

Posudek oponenta na disertační práci

Ing. Pavel Křepelka:

Návrh optovláknového biosenzoru se spektrální analýzou v blízké infračervené oblasti

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2019. Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Mikulka, Ph.D.

Práce má (v PDF verzi) celkem 157 stran, sepsána v českém jazyce, je členěna na výchozí formální části a seznamy (14 stran, 6 stran seznamu 92 obrázků už působí spíše rušivě), vlastní text (114 stran) a zbytek jsou přílohy. Námět práce odpovídá oboru disertace a je velmi aktuální vzhledem k situaci v oblasti detekce patogenních mikroorganismů.

Zaměření na detekci či spíše identifikaci bakterií pomocí NIR spektroskopie je originálním přístupem, který může doplnit standardní techniky kultivační, instrumentální (MS) i bioanalytické (ELISA, PCR, imunosensory).

Komentáře k jednotlivým částem práce, kap. 2.1:

Příprava vzorku je klíčová pro úspěch - obsah vody, která interferuje, může být významně ovlivněn. Praktickou komplikací je potřeba relativně vysokých koncentrací bakterií. Významnou úlohu ovlivňující konečný výsledek hrají také různé metodiky předzpracování naměřených spekter (derivace, normalizace) před finální chemometrickou klasifikací (vesměs PCA).

Měření zde byla prováděna na čistých kulturách, v realitě budou smíšené populace. I vlastnosti monokultur mohou být silně ovlivněny substrátem, na kterém proběhla kultivace, růstovou fází bakterií, přípravou vzorku. Toto v práci není příliš řešeno či zmíněno.

Tabulka 9 - co je zde vlastně výstupem analýzy, pouze kvalitativní informace (ano - ne), nebo lze uváděné kontaminace nějak kvantifikovat (třeba dle počtu mikrobů na jednotku množství vzorku potraviny)? Jsou definovány praktické limity pro uváděné kontaminace?

Tabulka 10 bude velmi užitečná pro další rozvoj techniky.

K části 2.2 - soustředí se na typické optovláknové biosensory a uvádí několik příkladů pro ilustraci. Co se týká pojmu "immunoassay", tak česky je to prostě imunostanovení. Vzhledem k rozsáhlosti tohoto oboru by bylo vhodné pro čtenáře uvést nějaké přehledné články.

Obr. 9 [26] není relevantní k zaměření práce.

V práci se často uvádí nejnižší detekované hmotnosti analytů, to je ale irelevantní, pokud není znám a uveden objem vzorku. Limit detekce se vždy musí uvádět v koncentračních jednotkách.

Co znamená v Tabulce 11 pojem "objemový analyt"?

V kapitole 3.1 je rozebírán teoretický základ NIR spektroskopie z hlediska využití v biosensorech. Logicky měl tento úsek předcházet části 2.1 - napřed probrat teorii, pak rozebírat aplikace.

Kapitola 3.2, bakterie reprezentuje prokaryotické buňky. Lipidy nemají polymerní charakter.

Dále jsou pak uvedeny vztahy pro totální odraz světla (3.3) potřebné pro navazující (3.4) modelování plánovaného sensoru na bázi evanescentního multimodového světlovodu. Nejsem specialista na optiku, takže uváděné vztahy jsem příliš detailně nezkoumal, nicméně oceňuji uváděné grafy, které jasně ilustrují diskutované aspekty.

Obr. 25, jaká byla délka vlákna pro uváděné počty odrazů? Následuje návrat ke kavitním technikám (3.5) a užitečné shrnutí (3.6) - jako obvykle se poněkud povrchně a trochu účelově kritizují alternativní techniky. Ty již ale jsou ve stadiu značné komerční úspěšnosti... Nakonec jsou nastíněny cíle práce (4).

Experimentální část pokrývají kapitoly 5 až 7. Na str. 62 jsou uváděny testované bakterie, přitom není nic řečeno o jejich koncentracích, zdroji kultur a způsobu kultivace, uchovávání a přípravě vzorku před měřením. Totéž na str. 67, kde jsou navíc použity jiné bakteriální kultury; zde byly analyzovány vysušené vzorky. Obr. 37, není uvedeno, čemu odpovídají spektra znázorněná různými barvami. Použité přístupy ke klasifikaci vzorku poskytovaly nadějně výsledky podporující perspektivnost NIR spekter pro analýzu bakterií.

Další část zase řeší různé matematické přístupy k předzpracování NIR spekter. Za pozornost v této části stojí uvedená minimální použitá koncentrace bakterií 10^8 CFU/ml, která je výrazně nad hladinou v reálných vzorcích. Na pohled (obr. 38) spektra pro tři různé bakterie vypadají zcela podobně, nicméně PCA a PLS-DA techniky dokázaly rozlišit specifické rozdíly bakterií. Další nástroj poskytuje dekonvoluce spekter na jednotlivé spektrální pásy.

Opět jiný soubor bakterií byl použit pro studium NIR-MIR korelačních závislostí. V popisu přípravy vzorky mne zaujalo dlouhodobé zahřívání vzorku na $50\text{ }^\circ\text{C}$ (str. 86). Tím velmi pravděpodobně dojde k denaturaci bílkovin, a ztratí se tedy jejich různorodost daná sekvencemi a 3D strukturami, přirozeně odlišnými pro různé druhy bakterií; denaturované proteiny jsou ve stavu náhodného klubka, tedy více méně shodné.

Kapitola 6 poznatky transformuje do návrhu koncepce biosensoru s evanescentním snímáním a kavitním zesílením. Řeší se zde vlastnosti reálně existujících komponent a materiálů vzhledem ke zjištěným spektrálním vlastnostem bakterií, konstrukce odrazivých ploch na koncích světlovodu, způsob zavedení světla aj. Nejnázornější je schéma na str. 112.

Závěr práce shrnuje dosažené výsledky, jsou uvedeny existující limitace techniky a naznačeny možnosti řešení

Celkově v práci převažuje metodika založená na výpočtech a simulacích vycházejících z reálně očekávaných dílčích parametrů předpokládaného systému. Schází mi větší důraz na experimentální ověření, často jedno měření vydá za mnoho modelů a simulací, protože odhalí neočekávané či podceňované problémy. Data z modelovaného biosensoru toto nemohou nahradit.

Dovolím si ještě formální komentář; v práci se stále píše o biosensorech, ale vyvíjený systém je pouze chemickým senzorem. Schází zde totiž biorekogniční složka, která umožňuje svou specifitou a selektivitou analyzovat komplexní vzorky. Autor si je dobře vědom, že toto jeho uspořádání nyní nedokáže, a nejsem si jist, zda se to podaří v budoucnu zajistit.

V práci schází přehled publikační činnosti autora, něco lze dohledat v seznamu použité literatury. Naštěstí se seznam nachází v příložených tezích disertace. Je zde jedna práce ve standardním mezinárodním odborném časopise s impakt faktorem:

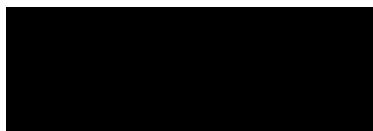
Křepelka, Pavel; Hynstova, Iveta; Pytel, Roman; et al. Curve fitting in Fourier transform near infrared spectroscopy used for the analysis of bacterial cells. JOURNAL OF NEAR INFRARED SPECTROSCOPY 25/3, 151-164, 2017 (dle WoS; v tezích je špatné pořadí autorů)

Ostatní položky, i když se objevují ve WoS, jsou méně významné výstupy z konferenčních prezentací.

Po formální stránce je práce standardní, snad, i techničtí odborníci by měli zvládat pravopis a vyvarovat se hrubých chyb.

Závěrem lze konstatovat, že Mgr. Pavel Křepelka prokázal vysokou vědeckou erudici ve zvoleném oboru výzkum, schopnost samostatné vědecké práce, a sepsaná disertační práce odpovídá obecně uznávaným požadavkům a doporučuji její přijetí k obhajobě.

V Brně 28.11. 2019



Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Ředitel Ústavu biochemie, Vedoucí VS Nanobiotechnologie CEITEC MU

Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

Kamenice 5, 625 00 Brno

Tel. 54949 7010, E-mail skladal@chemi.muni.cz