

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Marie Bártové *Detekce a monitoring potenciálně toxických sinicových lipopeptidů*.

Tuto magisterskou práci byla radost oponovat. Je to dobře rozmyšlený projekt s příběhem, s velkým množstvím odvedené práce jak při tvorbě literární rešerše, tak v množství a kvalitě odvedené práce a šíři zvládnutých metod.

Marie Bártová vytvořila prakticky celý protokol pro molekulární práci s PUW/MIN od izolace DNA, přes nové primery až po optimalizaci PCR protokolu. Pomocí těchto metod potvrdila výskyt potenciálních sinicových producentů PUW/MIN v biofilmech v Norsku (kde se víceméně očekávali) a hlavně je našla i v planktonu na Třeboňsku (kde se v takovém množství rozhodně neočekávali) a potvrdila správnost svých výsledků i HPLC-HRMS analýzou.

Kromě této vlastní práce oceňuji na zpracování pečlivé zacházení s jazykem a velmi malé množství překlepů

Ovšem hledá-li zlovolný oponent mouchy, vždycky něco najde, ale v tomto případě se skutečně jedná o drobnosti. Na obr. 19 mi není jasné, o jaké dvě lokality se jedná (ta na výřezu je ten jeden puntík u Trondheimu? Kde je pak ta druhá?). Kapitola 1.1 „Výskyt sinic“ je poněkud chaotická, o terestrických se zmiňuje vysloveně letmo a podivně nahodile uprostřed vodních organismů, které řeší mnohem víc. Jediné, co mě v oblasti tohoto typu nedostatků zarazilo více, je kontrast mezi pečlivě opraveným vlastním textem a trochu zanedbaným seznamem literatury: zacházení s křestními jmény autorů je značně chaotické; občas jsou uvedeni všichni autoři, občas „et al.“ a podobně. Pravděpodobně příznak závěrečného výčerpání.

Při postupném čtení práce jsem si připravil celou řadu závažných dotazů, které jsem hned po přečtení diskuze zase škrtal, neboť byly v diskuzi zodpovězeny. (Což svědčí o pečlivé práci a přemýšlení nad textem – ne mém, ale autorky). Pár méně závažných mi jich ale nakonec přece jen zůstalo.

1. „Produkované cyanotoxiny představují nebezpečí pro zdraví lidí a celý ekosystém (str.2)“ Mohla by autorka blíže specifikovat negativní účinky cyanotoxinů na celý ekosystém?
2. Velmi oceňuji to, že svým převážným založením laboratorní vědec nejenže sbírá osobně vzorky v terénu, ale že se je osobně naučil také velmi slušně determinovat pod mikroskopem. Nicméně k tomu nějaké dotazy mám. Jak je to s terestrickými Hapalosiphony? (str.3 + příloha č. 4) A jak s terestrickým výskytem *Merismopedia angularis*?
3. Skutečně jste průhlednost Secchiho deskou měřili v roce 2017 na centimetry? Jak?

Jak je však z celého mého posudku doufám patrné, považuji tuto práci za velmi zdařilou a navrhuji ji jednoznačně k obhajobě s klasifikací výborně.

V Českých Budějovicích, 26.4.2019

Doc. RNDr. Jan Kaštovský, Ph.D.

Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Marie Bártová

Název: Detekce a monitoring potenciálně toxických sinicových lipopeptidů

Vedoucí práce: RNDr. Jan Mareš, Ph.D.

Oponentský posudek vypracovala: RNDr. Eliška Kozlíková, Ph.D., Biologické centrum AV ČR, Hydrobiologický ústav, České Budějovice

Bc. Marie Bártová se ve své magisterské diplomové práci věnovala cyklickým sinicovým lipopeptidům ze skupiny puwainaphycinů a minutissamidů (PUW/MIN), vypracování metodiky pro jejich detekci a použití této metodiky při monitoringu příslušných biosyntetických genů v přírodních sinicových společenstvech. Předkládanou práci hodnotím jako velice významnou hned z několika důvodů: (1) zaměřuje se na látky, které jsou nejen potenciálně toxické, ale i potenciálně medicínsky významné; (2) přináší specifické metodické postupy pro detekci a monitoring těchto látek; (3) monitoruje výskyt biosyntetických genů pro PUW/MIN nejen v půdním, ale i v planktonním prostředí, které je z tohoto hlediska dosud málo probádané.

Diplomová práce v rozsahu 76 stran (vč. příloh) je standardně rozčleněna do oddílů Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Metodika, Výsledky, Diskuze, Závěr, Literatura, Přílohy. Ve smyslu množství použitých metod a rozsahu prací hodnotím předloženou diplomovou práci jako spíše nadprůměrnou a splňující nároky na magisterskou diplomovou práci.

Cíle práce jsou jasně definovány a odpovídají názvu práce. Překvapilo mě jejich zařazení až za Literární přehled. Za obvyklejší jsem považovala jejich umístění za stručný Úvod.

Literární přehled přímo navazuje na Úvod a není vyčleněn specifickým nadpisem a číslem kapitoly, což bývá obvykle zvykem. Stávající řešení považuji za formálně nepříliš šťastné, protože pak se dvě podkapitoly literárního přehledu (1 Sinice, 2 Lipopeptidy) ocitají na stejné hierarchické úrovni jako následující hlavní strukturní oddíly práce (3 Cíle práce, 4 Metodika, 5 Výsledky, 6 Diskuze, 7 Závěr, 8 Literatura, 9 Přílohy).

Předmětem literárního přehledu je problematika struktury, syntézy a funkce bioaktivních sekundárních metabolitů sinic vč. cyanotoxinů a lipopeptidů. Velmi oceňuji, jak se autorka s tímto komplikovaným tématem vypořádala. Text má přiměřený rozsah, je napsán jasně a srozumitelně a obsahuje přehledná ilustrativní schémata, takže je dle mého názoru velmi dobře přístupný i nezasvěcenému čtenáři.

Výhrady bych měla k názvům některých taxonů sinic. Rodový název *Aphanizomenon* v několika případech obsahuje překlady (*Aphanizomenom*, *Aphazinomenom*). V případě, že byl taxon revidován, měl by být na prvním místě uveden nově akceptovaný název a až v závorce název původní. To se týká *Kamptonema formosum* vs. *Oscillatoria formosa*, ale i *Dolichospermum* vs. *Anabaena*. Ve druhém jmenovaném případě je situace navíc komplikovaná tím, že oba rody (tedy *Dolichospermum* a *Anabaena*) existují nadále v revidované podobě oba. Nelze tedy napsat „*Anabaena* (= *Dolichospermum*)“ jako např. na str. 4. Pokud se v dalším textu práce píše o rodu *Anabaena*, není potom jasné, o jaké přesně sinici jde – zda o planktonní zástupce (*Dolichospermum*), nebo o sinici bez aerotopů (povětšinou půdní nebo bentické, *Anabaena*). To má ale přitom, i s ohledem na studium environmentálních vzorků v rámci práce, zásadní význam.

Logicky ne zcela šťastné mi připadá řazení kapitol 1.2 Toxicita sinic a 1.3 Další bioaktivní sekundární metabolity sinic. Kapitola 1.3 přehledně shrnuje různé typy bioaktivních látek s různým účinkem, mezi které však cyanotoxiny patří také. V kap. 1.3 jsou cyanotoxinům věnovány dvě věty, které jsou vlastně jen stručným shrnutím obecného úvodu kap. 1.2. Text kap. 1.3 (rozšířený o obecný úvod kap. 1.2) by mi tedy připadal jako logicky vhodnější úvod do celé problematiky bioaktivních

látek (cyanotoxiny, lipopeptidy, eventuálně další) s tím, že další podkapitoly by pak vybrané skupiny bioaktivních látek podrobně rozebraly.

Na studentku bych měla několik otázek ohledně onemocnění Alveld:

1) Název onemocnění zní nezvykle. Z čeho je odvozen? A je skutečně nutné ho psát s velkým písmenem na začátku?

2) V kap. 2.5 píšete, že „u sinice *Symplocastrum muelleri* NIVA-CYA 644 byly detekovány podobné biosyntetické genové klastry a produkce PUW/MIN“. Zřejmě vypadla informace, čemu podobné byly genové klastry tohoto kmenu.

V Metodice jsou srozumitelně popsány použité metody, někde však informace nejsou zcela kompletní. Na studentku bych proto měla několik doplňujících otázek.

1) Kap. 4.1.1, str. 21 – k čemu byly následně využity environmentální vzorky ve sterilních plastových 50 ml zkumavkách?

2) Tab. 1 – Nebylo by místo jednoho ze dvou kmenů *Cylindrospermum alatosporum* zajímavější použít zástupce jiného taxonu sinic? Ve sbírce na HBÚ, případně ve sbírce na BÚ AV ČR v Třeboni by měl být dostupný např. kmen *Sphaerospermopsis reniformis*, který rovněž obsahuje gen pro PUW/MIN.

3) Kap. 4.2 Mikroskopování – co přesně je míněno slovy „environmentální vzorky byly prohlíženy“? Co se dělo se dvěma sklíčky, které byly pro mikroskopování připraveny z každého environmentálního vzorku?

Drobnou výhradu mám k logickému řazení podkapitol metodiky: mezi podkapitolku o odběrech environmentálních vzorků a další o jejich mikroskopování je vložena kapitolka o sbírkových kmenech, které byly dále použity při molekulárních metodách (design specifických PCR primerů pro amplifikaci genů pro PUW/MIN).

Studentka získala velké množství výsledků za použití různých metod a odvedla velký kus práce. Oddíl Výsledky je hezky, přehledně a srozumitelně zpracován. Přesto mám i zde několik drobných výhrad, převážně formálního charakteru.

V mapě odběrů v Norsku (Obr. 19) se špatně orientuji. Dle textu by v ní měly být vyznačeny dvě odběrové lokality, vidím však pouze jednu černou tečku v celkové mapě Norska a pak druhou tečku v zeleném výřezu vpravo dole. Postrádám lokalizaci, kde na mapě Norska se onen zelený výřez nachází. Trochu zmatečná je i legenda, ve které se pod nadpisem „Lokality odběrů:“ vedle černé tečky uvádí „oblast výzkumu“. Jako oblast bych čekala nějakou vyznačenou plochu v mapě, zatímco tečkami by bylo vhodné vyznačit lokality.

Obecně bývá zvykem, že legendy k obrázkům by měly být plně vysvětlující samy o sobě, bez potřeby dalších upřesnění. To s sebou občas nese i to, že je určitý údaj opakovaně uvedený u více obrázků. Je tím usnadněna orientace čtenáři, který s textem pracuje selektivně. Pokud by mělo být splněno toto pravidlo, pak by informace ze str. 39 měla být uvedena u všech obrázků, a ne v textu („V popisu gelů u všech obrázků UTEX = UTEX B 1613, C 993 = CCALA 993, ...“).

Obr. 21 – „Vyznačení odebrané biomasy...“ – v obrázku vyznačení chybí.

Obr. 18 a Obr. 22 jsou vzhledem k rozměrům stránky (zejm. její šířce) zbytečně malé. Zvláště v případě Obr. 22 (odběrový terén v Norsku) je to na úkor zřetelnosti fotografie.

Na str. 36 – nepřesná formulace: „Absenci sinicové DNA potvrdily i negativní výsledky PCR reakcí s navrženými primery pro detekci sinic s geny PUW/MIN.“ Negativní výsledky těchto PCR reakcí potvrdily jen absenci sinic s geny pro PUW/MIN, nikoli absenci sinicové DNA.

V Obr. 36 chybí popis kmenů v posledních pěti jamkách (kontrolní sbírkové kmene?).

Vzorky v Tab. 11 (a obecně položky v jakékoli tabulce) by měly být řazeny podle nějakého logického vodítka, v našem případě nejlépe vzestupně dle čísel.

Dále mám k Výsledkům několik doplňujících otázek:

1) Proč byl gradient step při optimalizaci primerů A1 a A2 v jiném teplotním rozmezí než u primerů B1 a ještě jiný než u primerů F1?

2) Jen pro zajímavost. U všech vzorků měla největší výtěžnost izolace DNA kitem Nucleo Spin Soil. Jak si vysvětlit, že u treboňských vzorků dala při izolaci DNA větší výtěžnost metoda Yilmaz et al. 2009 oproti MO-BIO KIT, zatímco u norských vzorků tomu bylo naopak?

V Diskuzi autorka kriticky diskutuje výsledky svojí práce s jinými pracemi, přičemž vhodným způsobem akcentuje hlavní výstupy a přínosy práce. Z textu je zřejmé, že se v problematice i ve výsledcích své práce dobře orientuje.

K Diskuzi mám doplňující otázky:

1) Víím, že objem odvedené práce je i tak veliký, ale neuvažovali jste – třeba ještě dodatečně – o analýze přítomnosti genu pro PUW/MIN u izolovaných kmenů *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*? V textu píšete, že v rybníce Spolský, kde se tato sinice vyskytovala, se tyto cyklické lipopeptidy nevyskytovaly, což nepotvrzuje, ale ani nevyvrací možnost schopnosti *S. aphanizomenoides* tyto látky produkovat.

2) Jak interpretovat, že při porovnání PCR produktů ze vzorků č. 1, 7, 8, 16, 18 a 19 s kmenem NIVA-CYA 644 byla podobnost pouze 58-71%? Je možné, že nositelem genu pro PUW/MIC byla v těchto vzorcích jiná sinice než *Symplocastrum muelleri*?

Závěry jsou jasně a přehledně formulovány a zcela odpovídají výsledkům a výstupům práce.

Připomínku mám k citacím, jejichž používání v textu by bylo třeba sjednotit (používání čárky mezi jménem autora/autorů a rokem vydání publikace není uniformní).

Formální poznámky:

Číslování obrázků by mělo odpovídat pořadí, v jakém se k nim odvolává hlavní text práce.

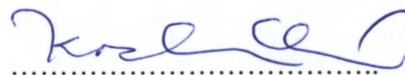
Obecně je zvykem, uvádět v textu jednociferné číslovky slovním vyjádřením, zatímco dvou- a víceciferné číslovky bývají psány číslicí.

Str. 41 – začátek kapitoly 5.2.4 mohl být odsazen na další stranu.

Závěrem mohu konstatovat, že magisterská diplomová práce Bc. Marie Bártové je kvalitním příspěvkem ke studiu sinicových cyklických lipopeptidů ze skupiny PUW/MIN. Kromě zavedení a ověření metodiky k detekci těchto látek přináší tato práce i cenné informace o výskytu potenciálních producentů v přírodních vzorcích, ať už v planktonu třeboňských rybníků nebo ve vzorcích z norských pastvin. Osobně pro mě byl velkým překvapením hojný výskyt potenciálních sinicových producentů PUW/MIN v třeboňských rybnících (59 % vzorků). Potvrzení a upřesnění výskytu nositelů genu pro PUW/MIN i samotného puwainaphycinu v norských vzorcích je významným krokem v dalších snahách o objasnění mechanismu vzniku nemoci alveld.

Předloženou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji ohodnotit klasifikačním stupněm výborně.

V Písku 14. 5. 2019



RNDr. Eliška Kozlíková, Ph.D.