



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

PR: 060 902 596
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Datum: - 5 -06- 2009 Č. jednací: 06/1345/07
Počet listů: 2 Počet příloh: 0

Česká sbírka mikroorganismů (CCM)

tel.: +420 549 491 430 • fax +420 543 247 339
e-mail: ccm@sci.muni.cz • http://www.sci.muni.cz/ccm

Věc: Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Alice Chroňákové: „Diversity of the soil ...“

Posuzovaná práce se týká problematiky biodiverzity prokaryotních organismů v půdním prostředí, které je stále více ovlivňováno lidskou činností. Zvolené téma práce je významné jak z hlediska základního výzkumu poznání půdní biodiverzity, tak i z hlediska praktické aplikace dosažených poznatků při eliminaci negativních vlivů lidské činnosti na vnější prostředí (těžba, zemědělství aj.). Rozsah studovaných mikroorganismů je pojat komplexně a velice oceňuji záběr na kultivovatelná i nekultivovatelná prokaryota včetně domény *Archaea*, což nebývá běžným zvykem u mikrobiologů ani ekologů. Pochopitelně si také nemohu nevšimnout toho, že je práce psaná v anglickém jazyce, čehož si také u uchazečky velice cením.

Oponovaná práce má mírně odlišnou jak strukturu, tak i rozsah, od disertačních prací, které jsem měl doposud možnost shlédnout, ale nevidím v tom problém, pokud je taková zvyklost na Jihočeské univerzitě. Z materiálů je zřejmé, že uchazečka byla/je zapojena v celé řadě výzkumných projektů a grantů a také absolvovala mnoho stáží a studijních pobytů v zahraničí. Takto získané poznatky zúročila ve své odborné práci v ÚPB, potažmo v disertační práci. Ze svého zapojení do problematiky mikrobiální ekologie výtěžila Mgr. Chroňáková mnoho výsledků, které prezentovala formou přednášek či posterů na tuzemských i zahraničních konferencích a řada ucelených výsledků byla publikována v kvalitních odborných časopisech. Publikační aktivita Mgr. Chroňákové (2x první autor, spousta spoluautorství) je vyšší, než standardně bývá u PGS studentů, přesto si však myslím, že u uchazečky mohla být – vzhledem k tomu velkému počtu projektů a celkové době řešení disertační práce – vyšší (tohle není výtka, pouze konstatování!).

V práci bylo použito mnoho moderních molekulárně biologických technik ke studiu mikrobiální ekologie, což hodnotím velice kladně, stejně jako „čtivou“ angličtinu. Pouze ojediněle se vyskytují drobné chyby formálního rázu, např. „South Bohemia x West Bohemia“ na str. 12 (= přehozeno, pokud nebyl přestěhován Sokolov ...), nebo „miocénní sediment x Míocénní sediment“ na str. 9. K uchazečce však mám několik následujících otázek k tématice předložené práce:

1. V práci se uvádí „...dominance heterotrofních mikroorganismů, hlavně aktinomycet a saprofytických hub...“. Které další heterotrofní bakterie lze v půdách očekávat? A co skupina oligotrofních prokaryot? Byly izolovány, nebo představují minoritní složku vzhledem k heterotrofům?
2. V práci se uvádí „...převaha grampozitivních bakterií v sukcesní řadě ...“. Mám to chápat tak, že gramnegativní prokaryota tam téměř nejsou v analyzovaných půdách přítomna? Nebo to bylo ovlivněno složením izolačních médií?
3. V práci se uvádí „...přežívání streptomycéty v miocénních sedimentech ...“. Jednalo se o spóry nebo i vegetativní vlákna? A jaké bylo jejich fylogenetické postavení v systému?



4. V práci se uvádí „...producenti antibiotik manumycinového typu ...“. Uvažuje autorka o patentování těchto produkčních kultur a jejich komerčním využití?

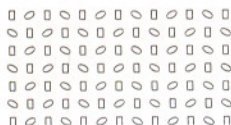
Při posuzování předložené disertační práce jsem neshledal závažné nedostatky, které by se týkaly metodiky, pracovních postupů nebo hodnocení dosažených výsledků. Konstatuji tedy, že dle mého názoru posuzovaná disertační práce splňuje všechny vytyčené pracovní cíle, a proto doporučuji komisi pro obhajoby doktorských disertačních prací oboru Ekologie PŘF JU, aby přijala tuto práci k obhajobě a na základě jejího úspěšného ukončení přiznala paní Mgr. Alici Chroňákové vědeckou hodnost Ph.D.

Závěrečné hodnocení práce:

- I. zvolené téma je aktuální a významné pro řadu biologických oborů i celospolečensky
- II. vytyčené cíle práce byly splněny
- III. k řešení byly použity odpovídající postupy, analýza výsledků prokázala odbornou erudici a znalost problematiky ekologie, fyziologie, klasifikace a typizace prokaryotních mikroorganismů
- IV. výsledky byly publikovány formou článků, přednášek či posterových sdělení

Doc. RNDr. Ivo Sedláček, CSc.

2.6. 2009



O p o n e n t s k ý p o s u d o k

doktorandskej dizertačnej práce

Autorka: **Mgr. Alica Chroňáková**
Jihočeská univerzita České Budějovice

Názov práce: „*Diversity of the soil microbial community and its functional aspects in man-influenced environments*“

Oponent: **Doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.**
Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra

Dizertačná práca svojím rozsahom (131 str.), usporiadaním a predovšetkým využitím výsledkov doterajšej výskumnej práce doktorandky publikovaných v 9-tich vedeckých príspevkoch, prináša návrhy na riešenie niektorých problémov súvisiacich najmä s aplikáciou a využitím metód molekulárnej biológie pri sledovaní zloženia a funkcie mikrobiálneho spoločenstva v ekosystéme. Práca je rozčlenená do 4 kapitol s úvodným zhrnutím dosiahnutých výsledkov. Riešenú problematiku v dizertačnej práci v súčasnom období považujem za vysoko aktuálnu a perspektívnu, a to ako z teoretického, tak aj z praktického hľadiska. Predkladaná práca prináša množstvo nových a podnetných informácií z oblasti ekológie mikroorganizmov, aplikovanej mikrobiológie a ochrany životného prostredia, a najmä integrácie metód molekulárnej biológie v problematike stanovovania mikrobiálnych spoločenstiev v tak heterogénnom prostredí ako je pôda.

Kapitola I obsahuje základné a všeobecne platné informácie o význame a aktivite pôdných mikroorganizmov so zameraním na aktinomycéty, denitrifikačné a metanogénne baktérie. Hlavný dôraz je v tejto kapitole zameraný na charakteristiku sledovaných antropogénnych vplyvov (baníctvo, poľnohospodárstvo), na zmeny v diverzite a funkcií pôdneho mikrobiálneho spoločenstva, ktoré plní kľúčovú kontrolnú úlohu z hľadiska zabezpečenia homeostázy vzťahov a procesov v takto narušených ekosystémoch. Súčasťou kapitoly je i charakteristika splnených jednotlivých čiastkových cieľov doktorandskej práce :

1. Osvojenie si techník extrakcie DNA a RNA z pôdy a sedimentov ako aj DNA/RNA metódy využívané na hodnotenie diverzity mikrobiálneho spoločenstva.

2. Popis spontánnej sukcesie spoločenstva heterotrofných baktérií s dôrazom na pôdne aktinomycéty a ich porovnanie po vyťažení a depozícii na výsypkách vo vybraných štyroch plochách, ktoré sa odlišovali časom uloženia (0-44 rokov).
3. Charakteristika životaschopných mikroorganizmov cez mikrobiálnu biomasu v tret'ohorných jazerných sedimentoch, z hĺbky 200 m, schopných sukcesných procesov na výsypkách.
4. Charakteristika zmien v abundancii a aktivite denitrifikačných baktérií a metanogénnych mikrobiálnych spoločenstiev na pasienkoch, na ktorých prezimováva hovädzí dobytok a spôsobuje zmeny vo fyzikálno-chemických vlastnostiach pôdy.
5. Sledovať korelácie zmien v zložení mikrobiálneho spoločenstva s ich potencionálnou aktivitou a tvorbou plyných produktov z pôdy.
6. Zistiť, či prítomnosť denitrifikátorov na pasienkoch je náhodná, alebo závisí od fyzikálno-chemických vlastností pôdy.

Z môjho pohľadu za obzvlášť zaujímavú a komplexne spracovanú hodnotím **Kapitolu II**, ktorá prináša zhrnutie a popis najnovších metód využívaných na sledovanie genetickej a funkčnej diverzity mikrobiálneho spoločenstva. V tejto oblasti sa v súčasnosti publikuje veľmi veľa nových metód, pričom práca prináša ich prehľadné zhrnutie s uvedením odkazov na tie metódy, ktoré boli využité v publikovaných príspevkoch. Pozitívom tejto kapitoly je i zhodnotenie pozitívnych a negatívnych stránok tej ktorej metódy využitej pre kvantitatívne alebo kvalitatívne hodnotenie mikrobiálneho spoločenstva.

Kapitola III je zhrnutím najdôležitejších výsledkov zo všetkých odpublikovaných prác s dôrazom na využívanie metód molekulárnej biológie pri sledovaní mikrobiálnych spoločenstiev, či už počas spontánnej sukcesie na hnedouhoľných výsypkách, alebo na eutrofizovaných pasienkoch.

Kapitola IV obsahuje úplný prehľad všetkých 9-tich popisovaných vedeckých príspevkov. Z toho podľa Web of Science publikované v karentovaných časopisoch boli 4 (spolu 13x citované), ďalšie 3 sú už v tlači, odovzdaný do tlače bol 1 a 1 článok bol publikovaný v recenzovanom zborníku. Zatiaľ najcitovanejším (5x) je príspevok uverejnený v časopise Folia Microbiologica „Growth strategy of heterotrophic bacterial population along successional sequence on spoil of brown coal colliery substrate“.

Z hľadiska formálnej úpravy je možné konštatovať, že práca je vypracovaná na veľmi dobrej úrovni, v anglickom jazyku.

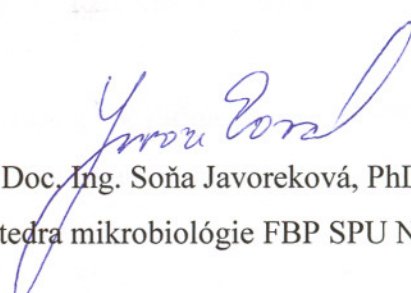
Na doktorandku mám nasledovné otázky:

1. Ktoré skupiny mikroorganizmov a akými metódami molekulárnej biológie navrhujete sledovať v prípade hodnotenia stability pôdneho ekosystému ?
2. V prípade izolácie celkovej mikrobiálnej DNA sa izoluje iba nukleová kyselina živých buniek, alebo aj ich spórových foriem? Popríklad v čom vidíte najväčšie problémy pri aplikácii metód molekulárnej biológie v pôdnom prostredí?
3. Ktorý parameter (-re) alebo ukazovateľ (-e) môžu najvýraznejšie ovplyvniť preukaznosť výsledkov kvantitatívneho a kvalitatívneho zastúpenia mikroorganizmov v pôde ?
4. V čom vidíte najväčšiu perspektívu využitia metód molekulárnej biológie v oblasti riešenia otázok dotýkajúcich sa ekológie pôdnych mikroorganizmov?

Celkovo hodnotím dizertačnú prácu vysoko pozitívne, autorke sa podarilo na základe reprodukovateľných metodických postupov získať výsledky, ktoré sú cenným prínosom pre teóriu, ale aj praktické riešenie problémov uvedených v cieľoch práce.

Dizertačná práca *Mgr. Alice Chroňákovéj*, spĺňa kritériá pre písanie dizertačných prác, a preto **odporúčam**, aby bola doktorandka pripustená k obhajobe a po splnení ďalších náležitostí v súlade s platnou legislatívou ČR jej bol v študijnom odbore Ekológia na Přírodovědeckej fakulte Jihočeskej univerzity v Českých Budějoviciach udelený príslušný doktorský titul.

V Nitre, dňa 15.5.2009


Doc. Ing. Soňa Javoreková, PhD.
Katedra mikrobiológie FBP SPU Nitra

Oponentský posudek

Alica Chroňáková: Diversity of the soil microbial community and its functional aspects in man-influenced environments

Předkládaná disertační práce se zabývá strukturou a funkcí mikrobiálního společenstva v půdních ekosystémech ovlivněných lidskou činností. Hlavní pozornost je věnována půdám v chronosekvenci primární sukcese na výsypkách po těžbě hnědého uhlí a plochám zatíženým pobytem skotu. Práce je tvořena souborem devíti článků, publikovaných ve vědeckých recenzovaných časopisech či sbornících a je opatřena úvodem s literárním přehledem, základním popisem některých metod, využívaných v práci a celkovým shrnutím výsledků.

Základ práce tvoří devět vědeckých publikací, z nichž na třech je autorka prvním autorem. Z těchto tří publikací je jedna přijata k publikaci v časopise s impakt faktorem (Soil Biology and Biochemistry, IF 2,580), jedna je do časopisu s IF zaslána a jedna pochází ze sborníku konference. Zbýlých šesti prací je publikováno nebo přijato k publikaci v časopisech s IF a to včetně tří článků v prestižních časopisech Environmental Microbiology a ISME Journal.

Z práce není bohužel přesně patrný rozsah, v němž se autorka disertace podílela na autorství článků, ve kterých není první autorkou. V práci je sice uvedeno sdělení spoluautorů článků, v němž označují podíl autorky za významný, v seznamu ale nejsou žádní zahraniční spoluautoři (tj. první autoři tří prací) ani všichni čeští spoluautoři. Považoval bych za vhodné, aby autorka doplnila jakým konkrétním způsobem se podílela na pracích, kde není první autorkou (plánování experimentů, provedení konkrétních analýz, vyhodnocení dat, atd.).

Celkově je rozsah předkládané práce dostatečný a kvalita zveřejněných příspěvků sama o sobě svědčí o schopnosti autorky samostatně provádět vědeckou práci. Za nejvýznamnější části práce považuji funkční analýzu společenstev v půdách ovlivněných skotem a soubor prací týkající se významu aktinomycet v půdách primární sukcese. Disertaci považuji za vysoce nadprůměrnou v oblasti ekologie mikroorganismů a doporučuji udělení příslušného titulu. Přesto mám k práci některé dílčí výhrady a dotazy, které jsou shrnuty níže.

V práci je celá řada chyb, které mohly být odstraněny při zběžné korektuře (dva podněty ve větě) nebo za použití funkce „spellcheck“. Rovněž odborným termínům nebyla často věnována potřebná péče („hyphes“, Zdá se mi, že revizi úvodního textu nebyla zdaleka věnována taková péče jako textu jednotlivých sdělení (i když i tady jsou kvalitativní rozdíly patrné).

V některých kapitolách nevystihuje jejich název obsah. Například v kapitole „Denitrification, methanogenesis ... etc.“ Str. 18 jsem nenašel žádnou zmínku o metanogenezi.

V úvodu je uváděno, že „human activity has negative impacts on environmental quality“. Prosím o vysvětlení, jak lze posoudit, zda je konkrétní vliv negativní a co je míněno termínem „environmental quality“. V úvodu práce je řada podobných obecných formulací, které podle mého názoru nemají informační hodnotu.

Na str. 16 autorka uvádí, že „Streptomycetes are key players in decomposition, humification, ... etc.“ Požádal bych o názor na jejich význam v jednotlivých procesech s ohledem, například, na aktivitu půdních hub. Publikované práce ukazují, že v prostředí, kde

dekompozice je nejrychlejší (rostlinný opad), je často zastoupení aktinomycet naprosto zanedbatelné.

Na straně 21 je uváděna „definice druhu v taxonomii“ jako „70% or greater DNA-DNA relatedness“. Co je míněno slovem „relatedness“, je to nový termín pro „similarity“? O pár řádek níže stojí, že oficiální definice bakteriálního druhu neexistuje. Jaký je vztah mezi těmito dvěma sděleními a jaký je názor autorky na definici nižších taxonů u bakterií?

Na straně 22 je v Tabulce 1 řada metod uvedena pouze zkratkou a vysvětlením zkratky. Pro běžného čtenáře by ale bylo vhodnější připojit i krátkou definici metod, vysvětlení zkratky často k pochopení principu metody nestačí. V této kapitole bych navíc uvítal vysvětlení proč byly v konkrétních případech (publikacích) zvoleny použité metody.

Autorka zmiňuje řadu metod fingerprint analýzy mikrobiálních komunit. Lze podle jejího názoru učinit nějaký obecný závěr ohledně toho, která metoda je obecně nejvhodnější anebo nejvhodnější pro konkrétní aplikace?

V jedné z prací jsou izoláty identifikovány pomocí profilů PLFA. Jaké jsou výhody této metody identifikace individuálních kmenů oproti standardní práci s DNA (sekvenaci)?

Autoři se v jedné z prací pokusili kvantifikovat podíl kultivovatelné složky půdního bakteriálního společenstva. Lze něco říci o tom, nakolik je tato složka reprezentativní co se týká zastoupení jednotlivých taxonomických skupin bakterií? Lze vůbec kultivovatelné společenstvo použít pro odhad početnosti či diversity celkového společenstva? V čem vidí autorka práce hlavní význam charakterizace jednotlivých environmentálních isolátů?