

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: doc. Ivo Konopásek

Datum:
6.9. 2015

Autor:
Bc. Barbora Kozická

Název práce:
Studium interakce houby *Pleurotus ostreatus* a bakteriálních kultur na abiotickém nosiči - morfologická, biochemická a proteomická analýza.

Cíle práce

Cílem práce bylo studium vzájemných interakcí houby *P.ostreatus* a bakterie *R. erythropolis* v bioreaktoru při dekolizaci barviva. V různých kultivačních systémech bylo sledováno vzájemné působení na růst při kokultivaci a dále vztah partnerů při degradaci barviva RBBR v bioreaktoru.

Implicitním vzdálenějším cílem bylo vlastně vyvinout systém houby a bakterie, který by byl účinnější v dekolizaci zkoumaného barviva.

Konkrétní cíl 2, identifikace předpokládaného inhibičního agens růstu bakterie se objevil až v průběhu práce a úplně se jej splnit nepodařilo.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 109 stran včetně přehledu literatury

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE

V klíčových slovech se případně mohla objevit degradovaná sloučenina

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

Úvod je odpovídající tématu, v části o mezidruhových interakcích v biofilmech bych přivítal víc interakcí na molekulární úrovni, které souvisejí s biodegradacemi - část je příliš obecná, což nepomůže u tak komplikovaného a mnohotvárného tématu, jakými jsou biofilmy.

Úvod je napsán dobře s výhradou, kterou řeší otázka 1 oponenta a která se týká obecných úvah o tom, jak by měly vypadat ideální vlastnosti bakteriálního a houbového partnera pro biodegradaci. Náhled na problém také komplikuje to, že bakteriální kultury vystupují při houbových biodegradacích jako buď jako nechtěné ale nutné kontaminanty nebo jako záměrně vnášení "pomocníci při biodegradaci". Nereálným ideálem by bylo, kdyby v provozních podmínkách byla každá stabilní kontaminace také pomocníkem biodegradace. Je

vidět, že situace je ve srovnání s klasickými jednodruhovými kultivacemi řádově složitější a že cesta k řešení je hodně komplikovaná.

Poznámky (číslo označuje stranu v DP):

26: Ne úplně pochopitelné tvrzení: "...cylindrické intravakuolární struktury, které jsou považovány za jednotku objemu biofilmu. "

27: "...V závislosti na přítomnosti určitých substrátů v kultivačním médiu bakterie mění složení lipidů buněčné stěny a tím upravuje fluiditu buněčného obalu."

Komentář: Jde o fluiditu membrány nebo buněčné stěny? Jinak se slovem „substrát“ v kultivačním médiu obvykle myslí komponenta média nebo přímo zdroj uhlíku.

28: Otázka: jaká je chemická podstata surfaktantů produkovaných *R. erythropolis*?

33: Poznámka: sloučenina **chlorpyrifos** není pesticid, ale insekticid, je to organofosfát.

Seznam literárních odkazů zahrnuje o něco méně než 200 citací, což je pro dané téma určitě přiměřené, 11 citací je z roku 2014, citace jsou většinou recentní, z posledních 5-10 let.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE

Kolik metod bylo použito?

Práce zahrnovala řadu kultivačních metod, analytické metody stanovení enzymatické aktivity, mikroskopické metody, 1 a 2D elektroforézu.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

V kapitole je uveden původ chemikálií a přístrojů, kapitola je psána velmi podrobně včetně podrobné přípravy roztoků a srozumitelně.

Obr. 6: Trochu nicneříkající komentář: Snímek **z digitálního fotoaparátu**

V práci se objevuje opakovaná chyba, kdy se tvrdí, že rozdíl absorbancí udává počet bakterií. To je pravda až po přepočtu rozdílu absorbancí na počet buněk.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

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

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Pokud nebyly některé cíle splněny, tak na to autorka sama poukazuje. Jde především o výsledky z 1D a 2D elektroforéz, kde se už zřejmě z časových důvodů nepodařilo rozpracovat to, co by na těchto analýzách bylo nejzajímavější.

Obr. 7 – růstová křivka - dal bych přednost spojení experimentálních bodů čarou, v určitém intervalu jde přece o lineární závislost.

Obr. 10: jak by vypadal obrázek ideálního smíšeného biofilmu?

Obr. 11: ve výřezech mikroskopických obrázků by mělo být měřítko, pojem „houbové“ v popisu je nicneříkající

Str. 67: Výraz „...při smíšené kultivaci se nepodařilo zkoordinovat růst mikroorganismů...“ dává možnost vysvětlení, že se experimentátor málo snažil, což tak asi není myšleno - výsledek byl plně v kompetenci bakterie a houby.

Obr. 12: výraz „normalizovaná OD“ není dobře vysvětlen. Není vysvětleno, jak byly konstruovány body na grafu a jaký mají vztah k Tab. 4. Pro ukázkou časového průběhu je tu málo bodů vzhledem k ose x.

Tab. 5: pokud je někde kolonií „nepočítatelné“, znamená to, že se mělo více ředit. Na kvantitativní údaj je to málo přesvědčivý komentář.

Str. 71: mohla by obsahovat údaj, zda je v roztoku stabilní samotné barvivo, přestože se to asi rozumí samo sebou. Nicméně, dekolorizace bez degradačního enzymu tuto otázku vyvolává.

Str. 72: vzhledem k tomu, že jde o diplomovou práci, data o peroxidázách klidně mohla být uvedena formou tabulky, i když možná nejsou příliš přesvědčivá.

Kap. 5.4: logičtější by bylo, aby se už v této kapitole uvažovalo vliv chybějící glukózy na výsledek kultivace *R. erythropolis*, který byl pěstován v částečně vyčerpaném médiu. V podstatě by bylo možno chybějící glukózu doplnit a sledovat pouze inhibici houbovými metabolity, aby start růstu probíhal v přibližně stejných podmínkách jako v čerstvém médiu, ale s předpokládanými inhibujícími látkami *P. ostreatus*.

Obr. 15: nejde o zobrazení normalizovaného počtu bakterií, ale o „normalizovanou“ OD

Obr. 16: výraz „lakáza plus“ v legendě je trochu zavádějící (nejde o mutanty), lépe by bylo „plus lakáza“

Poznámka: cíl pokusů s efektem pH a lakázy na růst bakterie by bylo lepší uvést ve výsledcích a ne až v diskuzi.

Str. 79 nahoře: 65% výchozího množství glukózy určitě bude ovlivňovat celkový nárůst – tato hodnota by měla být lépe diskutována.

Cíle proteomických experimentů by měly být deklarovány. Celkově by měly být pokusy v experimentální části uváděny cílem, který se sleduje.

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

Jak už bylo řečeno, bylo by možná bývalo lepší některé úvahy z diskuze předřadit jako cíle pokusů, někdy na závěr pokusů diskutovat o výsledcích. Teprve v diskuzi jsou totiž cíle experimentů deklarovány. Šlo by pak snadněji sledovat konzistentní postup při experimentování.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

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

V práci nejsou téměř překlepy, práce je psána srozumitelně. Jazyková úroveň se mi velmi líbí. Práce obsahuje málo jazykových neobratností, jsou tam například obvyklé anglicizmy:

21: ...versatilní peroxidáza (polyfunkční, s širokým spektrem účinku)

23:jiná farmaceutika (=farmaka)

55:.... do zkumavek Falcon® a ty byly stočeny(centrifugovány, laboratorní hantýrka)

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Celkově práci hodnotím jako zdařilou a líbí se mi i přesto, že vedla k výzkumu mikrobiálních partnerů, kteří nebyli vhodní jako partneři pro biodegradaci. To nelze autorce vyčítat.

Nicméně inhibiční efekt houbových metabolitů na růst bakterie a případný stimulační efekt bakteriálního metabolismu na degradaci stojí za dovedení experimentů v tomto systému, v práci dobře prozkoumaném, do konce. Práci v každém případě doporučuji k obhájení jako

diplovou práci.

Otázky a připomínky oponenta:

- 1) V úvodu se píše, že „Tato bakterie byla zvolena také z důvodu, že disponuje obdobnými biodegradačními schopnostmi jako *P. ostreatus*, což dává možnost spolupráce mezi oběma mikroorganismy při biodegradačních procesech (str.15). To mi připadá jako východisko pokusů málo. První vztah, o kterém se obvykle přemýšlí, je totiž konkurence. V úvodu mi trochu chybí rozvedená úvaha o tom, jaké vlastnosti by vlastně měli mít bakteriální a houbový partner pro interakci, která zesiluje biodegradační schopnosti směsné populace. V úvodu autorka cituje metodu optimalizace bakteriálního konsorcia (str. 32) algoritmem, ale není vysvětlen princip metody. Bylo by přitom žádoucí vědět, které charakteristiky kokultivačních partnerů jsou klíčové pro to, aby další experimenty měly perspektivu.

Jsou to následující vlastnosti: Vhodný podíl růstových rychlostí? Tvorba směsného biofilmu? Absence antagonistických vztahů jiných než potravní konkurence? Musí být oba partneři schopni biodegradace dané látky? Myslím, že v úvodu se těmto základním úvahám věnuje poměrně málo prostoru, respektive není důkladně vysvětlena volba partnerů pro biodegradaci, kterými se daná práce zabývá. Komentujte prosím tyto úvahy.

- 2) Proč myslíte, že to byl hydrofobní povrch houbových vláken, který znemožnil adhezi bakterie? *Rhodococcus* má přece také hydrofobní buněčnou stěnu. Jaké by měly být vlastnosti buněčné stěny bakterie, která dobře kolonizuje mycelium *P. ostreatus*?

- 3) Je flokulace *R. erythropolis* jako odpověď na stres aktivním nebo pasivním jevem? Pokud aktivním, tak jaký je mechanismus?

- 4) Přestože barvivo RBBR zřejmě neindukuje syntézu lakázy, stimuluje syntézu lakázy přítomnost *R. erythropolis*. Jak by bylo nejlepší postupovat ve vysvětlení tohoto zajímavého výsledku?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: