

Dizertační práce

Autor: Jakub Budil, M.Sc.

Název: Charakterizace biofilmu *Pseudomonas syringae* a jeho interakcí s antibakteriálními látkami - biofyzikální přístupy

Práce byla vypracována v rámci postgraduálního studia na UK Praha, obor mikrobiologie

Oponentský posudek

Disertační práce Jakuba Budila je zaměřena na tvorbu, vývoj a ošetření bakteriálního biofilmu v reálném čase pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Prací a metod zabývajících se vizualizací biofilmu a hodnocením účinku různých látek je celá řada. Jejich častou limitací je ovšem to, že nejsou schopny snímat biofilm kontinuálně v reálném čase a že nejsou obvykle aplikovatelné na průtokové uspořádání kultivace, které obzvláště z biotechnologického pohledu má velký význam. Zkoumané téma pokládám za aktuální a zajímavé.

Formální kvalita předložené práce

Práce má po formální stránce některé nedostatky, na které bych ráda upozornila. Pro další vědeckou publikační činnost bych studentovi doporučila, aby si dával pozor na psaní latinských výrazů italikou (např. *via*, *i.e.*, *per*, *per se*). Rovněž by čtenáři usnadnilo porozumění textu, kdyby byly všechny zkratky řádně vysvětleny při prvním použití a následně uvedeny i v seznamu zkratk (např. ABC, wss, CRPS). Rovněž výčty genů, u kterých není jasné, co kódují, nepovažuji za šťastné (např. *algT*, *algD*, *cop*, *cus*). Stupeň Celsia je jednotka, která má značku °C, pokud se číslice před jednotkou uvede bez mezery, značí tak přídavné jméno; jde-li o veličinu ve spojení s číslovkou, vkládá se mezi ně mezera. Označení obchodních značek (™, ®) se v odborném textu obvykle neuvádí.

Jazyk

Práce je psána v anglickém jazyce, nicméně překlepů a chyb není mnoho.

Hodnocení jednotlivých částí disertační práce

1) Literární úvod

Literární úvod shrnuje současné poznatky o *Pseudomonas syringae*, jeho životním stylu, virulenci a tvorbě biofilmu. Dále se zabývá využitím ATR FT-IR při monitorování bakteriálního biofilmu v reálném čase. Úvod považuji za zdařilý a poutavý, plný zajímavých a užitečných informací.

2) Metody

Praktická část (7 % práce) pojednává o přípravě biofilmu, přípravě cely a samotném měření. Poměrně strohý popis by zřejmě zasloužil doplnění o postup, jakým byly testované látky připraveny (rozpuštědlo, sterilace, 4.1.3), jaké jsou jednotky obrázků 6 a 7 či v kolika opakováních byly všechny experimenty prováděny. Rovněž není zřejmé, jaká byla finální koncentrace TWEEN-20, která přišla do kontaktu s biofilmem a zda se nemohla projevit její antimikrobiální aktivita? Byl totožný roztok Tween-20 použit jako negativní kontrola?

3) Výsledky a diskuze

Práce navazuje na celkem čtyři prvoautorské publikace autora, případně z nich přímo čerpá. Dovolím si zde nicméně konstatovat, že dvě z publikovaných prací byly publikovány ve 3. kvartilu oboru. Průměrný IF zveřejněných publikací je 3.1, což je ucházející a jistě splňuje nároky v rámci Ph.D. studia. Práce prošly recenzním řízením a nepovažuji tedy za relevantní hodnotit jejich kvalitu, neboť data v nich obsažená byla již hodnocena v průběhu recenzního řízení. Pro budoucí vědecké smýšlení autora si dovolím pár následujících připomínek.

Vzhledem k tomu, že se autor rozhodl pro vlastní metodu hodnocení minimální inhibiční koncentrace, a nikoliv pro standardní ISO normu, bylo by vhodné využít v tabulce 2 nějakých komparátorů (např. antibiotik), aby čtenář získal povědomí o aktivitě látek.

Každá tabulka a obrázek by měly být samo-vypovídající. V této souvislosti bych se ráda dozvěděla, jaký je rozdíl mezi „NA“ a „indeterminable“ (např. Tabulka 3) a proč jsou u některých médií dvě hodnoty na jednom řádku v závorce? Zároveň mne trochu mate fakt, že v mnoha případech vyšla hodnota MBC nižší než hodnota MIC. Ze své podstaty je obvykle minimální baktericidní koncentrace (MBC) výrazně vyšší než MIC. Mohl by se autor k této diskrepanci vyjádřit?

Pro sledování vlivu tří sloučenin na adhezi, tvorbu biofilmu a narušení maturovaného biofilmu by bylo vhodné výsledky zaznamenané pomocí FT-IR porovnat i s některou z klasických metod - např. kultivací biofilmu na Petriho misce a barvení krystalovou violetí, aby byly výsledky pomocí nově zaváděné metody validovány i nestranně s využitím standardizované metody. Zároveň by bylo vhodnější uvádět u testovaných sloučenin stejné jednotky, zde je koncentrace NP vyjádřena v uM koncentraci a koncentrace LEGO-LPPO v ug/mL.

Obrázku 37 by prospěla kontrola v podobě biofilmu, který nebyl ničím ošetřen.

K výsledkům mám několik dotazů, které budou následovat.

Další připomínky a otázky:

1. V rešerši (str. 13, první odstavec) autor uvádí přítomnost extracelulární DNA jako klíčový prvek tvorby biofilmu. Jakou přesnou funkci tato DNA má a jak vzniká?
2. Jak souvisí dvou komponentní systém GacS/GacA (str. 22, poslední odstavec), který je zodpovědný za produkci extracelulárních enzymů a sekundárních metabolitů, se systémem quorum sensing?
3. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) existuje ISO norma 20776-1, která se značně liší od postupu popsaného v této práci zejména počtem buněk, médiiem a vlnovou délkou použitou pro vyhodnocení. Právě využití těchto norem usnadňuje mezilaboratorní porovnání výsledků a interpretaci dosažených výsledků. Proč nebyla použita i v rámci této práce? Z jakého důvodu byla využita vlnová délka 450 nm před standardní délkou 590-600 nm? ISO norma definuje Mueller-Hinton půdu jako nejvhodnější pro *Pseudomonas* sp., jaký byl záměr ve využití i ostatních médií?
4. Využití FT-IR je jistě zajímavou myšlenkou, jak sledovat online v průtočné cele vlastnosti vznikajícího biofilmu, ale proč si autor vybral pro pozorování zrovna patogen rostlin, a ne třeba nějaký průmyslový (potravinářsky významný) kmen, který je problémem v provozech, či nemocniční kmen, který kolonizuje katetry apod?
5. Kolik biologických opakování bylo prováděno pro jednotlivé experimenty, z nichž byly vyvozeny závěry?

6. Je 2% LB půda fyziologicky podobná tomu, jaké podmínky má daná bakterie v přírodě, když infikuje rostlinu?
7. Vzhledem k tomu, jak dlouho trvá příprava biofilmu a kolik látek by člověk rád testoval, dají se průtokové komory od přístroje odpojit a vyměnit za jiné nebo je přístroj vyblokován na celou dobu měření? Je například možné sériové nebo paralelní zapojení komor?
8. Nevedla by aplikace síranu měďnatého nebo Cu-nanočástic pro ošetření rostlin ke zvýšení kontaminace životního prostředí těžkými kovy?
9. Čím jsou barveny biofilmy na obrázku 16? V metodě se uvádí, že safraninem, ale 16B vypadá spíš na krystalovou violeť, která je standardním barvivem biofilmů. Zvažoval autor využití krystalové violeti a proč se případně rozhodl pro safranin?

Celkové hodnocení disertační práce

Práci doporučuji k obhajobě, autor jasně prokázal, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopen o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty, výsledky správně interpretovat a také následně data publikovat v mezinárodních impaktovaných časopisech a sepsat do podoby disertační práce. Přeji autorovi úspěšnou obhajobu a mnoho dalších vědeckých úspěchů.

V Praze dne 10.6.2024

doc. Ing. Jitka Viktorová, Ph.D.