

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI ING. LUCIE ŠILHOVÉ „PROBLEMATIKA TVORBY, DETEKCE A OVLIVŇOVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH BIOFILMŮ“

Školitelka: Doc. Ing. Jarmila Vytršová, CSc.

Předkládaná disertační práce je zaměřena na aktuální téma nejen v potravinářské, ale i klinické mikrobiologii, tvorbu a metody detekce bakteriálních biofilmů a sledování možností ovlivňování jejich vzniku. Cílem disertační práce bylo zavést a porovnat kultivační a molekulárně-biologické metody detekce biofilmu, rozlišení živých a mrtvých buněk. Tvorba biofilmu byla sledována u zástupců rodů *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Cronobacter*, *Staphylococcus* a *Listeria*.

Práce je zpracována formou disertačního spisu, který je rozčleněn do předepsaných kapitol, sestává ze 144 stran vlastního textu a příloh, jenž obsahují sérii dílčích grafů růstu bakteriálních buněk ve vybraných médiích, elektroforetické záznamy a snímky vytvořených biofilmů z epifluorescenčního mikroskopu. Disertantka ve své práci použila 254 aktuálních, převážně zahraničních literárních a dva internetové zdroje, což svědčí o zvládnutí práce s literaturou a pečlivé teoretické přípravě při studiu a sepisování této práce. Spis je po stylistické stránce sepsán na velmi dobré úrovni s minimem překlepů, srozumitelným způsobem.

Práce je členěna do pěti kapitol. Teoretická část je věnována popisu vybraných patogenů způsobujících alimentární onemocnění, popisu tvorby biofilmů a prevenci jejich výskytu. Experimentální část zahrnuje popis použitých metod, materiálu a bakteriálních kmenů. Výsledky jsou prezentovány přehlednými grafy a obrázky, ze kterých vychází i diskuse. Výsledky práce jsou přehledně shrnuty v závěru.

Metodický přístup k řešení problematiky byl adekvátní. Použité metody jsou detailně popsány v disertační práci a zahrnují kultivační metody (Christensenovu zkumavkovou i mikrotitrační metodu, kultivaci biofilmů na kuponech) a molekulárně biologické metody na principu PCR pro detekci živých a mrtvých buněk pro arkobaktery, fluorescenční *in situ* hybridizaci včetně její optimalizace.

Drobné připomínky a podněty:

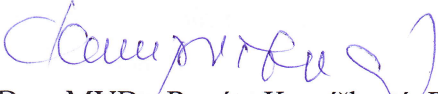
- Autorka v textu používá termín **alimentární patogen**. Jedná se o paralelu k termínům **humánní** či **animální patogen**. Tyto termíny vyjadřují, že se jedná o patogenní mikroorganismus, který vyvolává onemocnění u lidí nebo zvířat. Jakým výrazem by měl být termín **alimentární patogen** nahrazen?
- Na straně 18 je uvedeno, že „*L. monocytogenes* je schopna infikovat prostředí“, správně má být uvedeno „*L. monocytogenes* je schopna kontaminovat prostředí“.

- Autorka v práci používá termíny mikroaerofilní (str. 57, 58) a mikroaerobní (str. 16, 68), který termín je vhodnější?
- Lokalizace švédské sbírky mikroorganismů je Göteborg, ne Göteburg.
- Na straně 70 je uvedeno, že při teplotě 6 °C nedošlo k tvorbě biofilmu. Není možným důvodem fakt, že při této teplotě se sledované bakterie prakticky nepomnožují?
- Při jakých teplotách a časech docházelo u sledovaných bakterií k tvorbě biofilmu a kdy se jednalo pouze o přisedlé buňky? Uvažovala jste o využití metody konfokální mikroskopie?
- Autorka komentuje, že metoda stěru při kultivaci na kuponech není přesná. Zahraniční práce uvádí, že vhodnější je použití seškrabu kartáčkem či skalpelem.
- U některých bakterií je tvorba biofilmu kódována specifickými geny. Byly bakterie použité v experimentální práci testovány, zda nesou některé z těchto genů?
- Lze na základě vaší práce dojít k závěru, které vnější podmínky podporují tvorbu biofilmů a zda se tyto podmínky liší pro jednotlivé patogeny? Platily by tyto závěry i pro biofilmy tvořené z více bakteriálních druhů?

Ing. Šilhová je spoluautorkou šesti publikací (a další je odeslaná do redakce) v impaktovaných odborných časopisech (na třech je první autorkou), čtyř kapitol v knihách a 13 presentací na zahraničních a domácích konferencích (8krát první autorkou). Z předcházejícího výčtu publikačních aktivit je zcela bez pochyb, že disertantka jednoznačně prokázala schopnost vědecky pracovat a dosažené výsledky prezentovat na odborném fóru a zpracovat do publikovatelné formy.

Závěrem mohu konstatovat, že Ing. Lucie Šilhová prokázala ve své disertaci tvůrčí schopnosti a přinesla pro obor potravinářské mikrobiologie nové poznatky. Předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci, proto ji doporučuji k obhajobě podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb. a po úspěšné obhajobě a rigorózním řízení udělení diplomu a získání titulu Ph.D.

V Brně dne 24.8.2016


Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.

Oponentský posudek Disertační práce

Ing. Lucie Šilhová - „Problematika tvorby, detekce a ovlivňování bakteriálních biofilmů“

Předložená disertační práce absolventky doktorandského studia na Katedře analytické chemie, Fakultě chemicko – technologické, Univerzity Pardubice byla zpracována na jednoznačně významné téma tvorby bakteriálních biofilmů u patogenů, vyskytujících se v potravinářském průmyslu a detekčními metodami. Prezentovány jsou výsledky, které Ing. Šilhová získala během své několikaleté výzkumné činnosti. Práce obsahuje celkem 144 stran textu (včetně 13 tabulek, 29 obrázků, více než 200 literárních odkazů) a 31 příloh. Součástí práce je i přehled bohaté publikační činnosti Ing. Šilhové, včetně prací v impaktovaném časopise, kde je Ing. Šilhová prvním autorem.

Řešená problematika je v současné době vysoce aktuální, neboť tvorba mikrobiálních biofilmů je značným problémem (nejen) v potravinářské technologii. Patogenní bakterie (druhy rodů *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Cronobacter*, *Staphylococcus* a *Listeria*) byly ke studiu vybrány vhodně. Práce, tak jak byla zadána, je především metodického charakteru, získané výsledky by se měly stát podkladem pro výběr vhodné metody pro detekci biofilmu v praxi, ať už jde o potravinářské výroby, či o tvorbu biofilmu v jiných oborech (např. úpravy vod apod.).

Práce je členěna tradičně, literární přehled (úvod do problematiky) je vyčerpávající - na téma biofilmů existuje enormní množství odborné literatury, nicméně prací, které by se zabývaly vlastním zkoumáním tvorby biofilmu zase tolik není. Veškeré použité metody jsou vhodně a velmi podrobně popsány, jistě i s ohledem na to, že se jedná především o práci metodickou. Autorka provedla veliký počet vlastních experimentů, což svědčí o její velké pili a pracovním nasazení. Výsledky jsou diskutovány odpovídajícím způsobem. Ze získaných výsledků osobně významně oceňuji především výsledky, týkající se polymerázové řetězové reakce s využitím interkalačních barviv, což umožní odlišit DNA z živých či mrtvých buněk. Toto je pro praktické využití velmi přínosné, protože právě záchyt DNA z mrtvých buněk využití PCR v praxi do určité míry omezoval.

Celá práce je po formální stránce velmi pečlivě napsána, a plně vyhovuje požadavkům kladeným na disertační práci. Navíc rukopis obsahuje relativně málo překlepů či nepřesností. Ing. Šilhová svojí prací významně posunula znalosti ohledně metod studia biofilmů kupředu.

Přípomínky a dotazy, které k práci mám, jsou spíše diskusního charakteru a v žádném případě nesnižují kvalitu předložené práce:


- Výběr jednotlivých patogenních kmenů byl široký. Podle mého názoru by však bylo dobré pro další práci na této problematice zařadit více divokých kmenů a testovat i mezidruhovou rozdílnost ve schopnosti tvořit biofilm (očekávám velkou rozdílnost). Uvědomuji si však, že tato činnost svým rozsahem přesahuje zadání disertační práce Ing. Šilhové.
- Domníváte se, že Vámi optimalizovaná metoda fluorescenční in situ hybridizace je využitelná i pro „divoký biofilm“? V čem vidíte hlavní omezení této metody?
- Které testované metody (v případě většího počtu v jakém pořadí) byste vybrala resp. doporučila, kdyby bylo třeba prakticky vyšetřit biofilm v nějaké potravinářské výrobě?

