Oponentský posudek doktorské dizertační práce

Autor: Mgr. Jiří Jirout

Název: The impact of outdoor cattle overwintering husbandry on soil fungal community

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem diverzity a funkce půdních hub ovlivněné přezimujícím skotem. Autor věnuje pozornost třem plochám s rozdílnou intenzitou zatížení přezimujícím skotem. Ke studiu diverzity půdních hub využil jak moderní molekulárně-biologické metody (PLFA, DGGE, sekvenace), tak i klasické kultivační techniky. Tento přístup velice oceňuji, hlavně bych chtěl vyzdvihnout část dizertační práce zaměřenou na izolaci a následnou kultivaci anaerobních hub schopných denitrifikace. V této oblasti je práce velice novátorská a přínosná pro doplnění mezer v cyklu N. Vyizolované čisté houbové kmeny pak mohou, podle mne, dále posloužit pro podrobnější molekulárně biologické analýzy (studium genové exprese a regulace).

Práce je prezentována formou šesti článků (jeden článek je již publikován, dva jsou v tisku a zbylé tři byly zaslány do impaktovaných časopisů). U čtyř článků je autor prvním autorem. Z těchto čtyř je jeden článek zaslán do impaktovaného časopisu Soil Biology and Biochemistry a jeden do Climatic Change. Oceňuji tuto autorovu snahu zužitkovat svá data v maximální míře, i přes to, že je na některých odeslaných článcích vidět, že by si nějaký ten čas na korektury ještě zasloužily.

Práce je členěna do čtyř kapitol, kde první tři uvádějí čtenáře do problematiky jak studovaných ploch, tak i zvolených metodických přístupů. Forma a rozsah úvodní části je plně dostačující, je přehledně členěná a umožňuje čtenáři snadno se zorientovat ve studované problematice. Velice oceňuji i stručné zhodnocení výsledků všech šesti článků v závěru třetí kapitoly. Čtvrtá kapitola pak obsahuje šest zmiňovaných článků. K této části bych měl několik dotazů a doporučení, které jsou shrnuty níže.

Otázky na autora:

Článek II

- Autoři si v tomto článku dali za cíl porovnat dva nejčastěji využívané systémy pro fingerprintové DGGE analýzy (Ingeny a Biorad). V případě bakteriálního společenstva byla však zvolena jak výrazně odlišná voltáž, tak i denaturační gradient (autoři to zdůvodňují optimalizací pro oba systémy). Myslíte si, že jsou systémy i za takto odlišných podmínek porovnatelné? Celkově mi DGGE gel u bakterií u obou systémů

připadá chudý (tj. málo bandů). Jak vypadal agarozový gel po PCR? Nebyly nějaké problémy s amplifikací nebo čistotou vyextrahované DNA?

Článek III

- Kap. 2.2. Pokud bylo cílem studovat vliv přezimování skotu na půdní mikroorganismy, nebylo by vhodné volit periodu odběrů zahrnující podzim 2005 a jaro 2006? Proč byly pro zodpovězení hlavní otázky článku vybrány periody jaro 2005 a podzim 2005?
- Dále v té samé kapitole se uvádí, že pH bylo stanovováno v 0.01M $CaCl_2$. V Tab. I na str. 61 je však uvedeno pH ve vodném výluhu?
- Kap. 3.2. Opravdu bylo mikrobiální společenstvo na silně zatížené ploše SI signifikantně odlišné od ostatních? Jak byla testována signifikance? Pokud 1. PCA osa vysvětluje cca 68% variability a 2. pouze 18%, pak podle 1. PCA osy je signifikantně odlišné pouze společenstvo v exkrementech a ostatní společenstva si jsou víceméně podobné a rozděluje je až 2. osa.

Článek IV

- Fig. 3A,B. Pokud pH a P nebyly podle MonteCarlo testu signifikantní, jaký význam má jejich uvedení v CCA diagramu a jaké procento variability pak vysvětlují?
- Mohl byste popsat mechanismus toxického účinku NH_4^+ na mikroorganismy? Műller et al., 2006, který je v práci citován totiž tvrdí pravý opak. Existuje nějaká studie, která tuto Vaší hypotézu o toxickém účinku NH_4^+ podporuje?
- V Table III vidím jedinou periodu, kdy bylo zohledněno přezimování (October 2007-May 2008). Naneštěstí zrovna při odběru October 2007 chybí údaje z PLFA. Jsou k dispozici údaje pouze z kultivovatelné biomasy (CFU), která se po přezimování skotu (May 2008) snížila. V diskusi a závěrech článku se ale tvrdí pravý opak a to, že přezimování zvýšilo houbovou biomasu. Nemohlo dojít k překlepu v Tab III nebo vynechání některého odběru, např. May 2007?

Článek V

- Kap. Methods, Str. 90. Jak byly bakterie v mikroskopu pozorovány (přímo nebo po obarvení)?
- Fig. 3 mi připádá nepřehledný. Doporučoval bych rozdělit na 3 skupiny podle produkce N_2O, jak je uváděno v textu.
- Proč autor v článku používá jednotky μg $N\text{-}N_2O$ $d^{-1}.flask^{-1}$, přitom na konci práce jsou uváděny jednotky nmol $N_2O.h^{-1}.g^{-1}$ suchého mycelia? Prosím o objasnění?

I přes výše uvedené výtky (týkající se převážně článků teprve submitovaných do zahraničních časopisů) myslím, že práce Mgr. Jiřího Jirouta je kvalitní a novátorská v oboru mikrobiální ekologie a doporučuji přijmout práci Mgr. Jiřího Jirouta k obhajobě a po jejím úspěšném absolvování i udělení příslušného akademického titulu.

V Českých Budějovicích, dne 26.7.2010

Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

POSUDOK OPONENTA NA DIZERTAČNÚ PRÁCU

Autor: Mgr. Jiří JIROUT
Téma: „The impact of outdoor cattle overwintering husbandry on soil fungal community"
Oponent: Doc. RNDr. Alexandra Šimonovičová, CSc.

Predložená doktorandská dizertačná práca pozostáva z 114 číslovaných strán vrátane zoznamu publikácií, konferenčných zborníkov, zborníkov abstraktov a životopisu.

Autor prácu rozdelil do príslušných kapitol, z ktorých:
v kap. 1 uvádza čitateľa do študovanej problematiky, ktorou bolo sledovať vplyv dobytka v období zimovania na pôdu a pôdnu mikrobiotu, t.j. biomasu mikroorganizmov, zmenu štruktúry mikrobiálneho spoločenstva baktérií a mikroskopických húb. Autor tiež charakterizuje ciele dizertačnej práce a použité metodické postupy.
Kap. 2 je venovaná charakteristike monitorovanej lokality a línii odberu pôdnych vzoriek z pastviny s rôznou záťažou spôsobenou dobytkom a jeho aktivitami. Pri odbere pôdnych vzoriek by som však odporučila **uviesť hĺbku** odberu, čo sa vzťahuje aj na výsledky uvedené v tab. I. na str. 8.
V kap. 3 autor uvádza a diskutuje doteraz dosiahnuté výsledky, ktoré podrobnejšie predstavuje spoluautorstvom šiestich publikácií, z čoho päť je uvedených v zahraničných a vysoko impaktovaných časopisoch (kap. 4).

Poznámky k práci, ktoré majú charakter odporúčania:

- hodnotu a stupne Celzia píšeme oddelene, napr. 7°C → **7 °C**
- odporúčam použiť novšiu diagnostickú literatúru, napr. Domsch et al. 2007
- str. 12 - druhy rodu *Zygorhynchus* nie sú koprofilné, ale saprotrofné
- str. 92. - kurzívou píšeme iba **rod** a **druh**, t.j. čeľaď nie
- str. 100 - tab. II. - skratky „sp." a „f." nepíšeme kurzívou; drobné preklepy sú opravené priamo v texte; v tabuľke sú tiež uvedené dnes už neplatné druhové názvy niektorých mikroskopických húb:
  Fusarium moniliforme → ***Fusarium profileratum***
  Mucor hiemalis → ***Mucor hiemalis* f. *hiemalis***
  Paecilomyces lilacinus → ***Paecillium lilacinum***
  Penicillium frequentans → ***Penicillium. glabrum***

Ciele dizertačnej práce sú v plnej miere splnené. Doktorand predkladá množstvo výsledkov, ktoré v priebehu štúdia získal. Výrazne tak obohatil a rozšíril poznatky týkajúce sa výskytu mikroorganizmov v pôdach ovplyvnených rôznou záťažou

v priebehu zimovania dobytka. Vysoko hodnotím jeho publikačnú činnosť a účasť na viacerých konferenciách, kde prezentoval priebežne dosiahnuté výsledky.

Záver

Predložená dizertačná práca Mgr. Jiřího JIROUTA „The impact of outdoor cattle overwintering husbandry on soil fungal community" spĺňa všetky kritériá požadované na doktorandskú dizertačnú prácu. Odporúčam ju k obhajobe a navrhujem udeliť vedecko-akademickú hodnosť

„philosophiae doctor"

v Bratislave 16.07.2010

Doc. RNDr. Alexandra Šimonovičová, CSc.
Prírodovedecká fakulta UK
Katedra pedológie

Oponentský posudek disertační práce

Jiří Jirout: The impact of outdoor cattle overwintering husbandry on soil fungal community

Předkládaná disertační práce se zabývá strukturou a funkcí společenstva hub v půdních ekosystémech ovlivněných intenzivní pastvou skotu. Zatímco funkce hub v ekosystému trávních porostů je známa poměrně dobře, ekosystémy s intenzivní pastvou či pobytem dobytku byly dosud studovány pouze ve vztahu k půdním bakteriím, resp. archaeím. Téma práce je proto nové a vědecky závažné. Práce je tvořena souborem šesti článků, publikovaných ve vědeckých recenzovaných časopisech nebo zaslaných k publikaci a je opatřena úvodem s literárním přehledem, souhrnem cílů práce a shrnutím výsledků.

Základ práce tvoří šest vědeckých publikací, z nichž tři byly již vyšly nebo byly přijaty k publikaci v časopisech s IF. Na dvou článcích (IF 0,462 a 0,593) je předkladatel prvním autorem, stejně jako na dvou rukopisech, které byly do tisku zaslány. V přehledu publikací je jasně specifikován rozsah, v němž se předkladatel disertace podílel na autorství a lze konstatovat, že tento podíl je u všech publikací dostatečný.

Celkově je rozsah předkládané práce dostatečný jak po stránce rozsahu, tak vědecké kvality a svědčí o schopnosti autora samostatně provádět vědeckou práci. Až na výjimky (používání předložek) je psána velmi dobrou a srozumitelnou angličtinou. Autor využil při práci řady pokročilých metod z širokého spektra oborů od biochemie a analytické chemie po mikrobiologii a molekulární biologii a o zvládnuté těchto postupů svědčí i prezentace kritického hodnocení těchto metod ve dvou předkládaných pracech. Za nejvýznamnější části práce považuji analýzu funkce společenstva půdních hub v procesu denitrifikace, kterému dosud nebyla věnována dostatečná pozornost a spojení těchto výsledků s identifikací dominantních druhů společenstva hub jak na základě selektivní isolace z půdy, tak pomocí metod molekulární biologie. Disertaci považuji za odpovídající současné úrovni oboru ekologie mikroorganismů a doporučuji udělení příslušného titulu. Dílčí komentáře, výhrady a dotazy jsou shrnuty níže.

1. V práci mi chybí alespoň hrubý přehled – nebo tabulka – se souhrnem použitých metod, což by zjednodušilo orientaci v textu.
2. Postrádám seznam zkratek, který by usnadnil orientaci v textu (některé zkratky nejsou vysvětleny).
3. Diskuzi považuji na řadě míst za příliš obecnou. Proč se například popisují houby v „temperátních" půdách, když existuje dostatek literatury o houbách z travinných společenstev?
4. Úvodní část práce by měla být více integrovaná.
5. Na str. 8 jsou v Tab. 1 uvedeny chemické charakteristiky jednotlivých odběrových ploch. Chybí ale informace ze kterého období roku tyto údaje pocházejí.
6. Str. 12: lignin není rozkládán mykorrhizními houbami jak je uvedeno v textu a degradace aktinobakteriemi je nízká až nulová.
7. Str. 59. V obr. 1 jsou některé názvy fosfolipidů uvedeny tučně, ale není uvedeno co to znamená.
8. Str. 66: druhové složení společenstva hub nelze pomocí analýzy DGGE provádět – to lze provést pouze po sekvenaci (která nutně nemusí být spojena s DGGE.
9. Str. 70: u DGGE není uvedeno, jestli vstupními daty pro analýzu CCA byly intenzity bandů, nebo jejich přítomnost / nepřítomnost.

10. Pro přesnou identifikaci hub na základě sekvenace DNA je nutné použít úseky s dostatečnou informační kapacitou, což není případ 18S rDNA, ale například úseku ITS. U identifikace druhů / rodů hub musí být vždy uvedeno na základě jaké míry podobnosti byl isolát do daného druhu zařazen.
11. V práci mě výrazně chybí sekvenční informace z isolátů hub, která by umožnila přiřadit kultivovatelné druhy k druhům detekovaným molekulárními metodami.

Otázky:

1. Předkladatel uvádí, že pouhá část společenstva je kultivovatelná. Je tato část pouze náhodnou podmnožinou společenstva, nebo může být fyziologie isolátů výrazně odlišná od nekultivovatelných druhů (např. symbiontů)?
2. Jaká může být příčina pro supresi hub a aktinobakterií při vyšších hodnotách pH?
3. Mastná kyselina 18:2w6,9 je používána jako marker biomasy saprotrofních hub. Vyskytuje se také u arbuskulární mykorrhizy, a pokud ano, v jakém množství?
4. Jak předkladatel vysvětluje opačný – pozitivní – vliv pobytu skotu na množství hub v půdě než bylo zjištěno v předchozích studiích?
5. Jak přesně lze při použití analytické pyrolýzy oddělit pyrolytické fragmenty ligninu od fragmentů oligofenolů či monofenolů?
6. Článek 6 popisuje negativní vliv dobytka na mykorrhizu. Jaký význam má mykorrhizní kolonizace pro rostlinu v prostředí, kde je dostatek N a P?
7. Lze studovat biodiverzitu pomocí analýzy DGGE?
8. Jak byla stanovena důležitost hub při denitrifikaci (str. 99)? Její intenzita pravděpodobně souvisí s množstvím substrátu. Má autor představu, jak by se podíl hub na tomto procesu dal stanovit v podmínkách *in situ*?

V Praze, dne 27.8.2010

Petr Baldrian

RNDr. Petr Baldrian, Ph.D.