

POSUDEK VEDOUcíHO DIPLOMOVÉ PRÁCE

Mikrobiální zátěž potravinářských provozů a spolehlivost ochranných obalů potravin

Autor: **Bc. Michaela Vidrmová**

Téma diplomové práce Michaely Vidrmové bylo zadáno Laboratoří lékařské mykologie OKM Pardubické krajské nemocnice, a.s. jako studie, která by umožnila ucelený pohled na mikrobiologickou a mykologickou problematiku pekárenských provozů. Kromě sledování mikrobiální kontaminace prostředí a pekárenských výrobků se studie zaměřila také na obalovou techniku a v této souvislosti pak v experimentální části práce na prostupnost obalů pro mikrobiální agens. Získaná zjištění pak byla dána do souvislosti s možnými zdravotními riziky.

Pro potřeby studie shromáždila diplomantka značný počet literárních pramenů včetně státních norem, o které se opírá v teoretické části práce a které se rovněž promítají i do laboratorní metodiky u prováděných experimentů. Jak problematické je získat potřebný biologický materiál pro zadanou studii diplomantka zjistila již na začátku práce, kdy pouze dva ze všech oslovených subjektů souhlasili, aby se v jejich provozovnách sběr materiálů provedl. I přes tento poněkud společenský problém se však podařilo získat reprezentativní počet vzorků. Na základě jejich mikrobiologického rozboru doplněného o experimentální hodnocení vlivu mikroorganismů na obaly používané v sledovaných provozech a rovněž na základě velmi dobře zvládnuté literární rešerše se diplomantce podařilo uskutečnit velmi kvalitní diplomovou práci.

Z pohledu vedoucího diplomové práce mohu konstatovat, že se Michaela Vidrmová zadaného tématu zhostila velmi zdařile. Díky své pečlivosti, houževnatosti a studiu se velmi rychle orientovala v laboratorních technikách a ve velmi krátké době již pracovala naprosto samostatně, včetně pořizování technické dokumentace. Předpokládaný harmonogram mírně narušilo pouze zdržení při získávání potřebných biologických vzorků, diplomantka si však i přes tuto skutečnost dokázala rozložit své síly pro laboratorní práci a zvýšeným úsilím časovou ztrátu dohnat.

Zadané úkoly a vytýčené cíle práce se autorce předložené studie podařilo splnit. Z praktického pohledu pak byla prostřednictvím předložené studie zjištěna řada poznatků. Jedním ze zásadních bylo např. zjištění, že žádný z testovaných potravinářských obalů nebyl prostupný pro mykotická agens, nebo fakt, že ani v jednom z testovaných provozů nebyla zachycena přítomnost patogenů..

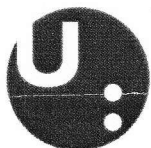
Předložená diplomová práce Bc. Michaely Vidrmové představuje velmi dobrou odbornou studii, která plně splnila požadavky jejího zadání. Vzhledem k aktivnímu přístupu k zadané problematice, samostatnosti v práci a kvalitě odevzdané studie **doporučuji** magisterskou diplomovou práci Bc. Michaely Vidrmové k obhajobě a hodnotím ji stupněm :

v ý b o r n á .

V Pardubicích dne 14.5.2011



MUDr. Karel Mencl, CSc.
ordinář lékařské mykologie
Oddělení klinické mikrobiologie
Pardubická krajská nemocnice, a.s.



POSUDEK OPONENTA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Michaela VIDRMOVÁ:

Mikrobiální zátěž potravinářských provozů a spolehlivost ochranných obalů potravin

Diplomantka se ve své diplomové práci zabývala studiem výskytu mikroorganismů v prostředí, vstupních surovinách a finálních výrobcích tří potravinářských provozů. Dále prováděla hodnocení ochranné funkce pěti obalů používaných v jednotlivých provozech z hlediska jejich prostupnosti pro mikroorganismy.

Téma diplomové práce je velmi aktuální, protože mikrobiologická kontaminace potravin může u člověka vést k rozvoji alimentárních infekcí či intoxikací. V zachování zdravotní nezávadnosti potravin hraje nepochybně klíčovou roli kvalitní a neporušený obal. Nové trendy v obalové technice představují aktivní a inteligentní obaly. Jedním z příkladů jsou obaly s antimikrobiální funkcí, využívané zejména pro prodloužení trvanlivosti baleného pečiva.

Práce má ucelenou teoretickou část zahrnující informace o potravinářském průmyslu, jeho dělení a jednotlivých fázích procesu pekařské výroby. Dále je zde hodnocena problematika kontaminace pekárenských výrobků mikroorganismy a jejich patogenní potenciál pro člověka. V teoretické části jsou také uvedeny zákony a vyhlášky související s potravinářskými provozy. Kapitola obsahuje informace o obalech používaných v potravinářském průmyslu a možnostech laboratorní diagnostiky mikrobiální kontaminace potravinářských provozů.

Výsledky jsou doloženy řadou tabulek a barevnými přílohami s fotografiemi dokumentujícími záchyt některých druhů mikroorganismů z odebraných vzorků a hodnocení kvality obalů.

V kapitole Diskuse jsou uvedeny pouze obecné názory diplomantky a chybí konkrétní srovnání s publikovanými poznatky. Tento závažný úsek diplomové práce neodpovídá požadované náplni kapitoly.

Kapitola Závěr pak přehledně shrnuje nejvýznamnější zjištění.

V literární rešerši diplomantka shromáždila 43 citací především české provenience, z nichž některé (např. odkaz č. 43) nepředstavují ověřené vědecké zdroje.

K diplomové práci mám následující připomínky:

- Některé anglické výrazy použité při překladu souhrnu nejsou po gramatické stránce správné.
- Obrázky (kresby, schémata, fotografie) vkládané do textu by měly být vždy opatřeny pořadovým číslem a popisným textem (vše uvedeno pod příslušným obrázkem).
- Použité obrázky a tabulky by měly být odkazovány v textu.
- Kapitola 2.2.2 Kypření těsta (str. 10-11) obsahuje některé informace, které obsahově více odpovídají kapitole 2.2.3 Hodnocení a kvalita pekárenského droždí.
- Na str. 12 (poslední odstavec) je krmné droždí řazeno k potravinářskému droždí. Předpokládám, že se jedná o chybné formátování.
- Na str. 15 (první odstavec) je uvedena chybná formulace: „...můžeme toto agens rozdělit na alimentární infekce a intoxikace.“
- Na str. 17 (odstavec 7) je neobvyklá formulace: „...potravy, ve které se produkovaný toxin pomnoží.“
- Na str. 18 (první odstavec) je chybně uvedeno, že *Bacillus cereus* je Gram-negativní tyčinka.
- Podkapitola Onemocnění způsobená druhem *Bacillus cereus* (str. 17-18) obsahuje informace o kontaminaci potravin plísněmi a kvasinkami. Předpokládám, že se opět jedná o chybné formátování.
- Na str. 25 uvádíte, že limity pro jednotlivé skupiny mikroorganismů jsou vždy stanoveny tak, aby byly pod hranicí zdravotního rizika. Avšak žádné konkrétní hodnoty neuvádíte. Pro dokreslení sdělované informace by to bylo vhodné.
- Kapitoly 2.6.2 Posuzování mikrobiální kontaminace poživatin a prostředí a 2.6.3 Mikrobiologické vyšetření obalů jsou velmi strohé a obsahují pouze výčet používaných metod. Bylo by vhodnější jednotlivé metody více popsat a uvést příklady jejich konkrétního použití. Očekávala bych také srovnání s metodami doporučovanými v zahraničí (např. v rámci EU).
- V experimentální části, v kapitole Výsledky i v Příloze se vyskytuje řada zkratk a označení pro kultivační média (STH, ST, SB, 8% SB aj.). Bylo by vhodné označení sjednotit a zaznamenat do Seznamu zkratk.

- V experimentální části není uveden původ a šarže jednotlivých kultivačních médií a jejich složek. Totéž se týká používaných biochemických testů.
- V experimentální části není uvedeno množství vzorku (vstupní, finální výrobek), které bylo testováno.
- Na str. 38 není uvedena doba, po kterou byly inkubovány mikrokultury plísní.
- U kapitoly 4.4 Hodnocení kontaminace prostředí pekárenských provozů není uvedena metoda, jakou byly vzorky vyšetřeny.
- U tabulky 12 (str. 51) je chybně uvedeno: „Přehled bakterií...“. Jedná se o výsledky mykologického vyšetření.
- V tabulkách „Přehled bakterií...“ nebo „Přehled plísní...“ je v některých případech uveden záchyt *S. cerevisiae*. Bylo by vhodné názvy tabulek přizpůsobit jejich obsahu.
- Str. 55 obsahuje tvrzení: „...odolnost vůči prorůstání mikroorganismy a plísněmi.“ Plísně patří mezi mikroorganismy.
- Každá tabulka by měla mít legendu vysvětlující zkratky, které jsou v ní použity. Tato legenda by měla být pod tabulkou (ne na jiné straně). V opačném případě ztrácejí tabulky vypovídací hodnotu. Pokud tabulka pokračuje na další stránce, uvádí se názvy sloupců na každé straně.
- V kapitole Výsledky se objevuje velké množství chyb v názvosloví mikroorganismů.
- Literatura není citována v souladu s normou ČSN ISO 690, ČSN ISO 690-2.

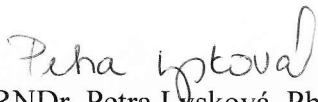
Při obhajobě diplomové práce by mohla diplomantka zodpovědět tyto doplňující dotazy:

- Na str. 21 uvádíte, že systém HACCP k zajištění bezpečnosti potravin je v současnosti povinný pro všechny provozovatele potravinářských podniků v EU. Ovšem na str. 59 doporučujete jako jedno z řešení pro omezení kontaminace potravin zavedení systému HACCP. Je tedy v ČR systém zaveden nebo není?
- V experimentální části zcela postrádám bližší specifikaci obalů, které diplomantka testovala - materiál, z kterého byly vyrobeny, výrobce. Označení, které diplomantka uvádí v kapitole Výsledky (folie se žlutým potiskem, apod.) je zcela nedostačující. Mohla by diplomantka tyto skutečnosti doplnit?

- V řadě vzorků byly zachyceny sporulující mikroorganismy. Na str. 45 je pak uvedeno, že se jedná konkrétně o *B. cereus*. Mohla by diplomantka popsat, jakým způsobem byla prováděna identifikace této bakterie a jaký je její potenciál z hlediska alimentárních intoxikací?

Předložená diplomová práce představuje velice zajímavou studii, jejíž kvalitu bohužel snižují nepřesnosti, formální nedostatky a gramatické chyby. Nicméně je nutno ocenit značné množství manuální práce při odběru a zpracování tak velkého množství vzorků. Diplomovou práci proto **doporučuji** k obhajobě a hodnotím známkou **DOBŘE**.

V Pardubicích dne 16. 5. 2011


RNDr. Petra Lysková, Ph.D.

Posudek školitele na diplomní práci Bc. Hany Málkové na téma

Stanovení disociačních konstant léčiv faktorovou a regresní analýzou absorbanční matice

Spektrofotometrické stanovení disociačních konstant léčiv představuje nalezení chemického modelu systému, t. zn. počtu částic, jejich stechiometrii, jejich rovnovážné koncentrace spolu s disociačními konstantami a molárními absorpčními koeficienty rozličně protonovaných částic regresní analýzou spekter nebo pH-potenciometrických titračních křivek. Pomůckami jsou přitom regresní diagnostiky k ověření věrohodnosti hledaného modelu, dále faktorová analýza k určení počtu všech světlo-absorbujících částic rovnovážné směsi a konečně statistická analýza reziduí aplikované nelineární regrese. Je obtížné a trvá obvykle dlouho, než se student naučí v regresní analýze diagnostikovat s náročnějším softwarem SQUAD a SPECFIT v analýze spekter a ESAB a HYPERQUAD v analýze potenciometrických titračních křivek a začne získávat validní výsledky. I po úspěšné zkoušce z chemometrie není pro studenta snadné se orientovat v numerických metodách vícerozměrné faktorové analýzy k určení hodnoty matice, která se zde rovná počtu světlo-absorbujících částic analýzou vějíře spekter.

Bc. Hana Málková se zapracovávala v obtížné počítačové regresní technice na diplomové práci v letním semestru 4. ročníku, a s problémy zvládla nelineární regresi, metody faktorové analýzy spekter, makra tabulkového procesoru Excel, a stejně jako i objektivě orientovaný statistický systém S-Plus. Programy SQUAD a SPECFIT otestovala řadu hypotéz chemického modelu, než dospěla k relevantním závěrům, které snesly srovnání s kvantově-chemickou predikcí pK od softwaru MARVIN, PALLAS a SPARC.

Cenné na diplomové práci Hany Málkové je věrohodné regresní vyhodnocení pH-absorbančních responzních ploch a potenciometrických pH-titračních křivek, a tím i věrohodné a publikovatelné odhady smíšených ale také termodynamických disociačních konstant studovaných tří léčiv, a to ***fyzostigmin salicylátu, risendronátu sodného a butamirátu dihydrogencitrátu*** při 25° a 37°C. Vlastní diplomová práce je napsaná publikačním jazykem za minimálního opisování poznatků z literatury a s elektronickým zařazováním obrázků z Originu do textu. Práce ukazuje na zvládnutí textového editoru Word 2007 dle zásad počítačové typografie. Prokazuje tím solidní připravenost k prezentaci výsledků své vědecko-výzkumné práce, získaných interaktivní počítačovou analýzou experimentálních dat.

Přes počáteční problémy s nastudováním analýzy rovno vah v roztocích náročnější nelineární regresi vícerozměrných responzních ploch se dotýčná svou pílí nakonec dopracovala relevantních výsledků. Předloženou diplomovou práci nakonec dokázala, že je připravena k vědecko-výzkumné práci s interaktivní počítačovou analýzou dat. V experimentální práci lze její pečlivost měření, a tím také věrohodnost dat sledovat ve velmi nízkých směrodatných odchylkách regresovaného signálu, zde absorbance (nebo pH), a to okolo 0.3 mAU, totiž veličiny, v níž se propagují náhodné chyby a šum celého experimentu. Dosažené výsledky považují proto za cenné, protože umožní dokončení dvou publikací do zahraničních impaktovaných časopisů, kde na sděleních bude spoluautorkou. Protože lze její výsledky dovést až do publikačního stádia, hodnotím její celkovou aktivitu na diplomové práci známkou

Výborně až velmi dobře.

V Pardubicích 15. května 2011


Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Posudek školitele

Téma diplomové práce: Hodnocení spektrofotometrických metod pro semikvantitativní analýzu peptidů v proteomice

Jméno studentky: Bc. Michaela Nováková

Vedoucí práce: PharmDr. Jiří Dresler
RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Studentka Michaela Nováková vypracovala diplomovou práci na pracovišti Ústavu molekulární patologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Téma její diplomové práce úzce souvisí s řešenými projekty obranného výzkumu Biodefence a Spektrometrie, které se zaměřují na výzkum a vývoj metod identifikace bakterií pomocí tandemové hmotové spektrometrie a rovněž zapadá i do komplexního konceptu tohoto proteomického pracoviště.

V průběhu práce se studentka úspěšně seznámila s řadou technik od kultivace bakterií přes vlastní zpracování proteomických vzorků až po testované semikvantitativní analýzy. Studentka si se všemi částmi práce poradila velmi dobře, její práce byla velmi samostatná a vyznačovala se spolehlivostí a laboratorní zručností. V otázce analýzy výsledků prokázala potřebnou míru orientace a logického uvažování. Vlastní testování bylo provedeno na širokém spektru komplexních proteinových vzorků a to jak na úrovni proteinů, tak na úrovni jejich peptidových fragmentů. Výsledkem její práce je validovaná metoda pro semikvantitativní analýzu naštěpených proteinů komplexních vzorků. Cíl diplomové práce tedy splněn byl. Kromě experimentálních schopností prokázala studentka i schopnost práce s literaturou, jak dokládá její diplomová práce. Náročnost zpracování daného tématu podtrhuje i fakt, že problematika spektrofotometrické kvantifikace na úrovni peptidů je v proteomice oblast relativně málo probádána.

Jako školitel považuji práci za úspěšně vykonanou a jednoznačně **doporučuji k obhajobě s ohodnocením výborně.**

V Hradci Králové dne 12. 5. 2011

PharmDr. Jiří Dresler



Posudek vedoucího diplomové práce

Diplomantka: **Bc. Zdeňka Martinková**

Název diplomové práce: **Izotachoforetické stanovení urotropinu.**

Úkolem diplomantky bylo vypracování literární rešerše na téma význam, základní reakce a metody stanovení urotropinu a dále ověření a optimalizace izotachoforetického stanovení urotropinu.

Zatímco rešeršní část práce se diplomantce podařilo zvládnout velmi dobře, i když snad až s příliš velkým důrazem na internetové zdroje informací, určité potíže měla se zvládnutím přístrojové techniky i s vlastním měřením a zvláště s interpretací výsledků měření. To se projevilo i ve zpracování experimentální části diplomové práce, která mohla být při řádném zpracování všech měření poněkud obsáhlejší. Situaci jí trochu komplikovala i roztěkanost a menší vnímavost k radám a pokynům. K experimentální práci ale přistupovala aktivně, i když poněkud mechanicky. Je možné konstatovat, že všechny úkoly uvedené v zadání diplomové práce splnila.

Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou:

v ý b o r n ě - m

V Pardubicích 19.5.2011


Ing. Martin Bartoš, CSc.

Hodnocení školitelky

Doktorandka: Ing. Petra Motřková (roz. Šnévajsová)

Školitelka: doc. Ing. Jarmila Vytrřasová, CSc.

Název práce: Metody izolace a imobilizace DNA plísni rodu *Aspergillus* a její analytická detekce

Ing Petra Motřková je absolventkou studijního oboru Hodnocení a analýza potravin na Katedře analytické chemie Univerzity Pardubice. Po ukončení studia zahájila prezenční doktorské studium na KAICH s pracovištěm na KBBV a po přijetí na místo asistentky na KBBV byla přeřazena do kombinované formy doktorského studijního programu.

Po celou dobu doktorského studia projevovala nevšední zájem o zvolený obor. Od počátku se aktivně zapojila do výzkumné činnosti i pedagogického procesu. Podílí se na realizaci řady projektů, je spoluřešitelkou několika grantů (TANDEM, TIP, GAČR), v roce 2008 byla hlavní řešitelkou projektu FRVŠ. Aktivně se podílí na výuce laboratoří z obecné a potravinářské mikrobiologie i na prezentacích našeho oboru v rámci akcí fakulty. Je konzultantkou celé řady diplomových prací, pravidelně vede bakalářské práce.

Úkoly dokáže řešit zcela samostatně, s maximální zodpovědností a pečlivostí. Z výsledků je schopna vyvozovat vlastní smysluplné závěry a diskutovat o možnostech dalšího řešení. Čile se zajímá o nové poznatky v oboru a značnou měrou se podílí i na inovaci výuky. Je zručnou experimentátorkou, zvládla celou řadu náročných technik, které využila jak pro svoji doktorskou práci, tak při práci s diplomanty. Je iniciativní, ochotná vždy pomoci a pracuje velmi často nad rámec svých povinností.

Výsledky své odborné činnosti prezentovala na mnoha seminářích a konferencích doma i v zahraničí nebo ve formě publikační (v impaktovaných časopisech a v celé řadě neimpaktovaných časopisů či sborníků).

Program svého doktorského studia plnila podle plánu a úspěšně vykonala státní doktorskou zkoušku. Její disertační práce beze zbytku splňuje cíle zadání.

Z hlediska školitele konstatuji, že Ing. Petra Motřková splňuje všechny podmínky pro zahájení řízení k získání vědeckého titulu Ph.D.

V Pardubicích 24. 3. 2011


doc. Ing. Jarmila Vytrřasová, CSc.

Posudek disertační práce Ing. Petry Motkové

Metody izolace a imobilizace DNA plísní rodu *Aspergillus* a její analytická detekce

Předložená disertační práce, byla vypracována na Ústavu analytické chemie, Fakulty chemické technologie, Univerzity Pardubice, pod vedením školitelky Doc. Ing. Jarmily Vytřasové. Práce měla stanoveny dva cíle: jednak optimalizaci izolace DNA studovaného organismu a dále zavedení elektrochemické detekce hybridizace DNA získané z příslušníků rodu *Aspergillus*. Zvolené téma je dobře vybrané a vyplňuje mezeru, která v problematice studia toxinogenních vláknitých hub v naší zemi existuje.

Ve svém posudku se budu zabývat pouze první částí této disertace. Autorka své výsledky předkládá na 129 stranách textu, doplněných ještě rozsáhlou přílohou. Práce nemá standardní členění, neboť diskusní část práce je spojena s výsledky, což je pro disertaci dosti neobvyklé.

Úvodní část věnovaná současnému stavu řešené problematiky vzhledem ke komplexnosti problematiky má odpovídající rozsah, 37 stran. Část věnovaná DNA a plísním rodu *Aspergillus* je věnovaná přehledu izolačních metod DNA. Zařazení schématu 1 do části 2.5 Polymerázová řetězová reakce, (v rozsahu jedné stránky) by si zasloužilo novější odkaz, nežli ten, který nese datum stažení 14.10. 2007. Kromě toho toto schéma není v seznamu literatury podobně jako obr. č.1, který má pod obrázkem také datum stažení rok 2007. Nevím, proč jsou v rešerši opomenuty základní údaje o genetice tvorby mykotoxinů u vláknitých hub, zde tedy u příslušníků rodu *Aspergillus*, které obsahují seskupení až 25 genů, které kódují enzymy nutné pro syntézu toxických a karcinogenních sekundárních metabolitů, tvořících prekursorů pro aflatoxin. Vztahy mezi specifickými transkripčními regulátory pro aktivaci jednotlivých genů této dráhy jsou komplikované a dosud ne zcela objasněné. Tím myslím produkt *aflR* genu, jehož aktivace je závislá na fyziologickém stavu mycelia a na stupni asexuální sporogeneze (tvorba konidií). O tomto genu je první zmínka na str.72 a je doplněna pouhými dvěma odkazy, zdůvodnění výběru ostatních genů je rovněž neuspokojivé. Vzhledem k faktu, že analýza přítomnosti tohoto genu (*aflR*) se objevuje v závěrech práce, prosím o vysvětlení tohoto opomenutí.

Tím se dostávám k metodické části práce, kde na str. 62 je uvedena celá řada primerů, u kterých není uvedeno, jak byly navrženy, nebo z čeho převzaty. Disertantka testovala osm způsobů izolace DNA, a správně našla skutečnost, že kvalita narušení buněčné stěny rozhoduje o úspěšnosti izolace a o čistotě získaného produktu. Tabulky 7a a 7b pokládám za klíčové vyhodnocení testovaných postupů. Podle mého mínění tyto výsledky patří do výsledkové části, a nikoli do příloh. Na našem pracovišti se pro izolaci DNA z vláknitých hub nelépe osvědčila následující metoda: Dneasy Plant MiniKit od firmy Qiagen (Německo). V této souvislosti kladu otázku co ovlivnilo výběr a počet testovaných metod izolace DNA?

Práce je napsaná vcelku pečlivě, ale tiskařský šotek se objevil v závěru jednak ve velmi zajímavém výrazu: str.124., 8. řádek shora “eppendorckový” homogenizátor, český výraz mikrozkuhavka by byl vhodnější, Tento výraz (eppendorfka) se v práci objevuje střídavě s jedním “p” (str.88) nebo jinde se dvěma, dále 13. řádek od spodu překlep ve slově “nespecifické”. Ještě jeden výraz není v pořádku a to “diatom”, který je průběžně používán v celé práci. Čeština má přesnější termín – rozsivky, nebo rozsivková zemina, každý ví, že se jedná o unikátní křemičitanové schránky řas. První věta na stránce 99 :”Autoři využívají poznatku, že se DNA v přítomnosti chaotropních solí váže na povrch křemičitých částic nebo diatomu”, tak opakuje stejný fakt.

Seznam literatury obsahuje úctyhodné množství – 225 citací. Způsob uvádění jmen autorů je nestandardní, mám na mysli používání zkratky et al., podle neznámého klíče. Nejsou zařazeny internetové citace v práci použité. Česká norma vyžaduje u webových stránek si poznamenat dlouhou adresu stránky, tedy např.

http://www.greenchameleon.com/gc/blog_detail/folksonomies_and_rich_serendipity/ místo samotného serveru (<http://www.greenchameleon.com/>), rovněž je nutné uvádět datum citace, tedy datum, kdy byl text na webu čten.

Závěr:

Předložená disertační práce Ing. P.Mořkové „Metody izolace a imobilizace DNA plísni rodu *Aspergillus* a její analytická detekce“ ukazuje způsoby a postupy pro izolaci DNA z mycelu vláknitých hub a z potravinářských vzorků“ vyhodnotila účinnost osmi způsobů izolace DNA s ohledem na její procesivitu. Dále byla prokázána vysoká shoda kultivační detekce (AFPA) toxinogenních mikromycet s molekulárně biologickou detekcí (PCR) genů odpovědných za biosyntézu mykotoxinů.

Ing. P. Mořková dokázala 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 Katedry analytické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice aby disertační práci přijala po úspěšné obhajobě jako podklad k udělení titulu PhD.

Praze 10. 5. 2011


Doc. RNDr. Jarmila Pazlarová, CSc.

Oponentský posudek disertační práce

Metody izolace a imobilizace DNA plísni rodu *Aspergillus* a její analytická detekce

Ing. Petry Mořkové

Oponentka: Mgr. Petra Horáková, Ph.D., Biofyzikální Ústav AV ČR v.v.i., Brno

Ing. Petra Mořková se ve své disertační práci zabývala detekcí potenciálně aflatoxinogenních plísni rodu *Aspergillus* pomocí specifických úseků jejich DNA. V rámci této práce byly porovnávány a optimalizovány jak klasické metody izolace DNA z plísni, tak postupy využívající komerčně dostupné soupravy. Po izolaci DNA byly pomocí PCR amplifikovány a elektroforeticky detekovány úseky genů *apa-2*, *ver-1* a *aflR*, hrající klíčovou roli při tvorbě aflatoxinů. Získané poznatky byly využity pro analýzu sbírkových kmenů rodu *Aspergillus* a také pro potenciálně aflatoxinogenní plísně získané z reálných vzorků BIO čajů, koření a bylin. V druhé části se autorka zaměřila na elektrochemickou detekci genu *aflR* pomocí hybridizace se sondou značenou enzymem s využitím uhlíkových elektrod.

Jde tedy o práci, která řeší problematiku velmi zajímavou a vysoce aktuální, zejména z hlediska využití v potravinářství, kde také elektrochemické metody mohou nalézt uplatnění jako rychlá a méně nákladná alternativa oproti dosud užívaným metodám.

Disertační práce je přehledně členěna do několika kapitol. Teoretickou část tvoří literární souhrn dosavadních znalostí uvádějících do problematiky tématu disertační práce. Tato kapitola je zpracována přehledně a srozumitelně a je doplněna 225 odkazy na původní zdroje informací, což svědčí o autorčině dobré orientaci v odborné literatuře. Bohužel zde autorka uvedla několik nepřesností, které však nesnižují významně celkovou kvalitu předložené práce (vybrané příklady viz připomínky a komentáře).

Vysoce hodnotím Experimentální část a kapitolu Výsledky a diskuze této disertační práce. V experimentální části jsou detailně popsány pomůcky, reagentie a postupy použité při vlastní práci. Kapitola Výsledky a diskuze představuje výstupy získané experimentální prací autorky vhodně doplněné obrázky, grafy a tabulkami (některé jsou v části Příloha) o vysoké technické úrovni. Zde bych chtěla zvláště ocenit množství, logickou návaznost a komplexnost prezentovaných výsledků. Také velmi dobře zpracované diskuze a komentáře k jednotlivým výsledkům svědčí o autorčině vysoké odborné kvalifikaci.

Celá práce je zpracována pečlivě a přehledně, po formální, jazykové a stylistické stránce jí lze vytknout pouze drobnosti.

Ve svém hodnocení nemohu opomenout fakt, že odborné kvality Ing. Petry Mořkové podtrhuje také to, že je první autorkou jedné publikace a spoluautorkou dalších tří, které jsou publikované v kvalitních mezinárodních časopisech (jedna z nich je dosud v publikačním

řízení). Dále je první autorkou kapitoly v knize a své výsledky samostatně prezentovala na několika mezinárodních i národních konferencích.

K práci mám tyto připomínky a komentáře:

- v seznamu zkratk jsou některé metody nedostatečně vysvětleny (př. IPA - metoda IPA, apod.), dále zde jsou nesprávně uvedené (a v textu dále používané) některé české názvy (př. GCE - elektroda ze skelného uhlíku, ne skelná uhlíková elektroda; CFE - elektroda z uhlíkových vláken, nikoli vláknitá uhlíková elektroda; RT-PCR – PCR, které předchází reverzní transkripce, ne reverzní transkriptázová PCR, ...)

- kapitola 2.3.2 – u některých příkladů publikovaných metod izolace DNA autorka nesprávně zaměňuje real-time PCR (kvantitativní PCR v reálném čase) za RT-PCR (PCR spojenou s reverzní transkripcí), pro kterou by byla izolována mRNA nikoli DNA (př. Sweeney 2000 - autorka uvádí příklad izolace DNA z dané publikace ne RNA, Haugland 2002, Schmidt 2004)

- kapitola 2.8.3.3 str. 43 – v kapitole o imobilizaci DNA vazbou streptavidin-biotin jsou nevhodně zvolené příklady - Kouřilová (2005), Fojta (2004) a Horáková-Brázdilová (2008) – nejedná se o imobilizaci DNA na elektrodu vazbou streptavidin-biotin, ale o uchycení značky - enzymu na již imobilizované DNA

- kapitola 2.8.5.4 str. 54 – v kapitole o detekci DNA pomocí značení nanočásticemi autorka nesprávně uvádí příklady, kdy jsou nanočástice použity jako nosič pro imobilizaci DNA a neslouží pro detekci (Paleček 2002a, Paleček 2002b, Fojta 2007, atd.)

- kapitola 4.6.3 str. 68 – autorka zavádí pojem „lyzát“ – avšak o lyzát se rozhodně nejedná, když je zde myšlena purifikovaná DNA izolovaná z lyzátu mycelia plísně *Aspergillus*. Autorka tento pojem používá i dále v textu, kde se ovšem o lyzát mycelia obsahující neseparovanou a nepurifikovanou DNA jedná pouze v případech, kdy byl použit postup popsáný v kapitolách 4.6.4 nebo 4.6.5. Nelze též hovořit o „lyzátu DNA“ viz str. 87, protože lyze bylo podrobena mycelium ne DNA)

- autorka uvádí, že při optimalizaci elektrochemické detekce hybridizace DNA využila kromě pastových a tištěných uhlíkových elektrod také elektrodu ze skelného uhlíku a senzory BVT, uvítala bych, kdyby výsledky získané pomocí těchto dvou elektrod byly v textu více diskutovány

Dotazy do diskuze:

1. Autorka se ve své práci zabývala *potenciálně* aflatoxinogenními plísněmi. Chci se zeptat, zda jsou známé konkrétní podmínky, kdy tyto plísně aflatoxiny tvoří a kdy ne? Hrozí nějaké zdravotní nebezpečí při požití např. koření napadeného touto plísní, pokud je uchováváno za podmínek, při nichž aflatoxiny tvořeny nejsou?

2. Detekce přítomnosti potenciálně aflatoxinogenních plísní v potravinách je velmi důležitá. Alternativním přístupem je detekce již tvořeného aflatoxinu biochemickými postupy.

Setkala se autorka v literatuře také s využitím molekulárně biologických metod – mám na mysli analýzu exprese genů spojených s tvorbou aflatoxinů? Zabývala se tím také při své experimentální práci?

3. Na začátku kapitoly 2.8.5.2 autorka píše „V určitých případech je však při detekci DNA výhodnější využít elektroaktivní značky, indikátory...“ ve srovnání s přístupy bez použití značek (label-free). Mohla by autorka zmínit nějaké konkrétní výhody a nevýhody label-free a label-based elektrochemické detekce DNA?

Disertační práce Ing. Petry Motřkové dle mého soudu splňuje všechny požadavky kladené na práci tohoto typu. Autorka prokázala nejen potřebné tvůrčí schopnosti, ale také že ovládá potřebné vědecké metody v příslušném vědním oboru a má rozsáhlé teoretické znalosti. Předloženou disertační práci Ing. Petry Motřkové hodnotím kladně a jednoznačně ji **doporučuji** k obhajobě.

V Brně 28.4.2011

Petra Horáková
Mgr. Petra Horáková, Ph.D.