



V Praze dne 9. 5. 2023

Oponentský posudek na disertační práci

Autor práce: Ing. Nikola Roulová

Název práce: Problematika analytické a mikrobiologické kvality odpadních vod

Oponent habilitační práce: doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.

Hodnocení práce po formální stránce:

Disertační práce disponuje poměrně rozsáhlou teoretickou a experimentální částí v počtu 138 stran textu a doplňující přílohou částí sumarizující 4 hlavní recenzované publikace Ing. Nikoly Roulové, 3 z nich publikované ve významných IF periodikách. Na tyto publikace se v textu autorka práce vhodně odkazuje (str. 78, str. 87, str. 112).

Teoretická část práce se zaměřuje na problematiku centralizovaného čištění odpadních vod s důrazem na odpadní vody ze zdravotnictví, které jsou v ČR poměrně diskutovanou a rizikovou záležitostí. Vzhledem k tomu, že se práce blíže věnuje detekci a výskytu antibioticky rezistentních bakterií v odpadních vodách, je rešerší zpracována antibiotická rezistence a případně i diskuse nad vhodnými procesy k odstranění mikrobiální kontaminace. Další významnou kapitolou je metodická část vlastní detekce a kultivačního stanovení vybraných mikroorganismů, jm. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* a *Salmonella* sp. Diskutovanou nosnou tématikou disertační práce je příjem polyfluorovaných léčiv za hydroponických podmínek pěstovaných rostlin. Třetí část práce se zaměřuje na ekotoxikologické zhodnocení na růst zelené řasy v průběhu fotokatalýzy vodných roztoků herbicidů alachloru, metolachloru a acetochloru.

Předložená disertační práce je **výsledkem řešení** konkrétní vědecké práce a **formálně odpovídá** požadavkům, vymezeným v článku 15 Disertační práce, specifikovaném ve Vnitřních předpisech Univerzity Pardubice ze dne 24. 6. 2021.

Hodnocení práce po věcné stránce:

Předložená disertační práce obsahuje četné překlepy a nesprávné termíny, včetně ne zrovna vhodně zvolených zkratk a symbolů. Jako zásadní chyby uvádím např. v seznamu zkratk, použitý symbol BSK s vysvětlením „biologická spotřeba kyslíku“, což není rozhodně správně, má být samozřejmě „biochemická spotřeba kyslíku“, symbol CHKS se v analytice a hydrochemii rozhodně nepoužívá pro symbol chemické spotřeby kyslíku (objevuje se i na str. 16). Ne všechny zkratky, které jsou používány v textu práce, jsou uvedeny v seznamu (např. ATCC na str. 51). Nadbytečně, a ne zcela běžně je uváděna zkratka pro latinský název taxonu bakteriálního nebo řasového kmene, viz ČSN EN 16493.

Str. 15 i dále v textu ... Termín „mikroflóra“ je již v současné době přežitý a namísto něho se doporučuje používat „mikrobiom“, zvláště v mikrobiologickém oboru a problematice.

Str. 15 i dále v textu ... *Přečištěná* voda není v technologii čištění definována (viz ČSN EN 1085 Čištění odpadních vod – Slovník). Rovněž tak se nepoužívá voda čistěná (viz str. 19). Lépe by se mělo uvádět v práci „předčištěná“, nebo „čištěná“. Bohužel v souvislosti s definováním „šedých vod“ a „čističek“ odpadních vod se na různých portálech

a v reklamách firem začíná používat i ne zrovna adekvátní termín „přečištěná“. Voda je předčištěná a dočistí se dále např. v recipientu.

Str. 17 ... Na čem je založeno tvrzení ... že *toxicita odpadní vody ze zdravotnických zařízení je 5-15krát vyšší než u komunálních odpadních vod...* O jakou řadu mikropolutantů a skutečné koncentrace se jedná? Z čeho tato informace vychází?

Str. 18 ... Při citaci „norem“ je vhodné uvádět správně celý název, tj. ČSN 75 6406, nikoliv *Norma 75 6406*. (Zde je v normě článek, zabývající se „předčištěnou“ odpadní vodou, viz poznámka k terminologii na str. 15 a dále v textu.)

Str. 19 ... Text uvádí, že ... *Decentralizovaným čištěním odpadních vod je možné eliminovat rozšíření specifických kontaminantů ze zdravotnických zařízení do veřejné kanalizační sítě a dále do vodního recipientu. Předchází se tím problémům, jako je kontaminace a inhibice aktivovaného kalu nebo podpora šíření antibiotické rezistence ...* Jak si představujete kontaminaci a inhibici aktivovaného kalu? Pokud vezmeme v potaz, že uvažujete o „vodním recipientu“. Jaké je riziko inhibice kalu v aktivaci a proč?

Str. 19 ... *Nejvýznamnějším zdrojem rezistentních bakterií, genů antibiotické rezistence a antibiotik ve veřejné kanalizační síti jsou odpadní vody ze zdravotnických zařízení, přestože obvykle tvoří pouze minoritní část surové odpadní vody, která je do městských čistíren odpadních vod přiváděna....* Zde mám dotaz, zda zvažujete i jiná rizika, o kterých se v souvislosti s antibiotickou rezistencí hovoří méně, a těmi je veterinární péče a případně antibiotika podávaná „mazlíčkům“. Našla jste případně v odborné literatuře i tuto skutečnost?

Str. 20 i dále v textu ... Důvod uvádění zkratky MGE v závorce – v textu práce jsou mobilní genetické elementy rozepisovány.

Str. 20 ... *Druhým faktorem přispívajícím k šíření antibiotické rezistence v prostředí čistíren odpadních vod je skutečnost, že podmínky nabízené mikroorganismům během biologického procesu čištění poskytují ideální prostředí pro selekci rezistentních bakterií, horizontální přenos genů antibiotické rezistence a vznik nových rezistentních kmenů ...* Dokázala byste přesně popsat, o jaké podmínky v rámci biologického procesu čištění aktivovaným kalem se jedná? Jak vysoká koncentrace kyslíku, co je stabilní teplota a pH? Dokázala byste specifikovat, které mikroorganismy a procesy jsou výrazně ovlivňovány?

Str. 23 ... *Mnoho z mikropolutantů zaváděných do čistíren odpadních vod je schopno inhibovat biologickou aktivitu společenstva mikroorganismů v aktivovaném kalu, což má za následek další snížení účinnosti biologického procesu čištění, a to z důvodu vymírání přítomné bakteriální populace. Dokázala byste lépe toto tvrzení specifikovat? ...* O jaké další snížení účinnosti biologického procesu čištění z důvodu vymírání přítomné bakteriální populace se toto týká?

Str. 28 ... *Z tohoto důvodu mohou kultivační metody podceňovat skutečné množství bakterií přítomných ve vyšetřovaném vzorku....* Zřejmě máte na mysli, že výsledky získané prostřednictvím kultivačních metod jsou podceněné. Myslíte si, že v tomto mohou hrát roli i do jisté míry např. přítomné viry? Třeba bakteriofágy?

Str. 29-30 ... *Naproti tomu v odpadních vodách tvoří patogenní bakterie pouze minoritní část z celkové bakteriální populace a jejich koncentrace jsou tak relativně nízké, neboť se nacházejí uprostřed mnohem většího množství komplexní doprovodné mikroflóry (Hsu et al. 2011; Varela and Manaia 2013; Petsios et al. 2016). Ve srovnání s ostatními bakteriálními skupinami jsou tak patogenní bakterie přítomny ve výrazné menšině (Hsu et al. 2011; Varela*

and Manaia 2013)..... Zde došlo zřejmě ke zrcadlení textu a opakování stejného faktu z publikací.

Str. 30 ... Z těchto důvodů není přímá izolace patogenních bakterií na pevných půdách pro vzorky odpadních vod dostatečně účinná. Vzorky odpadních vod typicky vyžadují pomnožení v tekutém médiu před vyočkováním na pevná média, aby bylo dosaženo zvýšení množství cílových patogenních bakterií. K tomu lze přispět i zkoncentrováním vzorku odpadní vody..... Zde mám dotaz na v praxi běžně používané kultivační metody, zaměřené na termotolerantní koliformní bakterie a enterokoky. Jakým způsobem by probíhala kultivační technika u těchto patogenů?

Str. 30 ... Ve vzorcích odpadních vod vyznačujících se vysokou mikrobiální zátěží však může růst a metabolismus doprovodné mikroflóry pomnožení patogenních bakterií potlačit....

Kdy je toto adekvátní použít? Dojde nejen ke zkreslení výsledku, nejen v početnosti, ale změni se původní profil přítomného mikrobiomu.

Str. 33 ... Přestože molekulární metody představují nástroj pro kvantifikaci bakterií, který je přesný, rychlý a zajišťuje specifickou detekci, nejsou součástí standardních metod..... Toto neplatí vždy a za všech podmínek. Umožňují třeba pouze kvalitativní stanovení – klasické PCR.

Str. 33 ... V současné době existuje pouze jedna mezinárodní norma v oblasti kvality vod, ve které je primárně využita molekulární detekce. Jedná se o normu ISO/TS 12869:2019, která specifikuje metodu detekce a kvantifikace *Legionella* spp. a *Legionella pneumophila* ve vodách, a to metodou qPCR. Metoda může být použita pro všechny typy vod, pokud povaha nebo obsah suspendovaných látek anebo doprovodné mikroflóry neovlivňuje stanovení (ISO/TS 12869:2019). Norma ISO/TS 12869:2019 však nebyla v České republice přijata a metoda qPCR se k detekci ani kvantifikaci legionel nepoužívá..... S tímto tvrzením nesouhlasím. Chápu, co bylo tímto textem zřejmě myšleno, ale takto uvedené se nezakládá na skutečnosti. Norma nebyla zatím transponována do řady ČSN norem, ale jsou laboratoře, které stanovení legionel metodou qPCR běžně provádějí. V ČR je od roku 2022 mezi akreditovaným subjekty zkušebních laboratoří laboratoř PVK, a.s., která má tuto metodu zahrnutou do zkoušek v rozsahu akreditace (viz konference Vodárenská biologie 2022 apod.).

Str. 34 ... Biochemické změny uhlíku a dusíku v půdě ovlivňují dostupnost živin pro rostliny. O jaké biochemické změny se přesně jedná? Lze je analyticky stanovit?

Str. 35 ... Toxicita vznikajících metabolitů pak může překročit toxicitu mateřské sloučeniny. Na druhou stranu velká část metabolitů může být v rostlinách přeměněna zpět na mateřskou sloučeninu, což je skutečnost, která pravděpodobně podporuje lékovou rezistenci (Klampfl 2019). Hladiny léčiv se tak v zemědělských produktech pohybují hluboko pod terapeutickou dávkou, na koncentračních úrovních $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Chuang et al. 2019). Přesto ale nejsou účinky dlouhodobé konzumace nízkých koncentrací léčiv skrze potraviny zcela jasné (Madikizela et al. 2018)..... Tento text je zvláště formulovaný a není jasné, co je tím přesně myšleno. Má toto sdělení význam pro řešenou práci? V souvislosti s tímto textem poukazují i na to, že je v textu rešeršní části práce velmi často používán odkaz např. na publikaci Klampfl 2019.

Str. 40 ... Již více než století se ke zvýšení produktivity zemědělství a výnosů kvalitních plodin používají herbicidy, přičemž jejich spotřeba neustále roste (Huang et al. 2020; Machado and Soares 2021; Wang et al. 2021)..... Jak velká ona spotřeba je, máte někde k dispozici data?

Str. 41 ... Navíc je oxid titaničitý netoxický, relativně levný a lze jej snadno recyklovat v průmyslovém měřítku..... Tato informace je trochu vytržena z kontextu. Posledních pár let se naopak hovoří o toxicitě a škodlivosti oxidu titaničitého a jeho toxický účinek je porovnáván s azbestem, protože působí na plíce, při vysoké vzdušné kontaminaci může evokovat nádory plic.

Str. 43 ... Přestože herbicidy byly navrženy tak, aby byly toxické pouze pro určitý druh organismů, v dnešní době existují nepopiratelné důkazy, že nepůsobí specificky pouze na svůj primární cíl. V důsledku toho herbicidy představují vážné riziko i pro necílové organismy a jejich přítomnost v půdě nebo ve vodách je doprovázena řadou nežádoucích účinků (Machado and Soares 2020)..... Máte představu, jakým způsobem jsou ovlivněna půdní společenstva, která jsou primárně důležitá pro půdní procesy a biogeochemické cykly (C, N, P a S)?

Str. 44 ... Hlavním cílem je zjistit, zda látka vykazuje toxický účinek a jaká je hraniční koncentrace umožňující přežití použitého zkušebního organismu (Ghosh et al. 2017; Abbas et al. 2018)..... Zde nesmíme zapomenout na jednu věc, že testy postihují účinek mnoha komponent, přítomných ve vzorcích. Lépe by bylo uvést ... zda látka nebo vzorek (matrice, apod.) vykazuje toxický účinek.

Str. 45 ... Testy in vivo poskytují ucelenější reakci organismu. Jsou prováděny jak s využitím prokaryotických, tak eukaryotických buněk, a to včetně mnohobuněčných organismů. Mezi běžně používané zkušební organismy patří bakterie (*Vibrio fischeri*), zelené řasy (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri*), rostliny a jejich semena (oves setý, hořčice bílá), korýši (hronatka velká) nebo ryby (živorodka duhová, danio pruhovaný, pstruh duhový) (Abbas et al. 2018; Babu et al. 2019). Ačkoli využití zvířecích modelů umožňuje komplexní zhodnocení toxických účinků testovaných látek, jejich použití je spojeno se zvýšenými provozními náklady a časovou náročností, vzhledem k dlouhé době růstu (Abbas et al. 2018)..... Došlo ke změně v názvu bakterie, používá se jméno *Allivibrio fischeri*. U testů na semenech se spíše než oves setý, používají např. semena salátu *Lactuca sativa* (Příloha č. 5 k vyhlášce č. 273/2021 Sb.). Zvířecí modely mají hlavně jiná rizika, a těmi jsou legislativní požadavky. Tento problém byl dlouhodobě řešen u testů na rybách. MZe uděluje oprávnění k chovu a oprávnění k používání pokusných zvířat podle § 15b, § 20 odst.1 písm. g) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. MZe schvaluje projekt pokusů podle § 23 odst. 1 a 23a odst.1 písm. a) zákona č.246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. MZe vydává osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 a odst. 4 zákona č.246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Do konce roku 2023 by měly být testy na rybách vyřazeny z baterie testů.

Str. 46 ... Stanovení obsahu chlorofylu na základě jeho fluorescence může být taktéž použito jako koncový bod toxicity (Abdelhaleem et al. 2020). Hodnoty EC50 získané pro jednu látku při testech toxicity na jednom druhu zelené řasy se mohou značně lišit.... V případě stanovení obsahu chlorofylu, se jedná o jakou metodu a jaký typ rostlinného barviva? EC50 se liší, ale na základě čeho? Jakého výstupu z testu se tato informace týká? Např. ČSN EN ISO 8692 a vyhodnocení testů.

Str. 47 ... Tento jev může být důsledkem rozdílného makromolekulárního složení buněk (konkrétně typu a obsahu lipidů a složení buněčné stěny), ale také odlišnými intracelulárními cíli, na které určitá látka působí, popřípadě rozdíly v aktivaci obranných mechanismů (Machado and Soares 2020)..... U rostlin a tudíž i u řas je v případě hodnocení toxicity pozorován jev, známý jako ROS. Víte, jak se projevuje?

Str. 47 ... Okřehky nebo okřehkovité ...

Str. 51 ... *Celkem byla použita tři tekutá pomnožovací média, která se lišila selektivitou a složením. Selektivitu jste testovala?*

Str. 51 až 52 ... Přehlednější by bylo propojení informací v textu experimentální části práce čl. 2.1.5.1 a Protokolu v tabulce 1. Protokol neobsahuje všechny informace, detailně je popsán krok pomnožení (teploty, expozice), ale vlastní kultivace využívající pevné médium, už tyto informace postrádá. Protokol je tak neúplný. Tato připomínka se týká dalších, podobně zpracovaných kapitol, věnovaných kultivacím vybraných 4 patogenů.

Str. 54 ... Tabulka 3 je spíše nepřehledná. Připomínka se týká dalších, podobně zpracovaných kapitol. U počtu pozitivních vzorků je uvedené i procento pozitivně potvrzených kmenů bakterií. Vhodnější by bylo tabulku lépe zpracovat, případně lépe provázat s doprovodným textem, kde jsou počty pozitivních vzorků z celkového počtu, uváděny v závorce. Např. *Bakterie St. aureus byla prokázána alespoň jedním z použitých kultivačních protokolů v 70,8 % (34/48) vyšetřovaných vzorků odpadních vod.*

Str. 58 ... *Typická byla přítomnost hnědavě zbarvených kolonií, ve kterých vyrůstaly bakterie rodu Proteus. Dělal jste konfirmační testy, případně MALDI?*

Str. 59 ... *Zatímco u kultivačních protokolů s totožným pomnožovacím krokem byla míra izolace bakterie St. aureus z obou použitých pevných médií srovnatelná, u protokolů s přímým roztěrem L-hokejkou byla patrná nadřazenost B-P agarů z hlediska počtu detekovaných pozitivních vzorků. Tento jev lze přičíst složení B-P agarů, neboť je obohacen glycinem a pyruvát sodným, jejichž úkolem je chránit poškozené buňky a usnadnit jejich obnovu.....*

Přehlednější by bylo uvedení přímo označení kroku, A až H, použitým v Protokolu.

Str. 60 ... *Multirezistentní profil byl u nemocničního MRSA kmene zaznamenán i v této práci, neboť jako jediný MRSA izolát vykazoval rezistenci k dalším testovaným antibiotikům. Jakou metodou jste stanovila přítomnost MRSA?*

Str. 76 ... *Pro tento způsob vyočkování byla navíc dostačující polovina Petriho misky o průměru 90 mm, čímž se snížil počet potřebných agarových ploten a tím i náklady (Obrázek 7)..... Doporučení a na zvážení do budoucna. Existují přímo sektorové misky (půlené, se 3 segmenty apod.), které umožňují 100% oddělení vzorků, a navíc šetří rovněž náklady.*

Str. 82 ... Protokol uvedený v tabulce 16 zcela neodpovídá informací, uváděným v uvozujícím textu, kde se uvádí rozsah teploty 36 ± 1 °C (str. 81) namísto 36 ± 2 °C (str. 82). Tato informace by měla být lépe specifikována, zvláště protože na str. 84 se uvádí, že inkubační teplota výrazně ovlivňuje účinnost selektivních pomnožovacích médií.

Str. 89 ... U modelových organismů semen klíčících rostlin by bylo vhodné uvést i šarži, která byla pro zkoušky toxicity použita.

Str. 90 ... Podle jakého modelu, metodiky, případně protokolu, byly zkoušky hydroponického pěstování provedeny? Chybí odkazy na normy, postupy, OECD metody, vyhlášky apod. Tato připomínka se týká i str. 93, kde je uvedena informace o intervalu 12 h světlo/12 h tma. Jakou metodou jste se inspirovala? Nebyla by vhodnější expozice 18 h světlo a 6 h tma?

Str. 91 a 92 ... Tabulka 21 by byla vhodněji umístěna před čl. 2.2.1.4.

Str. 100 ... Graf 1 (a i grafy následující) uvádí opakovaně čeho se zhodnocení týká. V titulku grafu, na ose y a rovněž tak popisek u grafu.

Str. 100 ... *Ve studii Mlunguza et al. (2020) byl studován příjem efavirenzu a dalších dvou antiretrovirových léčiv vodním hyacintem z přirozeně kontaminovaných vodních útvarů.....*

Dokázala byste tyto informace doplnit i o okřehky, které zmiňujete na str. 47 a věnujete jim podstatně významnou část textu?

Str. 102 ... Chápu důvody provedení 7denní expozice všech testů (slabší článek – řeřicha a plísně na médiu atd.), nicméně uvažovala jste, s ohledem na typ použitého semene rostliny, její metabolismus a vegetační cyklus, prodloužení testů na 14 dní, případně i 21 dní?

Str. 106 ... Uvádíte UV-A lampu. Můžete ji blíže specifikovat? Rozsah vlnových délek, např.?

Str. 107 a 109 ... Uvádíte rozsahy cyklů 12 h tma/12 h světlo u zásobních kultur, pak kultivaci v rámci testu v cyklech 18 h světlo/12 h tma. Důvod těchto rozdílů? Proč jste se neinspirovala rovněž normou ČSN EN ISO 8692, která je spíše používána? Důvod měření hustoty buněk při OD 684 nm vychází z jakého postupu?

Str. 110 ... Není reálné, aby test s řasami probíhal v rozsahu 6 000 – 70 000 lx. Maximum je 10 000 lx kvůli předcházení zničení fotosyntetického aparátu řasy v průběhu testu v termoluminostatu.

Děkuji za zodpovězení otázek, připomínek a komentářů.

Publikace, na které se v textu autorka odkazuje, jsou kvalitní a disponují zajímavými výsledky. Vhodně doplňují text předložené disertační práce.

Závěrečné prohlášení/vyjádření k předložené disertační práci:

Prohlašuji, že jsem disertační práci Ing. Nikoly Roulové dostatečně prostudovala a doporučuji ji k obhajobě.

V Praze

dne 9. 5. 2023

