

Oponentský posudek na magisterskou práci

Název práce: Zjištění diversity pikoplanktonních sinic v přírodních vodách pomocí metody CARD-FISH

Autor: Bc. Miroslava Švecová

Oponent: doc. RNDr. Petr Znachor, Ph.D.

HODNOCENÍ PRÁCE

název

- vystihuje dobře obsah práce ano
- věcný a stručný ano

úvod a literární přehled

- přehledný, logicky členěný ano
- vztahuje se k zadané problematice a obsahuje dostatečné množství informací ano
- obsahuje kritické hodnocení použitých informací ano

cíle a hypotézy

- jasně formulované ano
- chybí ne

materiál a metody

- dostatečně a přehledně popsané ano
- vhodně zvolené (mohou splnit cíle) ano
- dostatek zpracovaného materiálu **ano**
- logicky uspořádaný pokus s výhradami

výsledky

- odpovídají použitým metodikám ano
- přehledně prezentované (formou grafů nebo tabulek) ano
- výsledky se zbytečně neopakují ano
- vhodně statisticky zpracované ano

interpretace dat (diskuse)

- diskuse dostatečná, odpovídá rozsahu dat ano
- diskuse není spekulativní, je podložena dostatečným množstvím literárních údajů ano

závěry

- práce má jasné a jednoznačné závěry, které jsou podloženy daty ano

- závěry odpovídají na cíle a hypotézy práce ano
 - použitá literatura**
 - v odpovídajícím rozsahu ano
 - formální stránka**
 - obrázky a tabulky přehledné, obsahují dostatečné množství informací s výhradami
 - text a jeho členění po formální stránce bez větších nedostatků ano
 - jazyk -
 - je srozumitelný a gramaticky správný víceméně
 - použité odborné termíny jsou použity adekvátně ano
 - literatura
 - citována bez formálních chyb, jednotně a způsob citací odpovídá mezinárodním
 - nebo českým normám ano
 - použité citace jsou uvedeny v seznamu literatury ano
 - obsažené informace jsou (posuzujte pouze u mgr. prací)¹**
 - (x) pro obor nové nebo rozšiřující poznání
 - () jsou cenným potvrzením (aplikací) známých skutečností,
 - () jsou jen opakováním již známých skutečností bez nového přínosu
 - V případě potřeby uveďte doplňující komentář a otázky na zvláštním přiloženém listu**
 - doplňující komentář přiložen ano
-

Práce **splňuje** požadavky kladené na **magisterské** práce předkládané na BF JU a proto **doporučuji** k obhajobě.

Práci hodnotím klasifikačním stupněm

VELMI DOBŘE

Datum: 4.ledna 2023

Podpis oponenta:

¹ Zaškrtněte jednu z možností

Tématem magisterské práce Miroslavy Švecové bylo zjištění diversity pikoplanktonních sinic v přírodních vodách pomocí metody CARD-FISH. Práci se nevyhnuly obvyklé formulační nepřesnosti a stylistické přešlapy, ale naštěstí se vyskytují v tolerovatelné míře. Kvalita literární rešerše je trochu kolísavá. V kapitole 2.1. byla celá řada nepřesností a formulačních neobratností, kapitola 2.2. již tolik netahala za uši, nebo případné nedostatky oponent nebyl schopen odhalit ☺. Následující kapitoly se nesou v podobném duchu.

Metodika je detailní, nicméně způsob odběru vzorků je odbyt větou „Vzorky z nejrozličnějších lokalit a časových obdobích byly odebrány v příslušných lokalitách“. Co si pod tím máme představit? Kdy, kde, jak a co přesně se odebíralo (alespoň částečná odpověď na otázky byla v mezích nalazena v tabulce v příloze)? Zbývá část metodiky je velmi rozsáhlá a celkově složitá na orientaci. Rozhodně by čtenáři pomohlo nahradit některé části textu grafickým schematem, např. design pokusu. Během čtení výsledků popisující pokus PIZO I jsem se musel několikrát vracet zpět do metodiky. Po přečtení celého textu se domnívám, že by bylo mnohem vhodnější výsledky pokusu PIZO I do práce vůbec nezařazovat, či je maximálně zjednodušit a použít jako názornou ukázkou ověření metody CARD FISH.

Vzhledem k omezené dostupnosti požadovaných dat pro jednotlivé lokality bych jasně deklaroval, že cílem práce bylo pouze ověřit použitou metodu a provést screening různých genotypů sinic (tak jak je uvedeno v zadávacím protokolu magisterské práce) a úplně bych rezignoval na vysvětlování dílčích rozdílů mezi lokalitami. Zaměřil bych se pouze na srovnání různých typů ekosystémů, které vychází zajímavě a přináší nové poznatky o složení pikosinicového společenstva. Protože údaje o konkrétních lokalitách nepřidávají žádnou informaci navíc, doporučoval bych celý soubor anonymizovat a v textu jmenovitě zmiňovat jen nějaké extrémy či zajímavosti. Výsledky jsou značně detailní, ale osobně považuji za nejpřínosnější jejich prezentaci ve formě, v jaké jsou uvedeny např. na obrázku 22. Bohužel se jedná o jediný takovýto způsob prezentace pro celkovou úspěšnost hybridizace, v prezentaci při obhajobě doporučuji použít tento typ grafů i pro jednotlivé použité sondy. Aktualizace – kumulativní grafy % hybridizace uvedené v příloze jsou mnohem přehlednější než ty prezentované v textu, pro obhajobu jednoznačně doporučuji jejich použití namísto nepřehledných sloupečkových grafů.

Diskuse týkající se použití CARD FISH metody v různých typech ekosystémů je z větší části postavená na požadovaných datech, která jsou ale značně děravá a uvedená až v příloze na samém konci práce (přiznávám, objevil jsem je pozdě, moje chyba). Vzhledem k tomu, jak je postavena metodika a výsledky, diskusi bych zúžil na hledání obecných rozdílů mezi jednotlivými typy ekosystémů, t.j. důlní jezera, nádrže/jezera a rybníky. Takto bych také doporučoval prezentovat data při obhajobě. Také by asi bylo lepší, kdyby se diskusi ubírala více směrem k metodickým aspektům viz. kapitoly 6.2.4 a dále.

Celkově je velmi obtížné tuto práci hodnotit. Většina mých dotazů a výtek bohužel přesahuje vlastní zaměření diplomové práce a je adresována spíše školitelce. Z magisterské práce mám pocit, že studentka posloužila jako levná pracovní síla pro generování dat a na oplátku se jí dostalo ne zcela dostatečného vedení při konečném zpracování výsledků a finalizaci práce. Laboratorní práci studentky byla vysoce nadstandardní (čas, úsilí, množství vzorků atd.), vlastní diplomovou práci je v aktuální podobě spíše průměrná s mnoha výhradami, za které ovšem většinou nemůže. A přitom to mohla být tak skvělá práce. Textu by dle mého výrazně prospělo celkové zjednodušení a větší nadhled. Získaná data a odvedenou práci souhrnně hodnotím jako

cenný příspěvek k poznání pikoplanktonních společenstev sinic a věřím, že se tento soubor podaří zhodnotit i v podobě odborné publikace/cí, která by sloužit jako základ budoucí případné rigorosní práce. Celkovou známku navrhuji velmi dobře.

Konkrétní dotazy:

Definice pikosinice uvedená v úvodu literární rešerše není přesná a zohledňuje pouze metodické hledisko zpracování vzorku. Podle této definice by sem nepatřily koloniální pikosinice, jejichž kvantifikaci se zabývá práce J. Psohlavce vedená stejnou školitelkou. Nešlo by se shodnout a používat jednotnou definici pro tyto organismy? Nebo alespoň upřesnit, že touto definicí máme na mysli jednobuněčné a nikoli koloniální formy?

Mohla by autorka rozvést či upřesnit myšlenku uvedenou na konci věty „Fykobilizomy rozšiřují možnost získávat energii z vlnových délek světla do oblastí, které chlorofyl nevyužívá, *proto si s řasami příliš nekonkurují*.“

Na straně 3 autorka uvádí, že „Pikoplanktonní sinice jsou důležitou součástí mikrobiálního potravního řetězce (Obr. 1), kde společně s bakteriemi využívají organické látky uvolněné z organismů (Callieri & Stockner, 2002).“ Uvedená citace se však zabývá převážně autotrofními pikosinicemi. Navíc uvedené tvrzení implikuje potenciální hetero/mixotrofii jako významný způsob výživy pro pikoplanktonní sinice. Je tomu skutečně tak?

Tvrzení, že „Pikoplanktonní sinice produkují celou řadu sekundárních metabolitů a také dokáží tvořit masivní vodní květy.“ je třeba doložit odkazem na literaturu. Rychlým pátráním v literatuře oponent zjistil, že „masivní vodní květy“ se zpravidla týkají mořských ekosystémů a některé odkazy zmiňující sladkovodní pikoplanktonní květy se zase týkají eukaryotního pikoplanktonu, např. Somogyi et al. 2009, Aquat. Ecol.)

Tvrzení „Pikoplanktonní sinice *Synechococcus* sp. může dle výzkumů Gin et al. (2021) produkovat cyanotoxiny (CYN) či anatoxiny (ATX).“ implikuje, že anatoxiny nepatří mezi cyanotoxiny. Jak tomu tedy je?

„*Cyanobium* je významnou součástí sladkovodního pikoplanktonu. Náleží do sub-klastru 5.2 a je nejrozšířenějším a nejvariabilnějším rodem pikoplanktonních sinic. Jeho buňky jsou morfologicky jednoduché, oválné, 1–2 µm dlouhé a 1 µm široké. Pikoplanktonní sinice *Cyanobium* má kulatější tvar buněk.“ Z výše uvedeného odstavce není zřejmé, o jaké pikoplanktonní sinici *Cyanobium*, která má kulatější buňky (něž co?) je vlastně řeč.

Kapitola 3.1. „jejichž cílem bylo ověřit intenzitu a preference zooplanktonu přidáním izolovaných kmenů pikoplanktonních sinic do několika velikostních frakcí přirozeného společenstva.“ – o jaké intenzitě je řeč?

„Po zjištění ideální koncentrace byl objem vynásoben 4x a použit na přípravu FISH filtrů.“ Logika skrytá za tímto tvrzením si zasluhuje bližší vysvětlení.

Pro naprosté laiky v oblasti molekulárních metod, mezi něž se řadí i oponent, by bylo dobré vysvětlit, jakou funkci v metodickém postupu mají kompetitory.

Schéma pokusu PIZO I (4.3.1) je značně komplikované a obtížné na zorientování. Myslím, že nejen oponent, ale i případní čtenáři by jistě ocenili nějaké přehledné grafické schéma.

Kapitola 4.4. popisuje metodiku pro zjištění diversity pikosinic v různých typech ekosystémů. Z pohledu autorky rozumím tomu, že detailně analyzovala vzorky na filtrech, které někdo, někde někdy a nějakým způsobem odebral. Bohužel bližších údajů je málo. Z tabulky v příloze na samém konci práce jsem nabyl dojmu, že jde o kompilát vzorků odebraných v rámci různých vzorkovacích programů. Zatímco u většiny spadající pod pravidelné programy jsou dostupné požadované údaje, na celé řadě lokalit data chybí, což je škoda. Jak se mezi evropskými vzorky ocitl vzorek z Indie, o jakou šlo lokalitu a lze ji zařadit mezi nádrže? Značně neúplná požadovaná data mají velmi omezené interpretační možnosti.

Dle mého názoru je popis výsledků pokusu PIZO I příliš složitý (strany 24-26). Doporučuji při obhajobě nepopisovat nutně každý jednotlivý graf v obrázku 5, ale soustředit se na hlavní trendy a rozdíly. *Jak si autorka vysvětluje rozdílné zastoupení A1.1 a A3.1 v jednotlivých variantách na začátku pokusu (zejména varianty 0,2 a 1). BTW v metodice se píše, že frakce 0,2 neobsahovala žádné mikroorganismy. Zde jsem se vrátil zpět k metodice, kde se píše „ Varianty se od sebe lišily tím, přes jaký filtr byla voda filtrována (0,2 μm – 1 μm – 5 μm – 20 μm – 200 μm – UNF). “. Jak je tedy možné, že ve variantě 0,2 jsou nalezeny pikosinice jak jednobuněčné, tak i koloniální (první řádek grafů v obrázku 5)?* Oponent po chvíli našel odpověď – do vzniklých frakcí se přidaly kultivované pikosinice, proto tedy v obrázku 5 jsou zobrazeny (názorná ukázka, že rozdělení oponentury do více dnů přesahuje mentální kapacitu oponenta). Toto však přivádí oponenta k jiným otázkám týkajícím se opět designu pokusu. V metodice se zmiňuje kontrolní vzorek, ale ve výsledcích se člověk nikde nedočte, co v něm vlastně bylo (jaké organismy byly přítomny ve vodě z rybníka Rod). Proč byl vzorek složitě frakcionován, když pro určení vlivu predace stačilo pro zjednodušení použít frakce 0,2 a UNF (také časové změny bych zredukoval na porovnání začátku a konce experimentu). Rozumím použití i dalších frakcí pro odhalení vlivu různě velkých predátorů, t.j. bičíkovců, nálevníků, vírníků a velkého zooplanktonu. Jsou někde k dispozici informace, kolik těchto organismů ve vodě bylo. Možná by bylo lepší celý pokus koncipovat jako čistě laboratorní a místo různých velikostních frakcí použít definovaná množství konkrétních predátorů. Je mi jasné, že mé otázky a připomínky jsou adresovány spíše školitelce a rozhodně nebylo úkolem diplomové práce se těmito otázkami zabývat. Z těchto důvodů se mi jeví zařazení výsledků pokusu v této podobě do diplomové práce jako značně problematické. Preferoval bych neuvádět všechna data z pokusu, ale výsledky maximálně zjednodušit – začátek, konec, bez predátorů s predátory. Kvalita výsledků by nijak neutrpěla, závěry z pokusu by byly stejné – zvolená metoda je použitelná a přináší nové poznatky při studiu predace v laboratorních podmínkách.

Výsledky z důlních jam – čtenář pomalu proniká do tajů odběru vzorků a zjišťuje, že některé vzorky byly odbírány z různých hloubek. Číslování důlních jam na českém území naznačuje, že se jedná o opakované odběry, ovšem zda-li se jedná o jednu sezónu nebo meziroční sledování, se čtenář nedozví (pardon, dozví v tabulce na konci práce).

Proč, když se jedná o pilotní aplikaci CARD FISH metody, není obecně diskutován vývoj metody a metodické pokroky, byť u bakterií? Šlo by nějak porovnat použití CARD FISH metody u bakterií a u pikosinic. Např. hybridizovatelnost, metodické podobnosti, případně odlišnosti, jak daleko jsme se dostali u bakterií (rutinní použití, ad-hoc vývoj nových sond) a jak u pikosinic (první použití vůbec). Jak autorka vidí budoucnost této metody?

Závěry: mám za to, že hypotézu nelze potvrdit, ale jen zamítnout.