

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:  
RNDr. Vendula Brabcová, Ph.D.

Datum:  
28. 1. 2019

Autor:  
Bc. Tereza Patrmanová

### Název práce:

Geny sekundárního metabolismu v půdních bakteriálních společenstvech

### Cíle práce

Cílem práce bylo navrhnout primery pro vybrané geny sekundárního metabolismu streptomycet, optimalizovat podmínky PCR amplifikace u sbírkových a environmentálních bakteriálních kmenů a tyto primery použít v analýze genů sekundárního metabolismu ve vybrané lokalitě. Ve dvou vybraných lesních porostech použít tyto a další primery převzaté z publikací při kvantifikaci genů sekundárního metabolismu, biomasy bakterií a aktinobakterií. Posledním cílem bylo zhodnotit vliv stromového patra (typ opadu) na abundanci genů sekundárního metabolismu a změnu abundance těchto genů v půdním profilu.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 102

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO, některé dlouhé pasáže by mohly být nahrazeny obrázky či schémata, tabulkami.

Použil(a) autor(ka) 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, ale chybí popis manipulace s půdními vzorky (lyofilizace, zamražení, uchování ...?)

Kolik metod bylo použito? 4 hlavní metody v několika variantách: izolace DNA, navrhování primerů. PCR (optimalizace PCR, qPCR, dPCR, koloniální PCR)

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, ale chybí zdůvodnění, proč byly konkrétní metody použity (např u klonování).

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO u technického provedení experimentů, NE u závěrů výsledků abundancí genů sekundárního metabolismu jsou pouze odečítány z grafů s velkými směrodatnými odchylkami, statistické zhodnocení by mohlo výsledky podpořit více, nebo nejsou zmíněny v materiálu a metodách.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO, ale zvažila bych i použití „nested PCR“ přístupu popsaneho v citované literatuře.

**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? NE přímo, ale z diskuze vyplývá, že zvolená metodika není pro řešení problému zcela dostatečná. Což považuji rovněž za důležitý závěr.

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Tato práce je z formálního hlediska psána kvalitně s minimem chyb. Použitá grafika odpovídá tématu práce, grafy ve výsledkové části jsou zpracovány přehledně. Jen v případě abstraktu je český překlad trochu méně přesný než anglická verze.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Hlavním tématem práce je detekce genů sekundárního metabolismu v půdě pomocí metody digitálního PCR. Přestože autorka nebyla s návrhem a testováním těchto primerů úspěšná považuji to za důležitý závěr práce. Geny sekundárního metabolismu ve dvou různých lesních půdách poté detekovala pomocí dvojice primerů převzatých z literatury.

Literární přehled k tématu je psán velmi podrobně, v některých pasážích až příliš. Věnuje se popisu struktury půdních společenstev, aktinobakterií jako jejich hlavních producentů, struktury a funkci sekundárních metabolitů a jejich detekci. V textu je pouze velmi stručně zmíněn širší význam celé studie. Metodika a výsledky jsou až na několik detailů popsány přehledně a dostatečně, větší důraz by mohl být kladen na vyhodnocení dat ze srovnání genů sekundárního metabolismu v půdách. Text diskuze je věcný a přehledný. Celkově je práce kvalitní i přes drobné nedostatky a negativní výsledky studie.

**Otázky a připomínky oponenta:**

V literárním přehledu je mnoho prostoru věnováno struktuře a syntéze aminoglykosidů a polyketidů. Toto nepovažuji za potřebné vzhledem k tomu, že se práce věnuje detekci genů látek sekundárního metabolismu, ne jejich chemické struktuře a syntéze. Zároveň bych uvítala více informací o tom, které organismy, v jakých prostředích, a v jakých abundancích tyto geny nesou. Zvážila bych i začlenění kapitoly s přehledem a zdůvodněním použitých metod i například jen formou tabulky. Množství citovaných článků je vysoké (173 celkem), avšak počet nejnovějších článků je limitovaný (jen 6 za 2017-2018).

V metodice je nastíněn odběr vzorků půd ze dvou lokalit v jizerských horách. Zcela však chybí informace o tom, jak bylo s těmito vzorky dále nakládáno. Výsledky tímto nelze reprodukovat a porovnat s ostatními studiemi ani vzájemně (například mohla být jiná vlhkost obou materiálů). **Jak bylo s těmito vzorky nakládáno, které další analýzy (např. změření pH) u nich byly použity? Jak může ovlivnit manipulace se vzorky (např. lyofilizace / přímé zamražení / uchování při 4°C) výsledky studie?**

DNA byla v práci izolována dvěma metodami. **Proč?**

Při použití komerčně dostupného kitu se domnívám, že není potřeba návod podrobně přepisovat do textu, pokud nedošlo k modifikacím.

**Izolace DNA ze vzorků půd proběhla jednou pro každý vzorek, nebo byla izolována vícekrát?** Výtěžek izolované DNA se může pro jeden vzorek lišit i při opakované izolaci se stejného materiálu. Pokud byla použita qPCR, dPCR, může drobnější změna v efektivitě kvantifikace výrazně ovlivnit celkový pohled na výsledky. Zmíněno pouze v kapitole 5.4 u digitální PCR.

Ve výsledcích, které popisují výskyt genů sekundárního metabolismu v horských půdách, jsou zmíněny signifikantní rozdíly. Statistická analýza není zmíněna a z grafů nelze tento závěr jednoznačně vyčíst díky vysokým směrodatným odchylkám. **Jak byla tato data analyzována?**

V diskuzi je zmíněno použití „nested PCR“ přístupu pro úspěšnou amplifikaci genů sekundárního metabolismu (Nagaya *et al.* 2005). **Zvažovala jste použití tohoto postupu ve vašich experimentech? Proč?**

Na základě publikace Riesenfels *et al.* 2004 se zdá, že kvůli nízké sekvenční identitě genů rezistence (méně než 60%) není použití PCR metod vhodné a dostačující pro detekci těchto genů. **Proč jste tuto metodiku použili? Jaká jiná metodika by mohla být vhodná pro analýzu genů sekundárního metabolismu v půdě?**

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: