

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Charles University in Prague
Faculty of Science
Department of Genetics and Microbiology**

**Doktorský studijní program: Mikrobiologie
Ph.D. study program: Microbiology**



Autoreferát dizertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

**Vegetace na těžebních lokalitách určuje strukturu
půdního mikrobiálního společenstva a průběh půdních procesů**

**Vegetation of post-mining sites determines
soil microbial community structure and soil processes**

Mgr. Michaela Urbanová

Školitel / Supervisor: RNDr. Petr Baldrian, Ph.D.

Prague, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Program: Mikrobiologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Školící pracoviště: Laboratoř environmentální mikrobiologie
Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Autor: Michaela Urbanová

Školitel: RNDr. Petr Baldrian, Ph.D.

S touto dizertační prací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Abstrakt

Cílem této dizertační práce, kterou tvoří čtyři publikované články, bylo popsat vliv vegetace na půdní mikrobiální společenstva a procesy v *de novo* se vyvíjejícím půdním substrátu hnědouhelných výsypek v okolí Sokolova.

Hlušina – půdní jílovitý substrát, který byl postupně vytěžen z povrchového hnědouhelného dolu, rozvrstven na tzv. výsypkách a plánovaně zalesněn vybranými druhy dřevin nebo ponechán samovolnému zarůstání vegetací - mění během času a pod vlivem přítomné vegetace své biotické a abiotické vlastnosti. Ke změnám vlastností hlušínového substrátu dochází jednak růstem kořenového systému rostlin, ale zejména produkcí rostlinné biomasy, která se po odumření rozkládá a stává se součástí půdy, kde tvoří hlavní složku půdní organické hmoty. Proces rozkladu a transformace odumřelých rostlinných materiálů je zejména funkcí aktivity půdních organismů a mezi nimi především mikroorganismů. Navíc je existence řady z nich na přítomnost rostlin úzce vázána, neboť jsou symbionty rostlin či patogeny. Přesné mechanismy vztahů mezi rostlinami a půdními mikroorganismy a jejich rozsah nám stále zůstávají skryty. Experimentální plochy založené na hnědouhelné výsypce, jež jsou homogenní ve všech ostatních parametrech kromě skladby vegetace, dovolují studovat vliv rostlin a výše zmíněné vztahy v přirozeném prostředí.

V této práci byly použity biochemické metody (spektrometrie, chromatografie) pro sledování mikrobiálních procesů a pro sledování chemických změn v průběhu rozkladu rostlinného opadu a molekulárně-biologické metody (16S rDNA taxonomický mikroarray, 454-pyrosequencing) pro sledování změn ve skladbě bakteriálních a houbových společenstev.

Jednotlivé experimenty prokázaly, že typ vegetace podstatně mění chemické vlastnosti půdy, ovlivňuje průběh mikrobiálních procesů a složení mikrobiálních společenstev. Provedené experimenty umožnily kromě popisu vlivu vegetace na mikrobiální procesy v půdě rovněž porovnat efektivitu obou použitých způsobů obnovy ekosystémů a podpořit tvrzení, že rekultivace nemusí být jediným plnohodnotným způsobem proměny hlušínového substrátu v půdní substrát. Výsledky tohoto srovnání ukazují, že přirozená rostlinná sukcese je v případě hnědouhelných výsypek na Sokolovsku vhodnou alternativou k tradičnímu zalesňování.

Úvod

Přes nesporný negativní dopad těžby nerostných surovin na funkci zasažených ekosystémů, představují tyto disturbance jedinečnou příležitost pro studium ekologických procesů a jevů, které bychom jinak mohli studovat jen stěží. K těmto fenoménům patří i vliv vegetace na vývoj půdního prostředí a sukcesní vývoj společenstev mikroorganismů.

Obnova biotických a abiotických vlastností výsypkových substrátů se běžně děje buď plánovaným zalesňováním vybranými druhy dřevin nebo přirozenou rostlinnou sukcesí. Zalesňování je obvyklý způsob obnovy bývalých těžebních lokalit ve střední Evropě (Chodak and Niklinska, 2010; Insam and Domsh, 1988; Mudrák et al., 2010). Do vytěženého materiálu jsou vsazovány sazenice vybraných druhů dřevin a na těchto plochách je pak vývoj půdního substrátu od samého začátku ovlivněn pouze jedním typem vegetace, daným druhem dřeviny. Naopak během přirozené rostlinné sukcese, což je způsob obnovy ve středoevropském regionu daleko méně preferovaný (Prach and Pyšek, 2001; Prach et al., 2013) je půdní substrát ovlivněn postupně v čase nastupujícími a měnícími se rostlinnými společenstvy.

Rostliny výrazně ovlivňují půdní prostředí prorůstáním kořenového systému, ale zejména produkcí rostlinné biomasy, která je v čase rozkládána a transformována pomocí půdních organismů a stává se součástí půdní organické hmoty. Rostliny také ovlivňují teplotní a vodní režim půdy.

Přítomnost rostlin, respektive přítomnost mrtvé organické hmoty rostlinného původu, také pozitivně ovlivňuje výskyt půdních organismů a zejména mikroorganismů, které jsou díky svým schopnostem rozkládat rostlinné biopolymery a žít v úzkém spojení s kořeny rostlin zapojeny do řady biogeochemických procesů, ovlivňují zpětnou vazbou fitness rostlin a tudíž tvoří důležité funkční spojení mezi rostlinami a půdou (Prescott and Grayston, 2013; Wardle et al., 2003). Interakce mikroorganismů a rostlin jsou různě specifické a složité, přímé i nepřímé a naše znalosti o nich jsou stále velmi limitované.

Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy jsou často považovány za faktory rozhodující o struktuře a aktivitě mikrobiálního společenstva a samotný vliv vegetace mimo kořenový systém může být považovaný pouze za doplňující faktor, jehož vliv nebyl dosud s určitostí kvantifikován (Prescott and Grayston, 2013).

Cíle práce a hypotézy

Cílem celé této práce bylo zjistit, do jaké míry vegetace ovlivňuje složení půdních mikrobiálních společenstev a průběh půdních mikrobiálních procesů a zda může být považována za hlavní determinant struktury půdních mikrobiálních společenstev a mikrobiálních procesů.

Cílem první práce bylo popsat změny ve složení půdního bakteriálního společenstva v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti vegetace a v závislosti na vegetačním typu reprezentujícím jednotlivá sukcesní stádia. Abychom mohli srovnat úspěšnost obou procesů obnovy ekosystému, byly v tomto experimentu zahrnuty vedle ploch přirozeně zarůstající vegetací i plochy zalesněné olší.

Cílem druhého experimentu bylo sledovat změny v chemickém složení různých typů opadů během jejich dvouleté dekompozice a identifikovat ty vlastnosti rostlinného opadu, které ovlivňují průběh dekompozice. Dekompozice je proces, ve kterém hrají klíčovou roli půdní mikroorganismy. Současné hypotézy předpokládají, že průběh rozkladu opadu závisí zejména na jeho chemickém složení, které pak ovlivňuje strukturu mikrobiálního společenstva a jeho aktivitu. Obecně se rychleji rozkládá opad s vyšším obsahem živin a dostupných rostlinných biopolymerů a s nízkým obsahem ligninu. Rychlost rozkladu opadu je vyšší na počátku rozkladu díky vysoké koncentraci a lepší dostupnosti živin a může korelovat s vysokou mikrobiální biomasou a vysokou aktivitou extracelulárních enzymů, které jsou zahrnuty v dekompozici.

Cílem třetí a čtvrté práce bylo stanovit, zda má dominantní druh dřeviny rozhodující vliv na mikrobiální procesy spojené s rozkladem mrtvé organické hmoty, vyjádřené jako aktivity extracelulárních enzymů, a na strukturu půdního mikrobiálního společenstva. Hypoteticky lze předpokládat, že rozdíly v aktivitě extracelulárních enzymů a ve skladbě mikrobiálního společenstva jsou výsledkem změn vlastností půdy, která se vyvíjí pod vlivem konkrétní dřeviny a že tyto chemické a fyzikální parametry jsou rozhodující pro složení společenstva mikroorganismů.

Materiály a metody

Vzorky byly odebrány v terénu jako půdní sondy o průměru 45 mm nebo ze sáčků s opadem, které byly umístěny v opadové vrstvě (článek I) nebo byla opadová vrstva oddělena

přímo z odebraného půdního profilu (články III a IV); vzorky byly ihned po odběru převezeny do laboratoře a zde byl materiál dále zpracováván.

V článku I, II a III byla stanovena celková mikrobiální biomasa a její bakteriální a houbová část jako obsah celkových fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) a specifických bakteriálních a houbových PLFA biomarkerů (Elhottová et al., 2006; Frostegard and Baath, 1996). Ve článku II byl stanoven obsah v kyselinách nerozpustných organických zbytků jako celková hmota pevných látek po hydrolýze 72% H₂SO₄ (Kirk and Obst, 1988). Složení sacharidů bylo stanoveno po kyselé metanolýze a analyzováno pomocí plynové chromatografie (Šnajdr et al., 2011). Obsah celulózy byl stanoven z koncentrace glukózy, která byla měřena pomocí plynové chromatografie po kyselé hydrolýze a silylaci (Sundberg et al., 2003). Analýza extrahovaných sloučenin uhlíku, dusíku a fosforu byla prováděna podle Šantrůčkové et al. (2006).

Ve článku II a III byly aktivity extracelulárních enzymů účastnících se rozkladu mrtvé organické hmoty stanovovány spektrofotometricky, dříve popsáno Šnajdrem et al. (2008).

V článku I a IV byla DNA izolována z půdních vzorků s použitím upravené Millerovy metody (Ságová-Marečková et al., 2008) založené na fenol-chloroformové extrakci. Ve článku I, bylo složení bakteriálního společenstva popsáno s použitím taxonomického mikroarraye genu pro 16S rDNA (Kyselková et al., 2009). Pro amplifikaci genu 16S rRNA byly použity univerzální bakteriální primery T7-pA a pH (Bruce et al., 1992). V článku IV, byly použity specifické houbové primery ITS/ITS4 (White et al., 1990) pro amplifikaci ITS1 regionu, 5.8S rDNA a ITS2 regionu houbové ribosomální DNA. Upravené specifické bakteriální primery eub530f/eub1100 (Dowd et al., 2008) byly použity pro amplifikaci V4-V6 regionu 16S rDNA genu (Baldrian et al., 2012). Po dvoukrokové PCR byly přečištěné amplikony pyrosekvenovány na přístroji GS Junior a sekvence amplifikačních produktů byly analyzovány.

Pyrosekvenační data byla zpracovávána pomocí programu SEED navrhovanými postupy standardní analýzy data (Větrovský and Baldrian, 2013), zahrnujícími filtraci kvalitních sekvencí, odstranění chimerických sekvencí, tvorbu klastrů podobnosti (OTU) a identifikaci. Získané sekvence jsou uloženy ve veřejné databázi MG-RAST.

Statistické testy byly ve všech článcích prováděny s použitím softwaru STATISTICA7 (StatSoft). Ve článku IV, byl použit program SEED (Větrovský and Baldrian, 2013) pro předzpracování dat a výpočet diverzity.

Výsledky a diskuze

Tato disertační práce shrnuje výsledky čtyř experimentů sledujících vliv dominantní vegetace na složení mikrobiálních společenstev a mikrobiální procesy ve výsypkovém substrátu. Různé druhy dřevin nebo přirozená sukcesní vegetace byly využity k rehabilitaci biotických a abiotických vlastností tohoto substrátu.

Výsledky této disertační práce dokazují, že změny vlastností půdního substrátu souvisí zejména s přítomností a typem vegetace na daných stanovištích a že vegetace ovlivňuje jak složení mikrobiálních společenstev, tak mikrobiální procesy na těchto místech (článek I, II, III, IV).

V prvním experimentu bylo zjištěno, že přítomnost vegetace a typ vegetace významně ovlivnily množství mikrobiální biomasy a strukturu bakteriálního společenstva. Absence houbové biomasy na plochách bez vegetačního pokryvu a její přítomnost na plochách s různými typy vegetace dokazuje, že přítomnost vegetace je klíčovým prvkem pro výskyt hub v ekosystému. Naopak, bakteriální biomasa byla zjištěna již na plochách bez vegetačního pokryvu. Struktura bakteriálního společenstva se výrazně lišila s ohledem na přítomnost a typ vegetace, na plochách bez vegetačního pokryvu bylo složení bakteriálního společenstva nejvíce nepodobné ostatním společenstvům z ploch ovlivněných rostoucí vegetací. Bakteriální společenstvo z ploch bez vegetačního pokryvu bylo zčásti tvořené autotrofními bakterie ze skupin *Cyanobacteria* a *Rhizobiaceae*, ale také rody *Thiobacillus* a *Acidithiobacillus*. Důležitost bakteriální autotrofie pro vývoj půdního substrátu byla dokumentována na ledovcových předpolích, kde vegetace dlouhodobě chybí v důsledku silného deficitu živin v půdě a kde bakteriální autotrofie a atmosférická depozice tento deficit alespoň částečně eliminují (Fierer et al., 2010; Kastovska et al., 2005; Nemergut et al., 2007; Knelmann et al., 2012).

V další studii byl sledován rozklad různých typů opadu s cílem určit charakteristiky, které ovlivňují dekompozici. Ukázalo se, že rozklad jednotlivých typů opadu úzce souvisí s dostupností živin a obsahem některých polysacharidů, zejména celulózy v opadu. Studované opady se vzájemně lišily zejména pH, obsahem a dostupností živin a dále složením

rostlinných biopolymerů a monosacharidů (tabulka 1, článek II). Odlišnost v chemických charakteristikách jednotlivých typů opadů zůstala zachována po celou dobu rozkladu. Z toho můžeme usuzovat, že půdní organická hmota, která je tvořena transformovaným rostlinným opadem v sobě částečně odráží původní identitu opadu (článek II). S opadem asociovaná mikrobiální biomasa, ani enzymové aktivity nekorelovaly s průběhem rozkladu ani jednoho typu opadu, nejsou tedy vhodnými ukazateli dekompozice.

Vliv dominantního druhu dřeviny na enzymové aktivity byl popsán v článku III. Zjištěné rozdíly v enzymových aktivitách a mikrobiální biomase mezi opadem a půdou na plochách zalesněných různými typy dřevin souvisely, jak se ukázalo, zejména s vlivem konkrétní dominující dřeviny a méně, i když stále podstatně i s chemickými vlastnostmi půdy, které alespoň částečně také pramení z charakteru nadzemní vegetace. Vlastnosti půdy jako pH a vlhkost byly již dříve určeny jako důležitý faktor ovlivňující enzymové aktivity (Baldrian et al., 2008; Štursová and Baldrian, 2011). Nicméně, na našich studovaných plochách byl vliv vlhkosti zanedbatelný pravděpodobně díky vysoké homogenitě půdního substrátu a tudíž nízké proměnlivosti obsahu vody. Nalezená prostorová diferenciací enzymových aktivit a mikrobiální biomasy (enzymové aktivity a mikrobiální biomasa byly vyšší v opadové vrstvě než v půdě) byla v souladu s předchozími studiemi, které odhalily jasný stratifikační trend ve výskytu půdních mikroorganismů jako důsledek klesající dostupnosti živin s hloubkou půdního horizontu (Lindahl et al., 2007).

V článku IV byl vliv dominantního druhu dřeviny na mikrobiální společenstva v opadu a půdě potvrzen výsledky 454-pyrosekvenace. Dominantní dřevina byla nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím skladbu zejména houbových společenstev v celém půdním profilu, zatímco bakterie byly ve srovnání s houbami ovlivněny dominantním druhem dřeviny pouze v opadu a navíc v daleko menší míře. V půdě byl vliv vegetace na bakterie zprostředkován chemickými vlastnostmi půdy, zejména pH a obsahem živin. Vliv půdního pH je znám jako nejdůležitější globální determinant složení bakteriálních společenstev v půdě (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010).

Pozoruhodným objeveným rysem půdních bakteriálních a houbových společenstev byla rozdílná míra specifity výskytu bakterií a hub na jednotlivých zalesněných plochách (článek IV). Zatímco většina bakterií nevykazovala výhradní specifitu výskytu k jednomu druhu dřeviny (téměř 80% bakteriálních taxonů bylo společných pro alespoň 6 různých druhů dřevin), skoro třetina hub nalezených v půdě byly téměř výlučně asociovány pouze s jedním

nebo dvěma druhy stromů. Původně se předpokládalo, že vliv rhizosféry nebude pro složení půdního společenstva bakterií a hub mimo kořenový systém významný. Avšak nalezená vyšší specifická houbových společenstev naznačuje, že efekt rhizosféry se může mimo kořenový systém projevit a že je v případě houbových společenstev do půdy přenesen skrze houbové hyfy prorůstající od kořene dále do prostoru kolem stromu (Buee et al., 2009).

Shrnutí

Tato práce ukazuje, že vegetace významně ovlivňuje vývoj půdního substrátu a jeho biotické a abiotické vlastnosti.

Dále byla v této práci prokázána důležitost bakterií v procesu spontánní sukcese v temperátních zónách. Bakterie převažovaly na plochách bez vegetačního pokryvu tedy v iniciační fázi přirozené sukcese ekosystému. Houby v ekosystému prakticky chyběly až do doby než se objevila vegetace a v půdě se začala akumulovat organická hmota. Detailní prozkoumání odlišného složení bakteriálního společenstva na plochách bez vegetačního pokryvu odhalilo přítomnost autotrofních bakterií. Bakteriální autotrofie je zřejmě způsob překonání období nedostatku živin v půdním substrátu.

Sledováním a porovnáním průběhu dekompozice různých typů opadu se ukázalo, že průběh rozkladu opadu je závislý na jeho počátečním chemickém složení spíše než na množství asociovaných saprotrofních mikroorganismů a jejich aktivitě. Rychlost rozkladu různých typů opadu odpovídala obsahu extrahovatelného C a N a obsahu snadno dostupných rostlinných biopolymerů.

V podrobném srovnání environmentálních faktorů ovlivňujících složení houbových a bakteriálních společenstev a aktivity extracelulárních enzymů jak v opadu, tak v půdě byl determinován vliv dominantního druhu stromu jako faktor nejvíce vysvětlující variabilitu ve složení mikrobiálních společenstev a mikrobiální aktivit. Složení houbového společenstva a aktivity většiny měřených extracelulárních enzymů byly ovlivněny dominantním druhem dřeviny v celém půdním horizontu, zatímco bakterie byly ovlivněny zejména pH substrátu a obsahem živin a vliv vegetace byl patrný pouze spíše v opadu. Dále bylo zjištěno, že výskyt jednotlivých houbových taxonů byl vázán na specifický druh dřeviny a tato specifita nebyla omezená jen na mykorrhizní druhy, ale zahrnovala s druhy saprotrofní.

Celkové srovnání průběhu půdních mikrobiálních procesů a složení mikrobiálních společenstev na plochách procházejících přirozenou sukcesí a plochách zalesněných

neodhalilo žádné výrazné rozdíly ve studovaných aspektech vývoje půdního substrátu s výjimkou míst osázených olší, kde sledované aspekty byly zpravidla vyšší a kde rychlejší vývoj půdního ekosystému souvisel s produkcí opadu s vyšším obsahem dusíku, který vedl ke snížení nedostatku této klíčové živiny v půdě.

Abstract

The aim of this thesis, which consists of four published articles, was to investigate the effect of vegetation on soil microbial communities and processes in de novo developing soil substrate on the brown-coal spoil heaps in the surrounding of city Sokolov.

Spoil material – soil clayey substrate, which had been gradually mined from the opencast brown coal mine, stratified onto spoil heaps and reclaimed by assisted afforestation with selected tree species or left for spontaneous plant succession, changes its biotic and abiotic characteristic in the course of time and particularly under the influence of plants. Changes of spoil substrate characteristics are related to the growth of plant roots and particularly also to the production of plant biomass, which is decomposed gradually and takes part of soil, where participates to soil organic matter. The process of plant dead materials decomposition and transformation is the function of the activity of soil organisms and among them notably soil microorganisms. Moreover, the presence of many of them is closely related to the presence of vegetation, whose symbionts or pathogens are. The exact mechanisms of the plant-microbes interactions and their extent still remain unclear. Experimental plots established at the brown-coal spoil heap, which are homogeneous in all other parameters except the composition of vegetation, allow us to study these relationships in the natural environment.

In this work, biochemical methods (spectrometry, chromatography) were used for the observation of microbial processes and for investigation of chemical changes in the course of litter decay process and further molecular-biological methods (16S rDNA taxonomic microarray, 454-pyrosequencing) were used for the observation of changes in composition of bacterial and fungal communities.

Particular experiments demonstrated that the vegetation type substantially influences the chemical soil characteristics, the course of microbial processes and the composition of microbial communities. Further, the performed experiments enabled to compare the effectivity of both used measures of soil ecosystem restoration and to support the opinion that the technical reclamation is not necessary the only an adequate measure of the rehabilitation of spoil substrate. Results showed, that the natural plant succession is, in the case of brown-coal heaps near Sokolov, an adequate measure of ecosystem restoration and a suitable option to the assisted afforestation.

Introduction

Despite the negative impact of the mineral materials mining on the function of disrupted ecosystems, these disturbances represent a great opportunity to study those ecological processes and phenomena which would be otherwise impossible to study. One of these phenomena are for example, the effect of vegetation on the development of the soil environment or successional processes.

The restoration of biotic and abiotic characteristics of heap materials is carried out either by assisted afforestation with selected tree species or by natural plant succession. The assisted afforestation is the usual measure of the rehabilitation of the mining areas in the Central Europe (Chodak and Niklinska, 2010; Insam and Domsh, 1988; Mudrak et al., 2010). Tree seedlings of the selected tree species are planted into the spoil material and at these areas, the development of soil substrate is under the influence of only one dominant vegetation type from the initial point of the establishment. On the other hand, during the spontaneous plant succession, which is less preferred measure of the restoration of spoil heaps in the Central Europe region (Prach and Pysek, 2001; Prach et al., 2013), the spoil substrate is influenced by the changes of plant communities in time.

Plants greatly affect the soil environment by ingrowth of roots into the soil substrate and by production of biomass which is decomposed and transformed by soil biota in the course of time and incorporated into soil organic matter. Plants also affect soil temperature and water regime.

The presence of vegetation, more exactly of plant materials representing an important source of nutrients positively influences and creates niches for soil biota, notably for microbiota, which are involved in an array of biogeochemical processes through their abilities to decay dead organic matter and to interact with plant roots and thus they create a unique functional link between plants and soil (Prescott and Grayston, 2013; Wardle et al., 2003). The plant-microbe interactions are diverse and show a various specificity, both direct and indirect and their character and extent are still widely unknown.

Physico-chemical characteristics of soil are often considered to be the most important determinants of the structure and activity of microbial communities. The effect of vegetation itself has been so far unjustly considered as an additional factor (Prescott and Grayston, 2013).

Aims and hypothesis

The goal of this thesis was to determine if the vegetation affects the composition of soil microbial communities and the course of microbial processes and further to investigate if the vegetation may be considered as the most important determinant of the structure of microbial communities and microbial processes.

The aim of the first study was to describe the changes in the composition of soil bacterial communities in relation to the presence or absence of vegetation and in term of vegetation type representing individual succession stages. In order to compare the effectivity of both applied measures of ecosystem restoration, both the naturally revegetated plots and also plots afforested with alder trees were involved in this study.

The aim of the second study was to follow the changes in chemical composition of different litter types in the course of their two-year decomposition and to determine those litter characteristics which are responsible for the course of litter decay. Litter decomposition is a process, in which soil microorganisms play a key role. It is supposed, that the litter decay depends on its chemical composition, which also affects the structure of associated microbial community and its activity. Hypothetically, litter with higher nutrient content and higher content of available plant biopolymers and with low content of lignin is decomposed faster. The rate of decomposition should be higher at the beginning of decomposition due to the high nutrients concentration and their better availability and correlate positively with high microbial biomass and activities of extracellular enzymes related to decomposition of organic matter.

The aim of the third and the fourth study was to determine if the dominant tree species have a determinative impact on the microbial processes related to decomposition of dead organic matter – expressed as activities of some extracellular enzymes – and on the composition and diversity of soil microbial communities. Hypothetically, the differences in activities of extracellular enzymes and microbial community composition may result from the differences in soil characteristics that develop under the impact of specific vegetation, most obviously the dominant tree species..

Materials and Methods

Samples were collected as soil cores of 45 mm diameter or gained from litterbags placed into the litter layer (paper I) or litter layer was separated from composed soil samples

(paper III and IV); samples were transported to the laboratory and material was processed immediately.

In paper I, II and III, the total microbial biomass and its bacterial and fungal parts were assessed as the content of total phospholipid fatty acids (PLFAs) and specific bacterial and fungal PLFA biomarkers (Elhottová et al., 2006; Frostegard and Baath, 1996). In paper II, the content of acid-insoluble organic residues was measured as the dry mass of solids after hydrolysis with 72% (w/w) H₂SO₄ (Kirk and Obst, 1988). The carbohydrate composition of hemicelluloses was determined by acid methanolysis, followed by gas chromatography (Šnajdr et al., 2011). The content of cellulose was determined from the concentration of glucose measured by GC after acid hydrolysis and silylation (Sundberg et al., 2003). The analysis of extractable compounds of carbon, nitrogen and phosphorus was conducted as described by Šantrůčková et al. (2006).

In paper II and III, activities of extracellular enzymes related to decomposition were determined spectrophotometrically as previously described by Šnajdr et al. (2008).

In paper I and IV, DNA was isolated from soil samples using modified Miller method (Ságová-Marečková et al., 2008) based on a phenol-chloroform extraction. In paper I, bacterial diversity was assessed using a 16S rRNA gene taxonomic microarray (Kyselková et al., 2009). The universal bacterial primers T7-pA and pH (Bruce et al., 1992) were used to amplify 16S rRNA genes. In paper IV, the fungi-specific primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990) were used to amplify the ITS1 region, the 5.8S ribosomal DNA and the ITS2 region of the fungal ribosomal DNA. The bacteria-specific primers eub530f/eub1100br modified from Dowd et al. (2008) were used to amplify the V4-V6 region 16S rDNA gene (Baldrian et al., 2012). After two-step PCR, the purified amplicons were sequenced on a GS Junior 454-pyrosequencer. Amplified sequences were used for the description of microbial community composition.

The pyrosequencing data were processed using the pipeline SEED with the proposed procedures of standardised data analysis (Větrovský and Baldrian, 2013). Sequences were quality-filtered and trimmed, chimeric sequences were removed and clustered to form operational taxonomic units (OTU). Finally, sequences representing OTU were identified by database searches. The sequence data were deposited in the MG-RAST public database.

Statistical tests were conducted using the software package STATISTICA 7 (StatSoft) in all papers. In paper IV, the pipeline SEED (Větrovský and Baldrian, 2013) was used for data pre-processing and diversity calculations.

Results and Discussion

This PhD thesis summarizes the results of four experiments which examined the effect of dominant vegetation type on the composition of microbial communities and microbial processes in spoil substrates. Different tree species or naturally occurring successive vegetation have been used for the rehabilitation of biotic and abiotic characteristics of this substrate.

Results of this thesis demonstrate that changes in the soil substrate properties are related notably to the dominant vegetation type at these stands, which greatly affects both the microbial community composition and microbial processes at these sites (publication I, II, III, IV).

In the first study, it has been found out that the presence and the type of vegetation substantially affected both the amount of microbial biomass and the structure of bacterial community. The absence of fungal biomass at the plots without vegetation cover and its presence at the plots with different types of vegetation pointed out the key ecological need of fungi in the ecosystem. Contrarily, bacterial biomass was found out both at the plots without vegetation cover and at the plots with different types of vegetation cover. The structure of bacterial communities substantially differed among the sites. Bacterial community at the plots without vegetation cover was the most different from bacterial communities of sites dominated by grass, shrubs or woodland. The substantial part of bacterial community of sites without vegetation cover has been constituted of group of *Cyanobacteria* and *Rhizobizaceae* but also *Thiobacillus* and *Acidithiobacillus* genus. The importance of bacterial autotrophy was documented on glacier forelands, where the vegetation is absent for decades as a consequence of deficit of nutrients in soil substrate and where the bacterial autotrophy and atmospheric deposition eliminate at least partly the nutrient deficit (Fierer et al., 2010; Kastovska et al., 2005; Nemergut et al., 2007; Knelmann et al., 2012).

In the following litterbag experiment, the decomposition of different litter types has been studied with the aim to identify these litter characteristic which determine its decomposition. It was shown, that the decay of different litter types is related to availability of nutrients and

the content of certain plant polysaccharides and monosaccharides. The surveyed litters differed notably in pH, nutrient content and their availability, further composition of plant biopolymers and monosaccharides (Table 1, Paper II). The distinct chemical characteristics of the individual litters remained preserved and kept its specificity throughout the whole course of decomposition. This can indicate that soil organic matter which is mainly composed of decomposed and transformed litter residues still carries the legacy of the identity of original litter (paper II). Neither microbial communities associated with litter nor the activities of extracellular enzymes related to decomposition correlated well with the course of decomposition and they are not probably suitable predictors of decomposition rates.

The effect of dominant tree species on enzyme activities and microbial biomass has been described v paper III. The described differences in enzymatic activities and microbial biomass between litter and soil at the plots afforested with different tree species were notably related to effect of dominant tree species and far less but always significantly to chemical soil properties. Soil properties as pH and moisture were already previously identified as important factors influencing enzyme activities (Baldrian et al, 2008; Štursová and Baldrian, 2011). Nevertheless, at our experimental plots the effect of moisture neglected probably due to the high homogeneity of soil substrate and low variability of water content. Observed spatial stratification of enzyme activities and microbial biomass (microbial biomass and enzymatic activities were observed higher in the litter layer than in bulk soil) were in agreement with the previous studies, which revealed clear pattern of stratification in the abundance of soil microorganisms as a consequence of nutrient availability decrease in deeper layers of soil horizon (Lindahl et al., 2007).

In paper IV, the effect of dominant tree species on microbial communities in litter and bulk soil was confirmed by results of 454-pyrosequencing. The dominant tree species was the most important factor which significantly affected the composition of both fungal and bacterial communities in litter as well as soil. Compared to fungi, bacterial communities were less affected by dominant tree species and in soil, the effect of vegetation on bacteria was likely mediated by chemical soil properties, namely by pH and nutrient content. The effect of soil pH is known as the most important determinant of soil bacterial community structure worldwide (Fierer and Jackson, 2006; Lauber et al., 2009; Rousk et al., 2010).

There were also remarkable differences in the specificity of association of the litter and soil bacterial and fungal communities with dominant trees (paper IV). While most bacterial OTU

occurred under multiple trees (almost 80% of bacterial taxa were common for at least 6 tree species), almost one third of fungi were exclusively associated with only one or two tree species. Originally, it was supposed that the effect of the rhizosphere can not be considered as significant for the composition of the bacterial and fungal communities in our study due to the sampling of bulk soil. However, the results suggest that the effect of plant roots and rhizospheres possibly extends into the bulk soil due to its connection with plant roots via fungal hyphae (Buee et al., 2009).

Conclusions

This study shows that vegetation substantially affects the soil substrate development and its soil biotic and abiotic properties.

Further in this work, the importance of bacteria in the process of spontaneous succession in temperate zones has been demonstrated. Bacteria dominated the initial stage of ecosystem succession on barren, non-vegetated grounds. Fungi were virtually absent in the ecosystem since the establishment of vegetation and organic matter was delivered into soil. The more detailed investigation of bacterial community composition revealed the presence of autotrophic bacteria. This may suggest that bacterial autotrophic fixation of nutrients is important for this stage of substrate development.

We have also demonstrated by comparison of decomposition of various litter types, that the course of litter decay depends on the initial chemical composition of plant tissues rather than on the amount of microbial biomass or its microbial activity. The rate of decomposition of various litter types correspond with the contents of extracted C and N and on the content of easily available plant biopolymers.

In a detailed comparative study of the environmental factors influencing the fungal and bacterial communities and extracellular enzyme activities in litter and soil, the tree effect has been revealed as their best predictor of variability of composition of microbial communities and microbial activities. The composition of fungal communities and activities of most enzymes were more affected by dominant tree species both in litter and the bulk soil than bacterial communities. Bacteria were influenced by substrate pH and nutrient content and the tree effect was lower than in fungi and more observable in the litter. Moreover, fungi were also strongly tree species-specific and the observed specificity was not limited only to root-symbiotic fungal taxa, but included also saprotrophs.

Finally, the overall comparison of the course of the soil microbial processes and the composition of microbial communities developed at spontaneously revegetated sites and afforested sites did not reveal any substantial differences in examined aspects of soil substrate development except the sites revegetated with alder, where the examined aspects were usually higher and where the faster development of soil ecosystem was related to the production of nitrogen-rich litter, which let alone to the decrease of deficit of this crucial soil nutrient.

Použitá literatura / References

- Baldrian, P., Trogl, J., Frouz, J., Snajdr, J., Valaskova, V., Merhautova, V., Cajthaml, T., Herinkova, J., 2008. Enzyme activities and microbial biomass in topsoil layer during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2107-2115.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Žifčáková, L., Šnajdr, J., Rídl, J., Vlček, C., Voříšková, J., 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME Journal* 6, 248-258.
- Bruce KD, Hiorns WD, Hobman JL, Osborn AM, Strike P & Ritchie DA (1992) Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chainreaction. *Appl Environ Microb* 58: 3413–3416.
- Buee, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E., 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321, 189-212.
- Chodak, M., Niklinska, M., 2010. The effect of different tree species on the chemical and microbial properties of reclaimed mine soils. *Biology and Fertility of Soils* 46, 555-566.
- Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeethan, T., Hagevoort, R., 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol* 8: 125.
- Elhottová, D., Křišťůfek, V., Frouz, J., Nováková, A., Chroňáková, A., 2006. Screening for microbial markers in Miocene sediment exposed during open-cast brown coal mining. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 89, 459-463.
- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 626-631.
- Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., Craine, J.M., 2010. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in Microbiology* 161, 635-642.
- Frostegard, A., Baath., E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fert Soils* 22: 59–65.
- Insam, H., Domsch, K.H., 1988. Relationship between soil organic-carbon and microbial biomass on chronosequence of reclamation sites. *Microbial Ecology* 15, 177-188.
- Kastovská, K., Elster, J., Štibal, M., Šantrůčková, H., 2005. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (high Arctic). *Microbial Ecology* 50, 396-407.
- Kirk, T. K., Obst, J.R., 1988. Lignin determination. *Meth Enzymol* 161:87–101.
- Kyselková, M., Kopecký, J., Frapolli, M., Defago, G., Ságová-Marečková, M., Grundmann, G. L., Moenne-Loccoz, Y., 2009. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *ISME J* 3: 1127–1138.

- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5111-5120.
- Lindahl, B.D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S.E., Hogberg, P., Stenlid, J., Finlay, R.D., 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173, 611-620.
- Mudrak, O., Frouz, J., Velichova, V., 2010. Understory vegetation in reclaimed and unreclaimed post-mining forest stands. *Ecological Engineering* 36, 783-790.
- Nemergut, D.R., Anderson, S.P., Cleveland, C.C., Martin, A.P., Miller, A.E., Seimon, A., Schmidt, S.K., 2007. Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial Ecology* 53, 110-122.
- Prach, K., Lencova, K., Řehounekova, K., Dvořakova, H., Jirova, A., Konvalinkova, P., Mudrak, O., Novak, J., Trnkova, R., 2013. Spontaneous vegetation succession at different central European mining sites: a comparison across seres. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 7680-7685.
- Prach, K., Pyšek, P., 2001. Using spontaneous succession for restoration of human-disturbed habitats: Experience from Central Europe. *Ecological Engineering* 17, 55-62.
- Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2013. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* 309, 19-27.
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *Isme Journal* 4, 1340-1351.
- Sagova-Marečkova, M., Čermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., Kopecky, J., 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microb* 74: 2902–2907.
- Sundberg, A., Pranovich, A.V., Holmbom, B., 2003. Chemical characterization of various types of mechanical pulp fines. *J Pulp Paper Sci* 29: 173–178.
- Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valaškova, V., Merhautova, V., Petrankova, M., Špetz, P., Leppanen, K., Baldrian, P., 2011. Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiol Ecol* 75:291–303
- Štursova, M., Baldrian, P., 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transformint enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil* 338, 99-110.
- Vetrovsky, T., Baldrian, P., 2013. Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biology and Fertility of Soils* 49, 1027-1037.

Wardle, D.A., Yeates, G.W., Williamson, W., Bonner, K.I., 2003. The response of a three trophic level soil food web to the identity and diversity of plant species and functional groups. *Oikos* 102, 45-56.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: Inniss, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322.

Životopis/ Curriculum Vitae

Narozena / Born 20. 10. 1982, Zábřeh na Moravě, Česká Republika

October 20, 1982; Zabreh na Morave, Czech Republic

Vzdělání / Education

od / since 2008 postgraduální studium, Katedra genetiky a mikrobiologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Ph.D. study, Department of Genetics and Microbiology, Charles University in Prague, Faculty of Science

2002 – 2007 magisterské studium, Katedra genetiky a mikrobiologie, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

MSc. Study, Department of Genetics and Microbiology, Charles University in Prague, Faculty of Science

Granty / Grants

Účast na grantových projektech podpořených Grantovou agenturou České republiky - P504/12/1288 „Úloha funkčních vlastností listů rostlin při akumulaci půdní organické hmoty během primární sukcese“ a 13-06763S „Houby v lesních půdách a opadu: biogeografie a ekologie v regionálním měřítku“ a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR - LC06066 „Centrum environmentální mikrobiologie“ a LD12050 “ Analýza environmentálních metagenomů metodami next-generation-sequencing a vývoj postupů pro analýzu dat“.

This work was financially supported by the Czech Science Foundation - P504/12/1288 “The role of leaf functional traits in soil organic matter accumulation during primary succession“ and 13-06763S “Fungi in forest soil and litter: biogeography and ecology at a regional scale” and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic -LC06066 “Centre for Environmental Microbiology” and LD12050 “Analysis of environmental metagenomes using next-generation-sequencing and development of data analysis procedures”.

Stáže / Experiences

- 2009 vědecká stáž v Nizozemském institutu ekologie, Wageningen, Nizozemí
scientific stay at the Netherlands Institute of Ecology, Wageningen, The Netherlands
- 2010 vědecká stáž na univerzitě v Cardifu, Wales, UK
scientific stay in University of Cardiff, Wales, UK
- 2012 – 2013 Erasmus program na Vídeňské univerzitě, Rakousko
Erasmus program, University of Vienna, Austria

Seznam zařazených publikací / List of publications representing the thesis

Paper I

Urbanová, M., Šnajdr, J., Brabcová, V., Merhautová, V., Dobiášová, P., Cajthaml, T., Vaněk, D., Frouz, J., Šantrůčková, H., Baldrian, P. (2014) Litter decomposition along a primary post-mining chronosequence. *Biology and Fertility of Soils* 50: 827-837. IF₂₀₁₃ = 3.396

Paper II

Urbanová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Ságová-Marečková, M., Elhottová, D., Kyselková, M., Moëgne-Loccoz, Y., Baldrian, P. (2011) Development of bacterial community during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 59-69. IF₂₀₁₃ = 3.875

Paper III

Šnajdr, J., Dobiášová, P., Urbanová, M., Petránková, M., Cajthaml, T., Frouz, J., Baldrian, P. (2013) Dominant trees affect microbial community composition and activity in post-mining afforested soils. *Soil Biology and Biochemistry* 56: 105-115. IF₂₀₁₃ = 4.410

Paper IV

Urbanová, M., Šnajdr, J., Baldrian, P. (2015) Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biology and Biochemistry* 84: 53 – 64. IF₂₀₁₄ = 4.410

Konferenceční příspěvky / Conference presentations

Urbanová M., Kopecký J., Marečková M., Kyselková M., Elhottová D.: Development of bacterial community composition in the topsoil during spontaneous succession on mine deposits. BAGECO 10 – Bacterial Genetics and Ecology, Uppsala, June 15-19, 2009, Book of Abstracts, p. 347.

Urbanová M., Valášková V., Šnajdr J., Baldrian P.: Monitoring of litter decomposition, enzymes activities and microbial community in a primary succession chronosequence on brown coal mine deposits. FEMS 2009 – 3rd Congress of European Microbiologists, Gothenburg, June 28-July 2, 2009, Abstracts CD, p. 852.

Urbanová M., Valášková V., Šnajdr J., Cajthaml T., Baldrian P.: The role of saprotrophic fungi in the decomposition of litter on the primary succession sites of brown coal mine deposits near Sokolov. Česko-slovenská vědecká mykologická konference, Brno, September 27-29, 2009. Book of Abstracts, p. 59.

Urbanová M., Kopecký J., Valášková V., Kyselková M., Elhottová D., Baldrian P.: Development of bacterial communities during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. 13th International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, August 22-27, 2010, PS.06.106.

Urbanová M., Kopecký J., Valášková V., Kyselková M., Elhottová D., Baldrian P.: Monitoring of the succession of bacterial communities along chronosequence of spoil heaps after brown coal mining. 25. Kongres Československej Spoločnosti Mikrobiologickej, Stará Lesná, September 15-18, 2010, Sborník abstraktů, p. 65.

Urbanová M., Kopecký J., Valášková V., Kyselková M., Elhottová D., Baldrian P.: Characterization of bacterial communities during primary succession on spoil deposit sites after brown coal mining in Czech Republic. Structure and Processes of the Initial Ecosystem Development, Cottbus, September 20-24, 2010, Conference Programme, p. 3.

Urbanová M., Šnajdr J., Valášková V., Cajthaml T., Baldrian P.: Structure and function of fungal communities during litter decomposition at the primary succession sites on brown coal

mine deposits. 9th International Mycological Congress, Edinburgh, August 1-6, 2010, Delegate CD, P2.97.

Urbanová M., Baldrian P.: Sukcese hub a bakterií na výsypkách a vliv vegetace na vývoj mikrobiálních komunit, 3. konference České společnosti pro ekologii, Kostelec nad Černými Lesy, October 21-23, 2011, Book of Abstracts p. 38.

Urbanová M., Kopecký J., Valášková V., Marečková M., Elhottová D., Kyselková M., Baldrian P.: Bacterial communities in topsoil during spontaneous succession in spoil heaps after brown coal mining, Ecology of Soil Microorganisms, Prague, April 27 - May 1, 2011, Book of Abstracts, p. 216.

Urbanová M., Žifčáková L., Štursová M., Baldrian P.: Seasonal differences in microbial community composition in mountainous *Picea abies* forests revealed by metagenomics, 4th International Conference on Polar and Alpine Microbiology, Ljubljana, September 4-8, 2011, Book of Abstracts p. 149.

Urbanová M., Šnajdr J., Baldrian P.: The effect of seven different vegetation types on the composition of the litter and soil microbial community. 14th International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, August 19-24, 2012, PS.16.217B.

Urbanová M., Šnajdr J., Baldrian P.: Bacterial and fungal communities on seven different litter types: What determines their composition. INTECOL 2013, London, August 18-23, 2013, Abstracts.

Urbanová M., Šnajdr J., Baldrian P.: Vegetation as an important determinant of the composition of fungal and bacterial communities. 15th International Symposium on Microbial Ecology, Seoul, August 24-29, 2014, Book of Abstracts PS 362B.