



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v.v.i.

Ústav půdní biologie

adresa: Na Sádkách 702/7, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 746

fax: +420 385 310 133

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 5002209089/5500, Raiffeisenbank a.s.

www.upb.cas.cz | e-mail: upb@upb.cas.cz

Věc: Oponentský posudek doktorské práce Mgr. Marie Czinnerové s názvem: Assessment the impact of chlorinated ethens remediation on indigenous microbial populations using molecular biology tools (Hodnocení vlivu sanace chlorovaných etylenů na původní mikrobiální společenstva pomocí nástrojů molekulární biologie)

Program: Applied Sciences in Engineering

Předložená práce je sestavená jako kompilát 3 článků (Jimp z toho 2 prvoautorské) a jednoho rukopisu (také prvoautorský), který je v recenzním řízení. Součástí práce je úvod, cíle, teoretická část, experimentální část, závěry a souhrn literatury. Práce je napsána v anglickém jazyce s českým abstraktem. Tři hotové publikace vyšly ve velmi kvalitních časopisech, a tedy naznačují i vysokou kvalitu odvedené práce. Práce je po jazykové i formální stránce v pořádku, největší výtka mám k nepředložení Supplementary Material pro rukopis, nebylo tak možné dohledat data, na které se autorka v práci odkazuje.

Práce se zabývá vlivem sanačních technologií na mikrobiální společenstva v místě kontaminace. Tyto změny hodnotí využitím molekulárně biologických technik (sekvenování nové generace, qPCR). Tato práce rozhodně přispívá k pochopení dynamiky odpovědi zejména bakteriální složky mikrobiálních společenstev v prostředích, které z důvodu dlouhodobé akumulace nežádoucích kontaminantů (chlorovaných etylenů, CE) procházejí sanací. Molekulárně-biologické metody mají určitě potenciál přinést v tomto ohledu nové poznatky, zejména monitoring bakterií, které jsou zapojené v degradaci CE, či jiných, podpůrných členů mikrobiálního společenstva. Zejména sledování relativní abundance funkčních genů degradační dráhy (pokud je známa a dobře popsána), či jiných genových markerů (specifické primery pro 16S rRNA gen), mohou v tomto ohledu plně vyhovovat. Zvolené nástroje molekulární biologie považuji za vhodné, některé připomínky uvádím níže.

Úvod i cíle práce jsou popsány jasně.

Kapitola 4. Teoretická část. Obecně, doporučila bych citovat originální práce před citováním review (předpokládám, že není definovaný rozsah jednotlivých kapitol tak jak v některých časopisech).

Oceňuji uvedená schémata, které určitě přispívají k porozumění daného obsahu (Obrázky 1, 2), nicméně podobná schémata pro interakci mikroorganismů s nZVI, nebo podrobný přehled o mikroorganizmech, které se zapojují do dechlorinace v různých habitatech, o donorech elektronů či zdrojích uhlíku, produktech přeměny, by byl pro literární přehled velmi přínosný pro čtenáře.

Chybělo mi také více informací o biologii ORHB. Například, existuje hraniční redox potenciály, pH, či koncentrace CEs, které by inhibovala bakterie odpovědné za dechlorinaci CE, nebo přímo OHRB konsorcia? Případně existují (jsou známy) inhibitory zúčastněných enzymů? Jak se v takovém případě v praxi postupuje?

Poznámky k zvolené metodice:



1. Na stránce 15 (4.1.1) se čtenář dozvídá, že studované bakterie (OHRB) využívají k poslednímu kroku anaerobní dechlorinace tři typy VC-reduktáz (kódované *tceA*, *vcrA*, *bvcA* geny). Proč byly tedy ve všech studiích sledované jenom dva z těchto tří genových markerů? Věděli jste předem, že *tceA* genové markery se ve vzorcích ze zkoumaných lokalit nevyskytují?
2. Vyhodnocení dat získaných pomocí PCR v reálném čase (real-time PCR, neboli quantitative PCR, qPCR) pomocí metody relativní kvantifikace je možná pokud jsou data normalizovaná. V práci jsem se nedočel, jaký typ normalizace byl použit. Klasickým a zavedeným postupem relativní kvantifikace je metoda $\Delta\Delta C_t$, jenž jste nepoužila, a odkazujete na způsob vyhodnocení dat s použitím metody ΔC_t (která nezohledňuje rozdíly v úspěšnosti amplifikace) a je stručně popsán v práci *Dolinová et al., 2016*. V pozdější práci (*Czinnerová et al., 2020 (Environ Sci Eur)*, dále studie 3) citujete práci *Nechanická et al., 2018* (odkazující na nedohledatelný full-text příspěvku z konference – což mi tedy přijde dost diskutabilní zdroj). Prosím tedy o podrobné vysvětlení metodiky vyhodnocování qPCR dat (které chybí ve velmi obecně pojaté kapitole 4.3.1.). Zajímá mne: i) zda jste data normalizovali na objem vody (množství odebírané vody na analýzy se liší, v poslední práci velmi výrazně (0.03 – 0.5 L), nedovedu si představit jaká je reprezentativnost tak malého objemu (0.03 L), ii) zda jste provedli biologické, případně technické opakování a jaké jste měli odchylky, iii) jak se lišily úspěšnosti amplifikace jednotlivých genových markerů, když jste použili jednotný cyklus pro amplifikaci a detekci, přičemž předpokládám, že se minimálně T_m pro jednotlivé sady primerů se mohly značně lišit a tedy způsobovat nepřesnosti v amplifikaci, či kvantifikaci těchto genů v komplexním environmentálním vzorku (aspoň taková je má zkušenost).
3. Kapitola 4.3.2. je podle mě zpracovaná nedostatečně a chybí údaje o bioinformatickém vyhodnocení NGS dat v aspoň pomoci nějakého obecného přehledu. Chápu, že jsou uvedené postupy shrnuty v publikovaných článcích a v příloženém rukopisu (v tom tedy velmi nedostatečně), ale v této kapitole by měly být uvedeny spolu s informací, jaké konkrétní postupy a analýzy si kandidátka během studia osvojila a použila (tuto stránku věci tedy nemohu hodnotit). Ve 3. studii je uveden postup procesování NGS dat v prostředí R pomocí DADA2, vegan a phyloseq „packages“. V předloženém rukopisu (studie 4) citujete předchozí práci s tím, že byl použit software Mothur bez dalších podrobností, to se mi zdá nedostatečné a hlavně nepřesné (metodika by měla být publikována tak, aby byla opakovatelná). Prosím o upřesnění a doplnění.
4. To, že výsledky qPCR jsou prezentována formou relativních hodnot, znemožňuje některé porovnání získaných výsledků. Například v posledním rukopisu se to vysloveně nabízí: po 2. aplikaci glycerolu došlo k výraznému navýšení markerů *vcrA*, *bvcA* a *Dehalococcoides* 200 dní po začátku sanace (dle grafu odhaduji ca 400x vyšší hodnoty oproti původním). Nicméně *Dehalococcoides* i tak nebyl detekován pomocí NGS sekvenace. V jakých absolutních hodnotách se tedy tyto markery ve vzorcích vyskytovali? Jaký podíl bakterií rodu *Dehalococcoides* naznačovaly qPCR data?
5. Dovolím si upozornit na obecný problém interpretace mol-biol dat v mikrobiální ekologii, že samotná přítomnost genu, nebo jeho navýšení, neznamená přímo navýšení studované funkce. Navazuji tímto na část literární rešerše (4.1.1.), ve které mi chybí nové podrobnosti o genetické a funkční variabilitě druhu *Dehalococcoides mccartyi* publikované v r. 2018 (bakterie, která potenciálně provádí poslední, a zásadní krok degradace CE a to reduktivní dechlorinaci toxického vinylchloridu na ethen), a zapojení těchto informací do interpretace získaných výsledků. Tyto nové studie ukazují, že existuje extrémní vnitrodruhová variabilita genu *vcrA*, indikující, že ne všechny varianty genu jsou jednak pokryté použitými primery pro amplifikaci *vcrA* a za druhé, že některé varianty genu pravděpodobně nekódují enzymy provádějící uvedenou reakci. Testovali jste specifitu použitých primerů vzhledem na tyto



nové informace? Je tedy vůbec možné pomocí použité kvantitativní PCR zjistit, jestli došlo vlivem zásahu (sanace) k navýšení organismu, který opravdu degraduje toxický VC? Prosím o vysvětlení.

6. Autorka v závěru práce uvádí, že „I focused my studies on establishing reliable and easy-to-use molecular biology methods for monitoring autochthonous bacteria populations and their enzymes at polluted sites.“ K tomu mám několik dotazů. V čem spočívá vaše přesvědčení, že tyto metodiky (myšleno asi qPCR a NGS) jsou „easy-to-use“? Z uvedeného by člověk pochopil, že je to jednoduchá věc, nicméně mám k tomu několik podrobných dotazů, které spíše potvrzují opak (již uvedeny dříve).

Zajímá mě Váš názor. Pomohla by opakovaná aplikace nZVI-AC (studie 3), například po 40 dnech, vytvořit příznivé podmínky pro efektivní reduktivní dechlorinaci v daném systému?

Stanovené specifické cíle práce byly splněny s jednou připomínkou. V závěrech je mj. popsáno, že se studentka soustředila na optimalizaci extrakce DNA z komplikovaných vzorků z prostředí a pak se soustředila na zavedení spolehlivých metodik (reakční podmínky) pro qPCR analýzy jednotlivých genetických markerů. Nicméně v textu se čtenář na toto téma nic nedozví, takže nemohu hodnotit a prosím o objasnění (viz i můj předchozí komentář).

Závěrem chci vyjádřit své přesvědčení, že mgr. Marie Czinnerová odvedla velmi hodnotnou práci v oblasti aplikovaných věd a určitě bude posilou každé laboratoře a výzkumného týmu. V předložené práci jsem nenašla závažné nedostatky, práce splnila vytyčené cíle, a proto doporučuji komisi, aby tuto práci přijala k obhajobě.

V Českých Budějovicích, dne 7. 3. 2022

RNDr. Alica Chroňáková, PhD.

Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Ústav půdní biologie

370 05 České Budějovice



VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE
Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav biochemie a mikrobiologie

prof. Ing. Ondřej Uhlík, Ph.D.
VEDOUcí ÚSTAVU

Posudek oponenta dizertační práce

Uchazečka

Mgr. Marie Czinnerová

Téma dizertační práce

Hodnocení vlivu sanace chlorovaných etylenů na původní mikrobiální společenstva pomocí nástrojů molekulární biologie

Oponent

prof. Ing. Ondřej Uhlík, Ph.D.

Pracoviště oponenta

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Ústav biochemie a mikrobiologie

Marie Czinnerová se ve své dizertační práci zabývá aplikací molekulárně-biologických metod v monitoringu bioremediace. Specifickým cílem její práce bylo zhodnotit vliv různých sanačních technik na autochtonní mikrobiální populace, které se podílí na biodegradaci CE.

Dizertační práce se opírá o 4 publikace v renomovaných vědeckých časopisech z rozmezí let 2016-2022 (jedna publikace je ve stavu *odesláno do redakce*), přičemž dizertantka je první autorkou u 3 těchto článků. Úroveň časopisů, kde publikace vyšly, poukazuje na kvalitu výsledků, kterých bylo autorkou dosaženo. Výběr prezentace dizertační práce formou sumarizace a komentování vybraných prací tak hodnotím jako velmi vhodný a patřičný, už jen proto, že experimentální část práce prošla několika nezávislými recenzními řízeními. Je třeba rovněž podotknout, že dizertantka je spoluautorkou několika dalších publikací, což svědčí o její schopnosti samostatné vědecké práce. Na druhou stranu lze autorce vytknout, že samotné dizertační práci mohla věnovat více péče – práce je sice psána velmi pěknou angličtinou, obsahuje minimum chyb či překlepů, zároveň je ale v některých pasážích poměrně povrchní (např. kapitola zaměřená na molekulárně-biologické metody hovoří pouze o qPCR a v rámci NGS jen o jedné platformě), řada tvrzení není podložena literárním zdrojem (např. informace na začátku kapitoly o molekulárně-biologických metodách nebo v kapitole 5), či nepřesností (např. mikrobiom/komunita; vodíkový proton; VcrA, BvcA...). Je i škoda, že autorka v rámci práce nevypracovala jakousi závěrečnou diskuzi, kde by diskutovala všechny získané výsledky (ze všech publikací).

K autorce mám následující dotazy a připomínky:

1. Již výše jsem uváděl, že forma sumarizace a komentování vybraných prací je v případě autorčiných publikací velmi vhodná. Co ale v kapitole 5 postrádám, je popis příspěvku autorky ke každé z publikací. Vzhledem k tomu, že je autorka u 3 publikací první autorkou, předpokládám, že její příspěvek ke všem publikacím je významný, přesto bych ale rád požádal o doplnění, zda byla autorka zodpovědná za experimentální design, provedení experimentů, analýzu a interpretaci dat, psaní publikací atp.
2. Vytyčeným cílem dizertační práce bylo sice poměrně jednoznačné *zhodnotit vliv různých sanačních technik na autochtonní mikrobiální populace, které se podílí na biodegradaci CE*, ale zároveň i poměrně vágní *popsat základní principy a vyvodit obecné závěry* – může být autorka specifitější a upřesnit, co tím vlastně myslela?
3. V souvislosti s výše zmíněnou absencí jakési závěrečné/celkové diskuze bych rád požádal autorku o srovnání aplikace laktátu a glycerolu z hlediska propagace reduktivní dehalogenace, růstu OHRB, ekonomického hlediska atd.
4. Na str. 12 jsou definovány molekulárně-biologické metody. Definice se mi nejeví přesná a je již spíše aplikovaná na oblast bioremediace. Jak by autorka definovala molekulárně-biologické metody obecně?
5. Na str. 25 se uvádí, že při PCR dochází teoreticky ke zdvojení počtu molekul DNA při každém cyklu PCR – jak je to ve skutečnosti? Lze při PCR dosáhnout efektivity 100 %?
6. Na str. 27 se uvádí, že 16S rRNA, respektive její hypervariabilní úseky, lze použít k identifikaci bakteriálních druhů. Já s tvrzením ne zcela souhlasím a prosím autorku o revizi tvrzení.
7. Na str. 32 se uvádí, že mikrobiom (raději bych volil slovo *komunita*) byl obnoven po 15 dnech. Byla komunita obnovena do původní podoby z hlediska struktury i množství biomasy?

Závěrem konstatuji, že předložená dizertační práce je zpracována dobře a má jasný informační potenciál. Autorka splnila cíle, které si vytyčila, a získané výsledky považuji za přínosné pro další rozvoj poznání v oblasti aplikované mikrobiologie.

Marie Czinnerová prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Předložená práce dle mého názoru splňuje kritéria a požadavky kladené na dizertační práci v daném oboru. Na základě této předložené práce a po její úspěšné obhajobě komisi doporučuji Mgr. Marii Czinnerové udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 4. 3. 2022

prof. Ing. Ondřej Uhlík, Ph.D.