzędzi chemii analitycznej (desorpcji/ionizacji laserem wspomaganą matrycą (MALDI)/nanostrukturami (NALDI) sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu – MALDI/NALDI-TOF/MS, spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni – FT-IR, elektroforezy kapilarnej, CE) oraz technik biologii molekularnej (łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR oraz sekwencjonowanie DNA) jako metody odniesienia; (b) opracowywanie metod poszerzonej charakterystyki i rozróżniania blisko spokrewnionych szczepów mikroorganizmów w podejściu proteomicznym i lipidomicznym; (c) rozwijanie technik szybkiej detekcji antybiotykooporności u bakteryjnych patogenów klinicznych w oparciu o technikę MALDI/NALDI-TOF MS.

W trakcie realizacji podjętych przeze mnie badań odbyłem **3 staże naukowe w zagranicznych ośrodkach naukowych** (Załącznik nr 4, pkt.II.6A):

(1) w **Bioanalytical Development & Clinical Mass Spectrometry Department (Dział Badań i Rozwoju Technik Bioanalitycznych i Klinicznej Spektrometrii Mas) firmy Bruker Daltonik GmbH w Bremie (Niemcy)**, gdzie pod opieką **dr Markusa Kostrzewy** oraz współpracy z **dr Katrin Sparbier** oraz **dr Markus Peer** prowadziłem badania mające na celu opanowanie przeze mnie: techniki przygotowywania widm profili białkowych bakterii w referencyjnej bazie danych platformy do identyfikacji mikroorganizmów MALDI Biotyper; różnych metod identyfikacji grzybów i bakterii za pomocą techniki MALDI TOF MS; analizy bakterii metodą transmisyjnej spektrometrii w podczerwieni przy użyciu platformy IR Biotyper; wykrywania aktywności cefalosporynaz i karbapenemaz przy użyciu modułu MBT STAR-BL; wykorzystania oprogramowania ClinProTools do poszukiwania biomarkerów rozróżniających różne szczepy mikroorganizmów. Co ważne, pobyt na stażu umożliwił mi przeprowadzenie badania wpływu różnych zawiesin komórkowych i czasów inkubacji oraz dodatku inhibitorów enzymów na wyniki wykrywania aktywności karbapenemaz za pomocą modułu MBT STAR-BL u różnych szczepów *Enterobacterales* i *Pseudomonas aeruginosa* syntetyzujących odmienne klasy karbapenemaz, co opisałem w pracy **H4**. Staż był sfinansowany przez grant naukowy Sonatina 2 (Załącznik nr 4, pkt. II.5A, pozycja 6), którego byłem Kierownikiem, a podjęta współpraca jest kontynuowana, co zaowocowało włączeniem mnie do badań nad szybkimi testami na lekowrażliwość w oparciu o technikę MALDI-TOF MS („MBT FAST”), a także wspólnym wystąpieniem na największej na świecie konferencji naukowej poświęconej zagadnieniom mikrobiologii klinicznej (Załącznik nr 4, pkt.II.3A. pozycja 6 w Poster/E-poster) w związku z podjętymi wspólnymi badaniami nad poszerzeniem użyteczności testu MBT STAR-Carba w badaniu antybiotykooporności. (5-7.2019).

(2) w **Laboratorium Mikrobiologicznym Zespołonego Szpitala Uniwersyteckiego w A Coruña (The University Hospital Complex of A Coruña – CHUAC, Hiszpania)**, gdzie pod opieką **dr Mariny Oviano Garcia** odbyłem przeszkolenie z: (a) pracy jednostek

szpitalnych zajmujących się zwalczaniem drobnoustrojów wielolekoopornych i kontroli epidemiologicznej (m.in. poznanie głównych metod wykrywania mechanizmów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, poznanie kryteriów interpretacji antybiogramów); (b) zastosowania technik proteomicznych w praktyce klinicznej (m.in. bezpośrednia identyfikacja z posiewu krwi); (c) epidemiologii molekularnej (poznanie teoretycznych i praktycznych podstaw masowego sekwencjonowania NGS (ang. *Next Generation Sequencing*)). (9/2022).

(3) w **Zakładzie Mikrobiologii i Parazytologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Nawarry w Pampelunie**, gdzie pod opieką **dr Guillermo Martínez de Tejada de Garaizábal** podjąłem badania mające na celu udoskonalenie mojego warsztatu w zakresie przygotowania i analizy biofilmów bakteryjnych do badania wpływu różnych rodzajów substancji bakteriobójczych, takich jak peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *Antimicrobial Peptides*, AMP), antybiotyki i ich kombinacje oraz oceny możliwości ich wykorzystania w przygotowywaniu funkcjonalizowanych powłok tytanowych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Nawiązana podczas pobytu współpraca zaowocował złożeniem wniosku pt. „*Właściwości przeciwdrobnoustrojowe kompleksów laktoferyny bydlęcej z metalami przejściowymi (me-bLTF)- skuteczna broń przeciw bakteryjnym biofilmom?*” (nr BPN/BEK/2024/1/00055) w **Programie Bekker NAWA 2024** celem prowadzenia dalszych wspólnych badań. (6/2023).

Odbyte staże naukowe pozwoliły mi na znaczne poszerzenie mojej teoretycznej i praktycznej wiedzy z zakresu problematyki szeroko pojmowanej diagnostyki mikrobiologicznej zarówno w kontekście wykorzystywanych metod, technik oraz aparatury naukowo-badawczej, badanych rodzajów materiału (charakteru matrycy biologicznej), jak i samych mikroorganizmów. Podjęte przeze mnie współprace są dalej kontynuowane, co daje możliwość dalszego rozwoju opracowywanych przeze mnie protokołów badawczych, ich walidacji na drodze badań między laboratoryjnych oraz aplikowania o międzynarodowe granty badawcze.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Działalność dydaktyczna

Prowadzenie lub współprowadzenie zajęć dydaktycznych rozpocząłem od roku akademickiego 2011/2012 z chwilą rozpoczęcia studiów doktoranckich. W okresie trwania studiów III stopnia poprowadziłem samodzielnie (S) lub w formie współprowadzenia (W) zajęcia laboratoryjne z przedmiotów: **Mikrobiologia (S/W)**, **Mikrobiologia ogólna (W)**, **Czynniki patogenności bakterii klinicznych (S)**, **Ekologiczna, rodzajowa i funkcjonalna różnorodność mikroorganizmów ryzosferowych (S)** oraz **Molekularne podstawy symbiozy i aplikacyjny charakter mikrosymbiontów roślin (W)**.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moje zatrudnienie miało w większości charakter badawczy, niemniej jednak, część mojej aktywności naukowej dotyczyła również działalności dydaktycznej, wśród której należy wymienić:

- Przygotowywanie **pracowni do zajęć laboratoryjnych** prowadzonych na Wydziale Chemii UMK w Toruniu w ramach zatrudnienia na stanowisku specjalisty inżynierijno-technicznego (1/2 etatu) w okresie 10.2021-9.2023 – przedmioty: **Mikrobiologia ogólna, Fizykochemiczne metody rozdzielania, Podstawy chemii procesów biologicznych i bioanalityka, Chemia środowiska i ekologia, Environmental Chemistry and ecology**;
- Współautorstwo **skryptu do ćwiczeń laboratoryjnych z fizykochemicznych metod rozdzielania w medycynie i farmacji** pod redakcją Magdaleny Ligor oraz Bogusława Buszewskiego (Załącznik nr 4, pkt. II.1, pozycja 8);
- Współautorstwo **rozdziału „Nowoczesne metody identyfikacji mikroorganizmów” w opracowaniu zbiorowym „Bioanalityka w nauce i życiu. 2: Nowe strategie analityczne i rozwiązania aparaturowe”** Wydawnictwa PWN pod redakcją Ireny Baranowskiej i Bogusława Buszewskiego skierowanej do szerokiego grona odbiorców społeczności akademickiej, w tym studentów, pracowników naukowych i pracowników laboratoriów badawczych (Załącznik nr 4, pkt. II.1, pozycja 6) – wspomniana pozycja została wydana również w wersji anglojęzycznej przez **wydawnictwo Springer** (Załącznik nr 4, pkt. II.1, pozycja 2);
- W okresie od 01.07.2019 do 30.09.2019 pełniłem rolę **opiekuna stażu** Pani Eweliny Maślak realizowanego w ramach programu *AS KIER UMK - Staż zawodowy jako dostosowanie Studentów i absolwentów Wydziału Chemii UMK do wymogów rynku pracy zgodnie z kierunkiem studiów*;
- W dniu 23.12.2020 r. zostałem powołany przez Radę Dyscypliny Wydziału Chemii UMK w Toruniu na **promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej** Pani mgr Eweliny Sibińskiej (z domu Maślak) w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Academia Scientiarum Thoruniensis. Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Istotność rozwoju metod spektrometrycznych w procesie identyfikacji mikroorganizmów”*.

6.2 Działalność organizacyjna oraz popularyzująca naukę i sztukę.

Wśród prowadzonej przeze mnie działalności organizacyjnej na rzecz Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu należy wymienić:

Przed uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- organizacja 18th International Symposium on Advanced in Extraction Technologies and 22nd International Symposium on Separation Science, Toruń (2016), (członek komitetu organizacyjnego);
- organizacja 29. Międzynarodowego Sympozjum nt. Chromatograficznego oraz 18 Międzynarodowego Sympozjum nt. Technik Rozdzielania "Chromatography &

Separation Science. Past, today, future.”, Toruń (2012), (członek komitetu organizacyjnego);

- organizacja Kopernikańskiego Sympozjum Studentów Nauk Przyrodniczych, Toruń (2011), (członek komitetu organizacyjnego);

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- organizacja konferencji naukowej w ramach 65. Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Toruń (2023), (członek komitetu organizacyjnego);
- organizacja 5. Konferencji Naukowej „Metabolomics Circle”, Przysiek k. Torunia (2018), (członek komitetu organizacyjnego).

Prowadzona przeze mnie działalność popularyzatorska nauki obejmuje:

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

- Prowadzenie zajęć w ramach Uniwersytetu Dziecięcego pt. „*Mikroorganizmy wokół nas*”, Toruń (2013);
- Przeprowadzenie warsztatów „*Wszystko co powinieneś wiedzieć o drożdżach. Czym żywią się grzyby, dlaczego ciasto rośnie*” w ramach Nocy Biologów zorganizowanej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu, (2013);
- Autorstwo i przeprowadzenie warsztatów z dziedziny mikrobiologii pt. „*Nieśmiertelnik z DNA*” w ramach XIII Festiwalu Nauki i Sztuki Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, (2013).
- Upowszechnianie rezultatów prac badawczych własnych i zespołu obejmujące m.in. prezentacje plakatów i komunikaty ustne na konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych (szczegóły w Załączniku nr 4, pkt II.3B).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- Wygłoszenie wykładu pt. „*Wszystkie nasze -omy, czyli 7-mio milowe kroki diagnostyki*” podczas II edycji sympozjum „*Mikrobiota a nowotwory*” (20.05.2024 r.) w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach na zaproszenie Górnośląskiej Fundacji Onkologicznej;
- Zorganizowanie warsztatów pt. „*Technika MALDI w rutynowej diagnostyce klinicznej - warsztaty z identyfikacji patogenów klinicznych i detekcji antybiotykoodporności*” w ramach działalności Uniwersyteckiego Centrum Doskonałości „*W kierunku medycyny spersonalizowanej*” skierowanej do społeczności akademickiej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii UMK, Toruń, 18-20.03.2024 r.). W ramach warsztatów wygłosiłem dwa wykłady: (1)

„Nowoczesna metoda kulturomiczna do analizy mikrobiomu” oraz (2) „Test MBT STAR BL do szybkiej detekcji oporności na antybiotyki betalaktamowe”;

- Wygłoszenie wykładu pt. „*Application of novel mass spectrometry techniques for microbial diagnostic purposes*” dla studentów i pracowników Szpitala Uniwersyteckiego Uniwersytetu Nawarry w Pampelunie (Hiszpania) (29.06.2023 r.);
- Przygotowanie 2 publikacji popularno-naukowych w kwartalniku „Analityka”, poświęconym ludziom i problemom pracy laboratoryjnej: (1) Błońska i in. 2021. *Metody oznaczania antybiotykooporności u bakterii* oraz (2) Maślak i in. 2020. *Analityka w diagnozowaniu zakażeń trudno gojących się ran a zespół stopy cukrzycowej* (szczegóły w Załączniku nr 4, pkt. II.1, pozycje 5 i 7)
- Upowszechnianie rezultatów prac badawczych własnych i zespołu obejmujące m.in. prezentacje plakatów i komunikaty ustne na konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych (szczegóły w Załączniku nr 4, pkt II.3A).

