

To
The University of South Bohemia in
České Budějovice, Faculty of Science
Dept. of Ecosystem Biology
Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice
Czech Republic

Evaluation of the doctoral thesis by Anna Matoušů

June 18th 2017

Hereby, I present the evaluation of PhD thesis '*Activity and occurrence of methane oxidizing bacteria in the water column along the River Elbe*' written by Anna Matoušů (University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic).

It was recognized that freshwaters actively process and transform received organic carbon. About half (1.4 Pg C yr^{-1}) of the received carbon is emitted to the atmosphere as carbon dioxide and methane. The degree of carbon degradation pathways and contribution to the atmospheric greenhouse gas budget in running waters are significantly impacted by environmental parameters as e.g. temperature, hydrodynamics. Emissions of methane are generally much lower than carbon dioxide; however methane has 28 times higher global warming potential on a per mass basis. As methane is a sparingly soluble gas (~27 times less soluble than carbon dioxide) it is estimated that about 50% of freshwater methane emissions are due to methane bubbles, which accounts for ~10% of all global emissions. A smaller part of methane emits via diffusion to the atmosphere. Another part of methanogenic Archae produced methane never reaches the atmosphere since it is microbial consumed and oxidised by either anaerobic oxidation (mostly in deep sea) and/or by aerobic methane oxidising bacteria (MOBs, methanotrophs). However, the 'loss' of methane by MOBs has a great range (5-70%) and its mechanism behind and the understanding is still not yet totally clarified but is important to know for the global carbon balance.

The thesis by Anna Matoušů contributes to our understanding of methane cycle on running waters (River Elbe) by applying field measurements and using a set of complementary and advanced methods to investigate the occurrence of methane concentration, its consumption and their drivers. Large-scale intensive field measurements along the River Elbe – a key strength to the present study - help to understand the distribution and oxidation of methane related to environmental factors as e.g. hydrology, temperature, landscape structure and nutrients.

Anna Matoušů doctoral thesis consists of five chapters: an overall overview and three already published papers and one manuscript. The former one contains the background/introductory of the thesis, hypothesis, a very short results and discussion part for the given publications and a conclusion.

One paper and the manuscript are written as a first author, the two others as a co-author. All three published papers are published in leading, renowned aquatic journals. The manuscript seems to be ready soon for a publication in an international journal.

Comments to the overall overview (the written frame of the thesis):

The papers and the manuscript have such interesting scientific outputs which unfortunately get lost in the overall overview since this kept too short. The introductory and the discussion parts are good referenced and set the context for the entire study. However, the introduction, the results and discussion parts could have been done into a more general ecological and environmental perspective and a little bit more detailed. It would have been also nice to see an overview e.g. a scheme for principle mechanism for methane cycling in the Elbe (different methane production/emission pathways). At the beginning it would have been also informative to get an outline about the Elbe River, estuary and the connection to the North Sea and its different parts. Emphasising on the different parts (natural, impounded, lowland) would have been easier for the reader for the entire understanding. An outline could have given also information about why it is reasonable to study such divers' ecosystems, for instance.

In general, most of the information's are given but sometimes the 'red line' and the important points are not very well worked (e.g. anoxic methane production, oxic is missing) out which is a pity since it is a very interesting and good data basis. Sometime the readers lose the 'red line' since it jumps from one part to another. For instance, the methods section and the para about the culture growing doesn't fit at all in the given context and should have been put at the end of the introduction to not disturb the reading flow of MOB's.

Though, it was very interesting to read the section part of the Archae, AOM, MOB's in general and its ecology since this gave a good overview. It would be very informative and interesting for the overview if the given information about e.g. the environmental influence on MOB's has been set into the context of the investigated ecosystem and what does it seem to imply for the river Elbe (e.g. combination with the own data).

In the discussion, at the end it would have been wonderful if you could come back to your introduction and answer scientifically open interesting discussion points, e.g. adding a 'new number' for the different parts of this heterogeneous river for microbial methane oxidation in the running water column.

Comments to the paper/ manuscripts:

A great strength of the thesis was the method development before starting the field campaigns. This was a fundamental basis for reliable and significant data collection and analysis. The citations of the paper show that this is also recognized by the scientific community.


I wonder why the paper by Osudar et al. is included as it doesn't really fit to the subject of the thesis since it is dealing with distribution and methane oxidation in the North Sea and not in the River Elbe.

The paper and the manuscript by Matoušů seem to very similar, just on different sections in the Elbe River. As the ms is written now, the reader wonders if we really needed both investigations to come to the given findings. There are a lot of interesting data in the ms but it seems that there are hidden. Would be nice to read what we can learn out of this study and why it was important to run it as well.

Overall, the work by Anna Matoušů is of good quality and it is good presented and written. The sampling seemed to be carried out with great scientific rigor and the results exhibits a good contribution for the scientific community. Key strengths of the thesis are the application of method development, advanced analytical approaches and models, which allow fundamental insights into the underlying mechanisms controlling methane dynamics and composition of MOBs in the river ecosystem, Elbe. There is no doubt that the research results will be well-recognised by the scientific community and stimulating further research. With this work Anna Matoušů showed that she is able to produce a good scientific research by being able to perform field studies, analysing and publishing data and being able to work in a team, even for longer periods and on reduced 'habitat' conditions (boat).

In conclusion, the written thesis by Anna Matoušů meets the requirements requested to get the scientific degree. Thus, I fully recommend the written thesis to be accepted as a doctoral work.

18/06/2017



Date/ Signature Evaluator

Dr. Katrin Premke
Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries (IGB Berlin),
Department of Chemical Analytics and Biogeochemistry,
Müggelseedamm 310, 12555 Berlin, Germany

Question for the disputation

- Ebullitive emissions from aquatic systems are still likely underestimated due to the stochastic nature of ebullition events but very importance for the global carbon balance. Just discuss briefly why this point is not included in the discussion of the methane fluxes
- In general methanogenesis occurs under strictly anoxic conditions as it is pictured in the thesis. However, very lately several investigations came up that described methane production in oxic waters (Kepler et al. 2006, Nature; Grossart et al. 2012 Proc.Natl.Acad.Sci; Bogard et al. 2014, Nature Communications; Tang et al. 2016, ES&T) which is unfortunately not discussed in the thesis. Please address also the oxic methane production, the 'methane paradox', and its relevance for the global methane production estimates. This might put your investigations in another framework.
- In the thesis you state that microbial methane oxidation in running waters water column is less efficient than lakes or other freshwater habitats. Please explain your assumptions in more detail and what is the mechanism behind.
- You state that a key issue is to understand the T impact on MOB's community structure and enzymatic activity. Unfortunately this is an important issue and could be more specified. Discussed and explain more in detail why T is influencing i) enzymatic activity of the MOB's and ii) what does it means for the ecosystem Elbe when type I is favoured by type II at a specific temperature?
- I haven't fully understood your methane concentration and oxidation water sampling from the boat. How was this exactly performed? As it is known that disturbance, turbidity and pressure change the methane concentration and MOX, how do you put these parts into the discussion with your data?
- It wasn't really clear for me how water velocity was measured (surface and depth?) and how deep the river was at the different points when taking bottom water? '1m above the river bed' can come from 20m or 2m.
- The basis for the river section classification is not clear. Would be nice if you can clarify.

Oponentský posudek doktorské práce Anny Matoušů „Activity and occurrence of methane oxidizing bacteria in the water column along the River Elbe“

Disertační práce A. Matoušů je vypracovaná velmi pečlivě a nemám k ní tedy žádné velké formální připomínky. Skládá se z obecného úvodu a závěru, které vytváří rámec 3 publikovaným pracím a 1 rukopisu v přípravě. Autorka publikovala (prozatím) jeden článek v IF z listu publikací jako první autor a splňuje tak předpoklady k obhájení disertační práce. Tematicky se práce zabývá metodickými aspekty měření a kvantifikací aktivity aerobních metanotrofů ve vodním sloupci podél řeky Labe a také aplikací navržené metodiky měření ve vzorcích spadajících do několika terénních kampaní. Téma práce je unikátní a zajímavé a věřím, že i dosažené data a jejich interpretace jsou velmi přínosné pro vědeckou obec.

Úvod práce je velmi přehledný, čitelný a obsahuje všechny informace, které potřebuje čtenář k obeznámení s tematikou. Výsledky jsou také popsány velmi přehledně a jednoznačně, ačkoliv autorka nebyla schopna na základě dostupných informací výsledky dostatečně vysvětlit. Tento fakt je dán zejména obecným nedostatkem dostupných dat a metodik, které by cíleně mohli odpovědět na otázku jak přesně souvisí aktuálně naměřená metanotrofní aktivita s jednotlivými faktory prostředí, jejichž vliv je velmi komplexní. Souvisí to také s velkou variabilitou různých prostředí, které se podél toku řeky vyskytují a u kterých s velkou pravděpodobností fungují různé faktory, včetně antropogenních) ovlivňující dynamiku metanu ve vodním sloupci. Autorka naznačuje, že v obecném smyslu byla metanotrofní aktivita mnohem menší než se předpokládalo, a mne by zajímalo, jestli to bylo spíše i) malou abundancí a tedy nízkým potenciálem MOB komunity, či ii) inhibicí metanotrofie, či iii) „grazing“ efektem, nebo iv) něčím úplně jiným? K čemu se autorka nejvíce přiklání. Závěrem autorka naznačuje nové výsledky, které nejsou prezentované v disertační práci, ty naznačují, že se tímto tématem chce dále zabývat.

Vývoji metodiky s podrobným praktickým návodem se věnuje první článek. V tomto případě musím velmi ocenit způsob, jakým byly vedeny experimenty a testování různých podmínek měření ve vodních vzorcích, včetně použitého laboratorního materiálu. Z práce je vidět, že autoři mysleli téměř na všechny možné detaily, které v praxi mohou nastat, a myslím, že silně čerpaly ze zkušeností erudovaného týmu. Vývoj metodiky založený na radioizotopickém značení metanu byl veden velmi precizně a důkladně, a tým, který se vývojem metodiky zabýval, jej dále používá. Využití metanu s radioaktivním H namísto C přineslo určité metodické výhody. Podobnými přístupy se nezabývá mnoho laboratoří a tento tým a jeho výsledky jsou v tomto směru unikátní. Zajímalo by mne, jestli by autorka měla nápad jak princip použité metodiky aplikovat na stanovení metanotrofní aktivity v půdním prostředí.

Druhý článek se zabývá podmínkami prostředí, které ovlivňují distribuci metanu a aktivitu metanotrofů od ústí řeky Labe a v části Severního moře (Německý záliv) směrem k Helgolandu. Autorka ve výsledcích popisuje časovou variabilitu aktivity metanotrofů, která je zřejmě závislá na teplotě prostředí. Tento trend byl viditelný zejména při únorových měřeních. Mne by zajímalo, jestli jsou k dispozici pro vodní (říční) ekosystémy denní průběhy koncentrací a emisí metanu, případně metanotrofní aktivity. Ze zkušeností s půdním prostředím je známo, že metanogenní aktivita dosahuje často významný vrchol v dopolední, či poledních hodinách, a pak prudce klesají. Podobné jsou roční průběhy dosahující vrchol časně na jaře, kdy se teploty půdy rychle zvedají a zároveň půda obsahuje množství anaerobních mikroprostředí díky zimním precipitacím a tání sněhu. Pokud by podobné závislosti platily i pro vodní habitaty a metanotrofii, hrála by v měřeních významnou roli i doba odběru či měření. Měli jste tento faktor v průběhu vzorkování nějak standardizovaný?

Třetí článek posuzuje distribuci metanu a jeho oxidaci v ústí řeky Labe. Výsledky ukazují na silnou závislost oxidace metanu na jeho koncentraci a menší závislost na teplotě prostředí. Ostatní měřené parametry neovlivnily aktivitu metanotrofů měřitelným způsobem. Zajímavým zjištěním je, že v tomto ekosystému nevykazovaly naměřené koncentrace metanu korelaci se salinitou, zřejmě kvůli silné fluktuaci v prostředí, které si autoři vysvětlují silným přílivem a značným mícháním mořské a říční vody a zároveň zvýšenou adaptací mikroorganismů na takové prostředí. Zajímalo by mne, jestli jsou dostupné nějaké nové informace o toleranci vodních metanotrofů na zvýšenou či rychle se měnící salinitu. Dále by mne zajímal názor autorky na možnost časového a prostorového oddělení metanogenů a metanotrofů ve vodním sloupci, eventuálně jejich hot-spotů, protože prezentované data (Supplement Fig. 4, 5) něco podobného naznačují. Závěrem autorský tým usuzuje, že ústí řeky Labe není významným zdrojem ani zásobníkem metanu.

Tyto práce prošly kvalitním recenzním řízením a nemám k nim moc připomínek ani otázek.

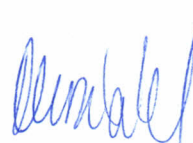
Ve čtvrté studii sepsané ve formě rukopisu se autoři snaží popsat dynamiku metanu v ekosystému řeky Labe od jejího horního toku až po ústí. Autoři popisují rozdílné koncentrace metanu a různou spotřebu metanu v rozdílných habitatech podél toku řeky Labe. Tyto rozdílnosti jsou vysvětlovány zejména charakterem vodního toku (přirozený, vysoce regulovaný technickými konstrukcemi, či nížinný pozvolnější tok řeky na německém území s tzv. groynes). Přídavným faktorem je silný antropogenní vliv v prostředním habitatu díky rozvinutému průmyslu. Je pravděpodobné, že už tento rukopis byl odevzdán do redakce vybraného časopisu a je možné, že autorka už má k dispozici nějaké připomínky, či komentáře. Zajímá mne, jestli už autorský tým našel novější vysvětlení pro „contradictory findings“, případně jestli má autorka v plánu provést nějaký cílený experiment, který by pomohl zodpovědět nezodpovězené otázky. K této části práce mám více technických či věcných poznámek:

- Na straně 133 autorka uvádí, že k výpočtu „turnover time“ používá „given CH₄ oxidation rate“ – z textu jsem nepochopila, co to přesně znamená, jestli autorka použila nějakou konkrétní naměřenou hodnotu, nebo nějakou konstantu?
- V rovnici č. 5 nebo souvisejícím textu je zřejmě překlep (neshoda E/F)
- V tabulce č. 2 chybí údaje o TDN (dle záhlaví tabulky, naopak je tam uvedena konduktivita)
- autorka uvádí, že v některých vzorcích nebyly zaznamenány žádné buňky metanotrofů. Zřejmě se při měření dostali pod limit detekce. Navrhla by dnes autorka jinou metodu kvantifikace methanotrofů, která by byla citlivější?
- Na straně 149 autorka uvádí fakty, které si odporují s těmi, které prezentuje v tabulce 1 v úvodu. Informace se týkají ekologie a preference jednotlivých typů metanotrofů. Informace autorka používá jako argumenty své diskuze. Dle mne je to trochu zavádějící a pravděpodobně bude muset svoji argumentaci a vysvětlování naměřených dat změnit.
- Při použití metody CARD-FISH je důležitý výběr správné DNA sondy, její specificita a následně hybridizační podmínky. Autorka použila k detekci „group specific probes“ pro typ I = My84, přičemž cituje práci Eller et al., 2001. Tato práce ovšem doporučuje použití ještě další DNA sondy My705. Zajímalo by mne, jestli toto rozhodnutí autorka udělala na základě empirických měření a testování na typových kmenech či kulturách, když si vybrala jenom jednu z uvedených hybridizačních sond?
- Zajímavá doplňující data by autorka získala přídatnou detekcí či kvantifikací metanogenů. Proč autorka nevyužila tuto možnost k získání komplexnějšího obrázku o mikroorganismech, které se podílejí na cyklu metanu?

V uvedených 4 článcích autorka ve spolupráci s kolegy optimalizovala a testovala novou metodiku měření a postupně s využitím několika větších i menších vzorkovacích kampaní popsala koncentrace metanu, čas obratu metanu, či jeho toky od 8. km toku řeky Labe až po její ústí a dále po ostrov Helgoland, který leží ca 60 km od pobřeží. V poslední studii obohatila metodické přístupy a osvojila si metodu detekce a kvantifikace metanotrofních bakterií pomocí CARD-FISH. Množství zvládnutých kampaní i množství naměřených a zpracovaných dat naznačují, že kandidátka je určitě velmi platným členem vědeckého týmu jak na lodi, tak v laboratoři, a předpokládám, že si dokáže také dobře poradit v různých krizových situacích, které v terénu mohou nastat. Myslím, že Anna Matoušů má velmi dobré předpoklady uplatnit se ve vědeckém týmu jako samostatný vědecký pracovník a pokračovat úspěšně ve své kariéře. Celkově dosahuje předložená práce vysokou kvalitu prezentovaných výsledků, jednotlivé studie na sebe velmi hezky a logicky navazují.

Závěrem doporučuji práci k obhajobě.

V Písku, dne 25.6.2017



RNDr. Alica Chroňáková, PhD.

Biologické centrum AV ČR, v. v. i.

Ústav půdní biologie

Na Sádkách 7

370 05 České Budějovice