Závěr:

Celkově konstatuji, že Ing. Šilhová jednoznačně prokázala své vědecké schopnosti a předloženou doporučuji její přijetí jako práci disertační. Navrhují udělit akademický titul „philosophiae doktor“ („PhD“).

V Praze

dne 18.8.2016


.....
Podpis oponenta

Posudek disertační práce Ing. Lucie Šilhové

Problematika tvorby, detekce a ovlivňování bakteriálních biofilmů

Předložená disertační práce, byla vypracována na Katedře analytické chemie, Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, pod vedením školitelky Doc. Ing. Jarmily Vytřasové, CSc.

Studiem biofilmů se v posledních letech zabývá celá řada mikrobiologů. Vznik biofilmu je přirozený jev, který probíhá všude tam, kde jsou mikroorganismy a kontaktní povrchy. Pro mikroby v přírodě je biofilm forma naprosto přirozená, je základním způsobem jejich existence. Fenomén biofilmu, jako výsledku kolonizace bakterií na površích technologických zařízení, se tak dostává do povědomí potravinářů a pracovníků zodpovědných za hygienu výroby z hlediska mikrobiologie. V centru pozornosti jsou práce, které pomáhají porozumět odolnosti biofilmů k antimikrobiálním látkám. Sledují se podmínky jejich difuze, hydrodynamiky, fyziologie a genetického pozadí tolerance testovaných mikroorganismů. V tomto kontextu je předložená dizertace vysoce aktuální a potřebná.

Práce měla komplexní zadání, neboť problematika tvorby bakteriálních biofilmů je stále aktuálním problémem nejen v potravinářském průmyslu ale také také v medicíně. Práce se soustředila na patogeny náležející do rodů *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus* a *Cronobacter* a evaluaci metod v současnosti používaných ke studiu biofilmů.

Autorka své výsledky zpracovala do celkem 160 stran textu včetně doplňujících grafů a snímků z epifluorescenčního mikroskopu. Práce je členěna do čtyř úseků, pátou kapitolu tvoří závěr. Co však práce postrádá, jsou cíle práce, tuto část nelze nahradit úvodem.

Literární rešerše je svědomitě vypracovaná (33 str.) je rozsáhlá a kvalitně zpracovaná. Seznam literatury je velice obsáhlý, i když obsahuje převahu údajů staršího data. Prací po roce 2010 je odhadem asi 20%. Část věnovaná materiálu a metodám uvádí většinu metodických postupů, avšak část 2.3.4, Polymerázová řetězová reakce není podle mého názoru dostatečně informativní, neboť tabulka č. 3, uvádějící použité primery je v části 2.14.2 – Pracovní roztoky. V části 2.3.5.1 EME/PMA- PCR pro arkobaktery, jsou použity zkratky, které nejsou na seznamu zkratk (ARCO, BUTZ, CRY).

Připomínky a dotazy:

1. Na str.103 (diskuse) : „Výjimkou byla pouze *Listeria innocua*, která tvořila biofilm jen při 6 °C v peptonové vodě s 1% NaCl, kdy byla zařazena mezi silně biofilm- pozitivní kmeny.“ Znamená to, že *L.innocua* při vyšších teplotách biofilm netvořila?

Nenašla jsem v práci graf, který by tento závěr dokumentoval. Na jakém základě byl učiněn tento závěr?

2. Metoda PCR s využitím barviv EMA a PMA byla zavedena ke zjištění podílu živých buněk v biofilmu. V předložené práci jsem výsledky např. podíl živých buněk po kultivaci biofilmu na kuponu nenalezla. Byly tyto hodnoty naměřeny?
3. Staří latiníci říkali: „Finis coronat opus.“ Závěr této práce (část 5) je na třech stránkách a má narativní formu. Upřednostnila bych jasně a stručně formulované výsledky, kterých bylo v disertaci dosaženo.
4. Z těchto důvodů bych se chtěla zeptat, kterých výsledků uvedených v disertaci si Ing. Lucie Šilhová nejvíce cení.

Předložená disertační práce Ing. Lucie Šilhové „Problematika tvorby, detekce a ovlivňování bakteriálních biofilmů“ se věnuje porovnání a vyhodnocování několika v současnosti používaných metod pro studium biofilmů. Disertace dokazuje schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje, podle § 47, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách.

Doporučuji proto komisi pro obhajoby Fakulty chemicko-technologické, Univerzity Pardubice, aby práci po úspěšné obhajobě přijala jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze dne 17.8.2016



Doc. RNDr. Jarmila Pazlarová, CSc.