

OPONENTSÝ POSUDEK

na dizertační práci Ing. Evy Hlavoňové s názvem:

„Studium produkce a vlastností vybraných bakteriálních polymerů“

Předložená dizertační práce je uceleným, pečlivě zpracovaným vědeckým spisem členěným do obvyklých kapitol. Vlastní text doplňují přehledné tabulky, grafická znázornění a velmi zdařilá obrázková dokumentace. Informace uvedené v teoretické části autorka čerpala ze 119 odborných a vědeckých publikací.

Téma zaměřené na studium biopolymerů produkovaných bakteriemi považuji za aktuální a významné nejen z hlediska jejich možného využití v mnoha průmyslových oblastech a lékařství. Vzhledem k snadnější degradaci těchto přírodních sloučenin v přírodě, ve srovnání se synteticky připravovanými plasty, také pro ochranu životního prostředí. Výrazné uplatnění nacházejí tyto „biosloučeniny“ v některých technologiích čištění odpadních vod.

V literárním přehledu autorka seznamuje s různými mikrobiálními druhy – známými producenty sloučenin charakteru biopolymerů, které mohou být uvnitř buněk /intracelulární polymery/, nebo se nacházejí na povrchu buněčných stěn /extracelulární polymery, ECP/, kde plní ochranné a adhezivní funkce. U některých mikrobiálních kmenů výrazně zvyšují jejich virulenci. Vzhledem k zaměření experimentální činnosti jsou dále charakterizovány extracelulární polymery, jejichž chemické struktury závisejí na druzích mikroorganismů, kterými jsou syntetizovány, a mnoha dalších faktorech uvedených v této kapitole.

Cílem práce bylo zjistit a charakterizovat různé vlastnosti dvou kmenů, včetně jimi produkovaných exosloučenin.

První, označený PR byl vykultivován z aktivovaného kalu odebraném v čistírně odpadních vod /ČOV/ Babice, druhý kmen FR 8 z aktivovaného kalu se znaky viskózního bytění, který pocházel z ČOV Fryšták. Na základě stanovených a ověřených parametrů, včetně sekvenace 16S rDNA byl kmen PR přiřazen s 99% shodou k taxonu *Leuconostoc /L./ garlicum*. V dalších experimentech zaměřených růst kmene a syntézu ECP za různých kultivačních i inkubačních podmínek byl optimální růst i produkce biopolymeru zjištěn

v Trypton kvasničném mediu /TYM/ s obsahem 10 % sacharózy a fosfátovým pufrém /pH 6,7/. Nejvyšší produkce ECP a zahuštění media bylo dosaženo v živné půdě s dvojnásobným množstvím kvasničného autolýzáta. Po optimalizaci postupů izolace a purifikace ECP byla ve spolupráci s pracovníky Chemického ústavu SAV objasněna jeho struktura. Bylo zjištěno, že sloučenina produkovaná *L. garlicum* je homopolysacharid typu glukopyranozy bez dusíkatých sloučenin. Nyní je ověřováno její možné využití ve farmaceutickém průmyslu.

Výsledky metody sekvenace genu pro 16 rRNA kmene FR8 se s 99% pravděpodobností shodovaly s druhem *Pseudoxanthomonas mexicana* rodu *Pseudoxanthomonas*, jehož platnost byla potvrzena v roce 2000. V průběhu ověřování růstu kultury na různých kultivačních půdách, včetně inkubačních podmínek byly pozorovány rozdíly v morfologii kolonií a charakteru produkované biomasy. Exoprodukt syntetizovaný kmenem na TYA s 2 % glukózy byl kompaktní, na kazeinovém agarů spíše pastovité konzistence. Velké úsilí vyžadovaly postupy získávání a purifikace kompaktní biomasy. Byly ověřovány i nové metody suspendace, které usnadnily uvolnění extracelulárních metabolitů do roztoku. Výsledkem série pokusů byl získání 2-3 rozpustných bílkovin o různé molekulové hmotnosti, detekovatelných metodou SDS-PAGE. Kvantitativní analýzou obou biosloučenin byl prokázán v kompaktní biomase vyšší obsah bílkovin, ve srovnání s pastovitou, která naopak obsahovala více sacharidů. Při zkouškách ztekucení suspendovaného produktu, získaného při kultivaci na TYA s 2 % glukózy byla účinná DNA-asa, což dokladuje význam DNA na soudržnosti biomasy. Přítomnost DNA byla potvrzena i v biomase kmene rostoucího na kazeinovém agaru.

Před závěrečným hodnocením si dovoluji uvést některé připomínky, doporučení a dotazy:

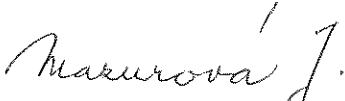
- str. 22 doporučuji změnit na zvyšují virulenci kmene daného druhu
- doporučuji správné používání termínů kultivace a inkubace v celé práci. Příklady: str. 33 kolonie byly v průběhu kultivace /inkubace/ přeočkovávány ..., str. 35 ...kultivace /inkubace/ probíhala ve tmě ..., str. 37 ... kultury FR8 byl získáván po 4 denní kultivaci /inkubaci/....
- termín „izolát“ doporučuji změnit na ... kmen izolovaný /vykultivovaný/ z ...
- pamatujte, že při psaní odborného textu je nutná přesná odborná formulace nikoliv laboratorní slang, viz str. 44 ... buněčná suspenze byla mikroskopovaná fázovým kontrastem ... pomocí počítačové komůrky ... str. 31 ... na vodní lázni ... a další
- termín narostené kolonie změňte za narostlé ...
- uveďte co považujete za běžné laboratorní vybavení /ČR/ str. 27
- upřesněte postup sterilizace živných půd /str. 28/
- uveďte způsob uchovávání a resuscitace kmene FR8
- doplňte složení plynů v prostředí anaerostatu při anaerobní inkubaci /ne kultivaci/
- doplňte postup vyhodnocení výsledků mikrotestů /počítačový program ...?/

- doplňte postup stanovení rezistence k novobiocinu vč. hodnocení výsledků
 - vysvětlete růstové fáze M, S, R
1. Jak lze objasnit zjištění produkce převážně polysacharidových polymerů bakteriemi vystavenými stresovým podmínkám?
 2. Je produkce EPC stálou vlastností bakteriální buňky a lze její kvantitativní syntézu těchto sloučenin ovlivňovat?
 3. Které bakterie vytvářejí pouzdra obsahující kyselinu hyaluronovou a jak vysvětlíte její imunologickou toleranci?
 4. Co jsou poriny a jaký mají pro bakteriální buňku význam.
 5. Vysvětlete příčiny ovlivnění růstu kmene PR a produkci ECP přítomností fosforečnanů v mediu.

Dizertační práce Ing. Evy Hlavoňové splnila vytyčený cíl. Po obsahové stránce se jedná o seriózně pojatou studii přinášející nové poznatky v oblasti biopolymerů a jejich producentů. Autorka vykonala značné množství experimentální práce a získané výsledky jsou přínosem nejen pro vědeckou oblast, ale nacházejí uplatnění i v praxi. Předložený spis dokumentuje schopnost vědecké činnosti dizertantky.

Pro uvedené skutečnosti doporučuji dizertační práci k obhajobě.

V Pardubicích 5. června 2011.


Doc. MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc.