

Oponentský posudek bakalářské práce

Autor: Eliška Juhaňáková

Název: Mikrobiomy komářích hostitelů: metodologická revize dosavadní praxe s využitím amplikonového sekvenování na Illumina platformách

Předkládaná práce se zabývá velice důležitými metodickými aspekty při analýze mikrobiomu komárů. Jedná se hlavně o problematiku uchování vzorků pro následné molekulárně biologické analýzy (extrakce DNA, RNA, sekvenace, atd.), určení biologického templátu s využitím přesahu použitých dopředných primerů i pro eukaryotickou 18SrDNA a v neposlední řadě i posouzení vlivu smíchání (poolování) více vzorků komárů.

Úvodní část práce podává velice podrobný a přehledný popis symbiotických mikroorganismů u různých druhů komárů. Tato část je čtivá a podává čtenáři ucelený úvod do problematiky. Oproti tomu část zabývající se metodikou stanovení mikrobiálních společenstev je zúžena do poslední kapitoly 1.8. Zde autorka popisuje několik molekulárně biologických metod. Popis je ale velmi obecný a nezahrnuje konkrétní práce zabývající se mikrobiomem komárů. Čtenář tak nemá možnost posoudit, kde jsou nedostatky těchto metod a proč by měly být metody založené na sekvenování 16SrDNA genu lepší než ty dosavadní. Jelikož se i v názvu práce objevuje termín „metodologická revize“, mohla být tato část v úvodu více vyzdvížena. V úvodu také postrádám část věnovanou uchovávání vzorků a jeho vliv na následné molekulárně biologické analýzy.

V práci se občas vyskytují anglikanismy a někdy doslovně přeložené anglické termíny. Např. místo termínu „cyanobakterie“ bych doporučoval používat český termín „sinice“. Dále termín „rodina“ vznikl asi doslovným překladem „family“, což je ale v českém překladu termín pro „čeled““. Pozor tedy na doslovné překlady. Místo „prezervační činidlo“ bych opět spíše používal český termín „konzervační činidlo“. Dále některé nepřesné formulace při popisu molekulárně biologických metod v úvodu: DGGE dělí fragmenty na základě sekvence ne na základě komplementarity. Fragmenty putují v denaturačním gradientu a podle sekvence denaturují a „zastavují“ se tak v polyakrylamidovém gelu. Úplné denaturaci zabraňuje tzv. GC bohatý konec, který se amplifikuje s každým templátem.

Metodická část je popsána velmi pečlivě a podrobně včetně bioinformatických analýz. Větší pozornost mohla být věnována popisu statistických metod.

K výsledkům a diskusi bych měl následující komentáře a otázky:

Autorka získala velice cenná data, týkající se uchování vzorků komárů v různých konzervačních činidlech. Závěry asi moc nepotěší výrobce drahých komerčních roztoků (Např. All Protect tissue), jelikož jednoznačně nejlepším konzervačním činidlem byl prostý etanol. Je však nutno podotknout, že tyto výsledky byly dosaženy při uchování vzorků při -20°C, kdy samozřejmě hraje roli i nízká teplota. Pokud se vzorky skladovaly při pokojové teplotě, etanol byl v porovnání s ostatními nejhorší. Proto mě malinko překvapil závěr autorky na str. 25 dole, kde tvrdí, že teplota nemá vliv na složení mikrobiomu. Mohla by toto tvrzení autorka doložit grafem? Je myšlen Obr. 1., kde jsou vyneseny počty OTU v závislosti na použitém konzervačním roztoku? Mohla by autorka popsat Obr. 1, kde jsou sice nesignifikační ale určité trendy v počtu OTU mezi vzorky uchovávanými při pokojové teplotě a v -20°C?

Musím vyzdvihnout použité bioinformatické metody a statistické zpracování v programu R. Bioinformatické postupy jsou aktuální a algoritmus usearch/uparse poskytuje asi nej přesnější určení počtu mikrobiálních druhů (OTU) ve zkoumaných vzorcích. Postupy jsou popsány velmi podrobně v metodice, což velice oceňuji. Myslím, že na studentku bakalářského stupně je opravdu chvályhodné, že zvládla tyto analýzy a dodatečné statistické zhodnocení.

U statistického zhodnocení bych se na chvíli zastavil. Autorka uvádí hodnoty R^2 , které předpokládám udávají % vysvětlené variability testovaného modelu, kdy $R^2 = 0$ odpovídá 0% a $R^2=1$, 100% vysvětlené variability. Pokud to tak není, mohla by autorka tento parametr vysvětlit? V metodice totiž nejsou statistické testy podrobněji popsány. Je víceméně popsáno, že analýzy byly dělány v programu R a pomocí příslušných knihoven. Chybí mi v datech i údaje o parametru p a na jaké hladině významnosti alfa byly statistické testy prováděny. Jelikož autorka uvádí, že rozdíly byly nebo nebyly signifikantní, bylo by dobré tyto parametry uvést. Navíc, statistické výsledky se vyskytují jen v textu. Spíše bych doporučil tato data uvádět v tabulkách. Chybí u nich např. i počet opakování u jednotlivých skupin, které se porovnávaly, protože i počet opakování má zásadní vliv na výsledky statistických testů.

Díličí otázky k samotné práci:

1. Jak bylo vyhodnoceno, zda je ve vzorku mikrobiální kontaminace? Mohla byste podrobněji pospat, případně ukázat obrázek gelu, kde je vzorek kontaminovaný a porovnat ho s nekontaminovaným vzorkem?
2. Jak byste vysvětlila to, že etanol měl při -20°C největší výtěžek DNA a přes to byl v této variantě nejmenší počet OTU (tj. bakteriálních druhů). Viz. Obr. 1?
3. Ví se jaký podíl při extrakci DNA představuje DNA z mikroorganismů a z tkáně komára? V závěru uvádíte, že mikrobiální DNA dominuje. Napadá vás nějaká metoda, jak informaci o podílu eukaryotické a prokaryotické DNA získat?
4. Jak byla testována specifita primeru 515F? Uvádíte odkaz na publikaci, avšak aktuální postup EMP ve svém protokolu používá modifikovanou verzi těchto primerů. Byly sekvenace prováděny s původními nebo aktuálními EMP primery? Nezkoušeli jste např. sami test *in-silico* v ARB-Silva databázi, kde se dá ověřit pokryvnost primerů s aktuální Silva databází?

I přes výše zmíněné výtky si myslím, že bakalářská práce je nadstandartní, jak co do počtu provedených analýz, tak i použitých metod a hodnotím ji stupněm výborně.

V Českých Budějovicích, 14.5.2017



Ing. Jiří Bárta, Ph.D.