

Oponentský posudek na disertační práci RNDr. Jaroslava Čepla s názvem „Morfogeneze bakteriálních kolonií“

Uspořádání dizertace

Disertaci realizovanou ve studijním programu Teoretická a evoluční biologie tvoří vedle příloh strukturovaný text v celkovém rozsahu 58 stran zahrnující abstrakt, úvod, literární úvod, čtyři kapitoly věnované vlastním výsledkům dizertace a seznam použité literatury. Přílohy tvoří dva články *in extensa* již publikované v zahraničních recenzovaných časopisech, u nichž je J. Čepl uveden na druhém autorském místě, dále provizorní rukopis článku s jeho prvním autorstvím a čtyři posterová sdělení.

Téma a jeho zpracování

Disertace se zabývá morfogenezí bakteriálních kolonií, zvláště morfogenezí kmene (morfortypu) *Serratia marcescens* F a bezprostředně navazuje na předchozí výsledky řešitelského pracoviště. Zatímco předchozí práce se zaměřily na popis a klasifikaci fenoménu morfogeneze, hlavním cílem předložené dizertace je identifikace efektorů podílejících se na morfogenezi. Cíle uvedené v abstraktu dizertace jsou: (i) najít faktory ovlivňující morfogenezi kolonií typu F a pokusit se je blíže popsat; (ii) charakterizovat interakce kolonií *S. marcescens* s kmeny jiných bakteriálních druhů (*Serratia rubidaea* a *Escherichia coli*) a (iii) prostudovat dříve popsany fenomén indukované resistance k antibiotikům u uvedených modelových mikroorganismů.

První kapitola věnovaná vlastním výsledkům (kapitola 3) studuje vliv pH na morfogenezi kolonií typu F a vede ke zjištění, že tuto morfogenezi ovlivňují přechody hodnot pH z neutrálních do kyselých a zpět do alkalických, jež pravděpodobně modulují syntézu prodigiosinu a umožňují vznik typického morfortypu F. Změny pH souvisejí s dynamikou katabolismu bakterie a jsou zjevně vyvolány formováním fermentačních produktů při růstu na komplexním mediu s glukosou a produkcí amoniaku. Kapitoly 4 a 5 se vztahují ke druhé otázce a sumarizují pleť fenotypů plynoucích z interakcí mezi druhy a morfortypy. Nabízí i vysvětlení výsledků těchto interakcí na základě růstových charakteristik interagujících organismů a jimi vyvolaných změn v růstovém mediu. V kapitole 5 jsou též shrnuty výsledky SIFT-MS provedené ve spolupráci se skupinou prof. Španěla z Fyzikálního ústavu AV, jež ukazují na možnost využití této metodiky pro kvantifikaci složek smíšených kultur v reálném čase. To může usnadnit studium mezikmenových interakcí v řadě aplikací např. při studiu kompetičního fitness. Poslední kapitola se zaměřuje na analýzu fenoménu snížení citlivosti na ampicilin a možnou roli amoniaku jakožto příslušného efektoru. Důmyslná kombinace experimentů vedla k závěru, že na zdánlivém poklesu citlivosti se zásadně podílí inaktivace molekul ampicilinu v alkalickém prostředí vyvolaném produkcí amoniaku, byť určitá role amoniaku jakožto modulátoru citlivosti na celulární úrovni vyloučena nebyla.

Připomínky k formální stránce dizertace

Zatímco k bezesporu biologicky inspirujícímu a věcně náležitě zpracovanému tématu dizertace nemám, s výjimkou níže uvedených otázek, zásadní námítky, řada mých připomínek směřuje k formální a dílem i obsahové náplni dizertace. Jde zvláště o:

1. Literární úvod (str. 12-15) se téměř výhradně věnuje předcházejícím studiím řešitelského pracoviště. Není literárním úvodem ve smyslu uvedení do kontextu tematizované problematiky podpořeného relevantními literárními odkazy, který by doložil širší orientaci v řešené problematice. Absenci této části považují za nedostatek, byť tím nikterak nesnižují kvalitu úvodního textu ve smyslu názorného uvedení do experimentálního modelu.
2. Ve vlastním textu dizertace chybějí precizně definované cíle, standardní součást dizertace, které umožní čtenáři orientaci ve struktuře následujícího textu a která obvykle následuje za literárním úvodem popisujícím kontext řešené problematiky a vytyčujícími otázky k řešení. V tomto případě na úvod přímo, bez náležitého propojení, navazuje text komentující výsledky vlastní dizertace.

3. V části věnované výsledkům vlastní disertace postrádám podrobný popis použitých experimentálních metod včetně charakterizace kmenů, použitých chemikálií a složení roztoků. Jde opět o standardní část mikrobiologické studie umožňující opakování provedených experimentů. Pokud jsou všechny tyto náležitosti uvedeny v přílohách, je vždy nutno uvést náležitý odkaz. Příkladem může být formulace „*Pokusili jsme se působit na kolonie roztokem čpavku přes přepážku. Při koncentraci 0,1 % roztoku čpavku jsme pozorovali,*“ (str. 26). Podobně následující odstavec odkazuje na výsledky SIFT-MS, avšak bez upřesnění metodiky nebo náležitého odkazu na vysvětlující text (str. 42). Podobné nedůslednosti lze nalézt i v následujícím textu.
4. K jazykové kvalitě textu disertace lze mít též řadu připomínek, což může překvapit v situaci, kdy školícím místem je pracoviště s významným průnikem do humanitně vědních oborů. Na některé zjevné chyby a problematické formulace upozorňuji v elektronické verzi rukopisu.
5. Chybí seznam příloh. Čtenář tak musí pátrat, jaký je jejich obsah a relevance k disertaci. Zatímco smysl publikovaných článků je zjevný, význam nedokončeného textu dalšího rukopisu je nejasný. Posterová sdělení se vzhledem ke své předběžnosti a neúplnosti obvykle neuveřejňují (zvláště jsou-li již zahrnutы publikace obsahující tytéž výsledky) a pokud ano, nutno uvést abstrakta posterů a jejich citace ve sborníku nebo časopisu.
6. Způsob citování referencí v nepublikovaných částech textu je neobvyklý a dle mého soudu nesprávný. Např. (str. 13) „*jsou blíže popsány v (Pátková et al. 2012, str. 3-5)*“ ... při tzv. plných citacích se autoři běžně uvádějí před závorkou.
7. Za určitý nedostatek též považuji chybějící seznam dokládající dosavadní publikační aktivitu autora, který obvykle bývá součástí dizertace nebo autoreferátu.

Závěr

Lze shrnout, že ve své dizertaci se J. Čepl náležitě věnuje pozoruhodnému jevu morfologie bakteriálních kolonií a to ve snaze identifikovat faktory tento jev ovlivňující. Jeho práci lze kladně hodnotit z hlediska zvoleného tématu, zpracování experimentální části, objemu výsledků i grafické názornosti a srozumitelnosti většiny hlavního textu dizertace. Jak je však výše uvedeno, k vlastnímu textu dizertace, zvláště jejímu formálnímu zpracování, lze mít řadu kritických připomínek, u nichž si nejsem jist, že lze řešit pouhou typografickou korekcí předloženého textu. Posouzení relevance těchto připomínek nechávám na hodnotící komisi.

Otázky

1. První otázka se týká termínu *mnohobuněčnost* bakterií, který se dnes běžně používá v souvislosti s morfologií a morfogenezí bakteriálních kolonií na pevných kultivačních půdách. Jde však o termín opravdu náležitý a nematoucí? Vždyť i tradiční mnohobuněčné organismy mohou vytvářet *kolonie* nebo uspořádání na vyšší úrovni, které mohou mít rodové (genetické) pozadí, jež se vyvíjejí podle určitých pravidel, u nichž se uplatňuje komunikace, sebeztažnost, diferenciací (str. 9) a další zmíněné jevy (str. 10) a v nichž jedinci (v tomto případě opravdu mnohobuněční) kooperují způsobem analogickým komunikaci buněk v bakteriální kolonii. Strukturovaná klonální kolonie jednobuněčného organismu přece nemusí být ekvivalentem *epifenomenu hromadění se jednotlivých bakterií* (str. 9). Prosím o definici bakteriální *mnohobuněčnosti*, respektive *protomnohobuněčnosti* (str. 9) v tomto ohledu.
2. Další otázky se týkají výskytu červených skvrn na potravinách nebo hostiích. Zajímalo by mě, ve kterém ze svých textů se Aristoteles zmiňuje o tomto fenoménu. Červené skvrny na potravinách mohou pravděpodobně způsobovat i jiné organismy, např. kvasinky rodu *Rhodotorula*. Předpokládá se něco o tom, do jaké míry je za historicky doložené fenomény opravdu zodpovědná *S. marcescens/S. rubidea*? Za nezdařilou větu považuji „*Za původce podobného zázraku byla v roce 1823 určena bakterie Serratia marcescens, nebo dříve také Bacillus prodigiosus*“ (str. 8). Jde o dobu o půlstoletí předcházející objevy Pasteura a Kocha (!). Znamená to též, že již před zmíněným objevem byla tato bakterie známa pod synonymem *Bacillus prodigiosus*?
3. Významným závěrem práce je konstatování, že za spouštěním zdánlivě komplikovaných a esteticky působivých jevů stojí hra jednoduchých fyzikálních a fyziologických faktorů. Jde o faktory známé a očekávatelné, ať už jde o chemickou nestabilitu antibiotika nebo změny v pH růstového media. Ty jsou u

fakultativně anaerobních organismů ze skupiny enterobakterií běžně známé mikrobiologům pracujícím s tradičními diagnostickými půdami obsahujícími fermentovatelný substrát a acidobazický indikátor. V těchto případech tudíž nejde o sofistikovaný a pro určitý organismus specifický typ regulace jako je např. *quorum sensing* (str. 9). Myslíte si, že jde o výlučný nebo převažující charakter morfogenů uplatňujících se při vývoji bakteriálních kolonií? Pokud ano, není tudíž pochopitelný pohled na morfologii kolonií jako na *epifenomén hromadění se jednotlivých bakterií*?

4. V kapitole 4 se naznačuje, že kmen F je auxotrofní a může revertovat na prototrofii. Pokusili jste se identifikovat růstový faktor za auxotrofii zodpovědný, což by umožnilo provádět experimenty v chemicky definovaném růstovém mediu bez nutnosti reverze? Byly prototrofní klony s morfologií F po opakovaných pasážích na komplexním mediu stabilní?

5. Metoda SIFT-MS (kapitola 5) byla použita pro studium interakcí mezi kmeny různých druhů, u nichž lze předpokládat jasně odlišné profily VOC. Byla získána experimentální data ukazující na možnost resp. nemožnost použití této metody k odlišení klonů/morfotypů téhož kmene?

6. Na str. 21 se uvádí „*Takto kondiciovaný a o živiny ochuzený agar byl doplněn přidáním 50 % živin původního živného agaru. Kontrolou představuje čistý agar doplněný na 50 % živin standardního živného agaru pomocí živného bujonu (viz. DP autora; str. 72-74).*“ Jak se tento krok technicky provádí?

7. Prosím o vysvětlení významu spojení „*gnotobiologické*“ (obvykle chápáno jako „*germ free*“) v případě interakcí mezi bakteriemi („*germs*“).

8. Jak si vysvětlujete kvantitativně vysoký rozdíl mezi MIK pro ampicilinu mezi kmeny *Serratia* F a R?

V Praze, dne 5. 11. 2013



Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, PhD.

Laboratoř bakteriální genetiky
Centrum epidemiologie a mikrobiologie
Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
100 42 Praha