7. Pozostałe informacje.

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

- Przyznanie przez Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu grantu indywidualnego pt. „*Jakościowa i ilościowa analiza sideroforów syntetyzowanych przez grzyby w warunkach ekspozycji na wysokie stężenia metali ciężkich*”, 2015.
- Przyznanie przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) grantu na realizację projektu badawczego (Preludium 4) nr 2012/07/N/NZ9/01608 pt. „*Molekularne i biochemiczne mechanizmy towarzyszące mikrobiologicznie wspomaganej fitoekstrakcji metali ciężkich*”, 2013-2015.
- Przyznanie zwiększenia stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych za osiągnięcia w roku akademickim 2011/2012;
- Przyznanie zwiększenia stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych za osiągnięcia w roku akademickim 2012/2013;
- Przyznanie zwiększenia stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych za osiągnięcia w roku akademickim 2014/2015;

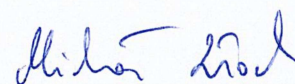
Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- Przyznanie przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) grantu na realizację projektu badawczego (Sonatina 2) nr 2018/28/C/ST4/00434 pt. „*Wykorzystanie techniki MALDI-TOF/MS w monitorowaniu i szybkiej diagnostyce rozwoju zakażenia stopy cukrzycowej*”, 2018-2022;
- Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu – za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2021 roku;
- Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu II Stopnia – za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2020 roku;

- Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu – za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2020 roku;
- Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu II Stopnia - za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2018 roku;
- Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu – za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2017 roku;
- Stypendium Rektora UMK za wysoko punktowaną publikację naukową: 1 (2024), 3 (2022), 1 (2021), 1 (2020);
- Nagroda za najlepszy komunikat ustny wygłoszony podczas 8th International Conference „Quality and safety in food production chain”, Wrocław (2018).

Począwszy od rozpoczęcia studiów doktoranckich w celu podnoszenia swoich umiejętności naukowo-badawczej oraz poszerzania wiedzy do celów realizacji podejmowanych badań naukowych uczestniczyłem w szeregu warsztatach i szkoleniach:

- Szkolenie „qPCR Gene Expression application training” zorganizowane przez ThermoFisher Scientific, Toruń (2023);
- Szkolenie “IDplus Confidence Application training” zorganizowane przez Shimadzu Center for Application and Training, Warszawa (2020);
- Udział w „Warsztaty z wykorzystania metod chemometrycznych w praktyce (kurs podstawowy)” zorganizowany w ramach VI Konferencji Chemometrii i Metrologii w Analityce, Poznań (2017)
- Szkolenie z zakresu prawidłowej obsługi, zasad eksploatacji oraz konserwacji urządzenia BioSpectrum firmy UVP Ltd. przeprowadzonego przez firmę Meranco Aparatura Kontrolno-Pomiarowa i Laboratoryjna Sp. z o.o., Toruń (2013);
- Szkolenie z obsługi StepOnePlus™ Real-Time PCR System przeprowadzone przez LifeTechnologies™, Toruń (2013);
- Warsztaty z zakresu Flow Field Flow Fractionation (FFFF) for the Separation of Macromolecules & Particles przeprowadzone przez Wyatt Technology Europe GmbH, Toruń (2012);
- Szkolenie z Real-Time PCR - Analiza ekspresji genów i Real-Time PCR - Diagnostyka mikrobiologiczna organizowane przez BLIRT S.A. w Gdańskim Parku Naukowo-Technologicznym, Gdańsk (2012);
- Kurs językowy English for Academic Purpose I, Etap I Read out Listen/Understand and Write na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu (2013);
- Kurs językowy English for Academic Purposes II, Etap II. Write Present and Engage in Discussion na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu (2013).



(podpis wnioskodawcy)