

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:  
RNDr. Jana Beranová, Ph.D.

Datum:  
11.9.2012

Autor:  
Bc. Volha Ramaniuk

Název práce:  
***Mycobacterium smegmatis* growth on agar plates and agar plates covered with cellophane – morphological and proteomic study**

### Cíle práce

*Podle toho jak jsou definovány v práci, byly cíle následující:*

- 1. porovnání morfologie kolonií *M. smegmatis* rostoucí na agaru a celofánu*
- 2. kultivace *M. smegmatis* na mediu se dvěma různými zdroji uhlíku (glukosa, glycerol)*
- 3. analýza a srovnání proteomu *M. smegmatis* rostoucí na pevné a tekuté půdě*

**Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?** ANO ~~NE~~

Rozsah práce (počet stran): 91 : Introduction 1 s., Literature review 22 s., Material and Methods 13 s., Results 31 s. ( fakticky ale méně, viz níže), Discussion 7 s., Summary 1s., References 6,5 s.

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO ~~NE~~

Je uveden seznam zkratk? ANO ~~NE~~

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ~~ANO~~ spíše NE - jen částečně , viz dále

Je napsán srozumitelně? ANO ~~NE~~

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO ~~NE~~

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ~~ANO~~ - spíše NE

*Je citováno 79 prací, nejméně čtvrtinu z toho tvoří přehledové články, ze kterých je v literárním přehledu hojně citováno. Jsem přesvědčena, že na zpracovávané téma - zejména na téma biofilmy - existuje celá řada původních prací.*

*Literární přehled je sice přehledný a poměrně čtivý, nicméně podle mého názoru je pojednán příliš široce a obecně a málo přímo souvisí se studovanou problematikou. Jsou rozpracována témata, která buď nejsou pro zaměření práce příliš relevantní, případně zcela chybí jejich uvedení do souvislostí s cíly práce (biofilmy, quorum sensing, tuberkulóza), není to posléze napraveno ani v závěrečné diskusi. Naopak témata, která by vzhledem k zaměření práce zasloužila být pojednána detailněji, jsou pojata velmi stručně (planktonický růst, metabolismu živin u mykobakterií a zejména pak studium jejich proteomu).*

*Zejména v kapitolách zabývajících se biofilmy je text velmi obecný, spíše charakteru základní učebnice; odpovídají tomu i citované zdroje (hodně je citováno z učebnice Brock Biology of Microorganisms, webových stránek, přehledových článků, méně z článků původních (a i v těchto případech se jedná spíše o informace obecného charakteru). Např. v kap 2.1.2 se vyskytují pouze dvě citace : zmíněná učebnice a časopis Vesmír; v kap. 2.4.3.2 (*M. bovis*) pouze učebnice.*

Vzhledem k tomu, že se tato BP zabývá studiem proteomu, postrádám jakoukoli zmínku o konkrétních proteinech, které hrají roli v tvorbě biofilmů, diferenciaci kolonií či jsou zásadní pro planktonický růst. Překvapilo mě také, že autorka v podstatě nezmiňuje předchozí výzkum domovské laboratoře na podobné téma (růst *M. smegmatis* na jiných substrátech) – pouze na s. 10 je o tom letmá zmínka, není však uvedena ani citace, výsledky už nejsou nikde později zmíněny ani srovnávány s výstupy této práce.

#### **Další připomínky:**

U citace monografie Brock *Biology of Microorganisms* (č. 43) není uvedeno vydání.

V seznamu chybí citace (Tortora, 2009).

Několikrát jsou citovány elektronické zdroje (webové stránky), v závěrečném seznamu nejsou uvedeny.

Citovat z internetové encyklopedie Wikipedia (2x v textu) nepovažuji za vhodné, stejně jako opakovaně se vyskytující citaci z časopisu *Vesmír* (Palková a Vachová, 2010), zejména v případě, kdy na příslušné téma pracovní tato skupina publikovala ve vysoce impaktovaných časopisech.

V abecedním seznamu literatury jsou práce autorů, jejichž příjmení začíná na CH, řazeny podle české abecedy (za H), ačkoli text je psán anglicky.

V některých částech textu citace postrádám: např. s. 13 diferenciaci kolonií u *B. subtilis*, s. 15 – vývoj biofilmu.

#### **Materiál a metody:**

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO ~~NE~~

Kolik metod bylo použito? 3-4 (kultivace mikroorganismů na tekutém a pevném mediu, světelná mikroskopie, elektronová mikroskopie - servisně?, 2-D elektroforéza a její vyhodnocení softwarem )

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~

Mám výhradu k zápisu parametrů centrifugace způsobem  $5 \times 10$  ( místo 5 min při 10 000g), který je matoucí ( mimo jiné proto, že na s. 41, 4. řádek kap. 3.2.4. je uveden chybně).

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO s výhradou ~~NE~~ - v čem jsou nedostatky?

Vzhledem k tomu, že studium morfologie kolonií je zásadní součástí práce, myslím si, mělo být zařazeno více fotografií, aby bylo zcela patrné, že pozorovaná morfologie je pro dané kultivační podmínky skutečně charakteristická. V práci je vždy jedna fotografie agarové plotny, a vybrané jedné kolonie při 2 různých zvětšeních. Zdá se mi to málo.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?  
v podstatě ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

#### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ~~ANO~~ spíše NE, je popisná

<p>Jsou výsledky porovnávány s literaturou? <u>ANO</u> <u>spíše NE</u>  <i>Výsledky jiných uvedeny jsou, ovšem pouze jako výčet, jsou jen velmi málo dávány do souvislostí s daty získanými v této práci. Autorka nevyvozuje žádné rozsáhlejší závěry. Pouze konstatuje nalezení rozdílů.</i></p> <p>Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? <u>částečně ANO</u> <u>NE</u></p>
<p><b>Závěry (Souhrn) :</b>          Jsou výstižné? <u>ANO</u> <u>spíše NE</u>  <i>Kap. Summary je pouze zkráceným popisem výsledků, závěry neobsahuje.</i></p>
<p><b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):</p> <p><i>Práce je psána anglicky, jazyková úroveň je dobrá, překlepy se nevyskytují, gramatické chyby vzácně.</i></p> <p><i>Velmi zvláštní je formátování - rozložení v kap. Results, kde se vyskytují dlouhé úseky bez textu (např. na s 63 obsahuje pouhé 4 řádky) – tento jev prakticky zkracuje rozsah této stěžejní kapitoly o cca. 7 celých stran (z 31 číslovaných na 24 faktických).</i></p> <p><i>Obrazová dokumentace je dobrá, zejména v kapitole výsledky oceňují kvalitní fotografie agarových ploten i kolonií. U obr. 13 – 24 by bylo vhodné zařadit pro snazší orientaci měřítko.</i></p> <p><b>Další připomínky:</b>  <i>Fig. 3: chybí u mikroskop. snímků měřítko, obrázek je navíc moc malý (mikroskopické snímky jsou nezřetelné).</i>  <i>Fig. 5 : část popisu obrázku je nešikovně zařazena do textu</i>  <i>Fig. 6: špatné rozlišení, obtížně čitelné</i>  <i>Fig. 10 : chybí informace o délce úsečky měřítko</i></p>
<p><b>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</b></p> <p><i>Cíle práce, tak jak byly formulovány, splněny byly. Vstupní hypotéza, tedy že zdroj uhlíku a způsob kultivace ovlivní morfologii kolonií i proteinové spektrum <i>M. smegmatis</i>, byla potvrzena, nepovažuji to však za příliš překvapivý objev. Bohužel výsledky práce nejsou zasazeny do širších souvislostí, což považuji za hlavní slabinu této práce. Je velká škoda, že žádné z proteinů, které byly pomocí 2-DE identifikovány jako unikátní pro některý z testovaných způsobů kultivace, nebyly identifikovány, práce by tím mnoho získala.</i></p> <p><i>Přes všechny uvedené připomínky doporučuji tuto práci k obhajobě, navrhuji však snížený stupeň hodnocení.</i></p>
<p><b>Otázky a připomínky oponenta:</b></p> <p><b>Připomínky:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Na obr. 3 a 5. je prakticky totéž.</li> <li>- Použití termínu „bacilli“ se smyslu „bacteria“ (s. 23) je nevhodné.</li> <li>- V kap. 3.2.2 se uvádí, že bakterie byly na agarových plotnách kultivovány 3 dny. Jak</li> </ul>

ale vyplývá z popisu výsledků, analyzovány byly i kolonie 6-denní.

- Pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku pomocí kitů BCA a 2-D Quant nejsou uvedeny kalibrační křivky.
- V diskusi na s. 82 se doslova opakují 3 věty z lit. přehledu s. 32 (He and De Buck in 2010 obtained ... methods (HE and DE BUCK 2010)).
- Na s. 82 se píše : „2-DE approach coupled with MS is also used in this thesis.“ Není to pravda, proteiny nebyly identifikovány pomocí MS.

#### **Otázky:**

Na s. 14 se tvrdí, že charakteristiky bakteriálních kolonií lze prakticky vztáhnout i na biofilmy. Skutečně je pravda, že tyto dvě formy bakteriálního růstu jsou si tak podobné, že jsou v podstatě zaměnitelné?

Jak přítomnost DNA v extracelulární matrix biofilmu přispívá k resistenci k antibiotikům (tvrdí se to na s. 18 v souv. s obr. 5)

Skutečně jedna třetina světové populace je/byla infikována *M. tuberculosis* ? (s. 25)

Jaká byla velikost celofánového disku – pokrýval celou plochu plotny? Na obr. 16, kde je podle popisku plotna bez celofánu, mám dojem, že vidím okraj celofánového výřezu i změnu morfologie kolonií na jeho okraji – prosím vysvětlit.

Nikde není uvedeno, kolikrát byla opakována kultivace v tekuté kultuře, ani kolik ploten/ kolonií bylo vyhodnoceno – prosím upřesnit.

Jak si vysvětlujete zvláštní tvar růstové křivky („hrb“ po skončení exp. fáze) *M. smegmatis* v tekuté kultuře?

Jak byl vybrán „cut-off“ limit pro kvantitativní analýzu, proč zrovna 8-násobná změna denzity?

Kolikrát byla 2-DE opakována pro daný experiment- z kolika individuálních gelů byly vytvořeny „mastergely“ na obr. 28, 29, 32 ? Z kolika hodnot byly vypočítány SD u expresních profilů (obr. 31, 34). SD jsou v některých případech velmi vysoké, považujete tedy všechny rozdíly za signifikantní?

Proč se 2-DE dělala pouze u vzorků z kultivace na glycerolu, když cílem práce bylo mj. i zkoumání vlivu zdroje uhlíku?

Proč pomocí SEM nebyly pozorovány kolonie 6-denní, který vykazují výraznější morfologii?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: