

## OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce **Bc. Svatavy Vodové** „Zavedení nových metod pro detekci biofilmu“ má rozsah 92 stran včetně souhrnu literatury a příloh. Práce je psána srozumitelně a je velmi dobře členěna na jednotlivé kapitoly, její součástí je i velmi pěkná obrázková příloha dokumentující provedené experimenty.

Práce je psána dle platných norem, jen okraje celé práce by měly být 3,5 cm x 2,5 cm (levý okraj x pravý okraj).

Literární přehled je poměrně rozsáhlý, autorka se zabývala problematikou detekce biofilmu pomocí nových moderních molekulárně biologických metod a velice oceňuji velké množství informací a aktuální přehled v této problematice.

V „Experimentální části“ je přehledně popsán použitý materiál a prováděné pracovní postupy, jen trochu postrádám postupy PCR a elektroforézy. Autorka má sice odkaz, ale domnívám se, že stručný popis by měl být v experimentální části uveden.

K experimentální části mám jednu formální výtku: na str. 45 autorka uvádí, že preparát byl mikroskopován bez oleje pod objektivem 40x. Domnívám se, že stačí uvést celkové rozlišení 400x ( to je vždy mikroskopováno bez imerze).

Dále k experimentální části mám pár otázek, které jsem v experimentální části postrádala a autorka by je měla doplnit:

- 1) Jaké je složení CAM agaru?
- 2) Proč si autorka vybrala jako negativní kontrolu při fluorescenční *in situ* hybridizaci rod *Cronobacter*?
- 3) Jakým způsobem byly připraveny mrtvé buňky?
- 4) Jakou velikost měly kovové kupony pro testování tvorby biofilmu a jaká denzita buněk byla očkovaná do zkumavek?

V kapitole „Výsledky a diskuse“ jsou formou obrázků a slovního komentáře uvedeny výsledky jednotlivých experimentů. Dosažené výsledky jsou velice dobře porovnány s jinými autory zabývající se touto metodikou. K této kapitole mám jedno doporučení a uvádím jednu formální chybu:

V kapitole „4.1.2 Bakteriální vliv barviv EMA/PMA“ autorka uvádí v tabulce pro jednotlivé koncentrace barviv nepočitatelné množství buněk na ml, na tomto místě bych jí doporučovala

provést stanovení počtu buněk (alespoň v řádech) u jednotlivých koncentrací barviv metodou postupného ředění. Je rozdíl, zda barvivo působí inhibičně o jeden či o tři řády.

Na str. 62 autorka uvádí, že mikroskopické pozorování bylo při zvětšení 40x. Předpokládám, že je to překlep a že tam mělo být uvedeno 400x.

Dále by měla diplomantka vysvětlit pár otázek:

- 1) Jak si autorka vysvětluje odlišný detekční limit pro stanovení arkobakterů metodou EMA/PMA-PCR v porovnání s prací Hrušková (2012)?
- 2) Stanovila autorka počty životaschopných buněk ve stěru z kovových kuponů? S tím souvisí i další otázky: Byl dostatečně vytvořen biofilm? Na vytvoření správného biofilmu se mi kultivace 3 dny při 25° C zdá krátká, také míchání bujóny s kupony a omývání destiček může být příčinou odstranění nedostatečně vytvořeného biofilmu.
- 3) Autorka uvádí jednotlivé rozdíly při stanovení životaschopných buněk metodou EMA/PMA-PCR pro biofilm a po pomnožení stěru z biofilmu v CASO bujónu (to již není růst buněk v biofilmu). Nemůže mít vliv na EMA/PMA-PCR vlastní složení biofilmu (živé a mrtvé buňky, ale i přítomnost extracelulárních polymerních látek, jako lipopolysacharidy, lektiny amyloidy, atd.)?
- 4) Použila autorka při stanovení specifčnosti sond při fluorescenční *in situ* hybridizaci i jiné mikroorganismy nebo se soustředila jen na vztah mezi rody *Campylobacter* a *Arcobacter*?

V kapitole „Závěr“ jsou formou slovního komentáře stručně a jasně shrnuty výsledky jednotlivých experimentů.

**Autorka si vybrala velice zajímavé, náročné a důležité téma, ve kterém by se mělo nadále pokračovat. Provedla obrovské množství práce, což hodnotím velice kladně. Uvedené připomínky nesnižují kvalitu předložené práce a diplomovou práci hodnotím**

**výborně a doporučuji ji k obhajobě.**

V Pardubicích 30.5.2013

  
Ing. Iveta Brožková, Ph.D.