

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : **Lenka Přenosilová**

Název práce: **Biodegradace 17 α -ethinylestradiolu enzymy ligninolytických hub**

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte **právě jednu** z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
X	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
	A - výborná, bez závažnějších připomínek
X	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
	C - uspokojivá, s čtenějšími drobnými závadami
	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
X	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
X	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
	C - uspokojivý, čtenější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
X	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo čtenějšími drobnými chybami
	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Diplomová práce studentky Lenky Přenosilové je napsána srozumitelně, vyskytuje se v ní menší množství překlepů a neobratných vyjádření, které však většinou nebrání ve správném pochopení textu. Dále zmiňuji tedy jen závažnější nepřesnosti, které by mohly být matoucí.

V kapitole 4.6 (pufry), str. 36, až na pufr MOPS neuvádíte, že by se jednalo o koncentrované zásobní roztoky pufrů (jedná se o pufrы TAE a TE). Jsou tedy tyto pufrы 1x koncentrované? U pufru TAE (Tris-acetát-EDTA pufr) není uvedeno, čím bylo upravováno pH a tudíž nemusí být zcela zřejmé, proč je tento pufr označován jako TAE, složení je jinak totiž shodné s pufrem TE. pH pufru TE bylo nastaveno na pH 8 pomocí 3M NaOH, což je podle mého názoru chybné.

Ve vzorci pro výpočet enzymové aktivity ligninolytických enzymů (str. 39 a 41) by měla být uvedena i optická dráha, jinak nemůže mít aktivita rozměr $\mu\text{mol}/\text{min.l}$

Na mnoha místech v diplomové práci se neshoduje objem uvedených reakčních směsí s objemem uvedeným v závorce. Konkrétně se jedná o složení PCR směsí pro amplifikaci genů *lac* a *mnp* (str. 46, 47, 48), kde je místo uváděných 25 μl pouze 24 μl . Složení reakční směsi pro prepis RNA (str. 51) by mělo být uvedeno kompletně, tj. včetně reversní tanskriptasy, templátu a primerů. O těchto složkách se dozvíme až po podrobnějším prozkoumání textu. Navíc po sečtení všech komponent se opět nedostaneme k celkovému objemu, který by měl být 40 μl . Podobná nesrovnalost se ještě objevuje u složení reakčních směsí pro kvantitativní PCR (str. 53, 54), kde je místo uváděných 20 μl ve směsi pouhých 19.88 μl .

Některé experimentální údaje se dle mého názoru opakují zbytečně i několikrát (stejně složení reakčních směsí pro PCR, podmínky PCR), což by šlo vyřešit formou odkazu na předchozí kapitolu, některé jiné údaje v metodách naopak postrádám (př. kap. 4.15- z jakého zdroje byly použité primery, kap. 4.17-složení promývacího pufru, 4.18-denaturační roztok...)

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1) Proč jsou pro jednotlivé experimenty či pro shodné experimenty a různé druhy hub použity různá časová schémata? Např. vzorky pro stanovení enzymových aktivit byly odebrány 2., 4., 7., 9., 11. a 14. den kultivace, ale izolace RNA a stanovení *pI* bylo u houby *T. versicolor* provedeno ze vzorků odebraných 1., 2. a 5. den kultivace, ale u houby *I. lacteus* bylo totéž provedeno 7., 9., 12. a 14 den kultivace.

2) Dále bych měla několik otázek týkajících se inkubace EE2 s extracelulárními enzymy a myceliem testovaných hub *in vitro* (kap. 4.10, str. 42)

Na jaký objem z původních 20 ml byl supernatant zahuštěn? V čem bylo homogenizováno mycelium? Proč bylo do reakčních směsí negativních kontrol (enzymový systém inaktivován povařením) aplikováno poloviční množství supernatantů než do směsí obsahujících aktivní supernatant (tab.1)? Proč reakční směsí *T. versicolor* obsahují menší množství supernatantu než reakční směsi ostatních studovaných hub (tab. 2)?

3) Čím je způsoben rozdílný výtěžek izolace RNA z *T. versicolor* a *I. lacteus* (tab. 13 st. 70 a tab.15, str. 75)? V prvním případě byly koncentrace u téměř všech vzorků v řádu stovek $\text{ng}/\mu\text{l}$ a čistota splňovala požadovaná kritéria, kdežto v druhém případě se koncentrace většiny vzorků ani 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ nepřibližují a čistota je také horší.

Dotazy k obhajobě

4) Pro detekci genu *mnp* v gDNA *I. Lacteus* byly použity dvě sady degenerovaných primerů a to *mnp* HET-F, *mnp*HET-R a *mnp*-U, *mnp*-L. Proč byly pro ověření reversní transkripce a dále pro kvantitativní PCR použity právě primery *mnp*-U a *mnp*-L?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci **doporučuji** k přijetí k dalšímu řízení: **ANO** / **NE**

Navrhovaná celková klasifikace:

Datum vypracování posudku: 22.5.2012

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): RNDr. Věra Černá, Ph.D.