

## Oponentský posudek

### na disertační práci

"STANOVENÍ FUSARIOVÝCH MYKOTOXINŮ A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJICH PRODUKCI"

**Autorka disertační práce:** Ing. Lucie Svobodová - Hlaváčková

**Školitel:** Doc. Ing. Jarmila Vytrásová, CSc.

**Školitel specialista:** Ing. Alena Honzlová

**Studijní program:** P1419 Analytická chemie, obor Analytická chemie

Disertační práce je zpracována na **163** stranách s **12** přílohami a je uspořádána do **7** kapitol. Seznam použité literatury čítá **128** položek, pouze **25** položek je z let 2006-2011.

Autorka věnovala v „Teoretické části“ značnou pozornost získání relevantních odborných informací a dat o charakteristice a identifikaci vláknitých mikroskopických hub rodu *Fusarium* s využitím klasické mykologie a metody PCR, dále fuzáriovým mykotoxinům z hlediska jejich charakterizace, ovlivnění jejich produkce, legislativy a metod jejich detekce a stanovení. Na závěr teoretické části se věnovala charakterizaci hmotnostní spektrometrie.

V části „Materiál a metody“ jsou popsány metody, instrumentální vybavení, laboratorní pomůcky, chemikálie a použítá kultivační mykologická média použitá v disertační práci.

V části „Výsledky a diskuse“ jsou prezentovány výsledky stanovení toxinogenity vláknitých mikroskopických hub rodu *Fusarium* metodou PCR (stanovení *Tri5 genu*), výsledky sledování výskytu vybraných fuzáriových mykotoxinů (deoxynivalenol, zearalenon a T-2 toxin) v krmivech metodou ELISA s konfirmací pozitivních vzorků metodou HPLC. Byla zavedena a validována metoda LC-MS/MS pro stanovení T-2 a HT-2 toxinů ke sledování vlivu živného média, kultivačních podmínek a vybraných mikroorganismů na produkci T-2 a HT-2 toxinů.

#### PŘIPOMÍNKY:

##### Formální připomínky:

Práce po formální a jazykové stránce je napsána pečlivě. Práce neobsahuje takové překlepy a takové formulace, které by činily text nejednoznačným nebo nesrozumitelným.

V anglické verzi „Disertation - Annotation“ je překlep na str. 18 v 7. řádku textu, kde má být *correspond* místo *cerrespond*.

V textu disertační práce bych preferoval český název *fuzáriové mykotoxiny* místo *fusariové mykotoxiny* a *trichoteceny* místo *trichotheceny*.

V seznamu použitých zkratk je překlep, správně má být *Sabouraud agar* místo *Sabouraude agar*.

Na str. 25 na předposlední řádce je překlep, kde má být *leukoencephalomalacia* místo *leukoencephalomalasia*.

V seznamu literatury chybí citace (Šimůnek, 2003) ze str. 26.

V části „4 Výsledky a diskuse“ je uveden název bodu „4.1 Detekce plísni rodu *Fusarium* metodou PCR“. Nejedná se však o detekci plísni rodu *Fusarium*, ale o sledování přítomnosti *Tri5* genu a stanovení toxinogenní potence sbírkových kmenů plísni rodu *Fusarium*!!

Český název disertační práce „*Stanovení fusariových mykotoxinů a faktory ovlivňující jejich produkci*“ významově nekoresponduje s anglickým názvem „*Effect of factors on Fusarium mycotoxins production and its analytical detection*“, kde na první místo jsou kladeny faktory ovlivňující produkci fuzáriových mykotoxinů (T-2 a HT-2 toxinů) před analytickým stanovením.

Disertační práce a její koncepce při prvním seznámení na mne působila nepřehledně a nekonzistentně, vzhledem k tomu, že v ní bylo spojeno několik ohraničených témat, které by se mohly stát po vhodném rozšíření a doplnění tématem pro samostatnou disertační práci. Jedná se především o následující témata:

- stanovení toxinogenní potence sbírkových kmenů plísni rodu *Fusarium* stanovením přítomnosti *Tri5* genu,
- sledování výskytu vybraných fuzáriových mykotoxinů v krmivech metodou ELISA,
- zavedení a validace metody LC-MS/MS pro stanovení T-2 a HT-2 toxinů ke sledování vlivu živného média, kultivačních podmínek a vybraných mikroorganismů na produkci T-2 a HT-2 toxinů.

Zde platí okřídlené, že někdy méně znamená více. Autorka se měla, vzhledem ke studijnímu programu oboru „Analytická chemie“, spíše věnovat tématu z pohledu analytického stanovení vybraných fuzáriových mykotoxinů metodou LC-MS/MS se zaměřením např. na multireziduální analýzu, které se věnuje řada pracovních týmů v Evropě (např. tým prof. Krsky z Centra analytické chemie z IFA-Tullnu v Rakousku).

Na druhou stranu je možné autorku disertační práce pochválit za to, že si osvojila jak stanovení metodou chromatografickou (LC-MS/MS), tak metodou molekulárně biologickou (PCR).

#### **DOTAZY:**

*Jak je to s výskytem *tri5* genu u producenta makrocyclických trichotecenů *Stachybotrys chartarum*?*

*Můžete stručně popsat, jakým způsobem vzniká „maskovaný“ fuzáriový mykotoxin DON-3-Glu v rostlinách?*

#### **ZÁVĚR:**

I přes odborné výhrady ke koncepci a obsahu disertační práce musím konstatovat, že autorka zvládla základy a prokázala způsobilost k výzkumné práci, práci s informačními zdroji a odbornou terminologií.

Předkládaná práce splňuje požadavky kladené na disertační práci.

**Předloženou disertační práci doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Brně dne 30. 11. 2011

  
Doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc.

Posudek disertační práce

Ing. Lucie Svobodové - Hlaváčkové

## **Stanovení fusariových mykotoxinů a faktory ovlivňující jejich produkci**

Disertační práce Ing. L. Svobodové - Hlaváčkové se zabývá analytikou mykotoxinů a testováním faktorů, které mohou ovlivňovat jejich produkci. V práci jsou použity metody biologické, molekulárně biologické ale také postupy jako vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostním detektorem a ionizací elektrosprejem. Sledovanou skupinou mykotoxinů jsou toxiny produkované mikromycetou *Fusarium*, v různých typech krmiv. Z tohoto hlediska je předložená disertační práce velmi potřebná, neboť ukazuje moderní analytické postupy a hledá alternativní možnosti kontroly růstu mikromycet a potlačování tvorby mykotoxinů.

Autorka své výsledky zpracovala do 114 stran textu, doplněných velmi obsažnými přílohami. Práce má standardní členění, i když klíčová část práce, totiž diskuse, je spojená s výsledky. Tento fakt je prvním nedostatkem předložené disertace. Vzhledem ke komplexnímu zadání, které spojuje jak biologické, tak analytické aspekty, je literární přehled velmi stručný a nevyvážený. Např. část věnovaná charakteristice a identifikaci příslušníků rodu *Fusarium*, včetně zmínky o technice polymerasové řetězové reakce (na té nejzákladnější, učebnicové úrovni) je představena na čtyřech stránkách. Rovněž kapitola 2.3 Mykotoxiny plísní rodu *Fusarium* je věnovaná převážně metodice čištění vzorku (popis funkce komerčních přečišťovacích kolonek) a následujícím analytickým postupům. Vzhledem k faktu, že hlavním mottem práce je analýza T 2 a HT-2 toxinu, by bylo vhodné na tomto místě zařadit strukturní vzorce a popis těchto látek. Tedy, T-2 toxin je triviální označení pro 4β,15-diacetoxy-3α, dihydroxy-8 α-[3-methylbutyryl-oxy]-12,13-epoxytrichothec-9-en, C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>, relativní molekulová hmotnost je 466,5 g/mol. Pro HT-2 toxin byl navržen vzorec 15-acetoxy-3 α ,4 β -dihydroxy-8 α -[3-methylbutyryloxy]-12,13-epoxytrichothec-9-en, čemuž odpovídá sumární vzorec C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>, a relativní molekulová hmotnost je 424,5 g/mol. Struktura T-2 a HT-2 toxinů se liší pouze v jedné funkční skupině na C-4 pozici.

Část 3 věnovaná materiálu a metodám je přiměřeně obsažná, připomínku mám pouze k části 3.7 Polymerasová řetězová reakce, kde není uveden původ (citace) primerů HA Tri/R a HA Tri/F. V této části se také uvádí, že pro ověření schopnosti tvorby sledovaných mykotoxinů byl vybrán gen *Tri5*, což je vhodné, ale v celé práci není dokumentovaná biosyntetická dráha pro fusariové trichotheceny, která měla být zařazena do části 2.3.

Autorka nashromáždila celou řadu kvalitních výsledků, které kvantifikují pomocí optimalizované techniky HPLC/MS/MS výskyt fusariových mykotoxinů v celé řadě krmiv a krmných surovin, dále pak ověřovala vliv media na toxinogenní kapacitu jednotlivých druhů rodu *Fusarium*. Těžiště práce je v optimalizaci podmínek HPLC/MS/MS od přípravy vzorku extrakcí až po validaci této metody, což je presentováno na schématu na obr. 36. Experimenty na modelových živných půdách, kde byl také sledován vliv různých typů doprovodné mikroflory na tvorbu obou sledovaných mykotoxinů, je dosti obtížné hodnotit, neboť v přírodním prostředí, kde při kultivaci obilnin k infekci houbou *Fusarium* dochází, je relevantních vlivů mnohem více.

V této souvislosti se chci zeptat, zda je výskyt bakterie *Pantoea agglomerans* v půdě běžný.

**Závěr:** Předložená disertační práce Ing. Ing. Lucie Svobodové – Hlaváčkové: „Stanovení fusariových mykotoxinů a faktory ovlivňující jejich produkci“ představuje exaktní analytické postupy, kterými lze objektivně kvantifikovat množství dvou významných trichothecenových mykotoxinů. Autorka prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje, podle § 47, odst.4, zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a proto navrhuji příslušné komisi přijmout její práci jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze dne 8.12.2011

  
Doc RNDr. Jarmila Pazlarová, CSc