

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
RNDr. Irena Lichá, CSc.

Datum:
10. 9. 2014

Autor: Bc. Petra Sklenářová

Název práce:

Účinek surfaktinu na lipidovou složku cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis*

Cíle práce

Jsou jasně definované v samostatné kapitole v 7 bodech.

Optimalizace a izolace surfaktinu z kultury *Bacillus subtilis*.

Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro *Bacillus subtilis*

Analýza složení cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* rostoucího v přítomnosti surfaktinu a analýza fosfolipidových tříd a mastných kyselin, stanovení poměru lipid:protein. Ověření změn měřením kinetiky lýze definovaných lipozómů.

Stanovení fluidity izolovaných cytoplazmatických membrán a jejich lipidické frakce.

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

Rozsah práce (počet stran): 97

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

Je uveden seznam zkratk? ANO ~~NE~~

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO ~~NE~~

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 ~~NE~~

Autorka uvádí 99 odkazů a kromě 6. (Bernheimer and Avigad 1970) a předposledního (Zhang et al. 2014) jsou správně a jednotně citovány.

Materiál a metody:

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

Kolik metod bylo použito?

Práce je čistě fyziologická a autorka ve své práci použila vedle základních mikrobiologických kultivačních metod převážně analytické a biofyzikální metody.

Tenkvrstvé chromatografie, LS/MS, anizotropie fluorescence sondy DPH, izolace cytoplazmatické membrány a její lipidické frakce, příprava lipozómů.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~

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

Některé grafy (obr č. 12, 13, 17, 18) by byly přehlednější v spojnicové formě a postrádám v nich znázornění odchylek od průměru.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

Možná by byl dobrý experiment lýze membránových váček připravených z lipidické složky

cytoplazmatické membrány Bacillus subtilis.

Diskuze:

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

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ~~ANO~~ NE

Autorka v diskuzi chronologicky shrnula výsledky z jednotlivých experimentů a porovnala je s obdobnými v literatuře či z předchozími výsledky z laboratoře. Závěry však jsou pouze popisné bez detailnějšího vysvětlení či je vysvětlení pouze obecné, bez navržení řešení problematiky či vysvětlení fenoménu případně pracovní hypotézy vysvětlující dokumentovaný fenomén stimulace růstu při nižších koncentracích surfaktinu a korespondující výsledky změn složení membrán a jejich fluidity.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO - ~~NE~~

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň práce je standartní, obrazová dokumentace až na již zmíněné grafy je kvalitní, formátování textu bez závažných nedostatků (nejsou ale třeba velikostně odlišené stupně nadpisů v textu a v obsahu není jednotné formátování v kapitole 4). V textu je jen malé množství překlepů, ale jsou a i třeba v nadpisech např. v seznamu u kap 4.12.5. nebo str 67 2. řádek – esek místo desek)

Závažná chyba, která je nutná opravit formou errat je to, že v kapitolách 5.1 a 5.2 (Výsledky) jsou chybně uvedeny odkazy na metodické kapitoly.

Anglická a česká forma abstraktu se liší v údajích doby zdvojení.

Styl jazyka práce je někdy trochu kostrbatý a autorka používá trochu archaické výrazy a slovní spojení. Text je ale psán srozumitelně a pečlivě. Výsledková část je psána logicky vždy začínající odůvodněním experimentu, dále prezentací výsledku a jeho shrnutí a zhodnocení. Slabinou práce je diskuse, ve které autorka příliš své výsledky nediskutuje a pouze je shrnuje a třídí, snaha o diskusi je často pouze formou obecného konstatování již řečeného.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Předložená diplomová práce navazuje na rozpracovanou tematiku školitelky a autorka měla dobrou výchozí pozici, protože metody, které používala, jsou v laboratoři dobře zavedené.

Cíle práce splněny tedy byly, autorka provedla úspěšně všechny naplánované experimenty a vylepšila metody a potvrdila a doplnila výsledky z práce své předchůdkyně.

Ulehčenou práci měla i v případě literárního úvodu, kdy pouze témata rozšířila o nejnovější poznatky. Práce je po stránce logiky experimentů a jejich ověřování velice systematická a důsledná. Obsahově i formálně práce splňuje požadavky kladené na práci diplomovou.

Doporučuji tedy k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

1. Připomínka k formulaci prvního odstavce úvodu: myslíte, že antibiotika nejsou látky mikrobiálního původu a naopak, že uvedení surfaktinu do praxe jako terapeutikum by nebylo nákladné?
2. Kapitola Materiál a Metody je řešena odlišně, kdy v materiálech jsou popsány pouze kmeny a složení kultivačních půd, složení roztoků pro izolace a analytická měření jsou vždy uvedena na začátku příslušné metodické kapitoly. Přijde mi tento přístup

přehlednější než klasicky zavedený postup vypisování složení roztoků odděleně v materiálové části.

3. Jak již bylo uvedeno dříve, u grafů dokumentující růstovou rychlost na pevných půdách bez směrodatných odchylek mi přijde nedostatečné, protože tato metoda může být zatížena velkou experimentální chybou při méně pečlivém provedení. (obr č. 12, 13,17,18)
4. Znova připomínám nutnost opravy čísel kapitol odkazující na metodické kapitoly v části popisující experimenty optimalizující růst na pevném mediu a izolace surfaktinu (v kap 5.1 a 5.2)
5. V tabulce na str 58 prosím o vysvětlení legendy (m/z a m/z Na+) i hodnot v druhém sloupci tabulky.
6. Proč se Vám v izolačních experimentech nepodařilo dosáhnout výtěžku uvedeném při optimalizačních pokusech popsáných na str. 55 (hodnoty 1655 mg/l versus 565 mg/l z tabulky na str 58)
7. Na str. 63 na obr 16 uvádíte, vliv surfaktinu na růst pouze do koncentrace 750 µg/ml, prováděli jste měření i při vyšších koncentracích surfaktinu?
8. Z jakých hodnot byl stanoven procentuální nárůst biomasy, jak je uvedeno v tab. 3, z velikosti kolonií nebo hodnot OD?

Otázky:

1. Práce se zabývá velmi atraktivním tématem a to vlastnostmi bioaktivní látky a jejímu vlivu na adaptační mechanismus producenta. Řeší jeden aspekt rezistence producenta k surfaktinu a to změnu složení lipidické složky cytoplazmatické membrány. Je složení lipidické složky cytoplazmatické membrány u *Bacillus subtilis* něčím významně odlišné od jejího složení u bakterií k surfaktinu citlivých? Je známa z literatury práce, ve které je též analyzováno složení cytoplazmatické membrány po aplikaci surfaktinu u organismů, které jsou k surfaktinu citlivé?
2. Je popsána nějaká studie, ve které se porovnává vliv ostatních biosurfaktantů (z různých producentů, např *Pseudomonas*) na *Bacillus subtilis* a opačně, surfaktinu na např. *Pseudomonas*?
3. Jakými mechanismy (biochemickými drahami) může *Bacillus subtilis* ovlivňovat složení cytoplazmatické membrány?
4. Může mít vliv na rezistenci k surfaktinu i zastoupení minoritních mastných kyselin v cytoplazmatické membráně? Protože i jejich zastoupení se více či méně mění, jak jste ve své práci dokumentovala.
5. Máte nějakou pracovní hypotézu vysvětlující fenomén aktivace/deprivace růstu *Bacillus subtilis* surfaktinem při jeho různých koncentracích a úzkého koncentračního rozhraní mezi těmito dvěma typy působení? Může mít tento fenomén fyziologickou funkci při růstu *Bacillus subtilis*?
6. Ve své práci na mnoha místech uvádíte, že surfaktin je nadějným antibiotikem, ale z úvodu i diskuse vaší práce vyplývá, že působí nejen na membrány bakterií, známa je např. silná hemolytická aktivita surfaktinu. Jak by se potlačily tyto nespecifické účinky a z nich vyplývající nežádoucí účinky na člověka při terapeutickém použití?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně x velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: