

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Ing. Jiří Janata, CSc.
	Datum: 13.9.2010
Autor: Tereza Hucková	
Název práce: Genetická charakterizace tetracyklinové rezistence u vybraných půdních izolátů bakterií	
Cíle práce Cílem práce byla identifikace determinant rezistence k tetracyklinu u vybraných půdních izolátů grampozitivních (<i>Staphylococcus</i> sp. a <i>Arthrobacter</i> sp.) i gramnegativních bakterií (<i>Chryseobacterium</i> a <i>Stenotrophomonas</i>). Izoláty byly získány z nehojené i hnojené půdy, která je považována za kontaminovanou tetracykliny.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 137 stran včetně obsahu a odkazů Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použila autorka v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 27, dle členění podkapitol v části metody Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, avšak zbytečně podrobně (jsou to doslovné návody, manuály)	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? NE je důsledkem nesmírně ambiciózního cíle práce, to odpovídá spíše náročnému zadání disertační práce	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Formální úroveň práce je velmi vysoká, text je psán srozumitelným jazykem, obsahuje	

minimum překlepů a chyb. Výjimečně lze vytknout nejednotnost progresivní a konzervativní terminologie (str. 17: konzervativní „difusního koeficientu“ a o řádek výše hybridní termín „rychlost difuze“, celkově je psána práce progresivním stylem, tedy v tomto případě by bylo nejvhodnější psát difúze, difúzní, rozhodně ne hybridně). Grafické zpracování je kvalitní, obrázky jsou hezké i účelné, legendy k nim jsou většinou dostatečné. Jde o pečlivě sepsanou práci.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení: Cíle práce jsou velmi ambiciózní, spíše než diplomové práci odpovídají práci disertační. Je to pokus vyřešit najednou příliš mnoho úkolů:

1. Porovnání rezistenčního profilu půdních izolátů z různých typů půd, nehnojené a hnojené, která je považována za kontaminovanou tetracykliny. Vzhledem k tomu, že v práci jsou studovány pouze dva izoláty z hnojené půdy, není toto fakticky možné porovnat a posoudit
2. Porovnání rezistenčního profilu u grampozitivních a gramnegativních izolátů. Vzhledem ke zcela odlišnému předpokládanému profilu rezistenčních determinant jde o dva dosti odlišné okruhy, velmi těžko řešitelné najednou.
3. Pokus o identifikaci tetracyklinových determinant u 12 izolátů čtyř různých druhů (příp. rodů), testován byl soubor 23 (!) potenciálních determinant.

Zde bylo dle očekávání dosaženo cíle u zástupce rodu *Staphylococcus*, kde bylo možné očekávat nalezenou determinantu z literárních zdrojů. U druhého zástupce grampozitivních bakterií z rodu *Arthrobacter* se determinantu nepodařilo identifikovat. Tvrzení na str. 91, že PCR fragment (210 bp) velikostně „zhruba“ odpovídal očekávání (171 bp), nemohu považovat za pozitivní výsledek. Tomu odpovídá i selhání následné sekvenace.

Hledání determinanty udílející rezistenci k tetracyklinu u málo prostudovaných gramnegativních druhů je hledáním pověstné jehly v kupce sena (vzhledem k šíři testovaných genů spíše o hledání deseti jehel v tisíci kupkách...). Přesto se podařilo dojít k zajímavé detekci genu pro symportérovou doménu hybridního proteinu, přítomného ve všech testovaných gramnegativních izolátech rodů *Chryseobacterium* i *Stenotrophomonas*. Sympatická je snaha diplomantky prokázat různými metodami HGT této determinanty i souvislost s rezistencí k tetracyklinu.

Sympatická a ocenění hodná je i snaha hledat alternativní přístupy ke hledání rezistenčních determinant např. cestou knihoven. V závěru dochází i na typizaci izolátů stejných druhů. Myslím, že to mohl být naopak jeden z prvních prvních kroků k vyloučení identických klonů a snížení počtu pokusů.

Celkové hodnocení: Přestože je možná samotná diplomantka rozpačitá z míry úspěšnosti splnění jednotlivých cílů, chtěl bych ji povzbudit, že výsledky nepovažují objektivně za neúspěch. Její program byl velmi ambiciózní. Rozhodně však studentka měla příležitost osvojit si široké spektrum metod a nejednoznačné výsledky jsou i větší výzvou pro zvládnutí jejich diskuze. Oboje studentka zvládla velmi dobře, což vidím jako nejpodstatnější.

Otázky a připomínky oponenta:

1. K výběru izolátů. Tato otázka možná není správně směřována na Vás ani na Vaše pracoviště: Víte zcela určitě, že izoláty z hnojené půdy byly opravdu vystaveny selekčnímu tlaku kontaminace tetracykliny? Velkochovy obvykle nejsou ochotny sdělit informace o aplikaci antibiotik v chovech a z analýz chlévské mrvy na přítomnost tetracyklinu vím, že ne vždy je lze analyticky prokázat ani v koncentrovaném vzorku, ty se velmi liší dle chovů.
2. Jaký je Váš současný názor na míru duplicity vzorků, tedy na klonální identitu více izolátů téhož druhu (např. ST2 a ST3)?
3. Proč jste se ve svém screeningu zaměřili výlučně na geny pro transportní proteiny, v úvodu uvádíte i jiné mechanismy rezistence k tetracyklinům? Proč jste nejprve nezkusili

experimentálně prokázat, o jaký mechanismus rezistence v jednotlivých případech jde (eflux, inaktivace antibiotika, modifikace cílového místa)?

4. Str. 86: Jediné dvě literárně popsané determinanty u rodu *Stenotrophomonas* tet(35) a tet(39) nebyly testovány. Proč ne? Jednoznačně přitom nebyla u žádného izolátu tohoto rodu prokázána jakákoliv z testovaných determinant.

5. Uvažujete, že nalezený hybridní protein je zodpovědný za rezistenci k tetracyklinu. Byl nalezen mj. u izolátů CHR1, 4, 5 a 6. Jak potom vysvětlíte různé hodnoty rezistence u nich zjištěné E-testem (str.76)?

Připomínka: Práce je nadměru dlouhá. Žádná diplomová práce nemusí mít víc než osmdesát stran. Psát stručněji je samozřejmě náročnější. Zejména kapitola Materiál a metody připomíná kuchařku, jsou to manuály dostupné v každé laboratoři elektronicky. Metody v publikaci se píšou stručně a s využitím citací.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: