

# Oponentský posudek na doktorskou práci Maria Bysse Bioremediation of Creosole-contaminated Soil předloženou na PŘF JU v Českých Budějovicích

**Vypracovala:** Hana Šantrůčková, Katedra biologie ekosystémů, PŘF JU v ČB

Předložená práce obsahuje stručný literární přehled, dvě opublikované práce, jeden rukopis a stručný závěr. Splňuje požadavky na doktorskou práci předkládanou na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích a **doporučuji ji k obhajobě**, i když mám určité výhrady.

Celkově by se práce dala charakterizovat jako telegraficky stručná. Jako oponent stručnost vítám, protože mám méně práce, ale přece jenom nesmí to být na úkor kvality. Tady k tomuto případu bohužel došlo.

**Úvod** obsahuje výčet obecných poznatků a působí velice povrchním dojmem. Chybí podrobnější údaje a eventuelně autorovo zhodnocení dostupných znalostí ve vztahu ke konkrétním cílům a řešené problematice.

**Cíle**, jak jsou definovány, necharakterizují to, co je v práci následně předloženo.

**První a druhou kapitolu** práce tvoří již opublikované práce, které přinášejí nové poznatky a o jejich dobré kvalitě a precizním provedení pokusů nelze pochybovat.

**Třetí kapitola** je tvořena rukopisem, který je podle mého názoru v opravdu raném stádiu přípravy a pokud bych byla oponentem časopisu, k přijetí bych ho nedoporučila.

**Závěry** jsou psány v telegrafickém duchu celé práce. Za neadekvátní považuji závěr, že kompletní biodegradace PAH nemohla proběhnout díky fyzikálně chemickým vlastnostem půd. Je to sice možné, ale práce to neprokazuje. Podobně práce neprokazuje pozitivní vliv aktinomycet.

## **K práci mám konkrétní dotazy, na které bych ráda slyšela odpověď.**

(i) V úvodu se hovoří o anaerobní degradaci PAH. Jaké mohou být cesty biodegradace v anaerobních podmínkách. Dále by mne zajímalo, zda kvasinky opravdu rozkládají PAH při anaerobním metabolismu.

### **Dotazy k 1. publikaci:**

(ii) Nemůže mít negativní vliv na schopnost biodegradace PAH houbami příliš vysoká koncentrace samotných PAH? V práci (1. publikace) je uvažován vliv těžkých kovů.

(iii) Půda A byla 2 měsíce po remediaci a půda B 2 roky po remediaci a přesto je v půdě B vyšší obsah PAH. Jaká byla kontaminace obou půd PAH při začátku remediace?

(iv) Zajímavým zjištěním je, že *Pleurotus ostreatus* účinněji degradoval PAH, měl negativní vliv na mikrobiální biomasu, ale současně podporoval růst aktinomycetů a nestresoval přítomné bakterie, na rozdíl od *Irpex lacteus*. Jaká jsou možná vysvětlení tohoto zajímavého jevu? Neodporují si tyto výsledky?

### **Dotazy k poslední publikaci:**

(v) Opravdu měly všechny kontaminované vzorky stejné pH, obsah C a N?

(vi) Proč vzorek B vykazuje tak nízkou mikrobiální aktivitu při velmi nízkém znečištění PAH (viz Tabulka 1, str 39; 15 mg/kg)?

(vii) na str 41, 2. odstavec. Není mi jasné, jak je to míněno. Byla inokulace tak masivní, že to mělo za následek zvýšení mikrobiální biomasy?

(viii) na str 41, 3. odstavec. Z čeho autor usuzuje na největší respirační potenciál po přidavku glukózy u vzorku X?

### **Obecný dotaz:**

Byly by testované houby použitelné k bioremediacím a jaké podmínky prostředí by musely být připraveny, aby byla degradace co nejefektivnější?

29/11/2008

**Doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.**

Kamenice 126/3

625 00 Brno

Tel: 549 494 964, Fax: 549 492 840

E-mail: [simek@recetox.muni.cz](mailto:simek@recetox.muni.cz)

<http://www.recetox.muni.cz/>

## Oponentský posudek disertace

**Mgr. Marius BYSS**

### **Bioremediation of Creosote-contaminated Soil**

Disertační práce předložená v anglickém jazyce obsahuje celkem 25 stran komentáře (včetně literárních odkazů) k autorem publikovaným pracím nebo pracím připraveným k publikaci v renomovaných mezinárodních vědeckých časopisech. Po formální stránce obsahuje disertační práce všechny potřebné náležitosti. Práce je dobře typograficky vybavena a má dobrou jazykovou úroveň. Je psána srozumitelným a velmi úsporným způsobem s důrazem na stručné vyjmenování základních výsledků presentovaných v příložených publikacích a rukopise. Výsledky jednotlivých částí disertace uvedené v části „results“ jsou uspokojivě shrnuty v části „conclusion“

Disertační práce má po odborné stránce velmi konzistentní obsah. Je zaměřena na charakterizaci mikrobiálního prostředí v půdě vhodného pro odstranění sledovaných organických polutantů z půdy, vývoj metody umožňující sledovat obsah fosfolipidických mastných kyselin v půdách kontaminovaných kreosotem a vlastní studium bioremediace půd kontaminovaných kreosotem. Disertační práce přináší nové poznatky v oblasti studia interakcí mikrobiálních individuů a směsí s organickými polutanty. Významné jsou především výsledky synergického působení směsí používaných a studovaných kultur. V práci je využíván nově navržený postup pro analýzu aktivity mikrobiálních společenstev z obsahu fosfolipidických mastných kyselin pomocí tandemové techniky GC/MS/MS. Zvláště pozitivně hodnotím vypracování a použití metody GC/MS/MS pro sledování průběhu biodegradace PAH z pohledu poklesu koncentrace organických polutantů a změn mikrobiální aktivity. Významnou součástí disertační práce je studium vlivu znečištění půd polycyklickými aromatickými uhlovodíky na aktivitu půdního mikrobiálního společenství. Výsledky navrženého způsobu aktivace růstu mikrobiálního společenství umožňují analyzovat efektivitu bioremediačního procesu.

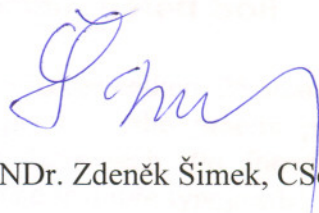
Hlavní části práce a její výsledky již byly podrobeny odborné kritice před uveřejněním v odborných časopisech. Také presentace výsledků na odborných konferencích na národní i mezinárodní úrovni je zárukou kvality vykonané práce. K obsahu práce nemám zásadní připomínky, pouze následující dotazy:

1. Je možné na základě provedených experimentů a získaných výsledků blíže specifikovat přístup umožňující nalezení podmínek pro efektivní biodegradaci vyššemolekulárních PAH?
2. Byl studován vliv pH půdního prostředí na mikrobiální aktivitu sledovaných kultur a účinnost bioremediace?

3. Byla nebo bude sledována korelace mezi koncentrací PAH v půdním prostředí a vlastnostmi směsí mikrobiálních kultur?
4. Jaká je výtěžnost extrakce PFLA z půdy? Jaký byl použit „recovery“ a interní standard?
5. Jaké jsou hodnoty limitů detekce a kvantifikace stanovení PFLA, jakou metodou byly stanoveny?

Závěrem konstatuji, že disertační práce obsahuje všechny požadované náležitosti a má původní charakter. Práce je svými mezinárodně srovnatelnými výsledky a metodickou úrovní přínosem pro rozvoj oboru disertace. Autor splnil předpokládané cíle práce a prokázal schopnosti pro tvůrčí vědeckou práci.

Doporučuji proto, aby práce byla přijata k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby a následných zákonných procedur byl disertantovi udělen akademický titul „doktor“ (PhD).



V Brně 28.11.2008

Doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.

## Posudek doktorské práce

Doktorská práce s názvem: „Bioremediation of Creposote –contaminated Soil“ se zabývá důležitým environmentálním tématem dekontaminace životního prostředí pomocí mikroorganismů. Práce je psána anglicky na dobré úrovni. Sestává ze tří manuskriptů, z nichž dva byly publikovány, či přijaty do tisku. Některé konkrétní poznámky ohledně zpracování práce jsou uvedeny dále, ale obecně lze říci, že úvod a závěr práce jsou velmi povrchně zpracovány. Se členěním úvodu až na výjimky lze v podstatě souhlasit (viz poznámky níže), ale naprosto neodpovídající jsou citace. Velké množství jich chybí a ty, které jsou použité, velmi často neodpovídají danému tématu.

Přes uvedené nedostatky se domnívám, že práce přináší zajímavé výsledky, a proto souhlasím s přistoupením k obhajobě.

V Praze 28.11.08

Tomáš Cajthaml

## Poznámky a připomínky:

Úvod:

strana-řádek

2-10 Chybí citace USEPA metody.

2-17 vysvětlení log P je až na další straně.

3-21 Zmínka o biodostupnosti je i na další straně, ale není citace. Reference Wicke et al., 2008 se týká sorpce PAU na biofilm z vodní fáze.

3-28 Tvrzení o stimulaci degradace ANT a PHE pomocí NAP je citováno jako Mollea et al., 2005, ale v této citaci jsem zmínku o dalších látkách nenašel.

4-20 je správná citace Cerniglia 1984?

4-16- Chybí citace na „slow“ a „fast“ frakce.

5 Zdá se mi nadbytečné citovat základní vlastnosti bakterií.

6-20 Citace podle mého názoru není odpovídající.

6-22 Některé z uvedených hub nejsou ani white rot houby, ale ani basidiomycety.

Obrázek 1. *Trans*-dihydrodiol je nakreslen jako *cis*.

8-4 Citace Cerniglia 1981 je stará.

9-2 Citovaný článek se zabývá pouze houbou *Pleurotus ostreatus*.

9-7 Citace je stará.

9-8 a dále: Tvrzení vyžaduje citaci.

9-31 Literatury lze nalézt mnohem více a dokonce i s white-rot houbami, což by bylo bližší vašemu tématu.

10-3 Nesprávná citace.

10-10 Nesprávná citace.

10-25 a dále: K jakému parametru nebo typu bioremediace jsou následující charakteristiky vhodné?

13 Otázky k cíli 1:

Podle mého názoru lze stěží posuzovat vliv znečištění, pokud nemáte původní nekontaminovanou půdu, nbo pokud nemáte půdy lišící se pouze v koncentraci PAU. Nerozumím poslední otázce o efektivnější cestě.

Článek 1:

Přináší zajímavé výsledky ohledně změn v populacích při aplikacích dvou druhů hub bílé hniloby pro bioremediace kontaminované zeminy. Autoři však opomněli srovnat degradační výsledky se články týkajícími se aplikace stejných hub v zemině ze stejné lokality Leonardi et

al., INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION 60, 165-170, 2007  
a Bhatt et al., FOLIA MICROBIOLOGICA 47, 255-258, 2002.

### Článek 2:

Tento článek přináší zajímavou optimalizaci metody měření methyl esterů mastných kyselin, která je využitelná při analýze fosfolipidických markerů mikrobů pomocí GC-MS-MS.

### Článek 3:

V tomto článku se autoři zabývají vlivem PAU na mikrobiální populaci v několika různě kontaminovaných půdách ze stejné lokality. Autoři detekovaly mastné kyseliny reprezentující stresové indikátory a provedly remediační experiment s bakterií rodu *Pseudomonas*. Bohužel se v článku nevyskytují podrobnější charakteristiky půdních vzorků. Autoři prokázali, že zvláště po dodání glukózy do vzorků došlo k prudkému nárůstu bazální respirace, což může naznačit limitaci (stres) zejména množstvím živin.

### Závěr:

Dvoustránkový závěr s řádkováním 2 mi připadá neadekvátně krátký.

48-22 Nejsem si jist jetli 16 PAU dle USEPA 610 bylo vybráno pro jejich karcinogenitu, neb se domnívám, že nebyly u všech karcinogenní účinky prokázány.

49-15 Tvrdíte, že PAU s více kruhy nebyly degradovány kvůli fyzikálně-chemickým vlastnostem půdy. Které to jsou a jak jste to prokázal. Dále přítomnost aktinomycet byla prokázána, ale jaká „důležitá“ role aktinomycet byla prokázána?

## **Hodnocení doktorské disertace Mgr. Maria Bysse**

### **„Bioremediace půd kontaminovaných kreozotovým olejem“**

Doktorská disertační práce Mgr. Maria Bysse se zabývala problematikou persistence toxických látek v prostředí, jejich dopadem na půdní ekosystém a přístupy vedoucími k jejich odstranění. Toto téma patří k současné celosvětově řešené problematice.

Disertace byla soustředěna na studium mikrobiální složky půd kontaminovaných kreozotovým olejem. Práce byla rozdělena do tří hlavních částí s cílem: 1) Popsat změny komplexního půdního mikrobiálního společenstva *in situ* v půdách s různou zátěží kreozotového oleje. 2) Ověřit a porovnat účinnost bioremediace půd kontaminovaných kreozotovým olejem při použití bakteriálního a houbového inokula v laboratorních podmínkách. 3) Zhodnotit specifická analytická rizika spojená s hodnocením mikrobiálních společenstev půd kontaminovaných kreozotovým olejem a navrhnout vhodné přístupy či jejich modifikace.

Řešení práce vycházelo z mezioborového spojení analýzy životního prostředí a půdní mikrobiologie a probíhalo na Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR (dříve Ústavu ekologie krajiny AV ČR) a Ústavu půdní biologie BC AV ČR v tradiční úzké spolupráci s Biologickou/Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Při řešení bioremediace půd pomocí dřevokazných hub Mgr. Marius Byss spolupracoval s RNDr. P. Baldrianem, Ph.D., z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze. Práce byla podporována výzkumným projektem Centra environmentální mikrobiologie MŠMT ČR.

Disertační práce přinesla výsledky ke všem výše formulovaným cílům. Výsledky jsou shrnuty formou dvou vědeckých článků v časopisech *Chemosphere* (IF 2,739) a *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (IF 2,867) a jednoho rukopisu a byly průběžně prezentovány na pěti mezinárodních konferencích.

První fáze řešení týkající se popisu mikrobiálního společenstva *in situ* pod různou zátěží organických polutantů ukázala význam mikrobiálního společenstva jakožto citlivého bioindikátoru znečištění půdy. Výsledky analýzy fosfolipidických mastných kyselin (PLFA) demonstrovaly skupinu PLFA s cyklopropylovým větvením jako specifický stresový biomarker a poukázaly na aplikační možnosti PLFA techniky při monitoringu znečištění prostředí. Studie také poukázala na riziko reziduí polyaromatických uhlovodíků (PAH) s vyšším počtem aromatických skupin ve studovaných půdách, které prošly běžným remediačním postupem v úpravně zemin.

V navazující části disertační práce byla porovnána účinnost bakteriální remediace používané v úpravně zemin a remediace pomocí vybraných kmenů dřevokazných hub. Studie přinesla původní výsledky o účinku dřevokazných hub na rozklad PAH v půdách se zátěží kreozotového oleje z běžného prostředí. Studie ukázala nejen významný potenciál jednotlivých testovaných kmenů, ale i specifických mikrobiálních konsorcií soustředěných kolem těchto účinných degradérů.

V poslední části práce jsou shrnuty metodické poznatky týkající se analýz půd kontaminovaných kreozotovým olejem, které vyústily v původní modifikaci PLFA techniky.

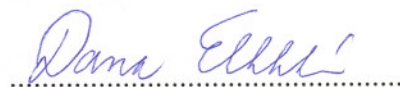
Disertační práce Mgr. Maria Bysse přinesla řadu nových poznatků týkající se mikrobiální ekologie půd kontaminovaných kreozotovým olejem, ale i originálních přístupů využitelných v aplikovaném výzkumu. Výsledky této práce vycházejí z konkrétní případové studie kreozotové zátěže v dřevozpracujícím závodě v Soběslavi a jsou významným přínosem pro řešení problematiky OŽP jihočeského regionu.

Mgr. Marius Byss v průběhu doktorského studia prokázal nezbytné schopnosti pro jeho úspěšnou kariéru v oblasti vědeckého výzkumu a vývoje, z nichž bych ráda vyzdvihla schopnost samostatné tvůrčí práce, smysl pro týmovou spolupráci, analytické myšlení, organizační schopnosti, vytrvalost, nadhled a také komunikační a vyjednávací dovednosti.

Potvrzením jeho profesionálního zájmu a nabyté erudice je jeho současné zaměstnání ve firmě MikroChem LKT, kde je odpovědný za řešení projektů „Remediace podzemních vod s využitím permeabilních reaktivních bariér“ a „Genetické a fyziologické manipulace s bakteriálními degradéry aromatických polutantů a jejich využití“.

**Doktorská disertace Mgr. M. Bysse je nesporným odborným přínosem a doporučuji ji k obhajobě.**

V Českých Budějovicích, 29. září 2008



RNDr. Dana Elhottová, Dr.