

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Ústav geologie a paleontologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Institute of Geology and Paleontology**

Doktorský studijní program: geologie
Ph.D. study program: geology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Aktuoekologie krytének ve sladkovodním a půdním
prostředí v interakci s houbami & jejich analýza
novými mikroskopickými technikami**

**Actuoecology of testate amoebae in fresh water and soil
environment in interaction with fungi & their analysis
with new microscopic techniques**

Mgr. Zuzana Burdíková

Školitelka/Supervisor: Doc. Katarína Holcová, CSc.

Konzultantka/Consultant: RNDr. Lucie Kubínová, CSc.

Praha, 2012

Obsah / Content

Abstrakt	3
Abstract	4
1. Úvod	5
2. Cíle práce	6
3. Materiál a metody	6
4. Výsledky a diskuse	7
5. Závěry	8
6. Introduction	9
7. Aims of the study	10
8 Material and methods	11
9. Results and discussion	11
10. Conclusions	13
11. Literatura / References	13
12. Curriculum Vitae	15
13. Curriculum Vitae (English)	17

Abstrakt

Tato disertační práce se zabývá studiem krytének ve vztahu k jejich přirozenému biotopu a možnostmi analýzy krytének pokročilými mikroskopickými technikami. Hlavní výzkum se opírá o původní publikované vědecké články, ty jsou zařazeny do tří samostatných kapitol (Část I, Část II & Část III) a každá je opatřena úvodem.

(Část I) Metodická část disertační práce se věnuje využití pokročilých mikroskopických technik používaných k rozšíření rozsahu ekologických analýz. Zejména přesné rozlišení živých a mrtvých jedinců ve vzorku, přesné měření biomasy uvnitř schránky či vizualizace cytoplazmy mohou výrazně ovlivnit výsledky ekologických studií. Jako hlavní metody analýzy krytének byly použity nově konfokální a dvoufotonová mikroskopie. Tyto pokročilé mikroskopické metody umožnily zkoumat podrobně morfologii krytének. Údaje mohou mít vliv na taxonomii a ekofyziologii, včetně využití krytének jako bioindikátoru znečištění.

(Část II) Aktuologická analýza se zaměřuje na výkyvy v druhovém složení společenstva krytének ve sladkovodním ekosystému, jmenovitě Komořanských tůňkách v Praze, v průběhu roku. Změny v druhovém složení krytének jsou korelovány se současně zaznamenávanými limnologickými parametry jako je teplota, pH, koncentrace těžkých kovů (Ni, Cd, Pb, Mn, As) nebo polycyklických aromatických uhlovodíků a dalších chemických látek (NH_4^+ , NO_3^- , P). Například údaje získané v mělkých tůňkách ukázaly, že ekologické preference nároky rodu *Arcella* a rodu *Diffugia* se zdají být v opozici.

(Část III) Složitější ekologické interakce byly studovány zkoumáním interakce v mykorhizosféře evropských rhododendronů mezi kryténkami a erikoidně mykorhizními houbami a DSE- asociací, pojmenované podle hub, které ji tvoří (*Dark Septate Endophytes*). Možná role krytének jako zdroje živin pro hostitelské rostliny je diskutována. Další studie se zaměřuje na interakci mezi kryténkami a myceliem saprotrofních hub kolonizujících opad borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Analýzou bylo zjištěno, že saprofytické/parazitické houby interagují s kryténkami ve smrkovém opadu. Půdní houby tak nepřímo ovlivňují bakteriální populace v hypofosféře. Tato interakce zahrnuje mykofagii, houbové parazity a dekompozici schránek krytének.

Abstract

The present thesis focuses on testate amoebae (TA) and their relationship to their natural environment, as well as on relevant microscopic imaging methods. The bulk of the data has been published in original scientific papers and is compiled into three separate chapters (Pt I, Pt II and Pt III), each annotated by a brief introduction.

(Pt I) The methods section is devoted to specialized microscopic techniques employed to broaden the scope of the ecological analyses. In particular, precise discrimination between live and dead individuals, biomass determination inside individual tests and a multi-modal visualization of the cytoplasm and organelles enhance the data. Laser scanning confocal microscopy and two-photon microscopy are the main imaging modalities employed to study TA morphology in detail. The data have implications for taxonomy and ecophysiology, including the use of TA as bioindicators of pollution.

(Pt II) An actuoecological analysis focuses on the seasonal variability of TA species composition in a freshwater ecosystem, namely the Komořany ponds in Prague, during the course of the year. The species composition variation is correlated to simultaneously recorded limnological parameters such as temperature, pH, contamination by (heavy) metals (As, Cd, Mn, Ni, Fe, Pb), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and other chemical species (NH_4^+ , NO_3^- , P). For example, the data obtained in shallow ponds revealed that the ecological preferences of *Arcella* and *Diffugia* genera are more-or-less opposite.

(Pt III) More complex ecological interactions were studied by investigating the interaction in the mycorrhizosphere of European rhododendrons between TA and ericoid mycorrhizal fungi (ErMF) and dark septate endophytes (DSE) fungi. The possible role of TA as a source of nutrients for the host plant is discussed. Another study focuses on the interactions between TA and saprotrophic fungi mycelium colonizing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). The analysis of TA species composition data revealed that the saprotrophic/parasitic fungi do indeed interact with TA. Soil fungi interact with TA indirectly by affecting the bacterial population in the hyphosphere. This interaction involves mycophagy, fungal parasites and TA test decomposition.

1. Úvod

Kryténky (Testate Amoebae, TA) (Arcellinida a Euglyphida) jsou polyfyletickou skupinou jednobuněčných améboidních organismů obklopených schránkou o velikosti 10 až 400 μm . Osídlují sladkovodní, výjimečně brakické prostředí. Mezi hlavní důvody zvýšeného zájmu o kryténky patří jejich kosmopolitní rozšíření (Ogden a Headley, 1980), vysoká abundance a vynikající zachování především v sedimentu pozdních čtvrtohor a holocénu (Patterson et al. 1985). Jako vhodná pro studie zabývající se paleoekologií ponejvíce kvartéru se ukázala aplikace současných ekologických poznatků z oblasti taxonomie a ekologie krytének, jež byla korelována s mnoha environmentálními parametry, jako je např. eutrofizace (Schönborn, 1990). Řada studií používá kryténky jako bioindikátory změny hladiny moře, paleohydrologie a paleoklimatu (Tolonen, 1986).

Důležitým předpokladem pro úspěšné použití krytének v ekologickém a paleoekologickém výzkumu je jejich správné taxonomické zařazení, které je i v dnešní době založeno především na struktuře schránky (Ogden a Headley, 1980). Pro mnoho taxonů struktura cytoplasmy, počet jader či typy pseudopodií ještě nebyly pozorovány (Meisterfeld, 2002a, 2002b). Na druhou stranu, současné studie kombinující morfologická a molekulární data odhalily nečekanou diverzitu mezi kryténkami; jemné morfologické rozdíly, které nejsou většinou viditelné pod světelným mikroskopem, se ukázaly být taxonomicky významné (Todorov, 2009; Heger, 2010). Dosud však bohužel chybí relativně přístupná metodika, jež by na tyto skutečnosti reagovala.

Mykorhizní symbióza je mutualistické soužití specializované skupiny půdních hub s kořeny vyšších rostlin. Jedná se o jednu z evolučně nejstarších a nejrozšířenějších rostlinných symbióz. Zvláštní druh představuje erikoidně mykorhizní symbióza, mutualistické soužití mezi specializovanými půdními houbami a kořeny rostlin z čeledi vřesovcovité (Ericaceae). Erikoidní mykorhiza je zásadní pro přežití vřesovcovitých rostlin v půdních podmínkách s nízkým obsahem minerálních látek ale vysokým obsahem těžko dostupných organických látek (rašeliniště, vřesoviště). Erikoidně mykorhizní houby tvoří široké spektrum enzymů (např. chitinázy), které jim umožňují čerpat látky z odumřelých hyf hub či živočichů. Erikoidně mykorhizní houby by tedy mohly být schopny rozkládat chitinózní schránky krytének a následně je využívat jako zdroj živin/energie. Tento ekologický aspekt dosud nebyl zkoumán, avšak z dostupné literatury vyplývá, že biomasa krytének představuje kvantitativně významnou součást biomasy půdních organismů. Mezi substráty chudé na živiny patří také půdy jehličnatých a opadavých lesů. Ty jsou kolonizovány velmi rozmanitým spektrem

nejrůznějších hub. Půdní protisti, tedy i kryténky mohou redukovat ektomykorhizní kolonizaci kořenů rostlin nebo snižovat hustotu mykorhizních hyf v mykorhizosféře (Bonkowski, 2001). Existuje nicméně pouze malá hrst prací, zabývajících se přímými interakcemi krytének a půdních/mykorhizních hub.

2. Cíle práce

1. Zkoumat možnosti a využití pokročilých mikroskopických technik k rozšíření rozsahu ekologických analýz.
2. Analyzovat změny v druhovém složení společenstva krytének ve sladkovodním ekosystému (Komořanských tůňkách), v průběhu roku a korelovat je se současně zaznamenávanými limnologickými parametry prostředí.
3. Zkoumat interakce mezi erikoidně mykorhizními a DSE houbami a kryténkami v mykorhizosféře evropských rododendronů.
4. Zkoumat vliv mycelia saprotrofních hub obývajících opad borovice lesní na distribuci a druhové složení komunit půdních krytének

3. Materiál a metody

Mikroskopické metody

- i) *Fluorescenční značení:* DAPI (D1306), Er-Tracker Blue-White DPX (E12353), Hoechst (H21486), LysoTracker Red DND (L7528), MitoTracker (M22426), AlexaFluor 633 phalloidin (A22284), SYTO 16 (S 7578), Texas Red C₂-imide, TMRE (T-699) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), acid fuchsine (84600), aniline blue (ANILO1600), BCECF-AM (B8806), DiOC₃(3), FITC 46952 a propidium iodide (70335) (Sigma-Aldrich, USA).
- ii) *Mikroskopické vybavení:* skenovací elektronový mikroskop FEI Quanta 200, konfokální mikroskop Leica TCS SPE postavený na Leica DM 2500 CSQ V-VIS fluorescenčním mikroskopu a Leica TCS SP2 AOBS postavený na Leica DM IRE2 invertovaném mikroskopu, vybavený Ti:Sapphire Chameleon Ultra femtosekundovým laserem (Coherent, Santa Clara, CA).
- iii) *3D vizualizace:* program Ellipse (ViDiTo Systems, Košice, Slovakia)

Ekologické analýzy

- i) *Odebrání vzorků TA*: horní nekonsolidovaná vrstva sedimentu byla odebrána vložním trubky (15 cm v průměru) do vrstvy a zasunutím posuvné desky.
- ii) *Odebrání vzorků hub*: z kořenů byly odebrány vrchní vrstvy půdy (hloubka 5 - 15 cm). Pro screening mykorhizní kolonizace: autoklávováno v 10% KOH po dobu 20 minut při 121 °C, opláchnuto 3% HCl, omyto tekoucí vodou a autoklávováno v 0,05% trypanové modři v laktoglycerolu po dobu 20 minut při 121 °C Druhá část kořenů byla přímo ponořena do roztoku 0,05% trypanové modři v laktoglycerolu.

Statistická analýza

Program Canoco pro výpočet Redundanční analýzu (RDA); program Mathematica (Wolfram Research, Inc, USA) pro statistické zpracování interakcí kryténky-houby

4. Výsledky a diskuse

Analýza krytének novými mikroskopickými technikami

Pro studium parametrů společenstev krytének jsme použili konfokální a dvoufotonovou mikroskopii. Celkem jsme vyzkoušeli 16 fluorescenčních barev pro zvýraznění různých buněčných struktur, z toho 10 úspěšně. Díky fluorescenčnímu barvení, konfokální a dvoufotonové mikroskopii jsme byli schopni zobrazit jádro, cytoplasmu, membrány, některé orgány (mitochondrie, endoplasmatické retikulum) a symbiotické řasy u mixotrofních druhů. Rovněž rozlišení živých a mrtvých jedinců díky fluorescenčnímu barvení propidium jodidem a BCECF-AM bylo úspěšné a do budoucna by mohlo nahradit doposud používané nespolehlivé barvení Bengálskou růžovou (Bernhard, 2000). Konfokální a dvoufotonová mikroskopie byly použity pro studium krytének poprvé a poprvé byly takto detailně zobrazeny buněčné struktury krytének. Ve spojení s 3D rekonstrukcemi a stereologickými metodami jsou tyto zobrazovací metody zajímavé zejména pro taxonomii, ekofyziologii a ekotoxikologii krytének.

Sezónní variabilita krytének a jejich závislost na limnologických parametrech prostředí v Komořanských tůňkách

Z pozorování vyplývá, že rod *Arcella* upřednostňuje vody s nízkou koncentrací organického materiálu a nižší teplotou. *Diffflugia* preferuje vody eutrofního charakteru. Obecně rod *Centropyxis* nevykazoval statisticky významné valence k jednotlivým limnologickým parametrům. Z mého pozorování vyplývá statisticky významná korelace s ionty NH_4^+ a NO_3^- . Podle RDA analýzy ovlivňují komunitu krytének v tůňkách: těžké kovy (As, Pb, Cd, Mn, Ni) a polyaromatické uhlovodíky (PAH).

RDA analýzy u většiny druhů krytének dokazují negativní korelaci s těžkými kovy. Např. rod *Centropyxis* vykazuje citlivost vůči kontaminaci arsenu avšak relativní necitlivost ke koncentraci niklu. Z přítomných druhů vykazuje v tůňkách statisticky signifikantní citlivost rod *Arcella* negativního charakteru. *C. discoides*, *D. oblonga*, *D. bartosi* a *D. oviformis* mají naopak pozitivní toleranci k přítomnosti arsenu. V našem výzkumu se ukázalo, že rod *Arcella* má mírně pozitivní korelaci s Fe a rod *Diffflugia* mírně negativní.

Interakce mezi kryténkami a mykorhizními a saprotrofními houbami

Biomasa odumřelých krytének tvoří podstatný zdroj živin v habitatech dominovaných vřesovcovitými rostlinami a Erikoidně mykorhizními (ErM) houbami (rašeliniště, slatiniště) ErM houby přitom dokážou z celé skupiny mykorhizních hub nejlépe využívat chitin jako zdroj dusíku. Dusík je vedle fosforu nejdůležitějším makroprvkem, který podstatně ovlivňuje rozšíření a druhovou pestrost a bohatost rostlin a řada rostlin při jeho získávání spoléhá právě na mykorhizní houby.

Interakcemi krytének a saprotrofních hub jsme zkoumali ve zjednodušeném mikrokosmu simulujícím podmínky panující v opadu borovice lesní. Opad obecně je rozkládán celou řadou specializovaných saprotrofních hub. Ukazujeme, že jedna z nejhojnějších krytének kolonizujících jak listnatý tak jehličnatý opad, *Phryganella acropodia*, umí na rozdíl od jiných krytének efektivně využívat přítomnost mycelia saprotrofní houby *Anavirga laxa*. Mycélium této houby signifikantně ovlivňovalo distribuci kryténky *P. acropodia*, ta se také v jeho přítomnosti úspěšně rozmnožovala a postupně opanovala celý experimentální systém, na úkor ostatních krytének. Ukázali jsme, že schránky odumřelých krytének představují v půdním prostředí bohatý koktejl živin, který je nejspíše hojně využíván houbami.

5. Závěry

V metodické studii jsem použila pokročilé mikroskopické techniky - CLSM a TPEM. Použití těchto technik přineslo nové poznatky o vnitřních strukturách krytének, pomohlo přesněji

rozlišit živé/mrtvé jedince ve vzorku, než doposud běžně používané metodiky a po aplikaci stereologických metod se ukázala tato metodika vhodná i pro výpočet biomasy uvnitř schránky.

Celoročním pozorováním se podařilo zachytit změny ve společenstvu krytének. Pozorovala jsem nejdříve rozvoj rodu *Arcella* následovaný rodem *Centropyxis* v jarních měsících. Během letních měsíců došlo k nástupu rodu *Diffugia* a postupnému ústupu rodu *Arcella*. Statistická analýza korelovala signifikantně skladbu společenstva krytének s teplotou, koncentrací fosforu, NH_4^+ , NO_3^- , As, Pb, Cd, Mn, Ni, PAH a Fe.

Dokumentovala jsem s kolegy interakci mezi kryténkami a kořeny rododendronu asociovanými s mykorhizními houbami, spojenými myceliem s mykorhizními kořeny. Naše pozorování a zjištění spolu s publikovanými články přináší podporu hypotéze, že kryténky mohou být zdrojem živin pro hostitelskou rostlinu.

Zjistili jsme, že saprofytické/parazitické houby interagují s kryténkami ve smrkovém opadu. Půdní houby nepřímo ovlivňují populaci krytének, díky jejich vlivu na bakteriální populaci v hyphosféře. Tato interakce zahrnuje mykofagy, houbové parazity a dekompozici schránek krytének.

6. Introduction

Testate Amoebae (TA) (Arcellinida and Euglyphida) are single-cell amoeboid polyphyletic group of organisms surrounded by a test of the size of 10 to 400 μm . They inhabit freshwater, rarely brackish environment. The main reasons for increased interest in TA stems from their cosmopolitan extension (Ogden and Headley, 1980), high abundance and excellent preservation in the sediments of the late Quaternary and Holocene (Patterson et al. 1985). They proved appropriate for studies of Quaternary paleoecology as well as for current ecological studies, where TA abundance was correlated with many environmental parameters, such as eutrophication (Schönborn, 1990). A number of studies use TA as bioindicators of sea level change, and in paleohydrology (Tolonen, 1986).

An important prerequisite for successful use of TA in paleoecology is correct taxonomic classification, which even today is based primarily on the structure of the test (Ogden and Headley, 1980). For many taxa the structure of the cytoplasm, the number of nuclei or types of pseudopodia have not been observed yet (Meisterfeld, 2002a, 2002b). On the other hand, recent studies combining morphological and molecular data revealed an unexpected diversity among TA, subtle morphological differences that are not usually visible under a light

microscope proved to be taxonomically important (Todorov, 2009; Heger, 2010). However, a relatively accessible methodology that would respond to these facts is still missing.

Mycorrhizal symbiosis is a mutualistic coexistence of specialized groups of soil fungi with the roots of higher plants. This is one of the evolutionarily oldest and most widespread plant symbioses. A special form is an ericoid mycorrhizal symbiosis, mutualistic coexistence of specialized soil fungi and plant roots from genus Ericaceae. Ericoid mycorrhizis is essential for the survival of ericaceous plants in soil conditions with low mineral content but high in inaccessible organic matter (peat, bogs). Ericoid mycorrhizal fungi possess a wide range of enzymes (e.g. chitinase) that allow them to digest dead hyphae or animals. Ericoid mycorrhizal fungi could therefore be able to decompose chitinous tests of TA and use them as a source of nutrients / energy. This ecological aspect has not yet been studied, but the available literature suggests that biomass of TA presents a quantitatively significant part of the biomass of soil organisms. The nutrient-poor substrates (e.g. the soil of coniferous and deciduous forests) are colonized by a broad range of fungi. Soil protist, including TA, can reduce ectomycorrhizal colonization of plant roots and mycorrhizal hyphae to reduce density in mycorrhizosphere (Bonkowski, 2001). There is however only a small amount of papers dealing with the direct interactions of TA and soil / mycorrhizal fungi.

7. Aims of the study

1. Explore the possibilities and use of advanced microscopic techniques to expand the scope of environmental studies
2. Analyze the variation of species composition in TA communities in freshwater ecosystem (Komořany ponds) during the year and correlate them with simultaneously recorded limnological parameters
3. Examine the interaction between ericoid mycorrhizal fungi and DSE with TA in the rhizosphere of European rhododendrons
4. Examine the impact of saprotrophic fungal mycelia inhabiting pine forest litterfall on the distribution and species composition of soil communities of TA

8. Material and methods

Microscopic methods

- i) *Fluorescent markers*: DAPI (D1306), Er-Tracker Blue-White DPX (E12353), Hoechst (H21486), LysoTracker Red DND (L7528), MitoTracker (M22426), AlexaFluor 633 phalloidin (A22284), SYTO 16 (S 7578), Texas Red C₂-imide, TMRE (T-699) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), acid fuchsine (84600), aniline blue (ANILO1600), BCECF-AM (B8806), DiOC₃(3), FITC 46952 and propidium iodide (70335) (Sigma-Aldrich, USA).
- ii) *Microscopic equipment*: FEI Quanta 200 scanning electron microscope, Leica TCS SPE confocal system based on Leica DM 2500 CSQ V-VIS fluorescent microscope, Leica TCS SP2 AOBS confocal system based on Leica DM IRE2 inverted microscope with a Ti:Sapphire Chameleon Ultra femtosecond laser (Coherent, Santa Clara, CA).
- iii) *3D visualization*: Ellipse software package (ViDiTo Systems, Košice, Slovakia)

Ecological analysis

- i) *sampling TA*: The upper layer of unconsolidated sediment was removed by inserting tubes (15 cm in diameter) in the layer and sliding a board at the end of the tube.
- ii) *sampling fungi*: the roots were collected from the ground (depth 5-15 cm). For screening mycorrhizal colonization: autoclaved in 10% KOH for 20 minutes at 121 °C, rinsed with 3% HCl, washed with running water and autoclaved in 0.05% tripan blue with lactoglycerol for 20 minutes at 121 °C. The second part of the roots was directly immersed in a solution of 0.05% trypan blue in lactoglycerol.

Statistical analysis

Canoco software was used to perform the redundancy analysis (RDA); Mathematica (Wolfram Research, Inc., USA) was used to assess the interaction of TA and fungi.

9. Results and discussion

Analysis of TA by new microscopic techniques

To study the parameters of TA communities, we used confocal and two-photon microscopy. In total we tested 16 fluorescent dyes to highlight different cell structures, of which 10

successfully. With fluorescent staining, confocal and two-photon microscopy, we were able to visualize the nucleus, cytoplasm, membrane, some organelles (mitochondria, endoplasmic reticulum) and the symbiotic algae in mixotrophic species. Also, the resolution of live and dead specimens by labeling with propidium iodide and BCECF-AM was successful and could replace the previously used unreliable Bengal rose staining (Bernhard, 2000). Confocal and Two-photon microscopy were used to study TA for the first time as well as to visualize their internal structures. In conjunction with 3D reconstructions and stereological methods these microscopic techniques are particularly attractive for taxonomy, ecophysiology and ecotoxicology of TA.

Seasonal variability of TA and their dependence on the limnological parameters of the environment in Komořanských ponds

The observations show that the genus *Arcella* prefers water with low concentrations of organic material and lower temperatures. *Diffugia* prefers eutrophic water. In general, genus *Centropyxis* did not show statistically significant valence to either limnological parameter. My observations show a statistically significant correlation with the NH_4^+ and NO_3^- ions. The RDA analysis shows the sensitivity of TA to heavy metals (As, Pb, Cd, Mn, Ni) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

RDA analysis for most TA species shows negative correlation with heavy metals. For example: genus *Centropyxis* exhibits sensitivity to arsenic contamination, but relative insensitivity to the concentration of nickel. *C. Discoides*, *D. oblonga*, *D. bartosi* and *D. oviformis* have a positive correlation to the presence of arsenic. Our research showed that the genus *Arcella* has a slightly positive correlation with Fe and genus *Diffugia* slightly negative.

The interaction between TA and mycorrhizal and saprotrophic fungi

Biomass of dead TA constitutes an essential source of nutrients in a habitat dominated by *Ericaceae* plants and ericoid mycorrhizal (ErM) fungi (bogs, peats). Among the group of mycorrhizal fungi the ErM fungi can use chitin as a source of nitrogen to the greatest extent. Nitrogen is the most important macro-element (aside of phosphorus), which significantly affects the distribution and species diversity of plants and many plants rely solely on mycorrhizal fungi in nitrogen acquisition.

We have investigated the interactions between TA and saprotrophic fungi in a simplified microcosm simulating the conditions in the pine forest litter. Litterfall is generally degraded

by a variety of specialized saprotrophic fungi. We showed that one of the most abundant TA colonizing both deciduous and coniferous litterfall, *Phryganella acropodia*, can unlike other TA effectively exploit the presence of *Anavirga laxa* saprotrophic fungus mycelium. *Phryganella acropodia* gradually mastered the experimental system at the expense of other TA. We have shown that the tests of dead TA present a rich cocktail of nutrients, which is probably widely used by fungi.

10. Conclusions

In the methodological study, I used advanced microscopic techniques - CLSM and TPEM. Using these techniques has provided new knowledge about the internal structures of TA, helped to more accurately distinguish between live / dead individuals in the sample than previously common methodology and together with stereological methods, this method proved suitable for calculation of biomass inside the test.

Year-round observation managed to capture changes in species community of TA. I studied the earliest development of the genus *Arcella* genus *Centropyxis* followed in the spring months. During the summer months, there was the onset of the genus *Diffflugia* and gradual retreat of the genus *Arcella*. Statistical analysis correlated the TA abundances with temperature, phosphorus concentration, NH_4^+ , NO_3^- , As, Pb, Cd, Mn, Ni, Fe and PAHs.

We documented the interaction between TA and rhododendron roots associated with mycorrhizal fungi and mycelium associated with mycorrhizal roots. Our observations and findings, along with published articles provide support for the hypothesis that TA may be one of sources of nutrients for the host plant.

We found that saprophytic / parasitic fungi interact with amoebae in spruce litter. Soil fungi indirectly affect TA population, due to their impact on the bacterial population in hyphosphere. This interaction includes mycofagy, fungal parasites and decomposition of TA tests.

11. Literatura / References

Bernhard J. M. (2000). Distinguishing live from dead foraminifera: Methods review and proper applications. *Micropaleontology* **46**, Suppl. 1, 38–46.

- Bonkowski M., Jenschke G., Scheu S. (2001). Contrasting effects of microbial partners in the rhizosphere: interactions between Norway Spruce seedlings (*Picea abies* Karst.), mycorrhiza (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.) and naked amoebae (protozoa). *Appl Soil Ecol* **18**, 193–204.
- Heger T. J., Mitchell E. A. D., Todorov M., Golemansky V., Lara E., Pawlowski J. (2010). Molecular phylogeny of euglyphid testate amoebae (Cercozoa: Euglyphida) suggest transitions between marine supralittoral and freshwater/terrestrial environments are infrequent. *Mol Phylogenet Evol* **55**, 113–122.
- Meisterfeld R. (2002). Order Arcellinida Kent, 1880. In *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd ed.; Lee J. J., Leedale G. F., Bradbury P. (Eds.), **2**, 827–860. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists.
- Meisterfeld R. (2002). Testate Amoebae with Filopodia. In *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd ed.; Lee J. J., Leedale G. F., Bradbury P. (Eds.), **2**, 1054–1084. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists.
- Ogden C. G., Hedley R. H. (1980). *An atlas of freshwater testate amoebae*. New-York: Oxford University Press.
- Patterson R. T., Mackinnon K. D., Scott D. B., Medioli F. S. (1985). Arcellaceans (“Thecamoebians”) in small lakes of New Brunswick and Nova Scotia: modern distribution and Holocene stratigraphic changes. *Journal of Foraminiferal Research* **15**, 114–137
- Schönborn W. (1990). Shell polymorphism and habitat structure in testacea (Rhizopoda). *J Protozool* **37**, 62A
- Tolonen K. (1986). Rhizopod analysis. In *Berlund BE (eds) Handbook of holocene palaeoecology and palaeohydrology*. Wiley, Chicchester , 645–666
- Todorov M., Golemanski V., Mitchell E. A. D., Heger T. J. (2009). Morphology, biometry, and taxonomy of freshwater and marine interstitial Cyphoderia (Cercozoa: Euglyphida). *J Eukaryotic Microbiol* **56**, 279–289.

12. Curriculum Vitae

Zuzana Burdíková

Bydliště: Jablůnka 551, 756 23

E-mail: burdikova.zuzana@gmail.com

Narozena: Vsetín, 3. listopadu 1978

Rodinný stav: vdaná, 1 dítě

Členem: CSMS, EMS, ISTAR - International Society for Testate Amoeba Research

Specializace

Protozoologie

Ekologie

Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Dvoufotonová mikroskopie

Zobrazování druhou harmonickou (SHG)

Vzdělání

1998 – 2004 – Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, studijní program: učitelství biologie a geologie pro střední školy; magisterský titul: 2004

2002 – 2004 – Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, studijní program: biologie, specializace: hydrobiologie

2004 – nyní – Ph.D. studium na Přírodovědecké fakultě, Univerzita Karlova v Praze, téma doktorské práce: “Aktuální ekologie kryptofagů ve sladkovodním prostředí, v půdním prostředí v interakci s houbami a jejich analýza novými mikroskopickými technikami”

2006 – Certifikát: Inženýrská hydrobiologie, Institut environmentálních služeb, Veolia, Praha

Současná pozice

Ph.D. student

2006 – nyní – Výzkumný pracovník: oddělení Biomatematicky, Fyziologický ústav, Akademie věd České Republiky

2006 – nyní – Výzkumný pracovník: Centrum fluorescenční mikroskopie v biologickém a medicínském výzkumu, Fyziologický ústav, Akademie věd České Republiky

Studijní stáže

2004 – Oddělení hydrobiologie, Aristotelova univerzita v Soluni, Řecko

2005 – Letní škola kvarterních studií, Brno

2006 – Dynamická mikroskopie, Rudolf-Virchow-Center / DFG výzkumné centrum experimentální biomedicíny, Univerzita ve Würzburgu, Německo

2007 – Škola biofyziky v Benátkách

2008 – Výzkumná jednotka: Hranice ekosystémů, Švýcarský federální výzkumný ústav WSL Lausanne, Švýcarsko

2009 – Univerzita Johna Moore v Liverpoolu, Oddělení půdní biologie

Vědecké konference

- 2005 – Měkkýši, Kvarterní stratigrafie, Změny fauny a dynamika prostředí, Praha
- 2005 – Druhé mezinárodní sympóziium o Coleoid Cephalopods: přítomnost a minulost, Praha
- 2005 – Mezinárodní sympóziium o původu obratlovců, Univerzita Karlova v Praze
- 2005 – Sympóziium kvarterních studií, Brno
- 2006 – Sympóziium kvarterních studií, Brno
- 2006 – Focus On Microscopy, Valencie, Španělsko
- 2007 – Osmý mnohonárodní mikroskopický kongres, Praha
- 2007 – Osmá paleontologická konference, Bratislava
- 2008 – Devátá paleontologická konference, Krakov, Polsko
- 2008 – Evropská mikroskopická konference, Graz, Rakousko
- 2009 – Focus On Microscopy, Krakov, Polsko
- 2009 – Mezinárodní sympóziium o kryténkách, Montbeliard, Francie
- 2010 – IMC 17, Rio de Janeiro, Brazílie
- 2011 – Urbino, Itálie
- 2011 – TERMIS, Granada, Španělsko

Ocenění

- Nejlepší prezentace - Škola kvarterních studií, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita v Brně, 2006
- Diplom za nejlepší prezentaci mladého vědce na konferenci Plant-Microbial Interactions, Krakov, Polsko, 2008
- Stipendium CSMS na konferenci IMC 17, Rio de Janeiro, 2010
- Stipendium EMS na konferenci IMC 17, Rio de Janeiro, 2010
- Stipendium EMS na konferenci v Urbinu, Itálie, 2011

Pedagogická činnost

- Výuka mikropaleontologie, zoo-paleontologie a paleontologie na Ústavu geologie a paleontologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
- Přednášky o mikroskopii na dnech otevřených dveří Fyziologického ústavu Akademie Věd České Republiky

Zvané přednášky

- Workshop současné konfokální mikroskopie v Košicích: Kryténky zkoumané pomocí konfokální a dvoufotonové mikroskopie

13. Curriculum Vitae (English)

Zuzana Burdíková

Home address: Jablůnka 551, 756 23

E-mail: burdikova.zuzana@gmail.com

Born: Vsetín, November 3, 1978

Marital status: married, 1 child

Member of: CSMS, EMS, ISTAR - International Society for Testate Amoeba Research

Specialization

Protozoology

Ecology

Confocal laser scanning microscopy

Two-photon microscopy

SHG Imaging

Education

1998 – 2004 – Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague, study program: teaching of biology and geology for high schools; Master degree: 2004

2002 – 2004 – Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague, study program: biology, specialization: hydrobiology

Currently (From 2004) – Ph.D. studies on the Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague, Doctoral thesis title: “Actuoeecology of Testate Amoebae in the river basin of Vltava”

2006 – Certification: Engineering Hydrobiology, Institute of Environmental Services, Veolia, Prague

Current Position

Ph.D. studies on the Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague, Doctoral thesis title: “Actuoeecology of Testacea in the river basin of Vltava”

2006 - research scientist, Department of Biomathematics, Institute of Physiology, The Academy of Sciences of the Czech Republic

2006 - Center for fluorescence microscopy in biological and medical research

Study stage

2004 – Department of hydrobiology, Aristotle university of Thessaloniki

2005 – Summer school on Quarter studies, Brno

2006 – Dynamic Microscopy, Rudolf-Virchow-Center/DFG Research Center for Experimental Biomedicine, University of Würzburg, Germany

2007 – School of Biophysics in Venice

2008 – Research Unit Ecosystem Boundaries Swiss Federal Research Institute WSL Lausanne, Switzerland

2009 – John Moore University in Liverpool, Department of Soil biology

Scientific Conferences

- 2005, Molluscus, Quarternary Stratigraphy, Faunal Changes and Environmental Dynamics, Prague, 25.-28. 7
- 2005, 2nd International Symposium on Coleoid Cephalopods: Present and Past. Prague, 26.-28. 9.
- 2005, International symposium on the origin of vertebrates, Charles University in Prague
- 2005, Symposium on Quarter Studies, Brno
- 2006, Symposium on Quarter Studies, Brno
- 2006, Focus On Microscopy Conference Valencia
- 2007, 8th Multinational Congress on Microscopy, Prague
- 2007, 8. paleontologická konferencia, Bratislava
- 2008, 9. paleontological conference, Krakow
- 2008, European microscopy conference, Graz
- 2009, Focus on microscopy, Krakow,
- 2009, International Symposium on Testate Amoeba, Montbeliard
- 2010 IMC 17, Rio de Janeiro
- 2011 TERMIS, Granada

Awards:

- The best presentation - Symposium on Quarter Studies, Faculty of Natural Sciences, Masaryk University in Brno, 2006
- Diploma for the best young scientist presentation in conference Plant-Microbial interactions, Krakow, 2008
- Scholarship CSMS Conference IMC 17 in Rio de Janeiro, 2010
- Scholarship EMS Conference IMC 17 in Rio de Janeiro, 2010
- Scholarship EMS Conference in Urbino, 2011

Teaching Experience

Teaching of micropaleontology, zoo-paleontology, and paleontology on the Institute of Geology and Paleontology, Faculty of Natural Sciences, Charles University in Prague, Microscopy

Invited talk:

Workshop Contemporary Confocal Microscopy in Košice: Testate amoebae examined by confocal and two-photon microscopy.

Seznam publikací / Selected publications

1. M. Vohník, Z. Burdíková, J. Albrechtová, M. Vosátka; Testate Amoebae (Arcellinida and Euglyphida) vs. Ericoid Mycorrhizal and DSE Fungi: A Possible Novel Interaction in the Mycorrhizosphere of Ericaceous Plants? *Microbial Ecology* 2009, **57**, 203
2. L. Vachová, O. Chernyavskiy, D. Strachotová, P. Bianchini, Z. Burdíková, I. Ferčíková, L. Kubínová, Z. Pálková; Architecture of developing multicellular yeast colony: spatio-temporal expression of Ato1p ammonium exporter. *Environmental Microbiology* 2009, **11**, 1866

3. E. Filová, Z. Burdíková, M. Rampichová, P. Bianchini, M. Čapek, E. Košťáková, D. Lukáš, E. Amler, L. Kubínová; Analysis and three-dimensional visualization of collagen in artificial scaffolds using nonlinear microscopy techniques. *Journal of Biomedical Optics* 2010, **15**, 066011
4. Z. Burdíková, M. Čapek, P. Ostašov, J. Machač, R. Pelc, E. A. D. Mitchell, L. Kubínová; Testate Amoebae Examined by Confocal and Two-Photon Microscopy: Implications for Taxonomy and Ecophysiology. *Microscopy and Microanalysis* 2010, **16**, 735
5. M. Vohník, Z. Burdíková, A. Vyhnal, O. Koukol; Interactions Between Testate Amoebae and Saprotrophic Microfungi in a Scots Pine Litter Microcosm. *Microbial Ecology* 2011 **61**, 660, DOI 10.1007/s00248-010-9777-4
6. L. Grausová, A. Kromka, Z. Burdíková, A. Eckhardt, J. Vacík, B. Rezek, K. Haenen, V. Lisá, L. Bačáková; Enhanced growth and osteogenic differentiation of human osteoblast-like cells on boron-doped nanocrystalline diamond thin films. *PLoS ONE* 2011, **6**, e20943, DOI 10.1371/journal.pone.0020943
7. Z. Burdíková, M. Čapek, Z. Švindrych, M. Gryndler, L. Kubínová, K. Holcová; Actinocology of Testate Amoebae in the Komořany Pools of the Vltava Basin. *Microbial Ecology* 2012, in print DOI 10.1007/s00248-011-0003-9