

**OPONENTSKÝ POSUDEK**  
**doktorské disertační práce**

**„Studium detoxikace nitrosloučenin tkáňovými kulturami rostlin“**

**Předkladatel disertace: Mgr. Radka Podlipná**

*Katedra anatomie a fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta UK Praha*

**Oponent: RNDr. Miroslav Griga, CSc.**

AGRITEC Plant Research s.r.o. Šumperk

Mgr. Radka Podlipná předložila disertační práci, která se zabývá studiem detoxikace nitrosloučenin (v praxi používaných především jako výbušniny) vyššími rostlinami; jedná se o postupy, které jsou součástí fytořediačních technik, jmenovitě tedy o fytořediaci. Velký rozvoj fytořediačních technik probíhá zhruba posledních 20 let a po ústupu od poněkud přehnaného počátečního optimismu dochází v současnosti k určitému „zreálnění“ pohledu na potenciál těchto technologií – kromě čistě biologických studií se postupně objevují i studie technologicko-ekonomické, které staví na reálný základ použití té či oné řediační techniky ve vztahu k částečné / úplné dekontaminaci dané lokality v daném časovém horizontu a za daných finančních nákladů (včetně ekonomického zhodnocení kontaminované biomasy). Takováto komplexní analýza pak může vést ke kvalifikovanému rozhodnutí, zda použít tradiční „inženýrské“ řediační přístupy nebo naopak zvolit některou z fytořediačních technik. Z hlediska konečného výsledku je fytořediací jednou z nejelegantnějších technologií, neboť v optimálním případě jsou xenobiotika (z pohledu chemického většinou látky organické) přijatá rostlinou řediována až na látky netoxické. Kupř. fytořediací v systému umělých mokřadů (constructed wetlands) se tak jeví jako vhodný systém pro dekontaminaci komunálních či průmyslových odpadních vod (řada pilotních projektů či realizací zejména v Evropě a USA). Z výše uvedených důvodů považuji téma práce za aktuální - studovaná problematika je v souladu se současnými trendy fytořediačního výzkumu a kromě získání metodických a teoretických poznatků lze v budoucnu očekávat i jejich praktické využití.

Disertace je prezentována na 171 str. textu doplněného 22 tabulkami, 51 grafy a 39 obrázky (převážně fotografie rostlinného materiálu, elektroforeogramy aj.). Z hlediska formálního je disertace členěna v zásadě obvyklým způsobem, a proto se postupně vyjadřuji k jednotlivým kapitolám, kde uvádím i případné věcné připomínky. Grafická a estetická úroveň práce je velmi dobrá.

**Název práce** ne zcela vystihuje její skutečný obsah, neboť i když gros experimentů se týká *in vitro* kultur, nezanedbatelná část práce je realizována v systému hydroponie, přes testy klíčivosti semen až po konstrukci umělých mokřadů.

Za velmi užitečné pro čtenáře považuji uvedení **Seznamu zkratk** hned na úvod práce (zejména kvůli množství různých typů řediacích produktů nitrosloučenin, které nejsou pro plně zasvěceného čtenáře zcela běžné).

V **Teoretické části** (54 str.) se autorka zaměřuje zejména na fyzikální a chemickou charakteristiku nitrolátek, jejich výskyt v životním prostředí a toxicitu vůči živým organismům. Velká pozornost je věnována metabolismu nitrolátek a mechanismům jejich transformace včetně zúčastněných enzymových systémů. V závěru této části autorka uvádí

přehled a krátkou charakteristiku fyto-remediačních technik. K formálním chybám či překlepům se vyjádřím souhrnně později; na tomto místě chci jen upozornit na některé věcné nesrovnalosti: na str. 24 autorka píše: „Nitroglycerin patří mezi značně toxické látky a již dávky několika desítek miligramů mohou způsobit smrt člověka.“ O dvě strany dále (str. 26) je však konstatováno: „Estery kyseliny dusičné jsou látky poměrně dobře biodegradovatelné, pro zdraví člověka málo nebezpečné, a proto o fyto-toxicitě nitroesterů najdeme v literatuře velmi málo informací.“ Na téže str. by mělo být sousloví „elektronický pár“ nahrazeno „elektronový pár“. Na str. 29 je asi terminologicky nesprávné vyjádření „...91 kmenů různých ekologických i taxonomických skupin.“ Jedná-li se o houbové kultury, bylo by přesnější kupř. „91 izolátů/kultur různého taxonomického zařazení spadajících do různých ekologických skupin“. Na str. 46 se objevuje rostlinný druh *Lyctuca scarriola* (ve vázané literatuře ani na Internetu nenalezen), patrně se má jednat o *Lactuca serriola*. I v další botanické nomenklatuře jsou chyby: str. 48 *Chemopodium* versus *Chenopodium*, str. 51 *Lepidum* versus *Lepidium*. Na str. 49 se píše: „...pro různé druhy trav (*Fabaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*)“ – z uvedených čeledí jsou však travami pouze *Poaceae*, takže by mělo být uvedeno kupř. pro různé bylinné druhy, i když ani toto nemusí být přesné (uvedenou práci španělských autorů bohužel neznám), neboť jak čeleď *Fabaceae*, tak *Asteraceae* obsahují i druhy dřevinné (keře, stromy). Co chemika až tak netlačí, to – bohužel - botanika okamžitě „uhodí“ do očí. Je samozřejmé, že gros práce spočívá ve fyziologicko-biochemických experimentálních přístupech a v tomto směru nelze autorce nic vytknout. Přesto musím jako oponent trvat na správné terminologii ve všech oblastech / aspektech prezentované práce. Celkově lze nicméně konstatovat, že autorka přistupovala k experimentálnímu řešení problematiky výborně teoreticky připravena (16 str. většinou recentní „fyto-remediační“ citované literatury).

**Cíl disertační práce** je shrnut do čtyř problémových okruhů, které jsou jasně a výstižně formulovány.

V kapitole **Materiál a metody** podává autorka na 27 str. informaci o spektru studovaných rostlinných druhů (celkem 14) a metodických přístupech při studiu toxicity a degradace nitrosloučenin. Osobně preferuji při koncipování vědeckého projektu menší počet rostlinných modelů, zejména kvůli možnosti srovnání a interpretace výsledků – úplně ideální by bylo použití stejných modelů v kultuře *in vitro*, v hydroponii i experimentech *in situ*. Nicméně z hlediska praktického je jasné, že kupř. formulace protokolu pro optimálně rostoucí buněčnou suspenzní kulturu je sama o sobě obtížným (mnohdy dlouhotrvajícím) úkolem. Volba rostlinných druhů pro jednotlivé problémové okruhy má tak svou logiku – buněčné suspenze byly odvozeny z mydlice perzistující na území zamořeném nitrosloučeninami, len a konopí zase představují průmyslové plodiny nevstupující do potravinového řetězce, a tedy ideální kandidáty pro fyto-remediační studie. Dřeviny dub letní a topol osika se taktéž běžně vyskytovaly na zamořených územích, rychle rostoucí hybrid topol x osika je osvědčeným modelem ve fyto-remediačních studiích. Pro studium umělých mokřadů je pak výběr omezen na typické mokřadní rostliny mírného pásma (rákos, sítina, orobinec, kosatec žlutý). Z hlediska exaktnosti a reprodukovatelnosti experimentů by bylo vhodné blíže specifikovat zejména kulturní druhy – odrůda, linie, genotyp, klon (toto uvedeno pouze u lnu a konopí, nikoliv však u slunečnice, kukuřice, hořčice, dřevin či mokřadních rostlin). Z literatury je známa významná vnitrodruhová variabilita v reakci na xenobiotika obecně (těžké kovy, organické polutanty), a proto je přesná charakteristika experimentálního materiálu opodstatněná. Tuto připomínku je nutno brát jako doporučení při publikačním zpracování výsledků. Začátek klíčení povrchově sterilizovaných semen lnu a konopí (str. 57 a 60) po 10 dnech je zvláštní – klíčení zdravého osiva začíná obvykle (samozřejmě v závislosti na teplotě!!!) po cca 2-3 dnech. Je to i v rozporu s textem na str. 86 a grafem 1, kde se uvádí, že

klíčivost byla hodnocena po 3 dnech (graf zahrnuje i len a konopí). Na obr. 11 je skutečně kvetoucí *in vitro* kultura semenáčku konopí? Po 10 dnech od začátku klíčení, jak uvádí text na str. 57 s odkazem na obr. 11, je to asi málo pravděpodobné. Jinak je ale kvetení *in vitro* ve stresových podmínkách poměrně běžné (často pozorujeme tvorbu květů a lusků *in vitro* v „shoot-tip“ kultuře hrachu či bobu). K popisu metod nemám věcných připomínek.

**Výsledky** prezentované na 55 str. představují stěžejní část disertace a jsou rozděleny do šesti problémových okruhů, a to (1) působení nitrolátek na růst rostlin, (2) degradační studie, (3) toxicita nitrolátek a jejich degradačních produktů, (4) enzymové studie, (5) distribuce radioaktivity v průběhu degradace a (6) fytořemediace nitroslouchenin *in situ*. V rámci těchto problémových okruhů pak jsou prezentovány experimenty na různých úrovních, tedy na úrovni *in vitro*, na úrovni celistvých rostlin v hydroponii či zemině, až po pilotní experiment na zamořené lokalitě. Gros výsledků spočívá v kvalitní obrazové (grafy, fotografie) a tabelární dokumentaci.

K tab. 16 na str. 84 mám dotaz, co je kukuřice A a B a proč je klíčivost kukuřice A na kontrolní variantě tak nízká (26.7%)? Nekvalitní osivo? U obdobného pokusu by bylo zajisté užitečné pro průkaznost výsledků uvést jeho uspořádání (počet opakování) a základní statistické veličiny ( $x \pm S.D$  či  $S.E.$ ). Na str. 86 má být správné znění věty: „Fytotoxický účinek TNT byl pozorován na inhibici růstu semenáčků zejména u lnu a hořčice.“ - nikoliv slunečnice. V tab. 18 na str. 92 by bylo užitečné znát výchozí koncentraci TNT. Grafy 22 a 23 na str. 106 se jeví jako zcela totožné! Na str. 115 by měla být správná formulace „...a u vybraných frakcí bylo stanoveno spektrum proteinů pomocí SDS-elektroforézy“ namísto „obsah enzymů“. U prezentovaných proteinových spekter (obr. 32) by byl užitečný nějaký popis – spektra na horním obr. jsou poměrně polymorfni (kupř. výrazná absence pruhů v oblasti 29-30 kD u frakcí 06 až 32), na obr. spodním naopak výrazně uniformní – na základě tohoto popisu by šlo spektra jednotlivých frakcí lépe komentovat / interpretovat. Na str. 118 je z obr. 33 vyvozován „obsah bílkovin“ – na základě SDS-elektroforézy lze však usuzovat na obsah bílkovin pouze orientačně (kvantitativní rozdíly v intenzitě pruhů) – hlavním smyslem je zde detekce přítomnosti či absence jednotlivých pruhů (polypeptidů či jejich podjednotek). Str. 122 - homologie nalezené sekvence (17 terminálních aminokyselin) mydlíce s huseníčkem byla 66,7% a s rajčetem 60% - přitom obě prezentované sekvence (huseníček, rajče) jsou totožné; stupeň homologie by tedy měl být shodný? Na grafu 45 str. 129 by měl být na ose x patrně čas vyjádřený ve dnech nikoliv v hodinách (viz text na str. 128 „Koncentrace nitroesterů v zásobnicích klesla pod hranici detekovatelnosti během 3 týdnů.“). Přes tyto drobné připomínky konstatuji, že autorka získala velké množství originálních dat, která by měla být rozhodně v budoucnu dále publikačně zhodnocena.

V kapitole **Diskuse** (10 str.) autorka dle jednotlivých problémových okruhů kriticky hodnotí použité metodické přístupy i dosažené výsledky, interpretuje je a konfrontuje s dosaženou úrovní poznání ve studované oblasti. Místy je však diskuse více rekapitulací výsledků (kupř. část 5.4 či 5.5), větší důraz by měl být proto kladen na konfrontaci s literaturou a interpretaci získaných dat, včetně formulace nových hypotéz či aplikačního potenciálu získaných výsledků (toto je myšleno hlavně jako námět pro autorku při dalším publikačním zpracování dat).

Hlavní dosažené výsledky jsou stručně v bodech shrnuty v **Závěrech** práce.

Z hlediska formálního nemohu pominout některé nedostatky disertace, kterým by se měla autorka v budoucnu – kupř. při zpracování výsledků pro tisk - vyhnout. Tyto tiskové a

jazykové nedostatky jsou vyznačeny přímo v textu výtisku disertace, který jsem měl k dispozici. Zde se spíše pokusím o jejich určité zobecnění či shrnutí:

- Práce je zatížena poměrně značným množstvím překlepů a jazykových / formálních chyb, které poněkud snižují jinak velmi dobrý dojem z její obsahové, grafické a estetické úrovně (týká se rovněž vědeckých názvů organismů či chemických názvů sloučenin).
- Číselné členění kapitoly Výsledky je jak v obsahu (úvod práce), tak ve vlastním textu zmatečné.
- Při citaci literatury je u kolektivní práce logičtější a užívanější použití plurálu než singuláru, tedy „Nepovím a kol. (2004) zjistili versus zjistil“.
- Řada položek literatury citované v textu není zahrnuta v Použité literatuře (námatkou Zeman (2000) str. 19, Stiborová (2002) str. 24, Jing a kol. (2003) str. 45, Robison a Stone (1992) str. 46, Kuramata (rok neuveden) str. 51, Schenk a Hildebrand (1972) str. 58, Čihalík a kol. (1989) str. 71, Channon a kol. (1944) str. 73, Laemmler a kol. (1970) str. 75, Nogura a Freedman (1996) str. 144, Breithaupt a kol. (2001) str. 147).
- Sjednotit formát Použité literatury - obvykle se neuvádí číslo vydání časopisu (pokud ho autorka hodlá uvádět, pak tedy u všech citací!), ale pouze ročník; sjednotit zkrácený či úplný název periodik; víceslovné názvy časopisů – velká písmena na začátku slov atd.; obecně lze akceptovat různé formy citace literatury – v rámci jedné práce však musí být jednotné!

Uvedené poznámky mohou zavánět „hnidopištvím“ oponenta deformovaného prací v redakčních radách vědeckých časopisů – avšak tak jak existuje řád a exaktní postupy ve vědecké práci, musí tento řád a kultura existovat i v její formální prezentaci. Tyto kritické poznámky nesnižují kvalitu výsledků dosažených autorkou, které jako oponent vysoce oceňuji.

K autorce mám několik dotazů:

- I když to nebylo předmětem disertace, zajímalo by mne, zda dřeviny (osika, dub) či byliny (mydlice, starček) rostoucí na lokalitách s vyšší kontaminací nitrosloučeninami (výbušniny a jejich degradační produkty) vykazovaly nějaké evidentní růstové / vývojové deformity či odchylky od standardního fenotypu.
- S tím je spojena i otázka na potenciální anatomické změny v pletivech mokřadních i terestrických druhů rostlin jako reakce na silnou kontaminaci nitrosloučeninami.
- Který z testovaných rostlinných druhů by bylo možné na základě dosavadních experimentálních dat doporučit pro dekontaminaci půdy (nikoliv vody) zamořené nitrosloučeninami (dle stupně zamoření, hloubky kontaminace, dosahu kořenového systému, účinnosti degradace TNT či TNG tím kterým rostlinným druhem, možnosti dalšího zpracování biomasy) a dal by se modelově vypočítat čas potřebný pro „vyčištění“ takovéto lokality do stavu použitelného pro zemědělskou činnost? Jaké jsou navrhované strategie pro dekontaminaci lokalit od výbušnin v zahraničí – co má být konečným stadiem – lesní ekosystém či použitelná zemědělská půda?

## ZÁVĚR

Mgr. Radka Podlipná předložila jako doktorskou disertaci soubor originálních výsledků týkajících se degradace toxických nitrosloučenin vyššími rostlinami, a to od buněčné úrovně *in vitro*, přes celistvé rostliny v laboratorních podmínkách či modelové čistírně odpadních vod až po pilotní experimenty *in situ* (na lokalitě kontaminované nitrosloučeninami). Výsledky s problematikou degradace / detoxifikace nitrosloučenin vyššími rostlinami autorka se spoluautory publikovala ve 4 impaktovaných časopisech a prezentovala ve 21 konferenčním příspěvku (přednášky a postery). Celkem je Mgr. R. Podlipná spoluautorkou 10 recenzovaných / impaktovaných publikací (1x první autor, 3x druhý autor atd.) a 48 konferenčních prezentací (14x první autor), vesměs s biotransformační / fyto-remediační tematikou. Autorka přesvědčivě prokázala způsobilost k tvůrčí vědecké práci, analýze experimentálních dat, jejich interpretaci a formulaci zobecňujících závěrů a nových pracovních hypotéz. Předložená práce splňuje po formální i obsahové stránce všechny předpoklady na doktorské práce kladené, stejně tak dosavadní publikační aktivita autorky, a proto doporučuji Komisi doktorského studijního programu Anatomie a fyziologie rostlin, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím splnění byla Mgr. Radce Podlipné udělena vědecká hodnost Ph.D.

V Šumperku 15. září 2006

M. Griga