

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Extracelulární fosfatasy bakterií ve vodním prostředí

Jaroslav Krafl

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Nedoma, CSc.

České Budějovice, duben 2010

Krafl J. (2010): Extracelulární fosfatasy bakterií ve vodním prostředí.

[Extracellular phosphatases of bacteria in the water environment. Bachelor thesis] 58 pp.,
Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce na základě literární rešerše popisuje současné znalosti o extracelulárních fosfatasách bakterií vodního prostředí a zhodnocuje metody jejich stanovení.

Annotation:

Based on the literature review, this work describes recent knowledge about extracellular phosphatases of bacteria in the water environment and evaluates methods of their determination.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury.

V souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené elektronické podobě ve veřejné části databáze STAG na internetových stránkách Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

V Českých Budějovicích 29. dubna 2010

Jaroslav Krafl

Poděkování:

Chtěl bych upřímně poděkovat mému školiteli RNDr. Jiřímu Nedomovi, CSc. za pomoc, cenné rady, laskavý přístup a zejména za bezmeznou trpělivost a čas, které věnoval mě a vedení mé práce.

Obsah

1. Úvod a cíle práce	7
2. Vodní bakterie a jejich postavení v toku látek	8
3. Postavení vodních bakterií v cyklu fosforu	11
4. Extracelulární fosfatasy	13
4.1. Definice fosfatasy	14
4.2. Lokalizace fosfatasy	15
4.3. Fosfatasy a vlivy prostředí, regulace	16
4.4. Fosfatasová aktivita u fytoplanktonu	17
4.5. Fosfatasová aktivita u bakterií.....	21
4.5.1. Aktivita u bakterií v aktivovaných kalech.....	21
4.5.2. Aktivita u sladkovodního bakterioplanktonu	22
5. Metody měření	25
5.1. Princip měření a substráty	25
5.1.1. Enzyme–Labelled Fluorescence / Fluorescently Labelled Enzyme Activity.....	27
5.1.2. Kombinace použití FLEA s dalšími metodami	30
5.1.3. Srovnání ELFP a MUFP substrátů	35
6. Vlastní pokusy	37
6.1. Lokalita, odběr vzorků	37
6.2. Stanovení mikroskopických počtů bakterií a měření fluorescence ELFA	37
7. Diskuse	43
8. Závěr.....	48
9. Citovaná literatura	49

1. Úvod a cíle práce

Bakterie jsou podrobovány stálé selekci vlivem fyzikálních a chemických faktorů a jejich výskyt ve vodním prostředí je ovlivněn především schopností adaptace (Kopřivík 1982). Heterotrofní bakterie patří ve vodním prostředí mezi nejvýznamnější degradační a transformační činitele, které se svou metabolickou aktivitou podílejí na rozkladu a mineralizaci organické hmoty a významně tak přispívají ke koloběhu biogenních prvků (Mlejnková 2000). Pelagické heterotrofní bakterie hrají zásadní roli ve vodních ekosystémech jako regulátoři koloběhu uhlíku a důležitých živin jako například fosforu a dusíku (Carlsson & Caron 2001) a při regeneraci organické hmoty z detritu do živé biomasy nebo její remineralizací zpět na anorganické sloučeniny (Azam et al. 1983, Ducklow & Carlsson 1992, Shiah & Ducklow 1994) a jsou největšími konzumenty rozpuštěné organické hmoty v planktonu (Carlsson & Caron 2001).

Bakteriální růst a biomasa ve vodních ekosystémech jsou ovlivňovány řadou fyzikálních omezení, jako například teplotou (Shiah & Ducklow 1994), stejně tak jako i top-down faktory - predací (Caron 1991), bottom-up faktory, jako je dostupnost substrátů – organické a anorganické živiny – (Cole et al. 1988, Rivkin & Anderson 1997) a virovými infekcemi (Proctor & Fuhrman 1992, Fuhrman & Noble 1995, Pace & Cole 1996).

Mezi těmito faktory je limitace živinami relativně málo prozkoumaná. Bakterie jsou známy tím, že jsou oproti primárním producentům lepšími konkurenty nejen v příjmu rozpuštěného anorganického fosforu (P_i), ale experimenty prokázaly že i dusičnanových a amonných iontů za podmínek limitace živinami (Currie & Kalff 1984, Bratbak & Thingstad 1985, Suttle et al. 1990). Doposud bylo zjištěno, že jejich růst může být limitován dostupností fosforu (Elser et al. 1995, Carlsson & Caron 2001).

Tato práce se formou literární rešerše a experimentální části zabývá problematikou extracelulárních fosfatas. Cílem práce je (i) kritické zhodnocení metod měření fosfatasové aktivity a (ii) seznámení se s metodou FLEA v praxi při vyhodnocení vzorků bakterioplanktonu z Čertova jezera.

2. Vodní bakterie a jejich postavení v toku látek

Bakterie potřebují zdroj uhlíku pro syntézu aminokyselin, organických bází, sacharidů, lipidů a jiných nízkomolekulárních látek, potřebných k tvorbě makromolekul. Z fyzikálně chemických vlastností látek přicházejících v úvahu jako zdroje uhlíku pro bakterie je určující pro dostupnost zejména velikost molekul, rozpustnost, stupeň okysličení atomů uhlíku a prostorová konfigurace (Rosypal et al. 1981). Organický uhlík byl tradičně považován za hlavní faktor limitující růst heterotrofních bakterií pelagického prostředí, ale řada autorů již ukázala, že bakteriální růst ve vodních ekosystémech může být limitován dostupností dusíku a fosforu spíše než nedostatkem uhlíku (Morris & Lewis 1992, Elser et al. 1995, Pomeroy et al. 1995). Z Čertova jezera popisuje Nedoma et al. (2003a), že jsou bakterie spíše závislé na allochtonním uhlíku než na fytoplanktonních exudátech, protože tyto pokryjí pouze malou část požadavků bakterií na uhlík.

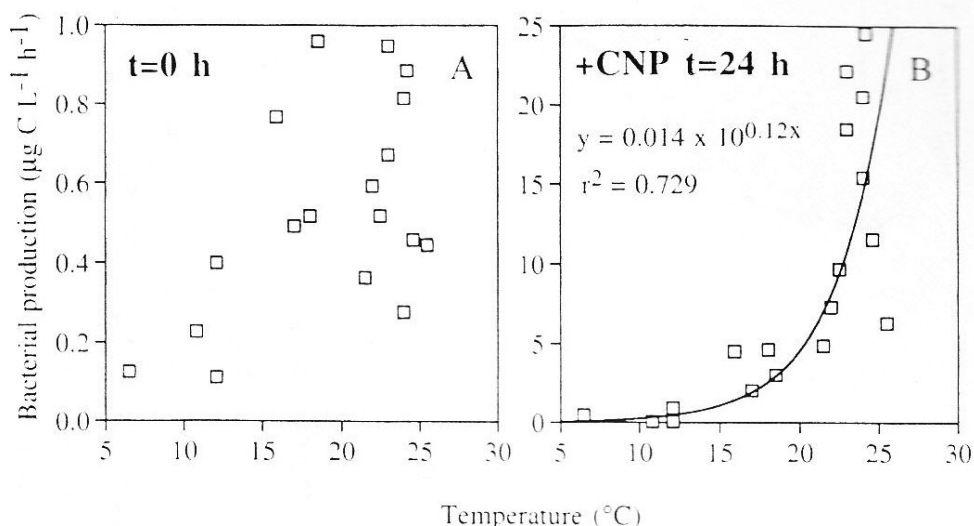
Bakterie si udržují nízké (ve srovnání s většinou eukaryotických organismů) poměry C : N a C : P a zřejmě mají omezenou schopnost ke změně své stechiometrie (Redfield et al. 1963, Goldmann et al. 1987, Caron 1991); tudíž požadavky bakterií na dusík a fosfor jsou vzhledem k požadavkům na uhlík poměrně vysoké a deficit těchto živin v organických substrátech využitých bakteriemi k růstu může vést k jeho limitaci (Carlsson & Caron 2001).

V jezerech temperátní zóny nastává limitace fosforem většinou během průběhu období rozvoje fytoplanktonu, kdy koncentrace P_i většinou klesá k nepatrným koncentracím (nanomolárním či subnanomolárním) (Hudson et al. 2000). Za těchto podmínek představuje rozpuštěný organický fosfor (P_{org}) alternativní zdroj fosforu, který není pro buňky přímo dostupný (Hernández et al. 1996) a musí být nejprve hydrolyzován extracelulárními fosfatasami na alkoholy a ortofosfát (Jansson et al. 1988).

Fosfor může být limitujícím prvkem nejen v oligotrofních jezerech, ale také v mezotrofních a eutrofních vodách. Během jarního či letního píku fytoplanktonu je velice malá část z celkového množství fosforu v prostředí ve formě ortofosfátu. Navzdory tomu, mnohé druhy fytoplanktonu jsou schopny dobře růst i za těchto deficitních podmínek (Rengefors et al. 2001). Carlsson & Caron (2001) se zabývali otázkou limitace živinami u sladkovodního bakterioplanktonu a neobjevili během své studie, oproti všeobecně vžitému názoru, žádný důkaz o limitaci bakteriálního růstu dusíkem. Organický uhlík byl kolimitující. Experimenty ukázaly, že fosfor byl hlavním faktorem limitujícím bakteriální růst během velké části léta. Prudký nárůst bakteriální abundance a produkce proteinů nastal při přidání fosforečných iontů a glukosy. Do designu experimentů vložili i vliv teploty na

bakteriální produkci a došli ke zjištění, že teplota nad 12°C nebyla důležitým určujícím činitelem co se týče bakteriální produkce. Avšak teploty pod 12°C utlumovaly efekt přidavku živin na rychlost produkce, kdy na přidavek libovolných kombinací glukosy, amonných a fosforečnanových iontů do prostředí nenastal jako odezva žádný významný nárůst bakteriální produkce.

Obdobně Ochs et al. (1995) zjistili, že bakteriální produkce a růstové rychlosti v epilimniu oligotrofního jezera nesouvisí s teplotou nad 14°C. Scavia & Laird (1987) a Hoch & Kirchman (1993) vypořizovali u jimi sledovaných bakterií korelaci růstové rychlosti s teplotou za podmínek, že teplota byla pod deseti až dvanácti stupni Celsia, ale při teplotách nad 10–12°C nezjistili žádnou korelaci.



Obr. 1 Vztah mezi bakteriální produkcí a teplotou. Graf A ukazuje hodnoty vzorku bezprostředně po odběru (slabá korelace; $P = 0,09$, F -test). Graf B ukazuje exponenciální růst produkce ($P = 0,0001$, F -test) po přidání všech tří živin (org.uhlík, amonné a fosforečnanové ionty) a 24hodinové inkubaci vzorku. Obdobné chování bakterií za neomezených zásob substrátů mimo jiné experimentálně prokázali i Topiwala & Sinclair (1971) (převzato z Carlsson & Caron 2001).

Odezva společenstva bakterioplanktonu na přidání organického uhlíku a anorganických živin naznačila, že ačkoliv byl fosfor hlavním prvkem limitujícím bakteriální růst, mnoho sledovaných vzorků bylo blízko podmínkám kolimitace dostupností

organickým uhlíkem. Nárůst bakteriální produkce při pokusech s přidavkem P_i iontů byl skrovný ve srovnání s nárůsty produkce pozorovaným při společném přidání fosforečnanových iontů a glukosy (Carlsson & Caron 2001).

González-Gil et al. (1998) zjistili, že kultury řas rostoucí v médiích bohatých na živiny organického či anorganického fosfátu dosáhly stacionární fáze při relativně vysoké úrovni biomasy, přičemž došlo s největší pravděpodobností k limitaci uhlíkem (Anderson et al. 1990), zatímco nejnižší úroveň biomasy byla pozorována při kultivaci v médiích obou typů chudých na obsah fosfátů, což bylo doprovázeno nárůstem fosfatasové aktivity. Vlivem limitace ortofosfátem hydrolyzují řasy okolní organické fosfáty pomocí extracelulárních fosfatas (Fitzgerald & Nelson 1966) a transportují takto uvolněný ortofosfát do svých buněk (Hernández et al. 1996).

Koloběh dusíku je ve srovnání s koloběhy ostatních minerálních prvků podstatně komplikovanější a variabilnější. Zahrnuje největší množství přeměn, na nichž se zúčastňují různé mikroorganismy, často úzce specializované na určitý typ přeměny (Úlehlová 1989). Dusík uložený zvláště v aminových skupinách proteinů je přeměňován deaminací na amoniak, který je však v aerobní zóně poměrně rychle oxidován na dusičnany. Fixace N_2 probíhá v tomto prostředí poměrně rychle a rychlost fixace je závislá na množství světla a koncentraci organické hmoty (jako zdrojů energie). Za určitých podmínek však fixace N_2 může být inhibována vyššími koncentracemi NH_4^+ (Němec & Horáková 2002).

3. Postavení vodních bakterií v cyklu fosforu

Po mnoho let byla role fosforu jako limitující živiny pro fytoplankton zdrojem polemik (González-Gil et al. 1998). Funkce pelagických heterotrofních bakterií v regulaci koloběhu fosfátu zůstává neobjasněna a málo je známo o jejich roli v systémech limitovaných fosforem (Nedoma & Vrba 2006). Mnoho badatelů věří, že je fosfor hlavní limitující živinou ve sladkovodních ekosystémech (Berman 1970, Wynne 1977, Healey & Hendzel 1980), ale pro mořské ekosystémy je tradičně uvažován dusík (Thomas 1970, Goldman et al. 1979). Role fytoplanktonu a bakterioplanktonu v regeneraci a příjmu fosforu se zdá souviset s trofickou úrovní jezer (Vrba et al. 1995). Ve studii González-Gil et al. (1998) pokusně zjistili, že kultury s menším obsahem fosforu v médiu (díky němuž se buňky řas ocitly v deficitu), měly nižší biomasu než kultury s dostatkem dostupného prvku.

Bakterie mají v buňkách poněkud vyšší podíl P než většina vyšších organismů, proto je významné, jaký podíl zásoby fosforu ve vodě je uložen v bakteriálních buňkách a jak rychle se uvolňuje a vrací do koloběhu (Straškrabová et al. 1996). Velké množství fosforu je obsaženo v neživém organickém materiálu s polymerickými strukturami a tudíž není bakteriím, řasám a houbám snadno dostupný (Štrojsová 2001). Málo je známo o procesech či mikrobiálních populacích, které depolymerizují organické sloučeniny fosforu s vysokou molekulovou hmotností v odpadních vodách nebo o těch, které hydrolyzují fosfomonoestery na organické monomery a P_i . Produkty degradace detritického organického fosforu jsou snadno přijímány a metabolizovány bakteriálními buňkami (Van Ommen Kloeke & Geesey 1999).

Zatímco byla značná pozornost věnována identifikaci populací bakterií, které akumulují poly- P_i , bylo malé úsilí věnováno mikrobiálnímu průběhu zpracování detritového organického fosforu či regeneraci fosforu (Van Ommen Kloeke & Geesey 1999). Regenerace fosforu byla definována jako hydrolyza P_i z organických či dalších komplexních sloučenin fosforu, rozpuštěných či partikulovaných, u nichž je hydrolyzovaný P_i uvolněn mimo buňku (Ammerman & Azam 1985).

Po období jarního maxima fytoplanktonu se významné množství fosforu ocitne mimo míchanou vrstvu, což může snížit jeho dostupnost pro bakterioplankton ve sladkovodních ekosystémech (Birch & Spyridakis 1981). Ukázalo se, že bakterie jsou lepšími konkurenty v boji o ortofosfát za podmínek jeho extrémně nízké koncentrace, zatímco řasy jsou schopny využít účinněji ortofosfát během jeho dočasně zvýšené koncentrace a mohou tedy růst díky využití naakumulovaného fosforu i během období jeho nedostatku (Cotner & Wetzel 1992). Udávaná koncentrace fosfátu, která stačí k uspokojení nutričních potřeb bakterioplanktonu je

0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Curie & Kalff 1984, Chróst & Overbeck 1987, Cotner & Wetzel 1992, Thingstad et al. 1993). Nicméně laboratorní studie naznačují, že mnoho druhů je schopných získávat fosfor z esterů za účelem udržení růstu během nedostatku ortofosfátu (Jackson & Williams 1985, Cotner & Wetzel 1992).

4. Extracelulární fosfatasy

Protože bakterie mají rigidní stěnu propustnou nanejvýš pro nízcce komplexní organické látky, je výživa všech bakterií osmotrofního typu. Makromolekulární látky mohou tedy bakterie metabolicky zužitkovat jen po jejich extracelulární degradaci na menší štěpy hydrolytickými extracelulárními enzymy vylučovanými do prostředí (Emberger et al. 1979). Adaptace na růst při nízkých koncentracích nutně vyžaduje dostatečné množství enzymů, transportujících substrát do buňky, s vysokou afinitou k substrátu (tj. s nízkou saturační konstantou K_m podle kinetické rovnice Michaelis-Mentenové). To je obvykle spojeno s nižší maximální rychlostí příjmu substrátu (V_m) a nižší maximální specifickou růstovou rychlostí (μ_{max}) (Straškrabová et al. 1996).

Intracelulární enzymy, kterých je většina, zůstávají uvnitř buňky, ve které vznikly a tam vykonávají své specifické funkce. Fungují buď v rozpuštěné formě nebo vázané v různých biologických strukturách. Většinou mají specifickou lokalizaci (Vodrážka et al. 1991). Podle podmínek, za kterých bakterie tvoří enzymy, rozeznáváme enzymy konstitutivní a adaptivní, které produkují jen za přítomnosti substrátu, který specificky mění. Množství všech enzymů, zejména enzymů adaptivních, je přitom řízeno několika mechanismy, spočívajícími jednak v indukci nebo represi jejich produkce, jednak v jejich aktivaci nebo inaktivaci (Emberger et al. 1979). Dostatek nízkomolekulárních látek v prostředí působí na produkci většiny ektoenzymů represivně (katabolická represe). Poklesne-li koncentrace nízkomolekulárních látek pod určitou kritickou mez, dojde k derepresi, tj. k odblokování tvorby ektoenzymů. Využitím represivní strategie pro syntézu ektoenzymů mohou mikroorganismy zabránit zbytečné produkci induktivních enzymů, které nejsou nutné, pokud růst mikroorganismů není limitován zdroji uhlíku, dusíku nebo fosforu. Aktivita ektoenzymů může být výrazně snížena v přítomnosti inhibitorů. Zatímco kompetitivní inhibitory soupeří se substrátem o vazebné místo enzymu, nekompetitivní inhibitory obvykle poškozují enzym na jiném místě (Straškrabová et al. 1996). Dereprese fosfatas byla zjištěna u vodních bakterií po přidání glukosa-6-fosfátu a ATP do jejich prostředí (Chróst 1991).

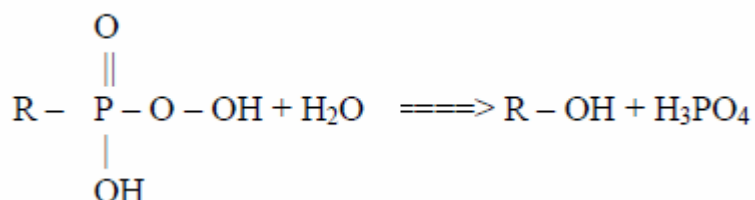
Mnohé polymery nejsou ve vodě přítomny trvale, takže trvalá produkce všech hydrolas je pro mikroorganismy nevýhodná. Účinná indukce ektoenzymů je komplikovanější než indukce intracelulárních enzymů. Jednak jsou molekuly polymerů příliš velké na to, aby mohly proniknout do buňky a sloužit jako induktor, jednak mikroorganismus musí být schopen monitorovat aktivitu ektoenzymu vně buňky. K tomu slouží vylučování malého množství konstitutivního ektoenzymu. Pokud je v okolí buňky přítomen substrát, je

hydrolyzován tímto konstitutivním ektoenzymem, nahromaděný produkt vstupuje do buňky a indukuje další tvorbu ektoenzymu (Straškrabová et al. 1996).

V případě nedostatku některé esenciální sloučeniny nebo prvku mobilizuje buňka jednak vnitřní rezervy, jednak intenzifikuje aktivní procesy získávání nedostatkového substrátu z prostředí. Při limitaci fosforem dochází na povrchu buňky ke zmnožení míst pro aktivní transport P přes buněčnou membránu a k indukci extracelulárních fosfatů, které zpřístupňují organicky vázaný P v prostředí (Straškrabová et al. 1996).

4.1. Definice fosfatů

Fosfatasy jsou hydrolytické enzymy, které štěpí estery kyseliny fosforečné (fosfolipidy, fosfoproteiny apod.). Jsou hojně zastoupeny v prokaryotických i eukaryotických buňkách, kde jsou součástí regulačních a syntetických procesů (Horáková & Němec 2003). Podle mezinárodní nomenklatury enzymů patří fosfatasy do třetí hlavní třídy enzymů, tedy mezi hydrolasy a do první podtřídy, ve které jsou hydrolasy katalyzující štěpení esterových vazeb. Jsou označeny kódem EC 3.1. Podle vztahu k substrátu lze fosfatasy rozdělit do dvou základních skupin: 1) specifické pro jeden typ substrátu (např. adenosintrifosfatasy, hexosodifosfatasy); 2) specifické k více substrátům (např. fosfomonoesterasy, fosfodiesterasy a pyrofosfatasy) (Horáková & Němec 2003). Fosfatové enzymy (fosfomonoesterasy, fosfomonoesterhydrolasy) hydrolyzují P–O vazbu fosfomonoesterů (Chróst & Albrecht 1986), zatímco nukleasové enzymy (fosfodiesterasa) hydrolyzují P–O vazbu fosfodiesterů (Jansson et al. 1988). Clark et al. (1998) poukazují na to, že fosfomonoestery představují okolo 75% všech makromolekulárních látek rozpuštěného organického fosforu.



Obr. 2 Obecné schéma katalyzování hydrolýzy monoesterů kyseliny fosforečné fosfomonoesterasou ($R =$ organická skupina) (převzato z Horáková & Němec 2003).

Fosfomonoesterasy se rozdělují do čtyř skupin (klasifikační číslo EC 3.1.3.1. až EC 3.1.3.4.), z nichž nejvýznamnější jsou enzymy EC 3.1.3.1. alkalické fosfatasy a EC 3.1.3.2. kyselé fosfatasy. V závislosti na producentním organismu vykazují alkalické fosfatasy vysokou aktivitu v širokém rozmezí hodnoty pH (pH 7,2 až 10,5). Kyselé fosfatasy vykazují nejvyšší fosfatasovou aktivitu při hodnotě pH okolo 5. Alkalická fosfatasa u mikroorganismů bývá velice často vázaná na struktury buňky, pouze malá část je sekretována do prostředí (Horáková & Němec 2003).

Fosfatasová aktivita byla po dlouhou řadu let zkoumána pouze u fytoplanktonu a až později u bakterií.

4.2. Lokalizace fosfatas

Fosfatasy jsou obvykle spojeny s buněčnou membránou (Cembella et al. 1984) a hydrolyzují rozpuštěné fosfátové estery vně buňky, dovolujíc tak buňce absorbovat pouze fosfátový ion a ponechat zbylou organickou část v médiu (González-Gil et al. 1998).

Lokalizací alkalických fosfatas u řas se zabývala řada autorů a byla popsána u mnoha rozdílných skupin - mořských rozsivek *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum* a *Phaeodactylum tricorutum* (Kuenzler & Perras 1965, Moller et al. 1975), u zelených řas u rodu *Chlorella* (Brandes & Elston 1956), u zlativek *Isochrysis galbana* (Kuenzler & Perras 1965) a u dinoflagelátů u druhu *Peridinium cinctum* (Wynne 1977).

Fosfatasy na vnějším povrchu buňky pozorovali Kuenzler (1965) i Fitzgerald & Nelson (1966). Brandes & Elston (1956) zjistili jejich přítomnost na povrchu buněčné stěny a v roce 1976 i Matagne et al. v plazmatické membráně.

Nicméně, jak podotýkají González-Gil et al. (1998) u některých dalších druhů jako například u dinoflageláta *Prorocentrum micans* (Uchida 1992) nebo zelené řasy *Scenedesmus quadricanda* (Overbeck 1962) nebyl zjevně tento enzym lokalizován na vnější membráně. Když byl pozorován charakter barvení ELF u *Alexandrium fundyense*, alkalické fosfatasy nebyly blízko vnější membrány, ale spíše se jejich rozšíření jevílo uvnitř buňky (González-Gil et al. 1998). Z této skutečnosti González-Gil et al. (1998) vyvodili, že fosfatasy pozorované u *Alexandrium fundyense* se neindukují vlivem „hladovění“ způsobeného nedostatkem fosforu. Messer & Ben-Shaul (1969) a Wynne (1977) experimentovali s dinoflagelátem *Peridinium cinctum* a lokalizovali u něj alkalické fosfatasy uvnitř buněk, avšak v případě potřeby byl enzym transportován k buněčné stěně a vyloučen přes póry. Schmitter & Jurkiewicz (1981)

zjistili, že u druhů řas *Gonyaulax polyedra* a *Gonyaulax tamarensis* byly alkalické fosfatasy přítomny a naznačili, že hrají roli v autofágických procesech.

4.3. Fosfatasy a vlivy prostředí, regulace

Byly vysloveny domněnky, že vyšší trofický status jezer koresponduje se vzrůstající produkcí alkalických fosfatů fytoplanktonem (Jones 1972) a s převažující rolí alkalických fosfatů v regeneraci organického fosforu (Ammerman 1991, Cotner & Wetzel 1991).

V zásaditých vodách (pH 6,0 – 10,0) řasy a ostatní mikroby vylučují zásadité fosfatasy (Gage & Gorham 1985), přičemž v kyselých vodách (pH 4,0 – 6,0) převládají kyselé fosfatasy (Jansson et al. 1988, Olsson 1991, Nedoma et al. 2003a). Kyselé fosfatasy mají optimum pH při 4,0 – 6,0 a má se zato, že jsou aktivní ve vnitřním buněčném metabolismu, nejsou potlačované ortofosfátem (Kuo & Blumenthal 1961, Reid & Wilson 1971, Jansson et al. 1988), jsou konstitutivní, produkované buňkou více či méně stále a slouží zejména v metabolismu fosforu (Cembella et al. 1984, Jansson et al. 1988). Alkalické fosfatasy se zdají být ve fytoplanktonu více běžné než kyselé fosfatasy (Nalewajko & Lean 1980). Obě formy jsou schopné hydrolýzy organických fosfatů a uvolnění ortofosfátu (González-Gil et al. 1998)

Alkalické fosfatasy jsou indukovány při nízkých vnějších koncentracích P_i a lokalizovány na a nebo u povrchu buňky, kde hydrolyzují fosfomonoestery včetně esterů primárních či sekundárních alkoholů, polyalkoholů, alicyklických alkoholů, fenolů a aminů z okolního prostředí, aby tak poskytnuly buňce alternativní zdroj P_i (Chróst 1991, Jansson et al. 1988). Alkalické fosfatasy jsou regulovány ortofosfátem – jeho dostatkem v buňkách a okolním prostředí (Jansson et al. 1988). Nedostatek ortofosfátu má za následek syntézu fosfatů (Lien & Knutsen 1973). V přírodním vodním prostředí i v kultuře vzrůstá fosfatová aktivita fytoplanktonu v období vyčerpání rozpuštěného ortofosfátu (Fitzgerald & Nelson 1966, Peterson 1980, Vrba et al. 1993), které nastává periodicky v létě ve většině přírodních vod (Wetzel 2001). Řasy s deficitem fosforu mohou mít až 25-krát větší fosfatovou aktivitu než buňky rostoucí v podmínkách dostatku fosforu (Fogg 1975). Aktivita alkalických fosfatů byla často používána k indikaci deficitu fosforu u přírodního fytoplanktonu (Healey & Hendzel 1980, Smith & Kalff 1981, Gage & Gorham 1985, Lean et al. 1987, Jansson et al. 1988, Istvánovics et al. 1993)

Některé druhy ovšem nemohou produkovat alkalické fosfatasy při limitaci fosforem, zatímco některé další mají konstitutivní enzymy (Cembella et al. 1984), což znamená, že syntetizují enzym v konstantním množství bez ohledu na růstové podmínky.

Boni et al. (1989) rovněž poukázal na denní kolísání v aktivitě alkalických fosfat u *Protogonyaulax tamarensis*. Toto kolísání bylo zaznamenáno i u mořských a sladkovodních dinoflagelátů z přírodních populací patrně plynoucích z vnitřních cirkadiálních rytmů těchto organismů (Rivkin & Swift 1979, Wynne 1981, Štrojsová & Vrba 2009).

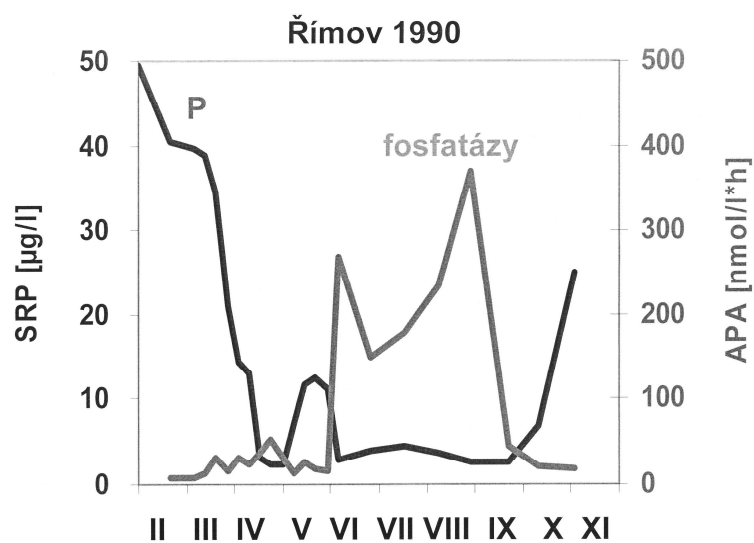
Na začátku 90. let 20. století se objevily první práce zmiňující se o významné roli bakteriální extracelulární 5'-nukleotidasy v regeneraci fosforu (Ammerman & Azam 1991a,b, Bentzen & Taylor 1991, Cotner & Wetzel 1991). Tato fosfatasa katalyzuje hydrolýzu nukleotidu a uvolňuje nukleosid a fosfát.

Současná koncepce regulace aktivity extracelulárních fosfat je vymezena nepřímo úměrným vztahem mezi růstovou rychlostí a fosfatasovou aktivitou a takový vztah byl skutečně potvrzen u mořského bakterioplanktonu (Valdstein & Olsen 1989). Předpokládá se, že nízká fosfatasová aktivita je důsledkem represe syntézy fosfat způsobené vysokým buněčným obsahem fosforu (Muda et al. 1992) a tento vysoký obsah fosforu vede, jestliže je mikrobiální růst limitován fosforem, k vysoké růstové rychlosti (Droop 1973).

K zajímavému zjištění dochází Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) ve své studii, a to že detekce fosfatasové aktivity v provzdušněných aktivovaných kalech obsahující ortofosfát v koncentracích 7 – 14 mg.l⁻¹ při pH 7,0 je v rozporu s mnoha jinými studiemi, které popisují u řas a bakterií inhibici vlivem zvýšené koncentrace ortofosfátu (Chróst & Overbeck 1987, Cotner & Wetzel 1991, Reid & Wilson 1971). Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) dále uvádějí, že k pozorované enzymatické aktivitě v aktivovaných kalech mohly přispět nescifické kyselé fosfatasy.

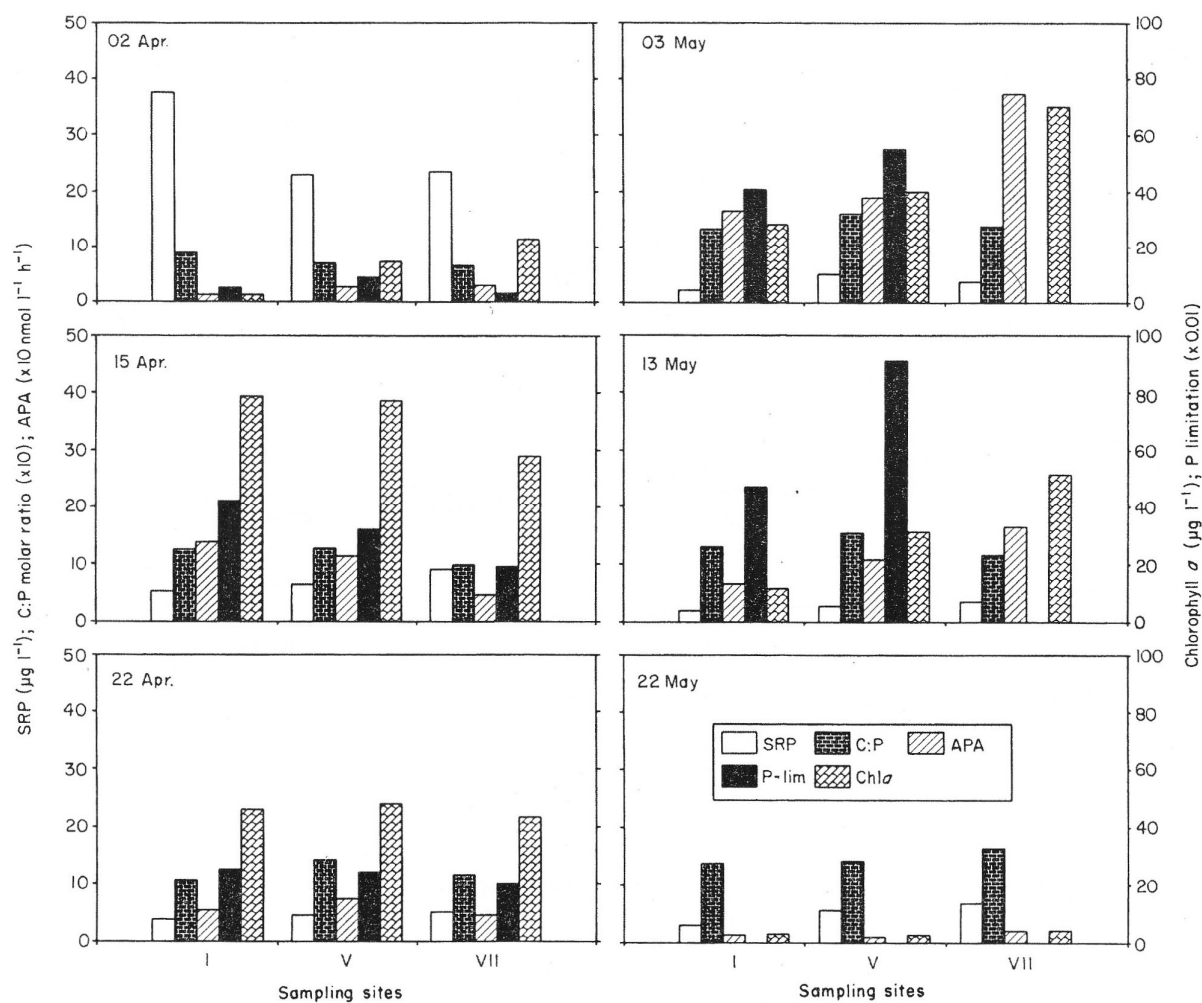
4.4. Fosfatasová aktivita u fytoplanktonu

V eutrofní nádrži Římov pozorovali Vrba et al. (1993) výrazné maximum aktivity alkalických fosfat během letního období v roce 1990, které korelovalo s výrazným nedostatkem fosforu u fytoplanktonu (Nedoma et al. 1993). Rozdílný charakter aktivit fosfat byl pozorován u dvou následných jarních period v roce 1990 a 1991 (Vrba et al. 1993).

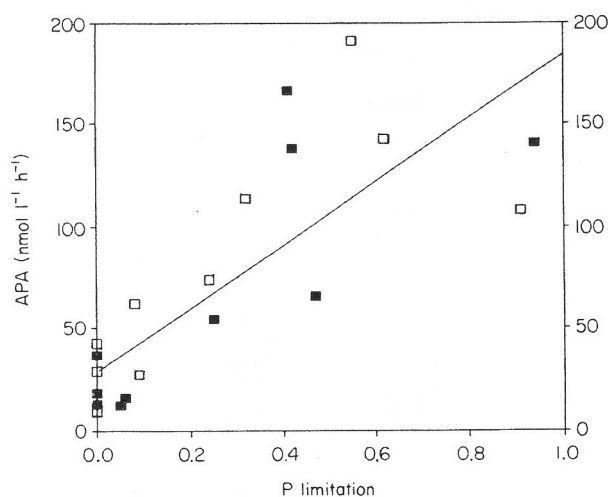


Obr. 3 Sezonní průběh fosfatasové aktivity a koncentrace rozpuštěného reaktivního fosforu (SRP) během roku 1990 na přehradě Římov (upraveno podle Vrba et al. 1993).

Vrba et al. (1995) zkoumali odběry vzorků ze tří míst Římovské přehrady vztah mezi aktivitou fosfatas, poměrem C : P, limitací fosforem a druhovým složením fytoplanktonu, i závislost fosfatasové aktivity na pH. Výsledky pokusů ilustrují obrázky 4 a 5.



Obr. 4 Grafické znázornění hodnot SRP (Soluble Reactive Phosphorus – rozpuštěný reaktivní fosfor), hodnot molárního poměru C : P u sestonu, APA (Alkaline Phosphatase Activity – aktivitu alkalických fosfatů) a P – lim (limitace fosforem, provedeno biologickým stanovením) na několika datech odběru majících odlišnou koncentraci Chl a (chlorofylu a). Biologické stanovení ukázalo nápadnou limitaci fosforem po prvním maximu Chl a , zatímco mimo toto období byla blízko nule. APA dosáhla vrcholu ($\geq 100 \text{ nmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) na obou místech (Sampling site I a V), v nichž byl zaznamenán epilimnický (0 – 2 m) deficit fosforu v dubnu a nejsilněji v první polovině května (převzato od Vrba et al. 1995).



Obr. 5 znázorňuje vztah mezi APA (Alkaline Phosphatase Activity – aktivitou alkalických fosfatas) a P – limitací (limitací fosforem) z míst odběru vzorků I (■) a V (□) (lineární regrese u všech dat; $r^2 = 0.65$, $P < 0,001$) (převzato od Vrba et al. 1995).

Zvětšení aktivity alkalických fosfatas v epilimniu bylo vždy spojováno s maximem fytoplanktonu a více než 50% celkové aktivity bylo v 2,5 – 100 μm frakcích během jarního i letního maxima fytoplanktonu v roce 1990 (Vrba et al. 1993). Podobné výsledky byly získány od ostatních autorů pracujících v eutrofních jezerech (Pettersson 1985, Chróst & Overbeck 1987, Feuillade & Blane 1990, Istvánovics et al. 1993).

Podle názoru Vrby et al. (1995) celková aktivita alkalických fosfatas u řas vyšší než 100 $\text{nmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ značí nedostatek fosforu, jak bylo potvrzeno dalšími indikátory deficitu fosforu v nádrži (Nedoma et al. 1993, Vrba et al. 1993). Jedinou výjimkou byla vysoká aktivita fosfatas naměřená v květnu poblíž přítoku, kde ale nebyla zjištěna limitace fosforem – jak vyplývá z obr. 4 (Vrba et al. 1995). Zvýšená aktivita alkalických fosfatas byla „časově posunuta“ po rozvoji fytoplanktonu, což je odpovídající hypotéze o adaptabilitě fytoplanktonního společenstva k vyčerpání epilimnického fosforu (Vrba et al. 1993). Aktivita alkalických fosfatas byla významně zvýšená u fytoplanktonu s deficitem fosforu. Nicméně zjevně nesouvisela s celkovou biomasou či druhovým složením fytoplanktonu (Vrba et al. 1995).

Během maxima fytoplanktonu často posunula intenzivní fotosyntéza pH vody nad 9,0, tedy směrem k pozorovanému optimu pro alkalické fosfatasy (Vrba et al. 1995). Celkově byla aktivita alkalických fosfatas dobře korelována s pH v nádrži. Nicméně alkalické fosfatasy s optimem pH kolem 9,0 byly aktivní pouze během píku fytoplanktonu, zatímco slabá aktivita prostředí extracelulárních fosfatas byla zpozorována při nízkých koncentracích chlorofylu *a*

(zima; fáze čisté vody). Ekologická významnost závislosti aktivity alkalických fosfatů na pH se nicméně mohla měnit se zásaditostí vody a složením fytoplanktonu (Vrba et al. 1995).

Mimořádně vysoké aktivity kyselých extracelulárních fosfatů jsou přítomny v kyselých šumavských horských jezerech (pH ~ 4,5 – 5,0) (Vrba et al. 1996). Tato jezera jsou charakterizována stálým nedostatkem fosforu v důsledku koprecipitace fosforu a hliníku (Kopáček et al. 2000), (inkorporace rozpuštěných forem fosforu do vznikající pevné fáze hydratovaných oxidů nebo hliníku) naprostou absencí ryb, absencí či slabým zastoupením zooplanktonu (Vrba et al. 2003a) a vysokým podílem bakterií s převahou vláknitých forem (Vrba et al. 2003b).

Co se týče přítomnosti fosfatů u různých taxonomických skupin, Štrojsová (2001) ve vzorcích fytoplanktonu z Plešného jezera a nádrže Římov našla fosfatovou aktivitu u většiny systematických tříd řas, kromě *Euglenophyceae*, *Cryptophyceae* a většiny *Chrysophyceae*. Zástupci *Cyanobacteria*, *Chlorophyceae* a *Conjugophyceae* vykazovaly aktivitu zejména v létě a na začátku podzimu, zatímco dva druhy *Chrysophyceae* (*Dinobryon divergens* a *Synura* sp.) a dva druhy *Chlamydomonadophyceae* (*Chlamydomonas* sp. a *Eudorina elegans*) produkovaly fosfaty pouze na jaře. *Ankyra ancora* a *Eudorina elegans* vykazovaly fosfatovou aktivitu vždy, kdy byly zastoupeny ve fytoplanktonu. U některých druhů zase nebyla přítomnost aktivních fosfatů nalezena vůbec (*Bitrichia ollula*, *Dinobryon* spp., *Cryptomonas* spp., *Katodinium* sp., *Isthmochloron trispinatum*). *Aphanizomenon flos-aquae* nebo *Peridinium* sp. produkovaly fosfaty pouze během sezony v roce 2001.

4.5. Fosfatová aktivita u bakterií

4.5.1. Aktivita u bakterií v aktivovaných kalech

Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) se zabývali fosfatovou aktivitou u bakterií v aktivovaných kalech čistírny odpadních vod Bozeman v USA nejen kvůli tomu, že běžným zpracováním aktivovaných kalů se může redukovat obsah fosforu v odpadních vodách o 60 – 66%, zatímco zvýšením biologických procesů se může dosáhnout 90 – 95% redukce fosforu (Tabor & Niehof 1985). Určité klíčové kroky v biochemických cestách rozšířeného biologického odstraňování fosforu jsou nyní známy, ale mikroorganismy zodpovědné za proces nebyly zatím identifikovány (Van Niel et al. 1998). Krom toho nebylo ještě objasněno mnoho základních biochemických mechanismů odstraňování fosforu (Christensson et al. 1998); existují pouze omezené informace o aktivitě fosfatů v aktivovaných kalech (Lemmer et al. 1994).

Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) ve své studii určovali frakci aktivovaného kalu zodpovědnou za fosfatasovou aktivitu, lokalizaci enzymové aktivity během tvorby vloček v kalu, proporce bakteriálních buněk asociovaných ve vločkách přispívajících k enzymové aktivitě a identitu a fyziologický stav významné části bakterií zodpovědných za tyto aktivity. Podotýkají, že lepší pochopení mechanismů a mikrobiálních populací zodpovědných za regeneraci detritového organického fosforu v kalech by mohlo vést k lepší kontrole nad procesy při úpravě odpadních vod.

Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) udávají, že většina fosfatasové aktivity objevené v aktivovaných kalech čistírny odpadních vod byla vázána na suspendovaný vločkový (koloidní vločky) materiál, respektive se zdála být lokalizována v částech vloček obsahujících bakterie – na základě vysrážených fluoreskujících krystalů jakožto výsledku enzymatické reakce a díky barvení nukleové kyseliny buněk. Fosfatasovou aktivitu vykazalo $8,8 \pm 1,2\%$ bakteriálních buněk. Mezi 35–45% ELF fluorescence bylo spojeno s bakteriálními buňkami, jež byly identifikovány (FISH metoda) jako skupina C/F. Tato skupina patří do podtřídy *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*. Toto zjištění bylo ve shodě se studii provedenými dříve (Bond et al. 1995, Fuhs & Chen 1975, Gude 1980, Manz et al. 1996, Manz et al. 1994, Pike 1975). Díky analýze FISH mohli Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) stanovit podíl bakterií patřících do klastru C/F na 17–20%. Obdobné zastoupení (12%) popsali v aktivovaných kalech Snaidr et al. (1997) i Manz et al. (1996) (10–12%). Výsledky naznačují, že C/F jako skupina jsou důležité v zprostředkování uvolňování anorganického ortofosfátu (P_i) z fosfomonoesterů detritového organického fosfátu v aktivovaných kalech při procesu úpravy odpadních vod.

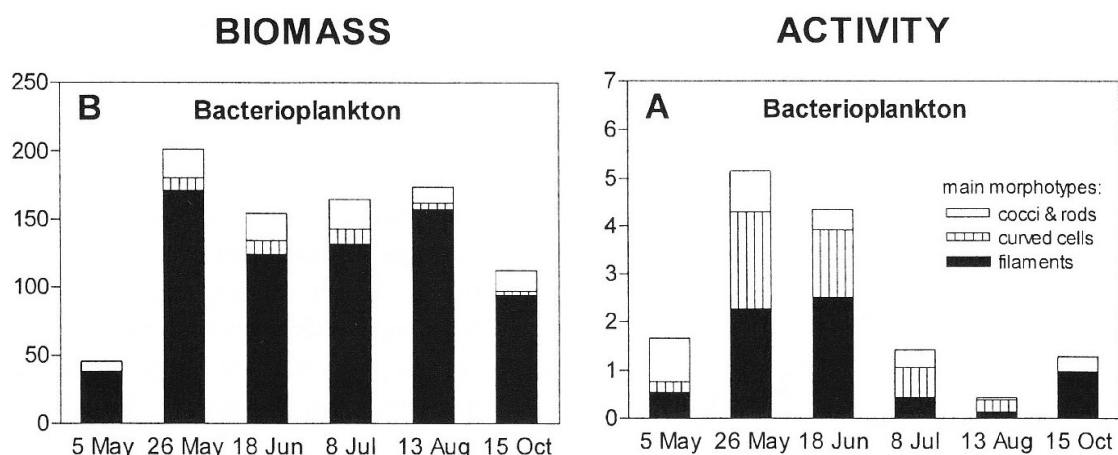
Dříve byla aktivita bakteriálních alkalických fosfatas spojována s intaktními buňkami (Jansson et al. 1988), ale podle výsledků Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) se zdá být enzymatická aktivita spojena s aktivní bakteriální frakcí. Většina fosfatasové aktivity ve vločkách totiž nepocházela z latentních či rozkládajících se buněk, ale z buněk aktivních, podle všeho schopných příjmu fosfátu a jeho začlenění do bakteriální biomasy.

4.5.2. Aktivita u sladkovodního bakterioplanktonu

Nedoma & Vrba (2006) porovnávali na základě předchozích studií, které prokázaly různou enzymatickou aktivitu u různých zástupců fytoplanktonního společenstva, skupiny bakterií operativně definovaných jejich morfologií a velikostí podle fosfatasových aktivit, které vyplývají z jejich rozdílných nutričních stavů a strategií.

Vrba et al. (2003b) popsali v šumavských jezerech výskyt velkého množství dlouhých vláknitých heterotrofních bakterií částečně jako důsledek zvýšeného žracího tlaku (př. *Dinobryon*) vyvíjeného na bakterie a jako první přišli s údaji o fylogenetickém složení bakterioplanktonu a vztahu mikrobiální aktivity na velikosti buněk jednotlivých frakcí. Přítomnost morfotypů a vysoké fosfatasové aktivity činí jezera Šumavy vhodnými modelovými lokalitami pro studování morfotypově – specifické fosfatasové exprese (Nedoma & Vrba 2006). Mezi bakteriemi se zdají být vlákna nejnápadnějšími formami vykazujícími aktivitu povrchově navázaných fosfatas (Nedoma et al. 2003a).

Nedoma & Vrba (2006) udávají, že na Čertově jezeře byl bakterioplankton složený z různorodých vláknitých morfotypů, přičemž většinu bakteriální biomasy (80–90% celkového bakteriálního uhlíku) tvořila vlákna. Poměrně homogenní skupina zakřivených bakterií (*vibria*) s vysokou fosfatasovou aktivitou tvořila přibližně 1,2–6,7% z celkového bakteriálního uhlíku. Ostatní jednobuněčné bakterie se podílely na bakteriální biomase podílem 7–16%.



Obr. 6 Biomasa hlavních morfotypů bakterioplanktonu (Biomass) a fosfatasová aktivita (Activity) na Čertově jezeře v sezoně 2003. Na osách x jsou data odebrání vzorků, na osách y: biomasa – uhlík ($\mu\text{g C.l}^{-1}$); aktivita – aktivita extracelulárních kyselých fosfatas ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (převzato od Nedoma & Vrba 2006).

Rozložení aktivity bakteriálních fosfatas jednotlivých morfotypů se výrazně lišil od rozložení biomasy (Nedoma & Vrba 2006). Nejpatrnější rozdíl byl u zahnutých buněk, které odpovídaly (v sezonním průměru) za 31% bakteriální fosfatasové aktivity, ale pouze za 4,1% biomasy. Méně nápadný rozdíl byl pozorován pro koky a tyčinky, které přispívaly k fosfatasové aktivitě 23% a k biomase 12%. Vlákna naopak, jakkoli tvořila dominantní část

biomasy bakterioplanktonu (v průměru 84% bakteriálního uhlíku), přispívala mnohem méně k fosfátové aktivitě – v průměru 45%.

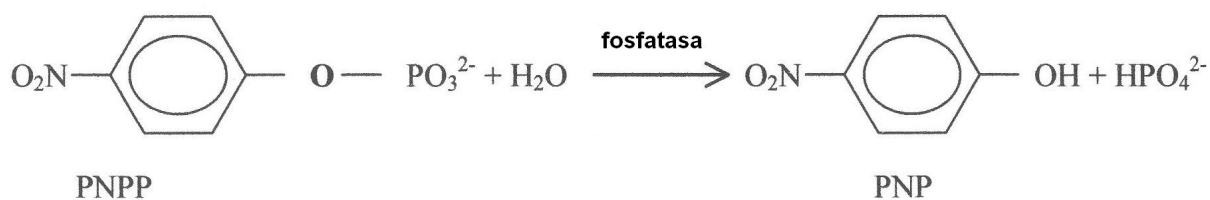
Celkové bakterioplanktonní fosfátové aktivitě dominovaly brzy po rozmrznutí jezera koky a tyčinky (55% z celkové aktivity), které byly vystřídány vláknitými bakteriemi v pozdním květnu (44%) a červnu (58%) a později v červenci a srpnu zahnutými buňkami (44% a 59%); v říjnu byla většina fosfátové aktivity (76%) vymezena opět vlákny (Nedoma & Vrba 2006).

Na základě zjištěného průběhu aktivity extracelulárních kyselých fosfátů (viz. obr. 6) předpokládají Nedoma & Vrba (2006), že v průběhu května, kdy se rozvinula teplotní stratifikace, byl epilimnický anorganický fosfor rychle vyčerpán, což vedlo k fosforovému deficitu a postupnému zvýšení se fosfátové aktivity planktonu. Autoři dále pokračují, že později v létě za podmínek ostré teplotní stratifikace a nízkého přísunu fosforu z povodí a dekompozicí organické hmoty ultrafialovým zářením (Kopáček et al. 2003) mohla být koncentrace ortofosfátu příliš nízká na to, aby uživila růst řas, ale zase natolik vysoká, aby uživila značnou bakterioplanktonní biomasu s nízkou fosfátovou aktivitou.

5. Metody měření

5.1. Princip měření a substráty

Principem stanovení fosfatázové aktivity je měření vznikajícího produktu hydrolýzy esterů. Metoda je založena na skutečnosti, že při této reakci enzym nerozlišuje mezi organickými skupinami R a katalyzuje i přeměnu syntetických analogů. Proto lze enzymatickou reakci provádět s nejrůznějšími substráty. Průběh reakce je pak sledován spektrofotometricky (Horáková & Němec 2003).

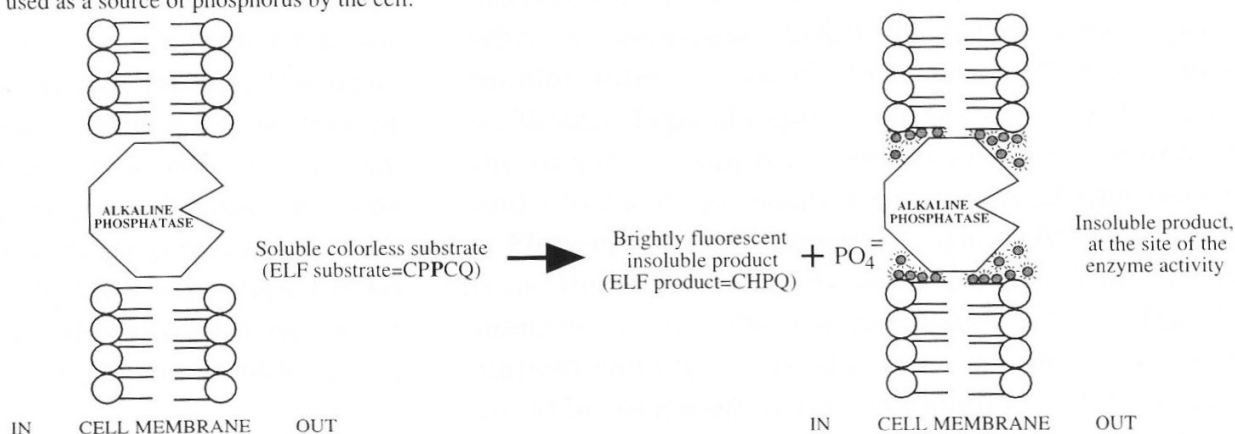


Obr. 7 Fosfatasová přeměna p-nitrofenylfosfátu (PNPP) hydrolýzou. Jedná se o často používaný chromogenní substrát pro laboratorní stanovení fosfatasové aktivity. Reakcí se mění na žlutě zbarvený 4-nitrofenolátový anion (převzato od Horáková & Němec 2003).

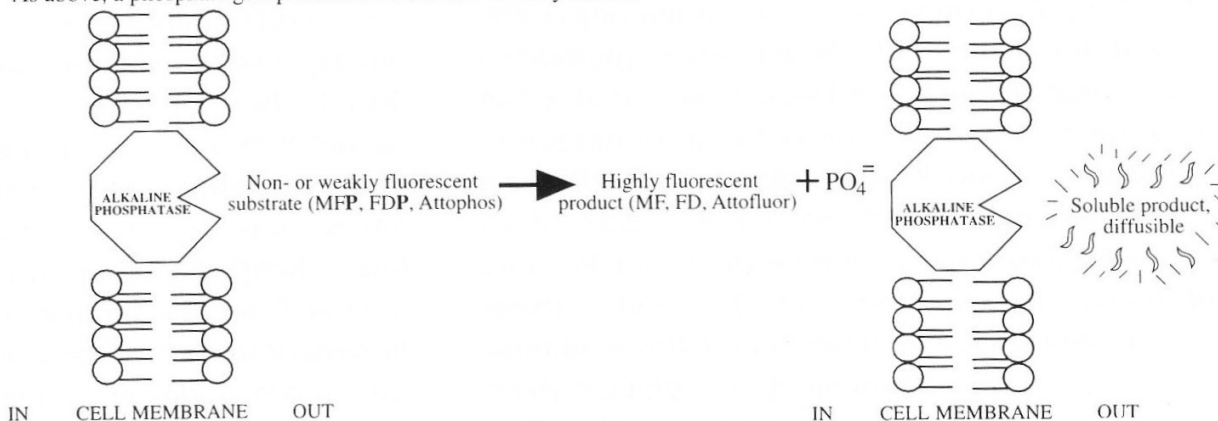
Jak shrnují Haughland & Johnson (1993), bylo použito mnoha metod k měření a detekci fosfatas ve tkáních i jednotlivých buňkách. Všechny používají substrát, který produkuje barevný nebo fluorescenční produkt, když reaguje s enzymem. Existují dva přístupy, které se liší v tom, zda se produkt enzym – substrátové reakce vysráží v místě enzymové aktivity bezprostředně po jeho vzniku nebo je uvolněný v roztoku. Princip obou přístupů demonstruje obr. 8.

Užitečnost postupu s nerozpustným substrátem spočívá v rychlém srážení mikrokrystalických usazenin v místech enzymové aktivity (Horwitz et al. 1966).

a) Insoluble substrates. The substrate is enzymatically cleaved by the alkaline phosphatase and the resulting product forms an intensely fluorescent precipitate at the site of the enzyme activity. The reaction also liberates a phosphate group which can be used as a source of phosphorus by the cell.



b) Soluble substrates. The substrate is hydrolyzed by the alkaline phosphatase yielding a highly fluorescent, soluble product. As above, a phosphate group is also liberated and used by the cell



Obr. 8 Schematické znázornění metod stanovení alkalických fosfatas použitím (a) nerozpustného ELFA a použitím (b) rozpustných substrátů - MFP, FDP (viz následující text). V případě vzniku nerozpustného fluorescenčního produktu můžeme přesně lokalizovat fosfatasovou aktivitu (a), kdežto při vzniku rozpustného fluorescenčního produktu vzdáleného od místa aktivity nemůžeme (převzato z Gonzáles-Gil et al. 1998).

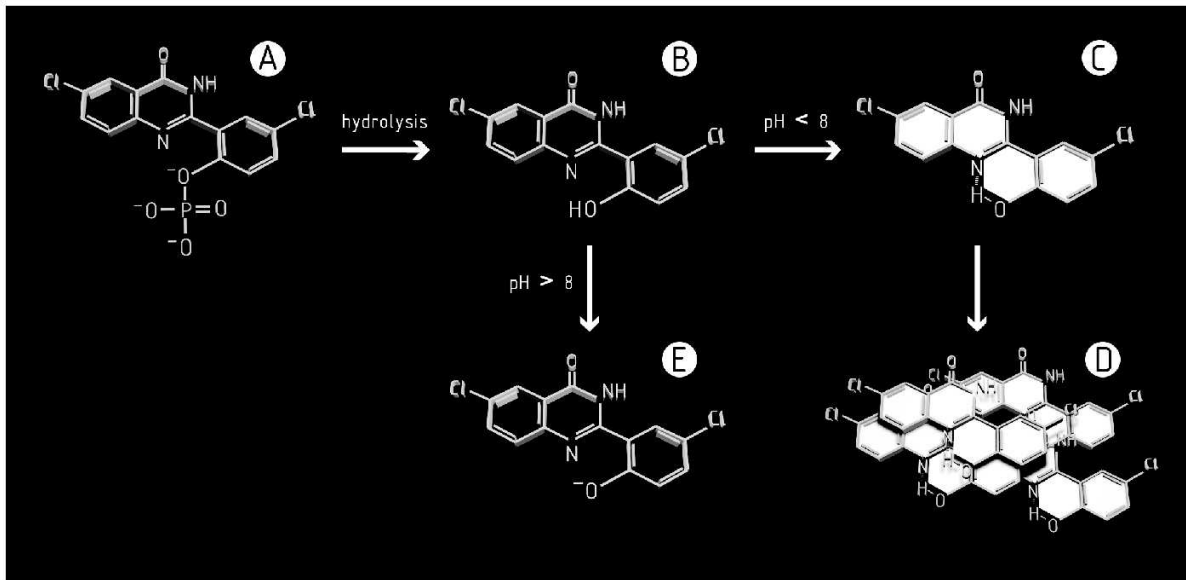
Vrba et al. (1995) měřili aktivitu alkalických fosfatas na přehradě Římov fluorometricky použitím substrátu MUFP (4-methylumbelliferyl fosfát) metodou odvozenou od Hoppeho (1983) (více Vrba et al. 1992). Aktivita byla měřena v pH a teplotě *in situ*. Výsledky závislosti aktivity alkalických fosfatas na pH podporují myšlenku, že tyto extracelulární fosfatas byly odpovědné za významnou hydrolyzu MUFP při *in situ* pH během období nedostatku fosforu. Obdobně i Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) použili ke stanovení enzymatické aktivity fosfatas také umělý fluorogenní substrát MUFP.

González-Gil et al. (1998) uvádí, že k detekci alkalických fosfatas ve většině studií o fytoplanktonu byly použity rozpustné produkty. Je tudíž nemožné označit přesné umístění enzymatické aktivity v buňkách či určit vzájemný přínos jednotlivých buněk k celkovému enzymovému signálu. Mezi metodami stanovení (používajícími nerozpustné produkty) byly používány oba substráty - kolorimetrické i fluorogenní, hlavně ty odvozené od aromatických etherů, naftolů nebo fluoresceinu. Další substráty, které poskytují více citlivosti jsou MFP (3-O-methylfluorescein fosfát) (Hill et al. 1968) a FDP (3,6-fluorescein difosfát) (Huang et al. 1992). Fosfátové deriváty fluoresceinu se ukázaly být ideální pro stanovení alkalických fosfatas kvůli vysoké extinkci a velkému množství přinášené fluorescence (Huang et al. 1992).

5.1.1. Enzyme–Labelled Fluorescence / Fluorescently Labelled Enzyme Activity

V devadesátých letech minulého století byla rozvinuta nová inovativní metoda založená na fluorescenci pro detekci alkalických fosfatas použitím bezbarvé sloučeniny CPPCQ, což je 2-(5'-chloro-2'-fosforyloxyfenyl)-6-chloro-4-(3H)-quinazolinon (Huang et al. 1993) známý pod obchodním označením ELF (Enzyme-Labelled Fluorescence) substrát (Molecular Probes Inc., OR, USA; Larison et al. 1995). V poslední době někteří autoři raději volí místo dřívějšího názvu nové označení – FLEA: Fluorescently Labelled Enzyme Activity (Štrojsová et al. 2008, Vrba et al. 2009).

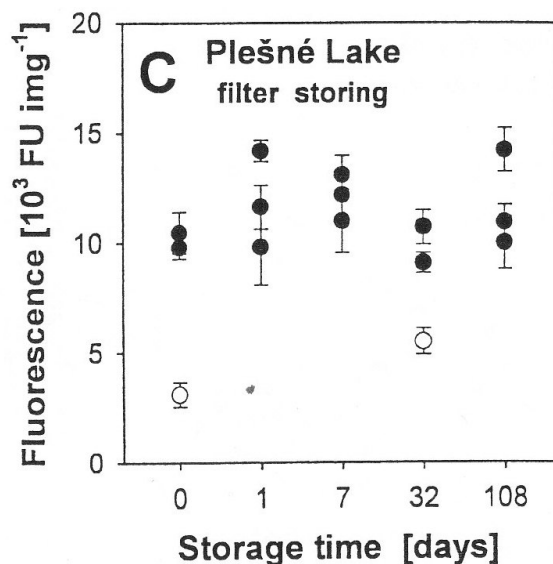
Substrát ELFP je rozpustný a nemá vysokou fluorescenci. Když reaguje s fosfatasami, je uvolněn fosfát a uvolněný nerozpustný žlutozelený produkt označovaný jako ELF-alkohol se sráží se rychle v místě enzymatické aktivity (Huang et al. 1993). Vzorky z alkalických nádrží s pH větším než 9 by ale měly být pufovány na hodnotu pH pod 8 k zajištění vysrážení molekul ELFA (Huang et al. 1992). Při vysokém pH vzniká oddělením vodíku z –OH skupiny nefluorescenční a ve vodě rozpustná fenylová forma ELFA (Štrojsová & Vrba 2006).



Obr. 9 Metoda FLEA - štěpení fosfátové skupiny z molekuly ELFP fosfatasami za podmínek rozdílného pH prostředí. A – ELFP, B – ELFA, C – ELFA s intramolekulární vodíkovou vazbou vznikající při pH menším než 8, D – vysrážení ELFA v místě enzymatické aktivity, E – nefluorescenční ELF-fenyl anion vznikající při pH vyšším než 8 (převzato od Štrojsová & Vrba 2006).

ELFA poskytuje stále dobře fluoreskující sraženiny v místě enzymové aktivity a má tudíž schopnost určit nutriční stav (P) u jednotlivých buněk (González-Gil et al. 1998). Sraženina ELFA je přibližně 500x fotostabilnější než rozpustný fluorescein (Larison et al. 1995) a může být pozorována pod mikroskopem více než hodinu bez významného blednutí (Haughland & Johnson 1993).

Výhodou ELFA je možnost dlouhého skladování za uchování stálých vlastností a stability. U vzorků kultivovaného fytoplanktonu byl detekován signál fluorescence dokonce i po tříměsíčním skladování. Vzorky by se měly promýt 10mM roztokem PBS (tlumící roztok) k zastavení reakce a ponechat v temnu při 4°C (González-Gil et al. 1998). Podobné zjištění publikovali i Nedoma et al. (2003a) (obr.10).



Obr. 10 Graf vlivu různě dlouhé délky skladování filtrů s mikroby označenými ELFA při teplotě -20°C na intenzitu fluorescence (převzato z Nedoma et al. 2003a).

Dříve byl ELFP používán v histochemii ke znázornění *in situ* lokalizace endogenních alkalických fosfatů v tkáňových preparátech či fixovaných buňkách (Haughland & Johnson 1993). Do roku 1998 nebyl ELFP použit pro žádnou studii o fytoplanktonu (González-Gil et al. 1998).

González-Gil et al. (1998) jako první použili průtokovou cytometrii ke kvantitativnímu odhadu aktivity alkalických fosfatů substrátem ELFP u jednotlivých buněk fytoplanktonu a hlásili její shodu s mikroskopickými pozorováními. Jak konstatují, je průtoková cytometrie užitečným nástrojem k detekci fytoplanktonních buněk, které jsou v deficitu fosforu. Nicméně zůstává otázkou, zda by byla průtoková cytometrie vhodná k detekci jednotlivých populací buněk limitovaných fosforem ve smíšeném planktonním společenstvu.

Aby se Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) ujistili, že získají fluorescenční signál vzniklý pouze biotickou cestou, porovnávali souběžně zautoklávované vzorky – abiotický kontrol. Jak vyplývá z výsledků, autoklávované vzorky po přidání MUFP substrátu nevykázaly žádný měřitelný fluoreskující MUF produkt. Z toho vyplývá, že vzniku MUF v neautoklávovaných vzorcích nebylo dosaženo abiotickou cestou. Obdobnou zkoušku provedli i v případě ELFP, a to se stejným výsledkem. Konečným důkazem bylo zjištění lineárního vztahu mezi intenzitou fluorescence a MUFP koncentrací. Při pozorování průběhu inkubace vzorků s ELF substrátem v čase zvolili pro všechna stanovení fosfatů čas 60 minut, který dovoľoval rozvoj maximální denzity ELF krystalů před vzrůstáním jejich velikosti a intenzity fluorescence způsobující spojování sousedních krystalů v jednolitý fluoreskující

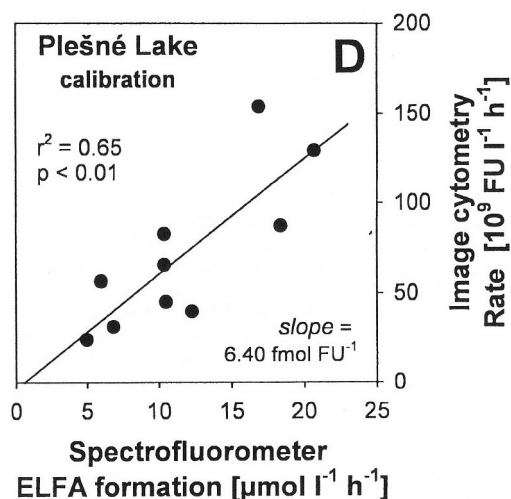
objekt. ELF krystaly produkovaly zelenožlutou fluorescenci v místech výskytu fosfatasové aktivity, přičemž se s expozicí měnila ze zelené na žlutou. Autoři získávali z jednoho místa snímání obrazu digitální CCCD kamerou vždy snímek s fázovým kontrastem a epifluorescenční snímek, které potom pomocí softwaru v rámci analýzy obrazu navrstvili na sebe. Během mikroskopování pozorovali i slabou zelenou a modrou fluorescenci v celém vložkovém materiálu. Modrý signál by mohl způsobovat nezreagovaný ELFP. Zelený by mohl vzniknout v důsledku míšení žlutého signálu vycházejícího z oblasti vysoké enzymatické aktivity s modrou fluorescencí pozadí nereagujícího ELFP.

5.1.2. Kombinace použití FLEA s dalšími metodami

Štrojsová (2001, et al. 2003) použila k měření celkové fosfatasové aktivity fytoplanktonu Plešného jezera a Římovské přehrady fluorometrickou metodu odvozenou od Hoppeho (1983) používající jako substrát MUFP. Ke spektrofluorometrickému měření fosfatasové aktivity použila ELFP. Použila získaný kalibrační faktor (vztah mezi rychlostmi vzniku ELFA měřených spektrofluorometricky a užitím obrazové cytometrie) k výpočtům celkové fosfatasové aktivity.

Při analýze obrazu se měřené buňky manuálně označí myší a systém měří průměrný jas měřeného objekt, měřený jas pozadí, z jejich rozdílu násobeného plochou objektu se vypočítá celkové množství fluorescence daného objektu a ta je úměrná množství hydrolyzovaného produktu. Reprodukovatelnost metody je vysoce citlivá na nastavení těch prvků fluorescenčního mikroskopu, které ovlivňují intenzitu fluorescence. Ke kalibraci metody se měří hydrolýza téhož produktu v témž vzorku – ta se srovnává s fluorescencí měřenou z celé plochy počítačových snímků (Nedoma et al. 2003b).

Nedoma et al. (2003a) navrhli inovativní metodu, která umožňuje za použití ELFP přesně lokalizovat fosfatasovou aktivitu a zároveň ji kvantifikovat skloubením obrazové cytometrie a spektrofluorometrických měření ke kalibraci dat získaných analýzou obrazu.



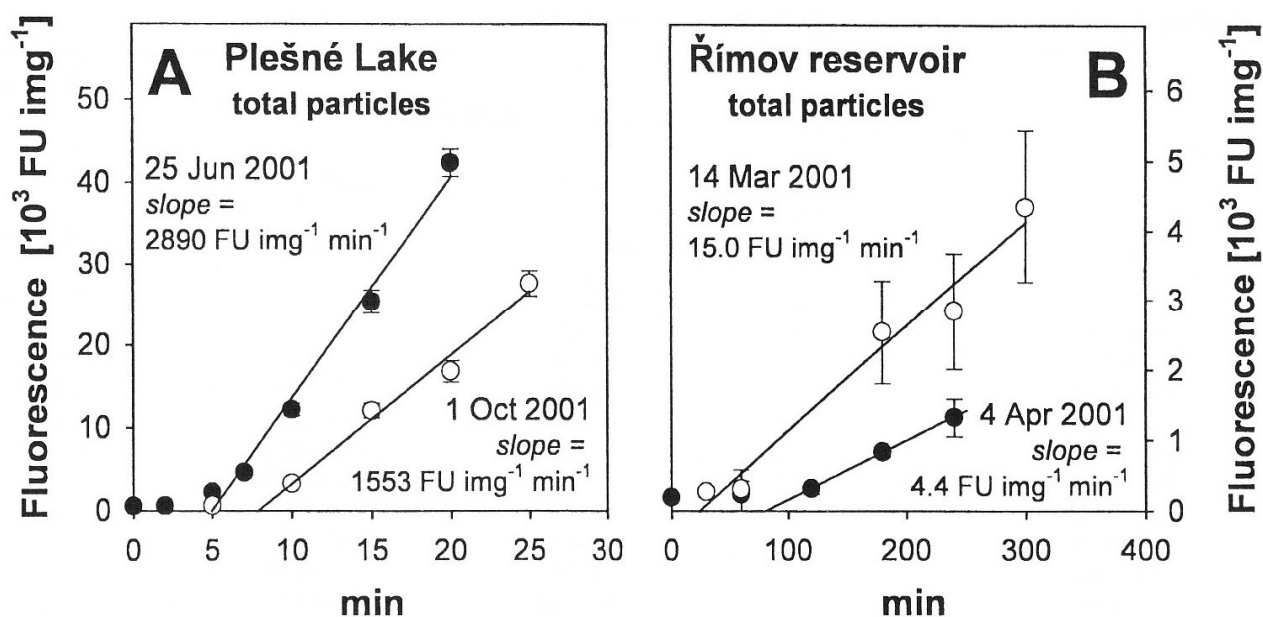
Obr. 12 Vztah mezi rychlostí vzniku ELFA (měřeno spektrofotometricky) a obrazovou cytometrií u různých dat odběru vzorků na Plešném jezeře. Hodnota směrnice šikmosti ($6,4 \pm 1,7 \text{ FU} \cdot \text{fmol}^{-1}$) posloužila jako převodní faktor pro výpočet fosfatasových aktivit jednotlivých buněk obou nádrží (Římov a Plešné jezero) (převzato od Nedoma et al. 2003a).

Nedoma et al. (2003a) podobně jako autoři v přechozích studiích snímali pomocí kamery na mikroskopu snímky s ELFA fluorescencí pro detekci a kvantifikaci fosfatasové aktivity a snímky s autofluorescencí chlorofylu *a* k určení řas. Ke kombinování snímků a analýze obrazu použili autoři speciální software analýzy obrazu. Detekovali fosfatasovou aktivitu u planktonu nádrže Římov a na Plešném jezeře. Na Plešném vykazovaly největší fosfatasovou aktivitu řasy rodů *Chlorogonium*, *Chlamydomonas*, *Gymnodinium* a dále vláknité bakterie. Aktivita byla měřitelná po celý rok. Na Římově byly pozorovány buňky s aktivitou fosfatas během jara a letního maxima fytoplanktonu, a to u řas rodů *Ankyra*, *Eudorina* a *Ceratium*; bakterie s aktivními fosfatasami se objevily v pozdním létě.

Postup detekce fosfatas a kvantifikace pomocí ELFP použitý Nedomou et al. (2003a) se liší důležitými detaily (vynechání předinkubační procedury ošetření ethanolem, kvůli možnému poškození buněk, zavedení ošetření choridem rtuť natým, který předchází poškození křehkých druhů či koncentrování buněk na polykarbonátové filtry před započítáním vlastního mikroskopování) od metod popsanych v dřívějších studiích (González-Gil 1998, Dyhrman & Palenik 1999, Rengefors et al. 2001). Použitá metoda byla odvozena ze standardních metod fluorometrického určení aktivity extracelulárního enzymu použitím MUFPP substrátu (Pettersen 1980, Hoppe 1983) s rozdílem teploty měření, která byla 25°C . Fosfatasové aktivity měřené Nedomou et al. (2003a) tak spíše odrážejí potenciální enzymatickou aktivitu v daném vzorku, než skutečnou aktivitu při *in situ* teplotě.

Nedoma et al. (2003a) popsali časový průběh vzniku ELFA fluorescence jednotlivých buněk měřený obrazovou cytometrií a ten vykázal podobný průběh jako u celkového vodního vzorku. Měřená buněčně specifická fosfatasová aktivita (CSPA) byla v rozsahu 10 až 2260 $\text{fmol}\cdot\text{h}^{-1}$. V Plešném jezeře byly mezidruhové rozdíly v CSPA výraznější, než sezonní rozdíly CSPA měřené u stejného druhu (*Chlorogonium fusiforme*).

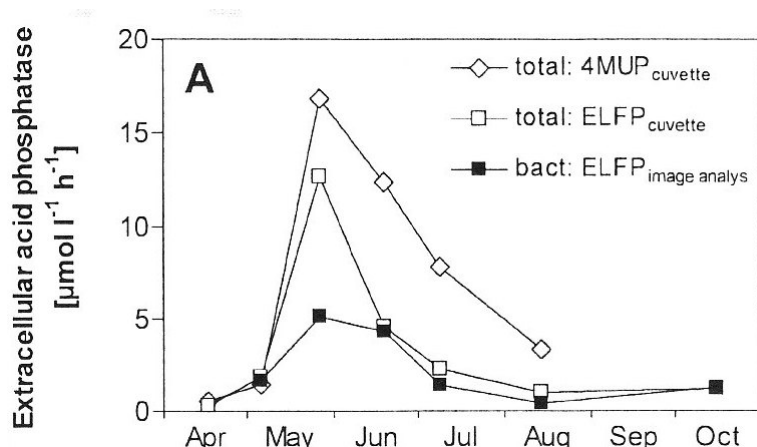
Teplotní závislost CSPA u řasy *Chlorogonium fusiforme* se projevila při snížení inkubační teploty z 25°C na 8,5°C zmenšením (3,3-krát) CSPA a byla zjištěna daleko větší fosfatasová aktivita u vzorků planktonu z Plešného jezera oproti vzorkům z Římov (~ 200-krát) ve shodě s předchozím porovnáním (rovněž ~ 200-krát) (Štrojsová 2001).



Obr. 12 Časový průběh fluorescence vznikající přeměnou ELFP substrátu na ELFA u inkubovaných vzorků z Plešného jezera a nádrže Římov za použití obrazové cytometrie. Data byla vyhodnocena pomocí lineární regrese. Na Plešném byl lag v průměru 7,3 minut, na Římově v průměru 98 minut. Na základě sezonních průměrů byly hodnoty fluorescence na Plešném cca 200-krát větší než na Římově (v průměru $88,0 \times 10^9 \text{ FU}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, resp. $0,46 \times 10^9 \text{ FU}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; FU=Fluorescence Unit). Převzato z Nedoma et al. (2003a).

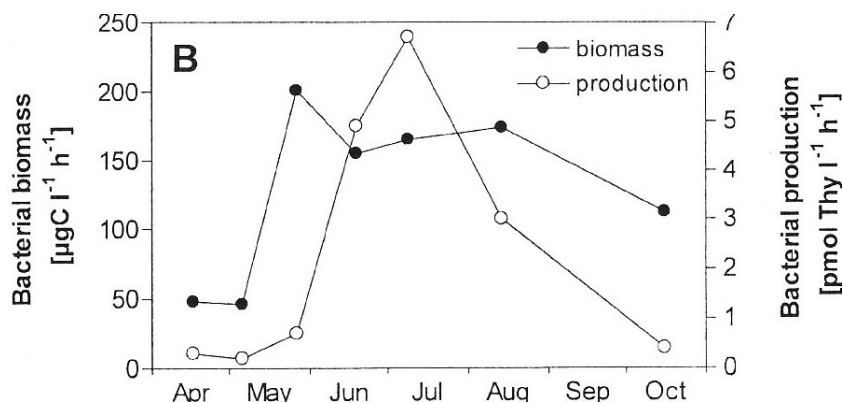
Nedoma & Vrba (2006) sledovali sezonní rozvoj aktivity kyselých extracelulárních fosfatas u morfologicky diferenciovatelného bakterioplanktonu v Čertově jezeře pomocí měření, jež probíhala třemi metodami. Prvním bylo měření celkové vodní fosfatasové aktivity za použití MUFP jako substrátu. Druhá metoda stanovovala celkovou vodní aktivitu fosfatas s použitím substrátu ELFP. Třetím způsobem bylo měření aktivity fosfatas pomocí analýzy

obrazu. Výsledky získané výše uvedenými způsoby se shodují, co se týče průběhu fosfatasové aktivity během sezony.

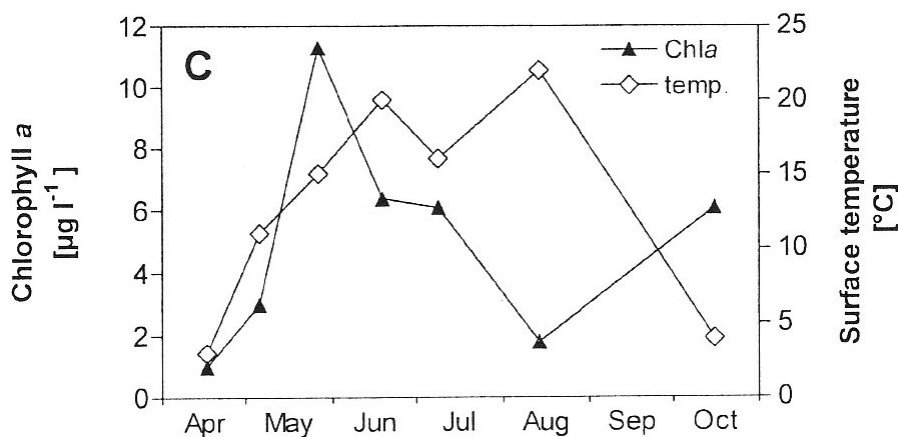


Obr. 13 Průběh aktivity extracelulárních kyselých fosfatů v Čertově jezeře v sezoně 2003 za užití tří odlišných způsobů měření (převzato od Nedoma & Vrba 2006).

Sezonní maximum fosfatasové aktivity se shoduje s maximem bakteriální biomasy a koncentrace chlorofylu *a*. Nízká míra aktivity fosfatas se ukázala na začátku sezony po roztání ledu, kdy rovněž i teplota, bakteriální biomasa, bakteriální produkce a koncentrace chlorofylu *a* byly nízké. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v období maxima chlorofylu *a* a následně docházelo k pozvolnému klesání (kromě bakteriální produkce) až do konce sezony.



Obr. 14 Průběh rozvoje bakteriální biomasy a bakteriální produkce Čertově jezeře v sezoně 2003 (převzato z Nedoma & Vrba 2006).



Obr. 15 Průběh růstu koncentrace chlorofylu a a teploty v Čertově jezeře v sezoně 2003 (Převzato z Nedoma & Vrba 2006).

Nedoma & Vrba (2006) zjistili, že se průměrná buněčně specifická fosfatasová aktivita měnila u rozdílných morfotypů bakterií mezi různými daty odběru v širokém rozmezí (0,17–46,0 fmol.cell⁻¹.h⁻¹). Malé koky a tyčinky vykázaly nízké hodnoty CSPA (0,17–0,56 fmol .cell⁻¹.h⁻¹), přičemž u celé poloviny případů ležely hodnoty pod detekční mezí. Z velkých vláknitých bakterií (délka 1,2–10,0 µm) vykazovaly nejvyšší hodnoty buňky dlouhé 2,5–5 µm (0,35–10,6 fmol.cell⁻¹.h⁻¹). Nejvyšší hodnoty CSPA naměřili autoři u morfotypu zahnutých bakterií, která většinou nejméně pět krát vyšší než hodnoty předchozích morfologických tříd. Hodnoty sezonních maxim u všech morfotypů byly zaznamenány v období maxima chla a CSPA pak následně klesala (v červenci a srpnu až třicetkrát nižší oproti maximu) a mírně vzrostly na podzim.

Podobně jako jiní autoři, museli i Nedoma & Vrba (2006) čelit určitým problémům pramenícím z barvicích technik. Hlavním problémem spojený s užitím barviva DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) ve studii byla skutečnost, že má společné excitační maximum s ELFP substrátem a emisní spektra obou se překrývají. Nutnost korigovat zelenou fluorescenci kvůli fluorescenci DAPI v zelené oblasti snižuje citlivost metody. Problém vyřešili pomocí převodního faktoru (mezi fluorescencí ELFA a množstvím ELFA). Autoři nicméně dodávají, že je na druhou stranu barvicí technika používající DAPI jednoduchá, poskytuje intenzivní fluorescenci a je slučitelná s barvivy použitými pro FISH proceduru.

5.1.3. Srovnání ELFP a MUFP substrátů

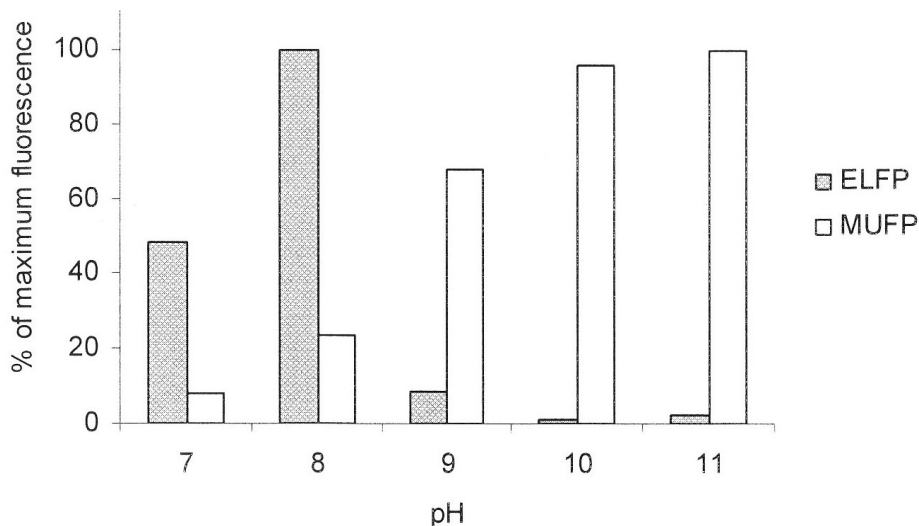
Nedoma et al. (2003a) studovali kinetiku srážení ELFA, a to jak na úrovni celkového vzorku planktonu, tak na úrovni jednotlivých buněk, přičemž zkoumali vhodnost používání substrátu ELFP k měření aktivity extracelulárních fosfatas.

Nevýhodou substrátu ELFP je lag při vzniku sraženin ELFA. Na druhou stranu, lag nedoprovází pouze reakci tohoto substrátu, ale v minulosti byl popsán i u jiných použitých substrátů – například u fluorochromu MHPQ (Huang et al. 1992).

Nedoma & Vrba (2006) při inkubaci vzorků s ELFP popsali rovněž lag, během něhož nedocházelo ke změnám fluorescence nebo jen nepatrným. Lag pozorovali u vzorků různých morfortypů a dat odběru v rozmezí 0–18 minut, po nichž následoval přibližně lineární vzrůst intenzity fluorescence vlivem hydrolýzy substrátu a pozvolného srážení krystalů ELFA na buňkách.

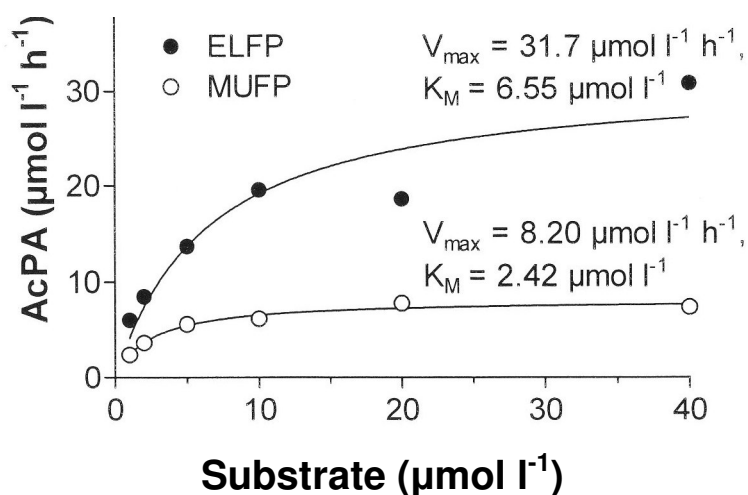
Délka lagu na začátku inkubace vzorků s ELFP byla závislá na teplotě; byla obecně delší a rychlost vzniku ELFA pomalejší při menší teplotě (Nedoma et al. 2003a). Zpoždění reakce určené pro velikostní třídy jednotlivých morfortypů (koky, vlákna, zahnuté buňky) neukázaly žádný jasný sezonní trend (Nedoma & Vrba 2006).

Štrojsová (2001) se zabývala srovnáním ELFA a MUFP substrátů a jejich závislostí na pH. Měřila spektrofluorometricky jejich saturační kinetiku a porovnávala fluorometricky měřenou fosfatasovou aktivitu s analýzou obrazu. Provedla s oběma substráty i inhibiční pokusy (přidání org. a anorg. zdroje fosforu ke měřeným vzorkům). Rozdíl je i v rychlosti hydrolýzy za rozdílných pH; u MUFP probíhá nejrychleji při pH 10 a 11, u ELFP byla zjištěna při pH 8.



Obr. 16 Vliv pH na hodnoty ELFP a MUFP hydrolýzy ve vzorku z Říмова z 31.srpna 2001; fluorescence byla měřena spektrofotometricky (MUFP) a obrazovou cytometrií (ELFP), doba inkubace byla jednotná (240 min) (převzato od Štrojsová 2001).

Spektrofotometrické srovnání ELFP a MUFP substrátů na vzorku z Plešného jezera (Štrojsová 2001) ukázalo rozdíly v průběhu hydrolýzy a v parametrech saturační kinetiky (V_{max} ; K_M). U ELFP docházelo k lagu (0,8–7,2 min) s následným lineárním vzrůstem fluorescence 15 – 40 min dlouhým. MUFP substrát nevykázal žádný lag a lineární vzrůst tval přibližně 30 min. Afinita MUFP ($K_M = 2,42 \mu\text{mol.l}^{-1}$) se zdá být třikrát vyšší oproti ELFP ($K_M = 6,55 \mu\text{mol.l}^{-1}$).



Obr. 17 Saturační kinetika hydrolýzy substrátů ELFP a MUFP měřená spektrofotometricky na vzorku z Plešného jezera z 5.května 2001; V_{max} – maximální rychlost hydrolýzy substrátu; K_M – Michaelisova konstanta (převzato od Štrojsová 2001).

6. Vlastní pokusy

6.1. Lokalita, odběr vzorků

V sezoně 2005 byl v rámci projektu vedeného docentem Vrbou sledován průběh vývoje bakterioplanktonu na Čertově jezeře na Šumavě. Bylo provedeno čtrnáct odběrů od 14. ledna do 2. listopadu 2005 (data odběrů jsou uvedena v grafu - obr. 18). Vzorky byly odebírány na jezeře z hloubky 0,5 m do sterilní skleněné láhve o objemu 2 litry s následnou prefiltrací sítím o průměru pórů 200 μm a transportu do laboratoře v termosce. Na mikroskopické počítání bakterií pomocí mřížky bylo odebráno nefiltrovaných 50 ml a přidáno 2,5 ml 40% roztoku formalínu.

V laboratoři se pro analýzu obrazu vzorky inkubovaly v Erlenmeyerových baňkách o objemu 12,5 či 25 ml přidáním ELFP v poměru 4 μl přefiltrovaného originálního roztoku na 1 ml vzorku (finální koncentrace 20 μM). Inkubační doba byla orientačně stanovena při teplotě 20°C : blank-0-5-10-15-20-25 minut. Ukončení inkubace bylo provedeno přenesením 2 (4) ml inkubovaného vzorku do plastových jednorázových zkumavek o objemu 10 ml s 200 (400) μl fixativu a fosforečnanů (pH=5), přičemž při času 0 se odebraly a fixovaly 2 (4) ml ihned po přidání ELFP. Blankem se rozumí nafiloxování 2 (4) ml vzorku bez přidání ELFP. Nafiloxované inkubované vzorky byly uskladněny v lednici při teplotě 4°C a zfiltrovány do 24 hodin.

Filtrace 3 ml vzorku s přidáním 50 μl barviva DAPI (doba probarvování cca 4 minuty) proběhla na aparatuře Sigma přes filtr poretics o průměru 25 mm a porozitě 0,2 μm . Filtr se otočil hladkou stranou nahoru a podložil nitroceluloseovým filtrem Sartorius. Přefiltrování a promytí MQ vodou proběhlo za podtlaku 0,2 MPa. Na vzduchu usušený filtr byl označen tužkou pořadovým číslem, vložen do plastové mikrozkušavky (Eppendorf, objem 1,5 ml) a zamražen.

6.2. Stanovení mikroskopických počtů bakterií a měření fluorescence ELFA

Připravil jsem samostatně preparát na mikroskopické stanovení počtů bakterií. Ten jsem zhotovil z jedné čtvrtiny filtru (vystřížena, zbytek opět uložil do mrazáku), jež jsem položil na podložní sklíčko s kapkou směsi imerzního oleje a DAPI (10 $\mu\text{g/ml}$), zakápnul další kapkou směsi oleje a DAPI a přikryl krycím sklem.

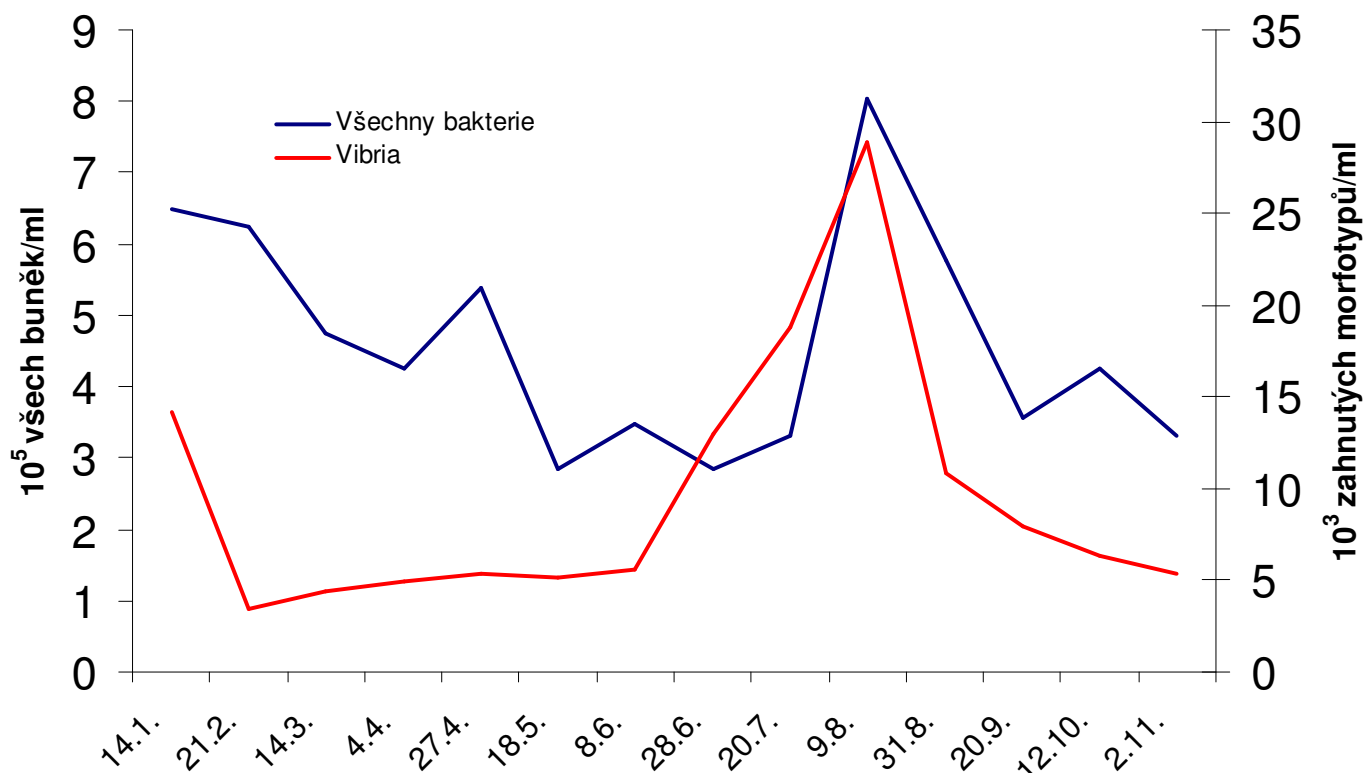
Před vlastním snímáním bylo vždy zapotřebí provést na mikroskopu kalibraci pomocí roztoku fluoresceinu (9,4%), jakožto korekce na zastiňování – shading – (Model & Burkhardt 2001). 20 μl 9,4% roztoku fluoresceinu jsem nanal na podložní sklíčko, zakryl krycím

sklíčkem a přichytil v rozích černým lakem na nehty. Po jeho zaschnutí jsem nanesl vrstvu po celém obvodu krycího skla. Vlastní kalibrace jsem prováděl pomocí programu Lucia G/F 4.8 (Laboratory Imaging s.r.o., ČR).

Po kalibraci fluoresceinem a výměně karuselu (modrý kanál – kostka: specifický filtr pro DAPI; zelený kanál – kostka: specifický filtr pro ELFA) jsem přistoupil k vlastnímu nasnímání preparátu dle metodiky Nedoma et al. (2003b). Měřené buňky jsem označoval manuální segmentací a systém měřil průměrný jas měřených buněk a průměrný jas pozadí, z jejichž rozdílu násobeného plochou buněk se vypočítalo celkové množství fluorescence dané buňky, které je úměrné množství hydrolyzovaného produktu. V každém inkubačním čase jsem změřil ~ 30 buněk (zahnuté morfotypy, vibria) (viz obr. 19-22).

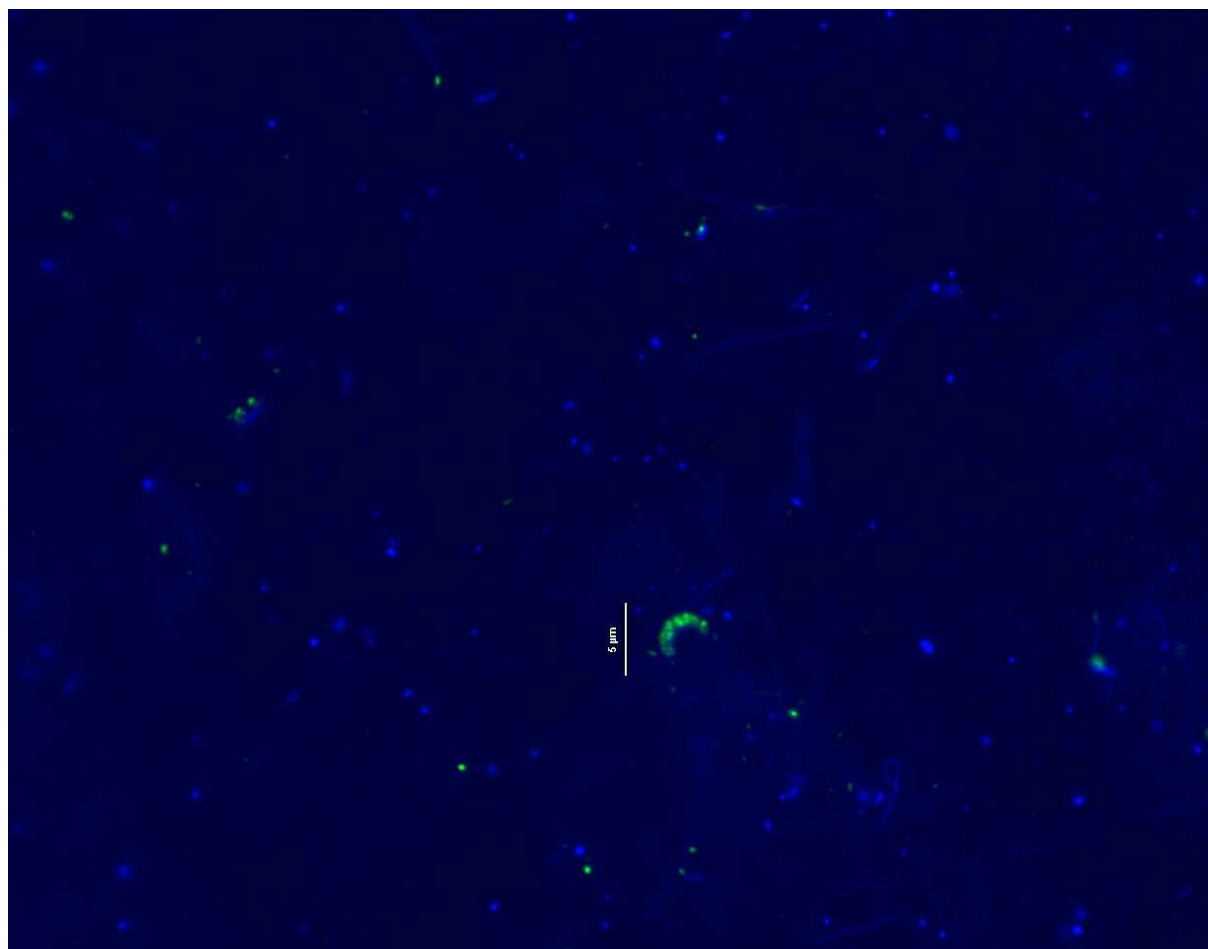
Bakterie (všechny a zahnuté morfotypy selektivně zvlášť) jsem počítal mikroskopem pomocí mřížky v okuláru. Jak vibria, tak všechny bakterie celkově vykazovaly podobný průběh vývoje se zřetelným maximem v srpnu, po němž následoval pokles abundance, což poněkud odporuje původní představě, že vibria s extracelulárními fosfatasami se budou rozvíjet i po vyčerpání fosforu v prostředí nebo alespoň nebude jejich úbytek tak strmý, jak se ukazuje v grafu.

Vývoj bakterioplanktonu během roku 2005



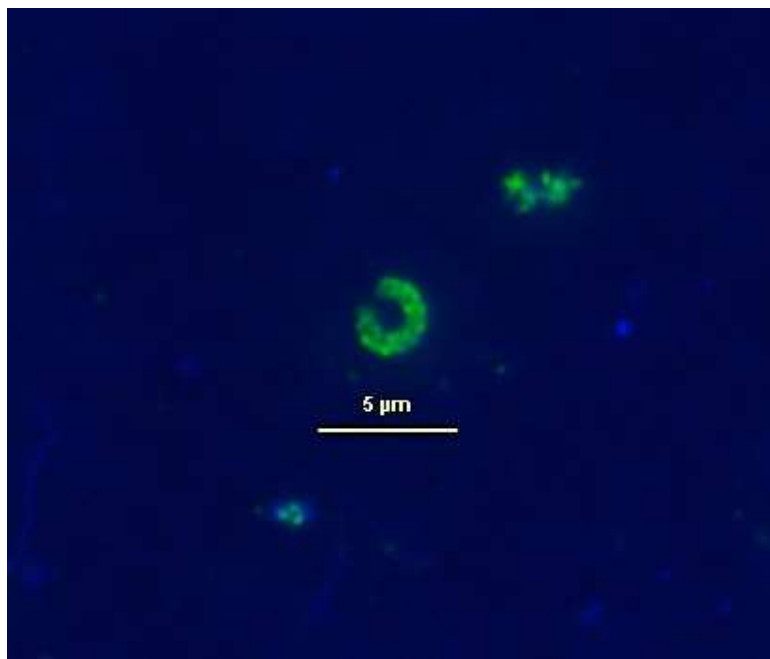
Obr. 18 Graf znázorňující abundance všech bakterií a vibrí v sezoně 2005 na Čertově jezeře. Abundance zahnutých morfotypů byla o1–2 řády nižší oproti množství všech bakterií v prostředí (vlastní měření autora).

U vzorku odebraného 8. června jsem pomocí obrazové cytometrie sledoval u celé časové inkubační řady (0–9–16–22–29–36 min) průběh vzniku fluorescence u zahnutých morfotypů bakterií.

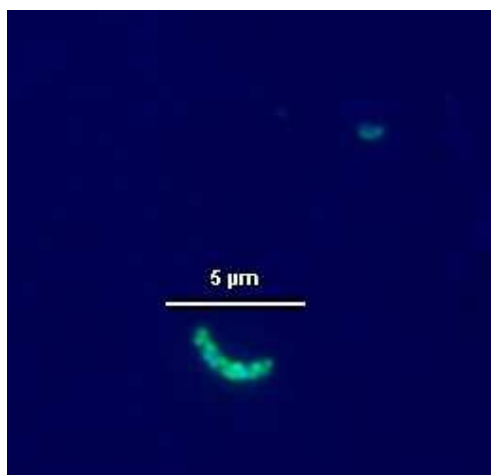


Obr. 19 Snímek bakterioplanktonu ze vzorku z Čertova jezera 8.6.2005; doba inkubace 29 minut (objektiv 100×; foto J. Krafl).

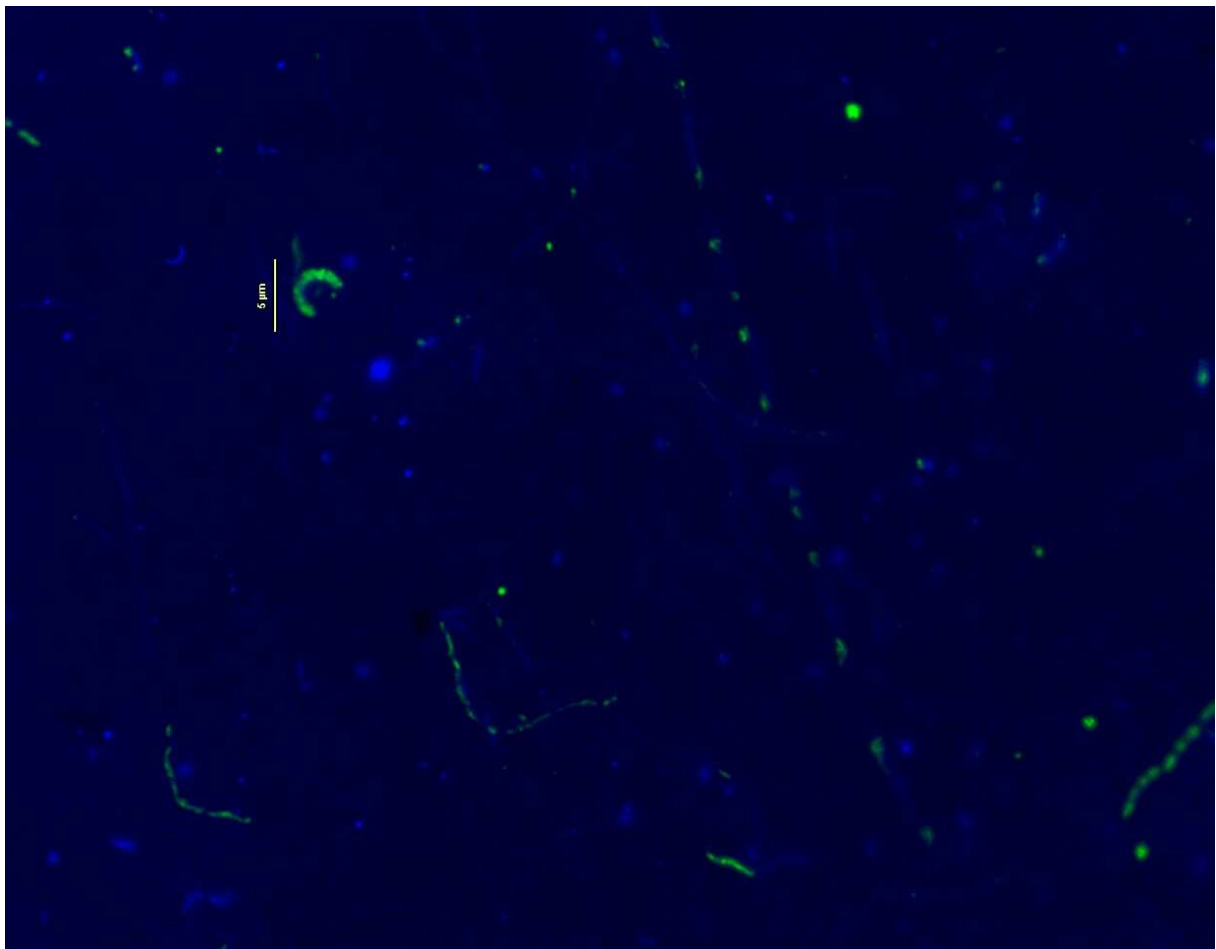
Celkem bylo proměřeno 251 bakteriálních buněk (vibrií). Buňky byly rozčleněny podle délky do čtyř skupin (0,3–0,9 μm, 0,9–2,5 μm, 2,5–5,0 μm a 5,0–10,0 μm) v početnostech 1, 63, 138 a 49 jedinců (0,40%, 25,10%, 54,98% a 19,52%) (viz. obr. 23) .



Obr. 20 Zvětšený výřez zahnutého morfortypu (vibria) bakteriální buňky s vysráženými krystaly ELFA ze vzorku z Čertova jezera z 8.6.2005 (objektiv 100×; foto J. Krafl).

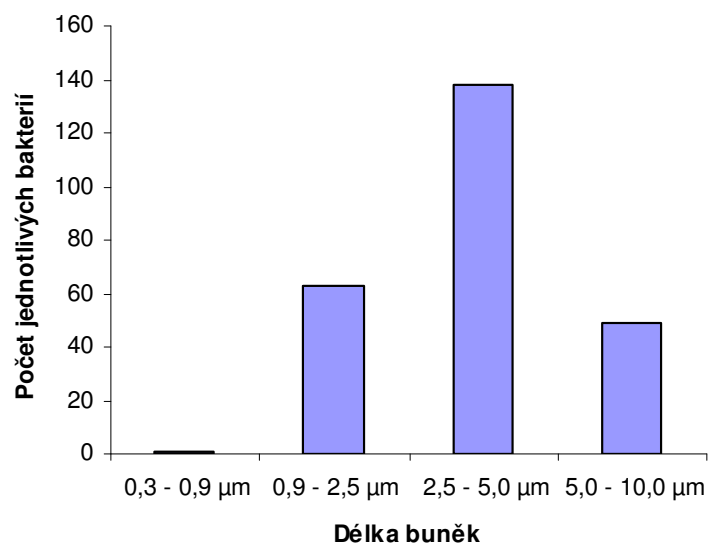


Obr. 21 Zvětšený výřez zahnutého morfortypu (vibria) bakteriální buňky s vysráženými krystaly ELFA ze vzorku z Čertova jezera z 8.6.2005 (objektiv 100×; foto J. Krafl).

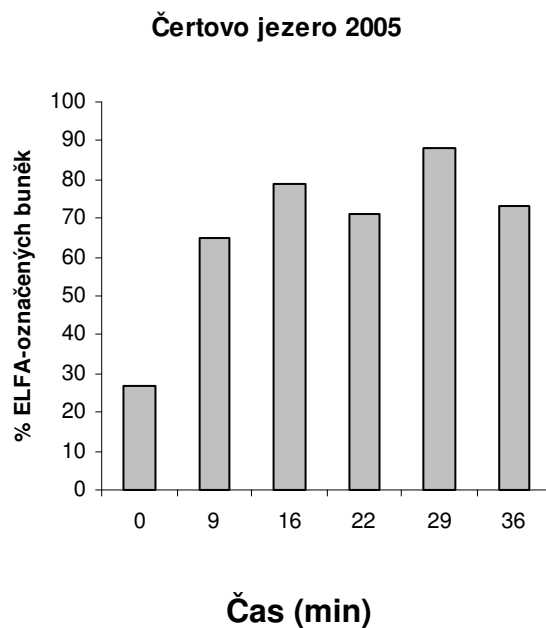


Obr. 22 Snímek bakterioplanktonu ze vzorku z Čertova jezera 8.6.2005; doba inkubace 36 minut (objektiv 100×; foto J. Krafl).

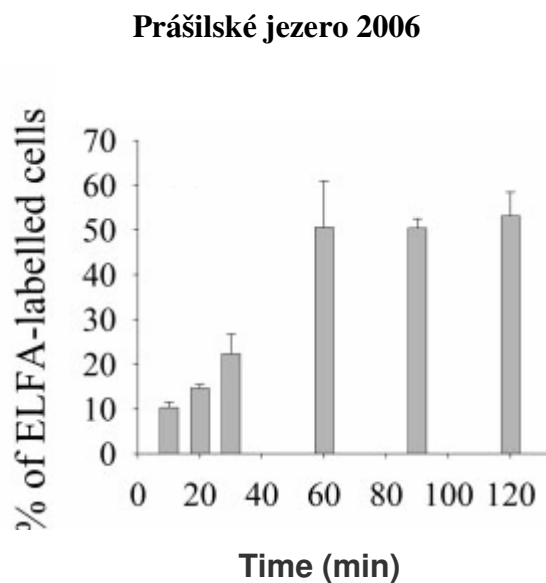
Početnost sledovaných vibrií podle jejich délky



Obr. 23 Graf zastoupení jednotlivých velikostních tříd měřených buněk ve vzorku z Čertova jezera 8.6.2005 (vlastní data autora).



Obr. 24 Množství ELF-pozitivních buněk během inkubace ve vzorku z 8.6.2005 (mikroskopie + analýza obrazu; vlastní měření autora).



Obr. 25 Množství ELF-pozitivních buněk během inkubace ve vzorku z Prášilského jezera (průtoková cytometrie; převzato z Duhamel et al. 2009).

Procentuální zastoupení ELF-pozitivních buněk v časové inkubační řadě vykázalo u vzorku z Čertova jezera (obr.24) obdobný charakter jako u vzorku z Prášilského jezera z roku 2006 (obr.25) (Duhamel et al. 2009).

7. Diskuse

Nedostatek fosforu je často limitujícím faktorem růstu sladkovodního fytoplanktonu a nejvýznamnější zdroj selektivního tlaku na jednotlivé populace různých vodních prostředí mírného pásma (Štrojsová & Vrba 2006). Rozpuštěný anorganický fosfor je mikroorganismům přímo dostupný a jeho koncentrace v povrchových vodách je významně nižší oproti koncentraci rozpuštěného organického fosforu, který je považován za alternativní zdroj fosforu (Duhamel et al. 2009).

Extracelulární fosfatasy jsou produkovány fytoplanktonem za nedostatku P_i . Enzym je syntetizován a následně uvolněn do okolního prostředí jako volná nebo na povrch buňky vázaná molekula (Jansson et al. 1988). Do současnosti byla prokázána přítomnost a aktivita extracelulárních fosfatas u řady planktonních zástupců bakterií, sinic, řas a také u některých druhů zooplanktonu. Někteří zástupci měli alkalické extracelulární fosfatasy, jiní disponovali kyselými fosfatasy. Byly popsány konkrétní případy výskytu fosfatase aktivity i inhibice. Byl zkoumán vliv prostředí (zejména pH) na expresi těchto enzymů. Přítomnost a aktivita těchto extracelulárních enzymů byla zkoumána na úrovni celých vzorků i jednotlivých buněk.

V současné době není přiměřeně vhodná metoda k určení skutečnosti, která živina limituje růst jednotlivých druhů ve smíšeném společenství fytoplanktonních organismů (La Roche et al. 1993). Dohady o limitaci fosforem a dusíkem nejsou uspokojivě vyřešeny, z toho důvodu, že jednotliví členové fytoplanktonního společenstva mají rozdílné nároky na výživu a různou schopnost příjmu těchto živin (González-Gil et al. 1998).

Fyziologické projevy deficitu fosforu a exprese fosfatas jsou komplexní a proměnlivé v rámci druhů (González-Gil et al. 1998). Data z řasových kultur naznačují podstatné rozdíly mezi druhy ve výskytu, buněčně specifické aktivitě a způsobem regulace extracelulárních fosfatas (Healey & Hendzel 1979, Van Boekel & Veldhuis 1990, Lubián et al. 1992). Tyto vlastnosti enzymů možná vysvětlují částečně rozporné závěry z různých studií na extracelulárních fosfatasech a selhání aktivity fosfatase jako spolehlivého indikátoru deficitu fosforu ve vodní ekologii (Vrba et al. 1995).

Běžné enzymové metody ke stanovení nutričního statusu u fytoplanktonu měří pouze fosfataseovou aktivitu celého společenstva a nepřináší informace o jednotlivých druzích ani jednotlivých buňkách (González-Gil et al. 1998). První sezonní studie se substrátem ELFP byla provedena v roce 1998 (González-Gil et al.), pokusy s řasami v kultuře následovaly v roce 1999 (Dyhrman & Palenik) a v roce 2001 Rengefors provedl studii u jarního sladkovodního fytoplanktonu. Na rozdíl od fytoplanktonu, není mnoho známo o rozšíření fosfatase aktivity u bakterioplanktonních skupin v přírodních vodách (Nedoma & Vrba 2006), byť je známo již

dlouho, že jsou u bakterií fosfatasy přítomny; například Ammerman (1991) uvádí, že ve vodním sloupci oceánu bylo s bakteriemi přímo souvisejících 15–73% aktivity alkalických fosfatas z partikulované fáze.

Chróst (1991) předpokládá, že nízká fosfatasová aktivita je důsledkem represe syntézy fosfatas způsobené vysokým buněčným obsahem fosforu, nicméně Štrojsová et al. (2008) zjistili, že produkce extracelulárních fosfatas nebyla zcela inhibována či zastavena v prostředí obohaceném fosfátem, protože některé buňky fytoplanktonu vykazovaly aktivitu i potom. To je v souladu se zjištěním Vrby et al. (2009), že některé druhy řas produkují extracelulární fosfatasy i když není fosfor (v dostupné formě) vyčerpán.

Předpoklad, že vysoká fosfatasová aktivita by měla nastat při nízkém obsahu fosforu, který také vede k nízkému růstu, v prostředí (Nedoma & Vrba 2006), je v rozporu s poznatky z práce na aktivovaných kalech (Van Ommen Kloeke & Geesey 1999). Jedním z možných vysvětlení je konstitutivní tvorba enzymu.

Řada autorů (Kuo & Blumenthal 1961, Chróst & Albrecht 1986, Chróst & Overbeck 1987) uvádí, že syntéza alkalických fosfatas u mnoha bakterií, včetně vodních, je konstitutivní a nepotlačuje se zvýšením koncentrace P_i v prostředí.

Zatímco Smith & Kalff (1981) zaznamenali malý vliv změn ve složení společenstva na aktivitu alkalických fosfatas v kultuře, Hino (1988) a Olsson (1990) pozorovali, že fosfatasová aktivita byla závislá na druhovém složení fytoplanktonu v jezerech. Na Římově zjistili Vrba et al. (1995), že byla fosfatasová aktivita více ovlivněna nutričním stavem než druhovým složením či biomasou fytoplanktonu. Na druhou stranu, zaznamenali snížené aktivity pod pH 7,5 během píku fytoplanktonu, které byly podobné základním *in situ* hodnotám měřeným před a po jarním maximu fytoplanktonu. Vrba et al. (1995) se shodují s obecným názorem (např. Jansson et al. 1988) a naznačují, že i na Římově byla základní, na pH nezávislá (nad pH 6,5) konstantní fosfatasová aktivita, jež byla konstitutivní – možná kyselé fosfatasy – zatímco zvýšená aktivita alkalických fosfatas se vyskytovala pouze za deficitu fosforu (Nedoma et al. 1993, Vrba et al. 1993) Dalšími závěry experimentů Vrby et al. (1995) je zjištění, že aktivita římovských alkalických fosfatas byla pravděpodobně indukována anebo dereprimována (Jones 1972, Chróst & Overbeck 1987, Jansson et al. 1988) jako odpověď na změny v okolních koncentracích org. a anorg. P, což by mohlo vysvětlit pozorované vztahy – nesporný vztah mezi fosfatasovou aktivitou a ostatními parametry fosforového deficitu a problematický vztah mezi aktivitou fosfatas a biomasou fytoplanktonu.

González-Gil et al. (1998) prokázali, že dva ze tří rodů zkoumaných ve studii syntetizovaly alkalické fosfatasy, když byly kultivovány v obou typech médií (anorg. i org.) za podmínek limitace fosforem. Jen buňky (fytoplanktonu) rostoucí v nízkých koncentracích

fosfátu ukázaly jasný zelený fluorescenční signál ELFA. Autoři dodávají, že tento signál byl vždy pozorován u nedostatkem fosforu trpících („vyhladovělých“) buněk u řas *Amphidinium* sp. a *Isochrysis galbana*, zatímco u třetí sledované, *Alexandrium fundyense* jen během pozdní stacionární fáze. Domnívají se, že *Alexandrium fundyense* má alkalické fosfatasy či jiné enzymy, které nereagovaly s užitými rozpustnými i nerozpustnými substráty za podmínek (zejména pH) užitých v jejich experimentech, protože kdyby buňky produkovaly fosfatasy jako odpověď na deficit fosforu, mohly by očekávat pozorování buněk s ELFA v populaci a fosfatasy by byly lokalizovány po okrajích. Vyslovili rovněž hypotézu, že jimi popsána pozorování souvisejí spíše s enzymatickým rozkladem odumírajících nebo mrtvých buněk než s hladověním po fosforu a tudíž tyto nejsou související s výživou fosforem.

Některé studie FLEA ze sladkovodního prostředí prokázaly, že fosfatasovou aktivitu vykazovaly ty druhy, které ve fytoplanktonu nebyly dominantní (Rengefors et al. 2001, Štrojsová et al. 2003). Podobně i Vrba et al. (2009) zjistili, že druhy označené ELFA tvořily jen malou část z celkového množství druhů ve fytoplanktonu zkoumaných čínských jezer.

Štrojsová et al. (2008) ve shodě s předcházejícími pracemi (např. Rivkin & Swift 1979, Wynne 1981, Boni et al. 1989) poukazují na fakt, že aktivita povrchově navázaných fosfatas u konkrétní populace řas může kolísat v rozmezí několika hodin. Proto navrhují, aby se vzorky na analýzu fosfatas odebíraly častěji a nebo používat metodu stanovení FLEA k hodnocení aktuální části (fosfatasově aktivních) druhů fytoplanktonu či bakterioplanktonu.

Studie o rozšíření, proměnlivosti a regulaci mikrobiálních extracelulárních enzymů sladkovodních ekosystémů může přispět ke zlepšení základních znalostí o mobilitě klíčových živin (Štrojsová 2001). K lepšímu porozumění role fosfatas vázaných na buněčný povrch ve výživě bakteriální buňky musejí být v budoucnu plně také objasněny vztahy mezi růstovou rychlostí rozdílných skupin bakterií a jejich fosfatasovými aktivitami (Nedoma & Vrba 2006). Specifická buněčná aktivita se může podstatně lišit mezi různými planktonními druhy a populacemi (Nedoma et al. 2003a) a pravděpodobně odráží jejich rozdílné živinové strategie a rozdílný nutriční stav (Nedoma & Vrba 2006).

Štrojsová (2001) zaznamenala nejen velkou variabilitu v produkci fosfatas pouze mezi různými druhy řas, ale také v rámci jedné populace (obdobně i Štrojsová & Vrba 2006). Ne všechny buňky populace byly označeny ELFA a také míra fluorescence ELFA byla různá. Způsob vysrážení ELFA byl také rozdílný – u některých druhů se vytvářely lineární struktury (*Ceratium hirundinella*, *Asterionella formosa*), u jiných tečky (*Anabaena mendotae*, *Pseudoanabaena* sp., *Peridinium* spp.), u *Ankyra ancora*, *Monoraphidium dybowskii* a *Chlorogonium fusiforme* došlo k vysrážení ELFA na celém povrchu buňky.

Nedoma & Vrba (2006) konstatují, že je těžké učinit detailnější závěry, pokud jde o regulaci bakteriální fosfatasové aktivity z provedených měření na šumavských jezerech, protože skupiny bakterií definovaných jejich morfologií a velikostí rozhodně nejsou homogenní a skládají se z mnoha genotypů možná s odlišnými způsoby regulace. Zahnuté buňky byly nepochybně nejvíce homogenní ze studovaných skupin. Možná byly tvořeny jedním či několika bakteriálními druhy. Zdá se, že právě tato morfologická skupina by mohla regulovat svou fosfatasovou aktivitu podle svého aktuálního živinového statusu a potřeb, které se asi liší od ostatních bakterií. Rozdílná přítomnost buněčně specifické aktivity fosfatas u různých skupin bakterioplanktonu by mohla mít významné ekologické důsledky, jež by naznačovaly možné rozdíly ve statusu fosforu, konkurenceschopnosti a poměrnou důležitost v regeneraci fosforu těmito skupinami.

Carlsson & Caron (2001) ve své práci zaměřené hlavně na živinovou limitaci sladkovodního bakterioplanktonu v malém dimiktickém jezeře Deep Pond (Massachusetts, USA) okrajově zabývali i aktivitou alkalických fosfatas za použití ELFP. Omezili se však pouze na kvalitativní měření fosfatasové aktivity provedené na úrovni jednotlivých buněk, přičemž většina aktivity byla pozorována na detritových agregátech obsahujících velký počet bakterií a na fytoplanktonních koloniích s přidruženými bakteriemi.

ELFA signál může být kvantifikován průtokovou cytometrií a může být použit pro druhy produkující významné množství fosfatas, když jsou stresovány nedostatkem fosforu, ke stanovení živinového stavu organismu (González-Gil et al. 1998). Ti dále podotýkají, že velmi důležitým aspektem je skutečnost, že ELFP (FLEA) reprezentuje metodu indikace deficitu v příjmu fosforu tím, že poskytuje ty samé informace, které mohou být získány užitím molekulárních sond a protilátek určených k detekci, například proteinů spojených s příjmem fosforu (Dyhrman & Palenik 1995).

Používání ELFP je vhodné pro fosfatasovou detekci stejně tak jako pro kvantifikaci její intenzity a to jak na úrovni celého vzorku, tak jednotlivých buněk. Před objevením se substrátu ELFP na trhu bylo možno druhově specifickou fosfatasovou aktivitu studovat pouze v řasových kulturách (Štrojsová 2001). ELFP má potenciál jako nástroj pro detekci vnitřních aktivit fosfatas v širokém výběru organismů a tkání. Zdroj fosfatasové aktivity ve vzorcích mořského a sladkovodního fytoplanktonu byl dříve těžko určitelný a nyní se může zkoumat na úrovni druhů, které organismy jsou zodpovědné za dříve udávanou celkovou aktivitu ve vodě (González-Gil et al. 1998).

ELFP je vhodný ke kvantifikaci pomocí obrazové cytometrie díky výtečné fotostabilitě a díky (nežádoucí) slabé nespecifické fluorescenci pozadí, jak to popsali Paragas et al. (1997) a Cox & Singer (1999). Buňky a tkáně mohou být zkoumány za užití ELFP

pomocí epifluorescenční (González-Gil et al. 1998) nebo konfokální (Dyhrman & Palenik 1999) mikroskopie nebo průtokovou cytometrií (Telford et al. 2001).

Štrojsová (2001) se ve své studii zaměřila na srovnání vlastností a aplikace při výzkumu fosfatasové aktivity a zjistila, že ELFP přináší oproti MUFP detailnější informace o deficitu fosforu ve společenství fytoplanktonu. Měla vždy vyšší výsledky fosfatasové aktivity při použití ELFP oproti MUFP (ikdyž González-Gil (1998) získal vyšší hodnoty standardní MUFP metodou oproti ELFP substrátu).

Nevýhodou tohoto substrátu je popsána skutečnost (Huang et al. 1992), že vznik intramolekulární vodíkové vazby na molekule ELFA, jež je zásadní pro její fluorescenci, je inhibována při $\text{pH} > 10$. Štrojsová (2001) uvádí, že lag u ELFA je dán existencí meziprojektu při enzymatické reakci přeměny ELFP na ELFA.

Dle Van Ommen Kloeke & Geesey (1999) nabízí kombinace jimi použitých technik, metod, barviv a substrátů (FISH a lokalizace specifické enzymatické aktivity) příležitost monitorovat specifických aktivit bakteriálních populací v komplexních mikrobiálních systémech a určit vliv různých podmínek prostředí na určité procesy a zároveň usnadnit identifikace rolí každé populace v mikrobiální komunitě a tím popsat diverzitu, strukturu a funkci mikrobiální populace v ekosystému.

8. Závěr

Fosfatasy byly studovány zejména u fytoplanktonu, u bakterií poměrně málo a není proto možné si zatím utvořit celkový obrázek. Jedním z hlavních problémů zůstává způsob oddělení bakterií od fytoplanktonu. Možností je selekce za pomoci velikostních frakcí, ta je ale nespolehlivá.

Určitým přínosem je metoda FLEA, která umožňuje studium fosfatas na úrovni jednotlivých buněk. Metoda je ale časově náročná, klade vysoké nároky na přístrojovou vybavenost a zůstává nedořešena metodicky.

V poslední době se často přistupuje k používání efektivnější průtokové cytometrie, u níž je potenciál zejména v kombinaci s dalšími metodami.

V praktické části jsem se seznámil se způsobem stanovení počtu bakterií, metodou FLEA a vyhodnocováním snímků pořízených na epifluorescenčním mikroskopu analýzou obrazu.

9. Citovaná literatura

- Ammerman JW (1991) Role of ecto-phosphohydrolases in phosphorus regeneration in estuarine ecosystems. In: Chróst RJ (ed) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer-Verlag, New York, p 165–186
- Ammerman JW, Azam F (1985) Bacterial 5'-nucleosidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* 227:1338–1340
- Ammerman JW, Azam F (1991a) Bacterial 5'- nucleotidase activity in estuarine and coastal marine waters: Characterization of enzyme activity. *Limnol Oceanogr* 36:1427–1436
- Ammerman JW, Azam F (1991b) Bacterial 5'- nucleotidase activity in estuarine and coastal marine waters: Role in phosphorus regeneration. *Limnol Oceanogr* 36:1437–1447
- Anderson DM, Kulis DM, Sullivan JJ, Hall S, Lee C (1990) Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp.. *Mar Biol* 104:511–524
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyerreil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of watercolumn microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Series* 10:257–263
- Bentzen E, Taylor WD (1991) Estimating organic P utilization by freshwater plankton using [³²P] ATP. *J Plankton Res* 13:1223–2338
- Berman T (1970) Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr* 15:663
- Birch PB, Spyridakis DE (1981) Nitrogen and phosphorus recycling in Lake Sammamish, a temperate mesotrophic lake. *Hydrobiologia* 80:129–138
- Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, Blackall LL (1995) Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol* 61:1910–1916
- Boni L, Carpena E, Wynne D, Reti M (1989) Alkaline phosphatase activity in *Protogonyaulax tamarensis*. *J Plankton Res* 11:879–885
- Brandes D, Elston RN (1956) An electron microscopical study of the histochemical localization of alkaline phosphatase in the cell wall of *Chlorella vulgaris*. *Nature* 177:274–275
- Bratbak G, Thingstad F (1985) Phytoplankton-bacteria interactions: An apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Mar Ecol Prog Ser* 25:23–30

- Cano RJ, Torres MJ, Klem RE, Palomares JC, Casadeus J (1992) Detection of salmonellas by DNA hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate. *J Appl Bacteriol* 72:393–399
- Carlsson P, Caron DA (2001) Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. *Limnol Oceanogr* 46:108–120
- Caron DA (1991) Evolving role of protozoa in aquatic nutrient cycles. In: Reid PC, Turley CM, Burkhill PH (eds) *Protozoa and their role in marine processes*. Springer-Verlag, New York, p 387–415
- Cembella AD, Antia NJ, Harrison PJ (1984) The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part I. *CRC Crit Rev Microbiol* 10:317–391
- Clark LL, Ingall EL, Benner R (1998) Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature* 393:426
- Cole JJ, Findlay S, Pace ML (1988) Bacterial production in freshwater and saltwater ecosystems: A cross system overview. *Mar Ecol Prog Ser* 43:1–10
- Cotner JBJr, Wetzel RG (1991) 5'-nucleotidase activity in a eutrophic lake and an oligotrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 57:1306–1312
- Cotner JBJr, Wetzel RG (1992) Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 37:232–243
- Cox WG, Singer VL (1999) A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J Histochem Cytochem* 47:1443–1456
- Currie DJ, Kalff J (1984) A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol Oceanogr* 29:298–310
- Droop MR (1973) Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J Phycol* 9:264–272
- Ducklow HW, Carlson CA (1992) Oceanic bacterial production. *Adv Microb Ecol* 12:113–181
- Duhamel S, Gregori G, Van Wambeke F, Nedoma J (2009) Detection of extracellular phosphatase activity at the single-cell level by Enzyme-Labelled Fluorescence and flow cytometry: The importance of time kinetics in ELFA labeling. *Cytometry* 75A:163–168
- Dyhrman ST, Palenik B (1995) Identification and characterization of a *Prorocentrum minimum* cell surface protein specifically induced under phosphorus limitation. *J Phycol* 31:6
- Dyhrman ST, Palenik B (1999) Phosphate stress in cultures and field populations of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Appl Environ Microbiol* 65:3205–3212

- Elser JJ, Stabler LB, Hassett RP (1995) Nutrient limitation of bacterial-growth and rates of bacterivory in lakes and oceans: a comparative study. *Aquat microb Ecol* 9:105–110
- Emberger O, Hejzlar M (1979) Obecná a speciální mikrobiologie I. Obecná bakteriologie. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 111 pp.
- Feuillade J, Feuillade M Blanc P (1990) Alkaline phosphatase activity fluctuations and associated factors in a eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens*. *Hydrobiologia* 207:233–240
- Fitzgerald GP, Nelson TC (1966) Extractive and enzymatic analyses for limiting or surplus phosphorus in algae. *J Phycol* 2:32–37
- Fogg GE (1975) Increase of phytoplankton in temperate waters in the spring. In: *Algal cultures and phytoplankton ecology*. The University of Wisconsin Press Ltd, Madison, p 84–105
- Fuhrman J, Noble RT (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol Oceanogr* 40:1236–1242
- Fuhs GW, Chen M (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb Ecol* 2:119–138
- Gage MA, Gorham E (1985) Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes. *Freshwater Biol* 15:227–233
- Goldman JC, Caron DA, Dennett MR (1987) Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C : N ratio. *Limnol Oceanogr* 32:2339–1252
- Goldman JC, McCarthy JJ, Peavey DG (1979) Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature* 279:210–215
- González-Gil S, Keafer BA, Jovine RVM, Aguilera A, Lu S, Anderson DM (1998) Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 164:21–35
- Gude H (1985) Occurrence of Cytophagas in sewage plants. *Appl Environ Microbiol* 39:756–763
- Haughland RP, Johnson ID (1993) Detecting enzymes in living cells using fluorogenic substrates. *J Fluoresc* 3:119–127
- Healey FP, Hendzel LL (1979) Fluorimetric measurement of alkaline phosphatase activity in algae. *Freshwat Biol* 9:429–439
- Healey FP, Hendzel LL (1980) Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Can J Fish Aquat Sci* 37:442

- Hernández I, Hwang S-J, Heath RT (1996) Measurement of phosphomonoesterase activity with radiolabelled glucose-6-phosphate. Role in the phosphorus requirement of phytoplankton and bacterioplankton in a temperate mesotrophic lake. *Arch Hydrobiol* 137:265–280
- Hill D, Summer GK, Waters MD (1968) An automated fluorimetric assay for alkaline phosphatase using 3-O-methylfluorescein phosphate. *Anal Biochem* 24:9–17
- Hino S (1988) Fluctuation of algal alkaline phosphatase activity and the possible mechanism of hydrolysis of dissolved organic phosphorus in Lake Barato. *Hydrobiologia* 157:77–84
- Hoch M, Kirchman DL (1993) Seasonal and inter-annual variability in bacterial production and biomass in temperate estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 98:283–295
- Hoppe H-G (1983) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrates. *Mar Ecol Prog Series* 11:299–308
- Horáková D, Němec M (2003) *Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií*. Masarykova univerzita v Brně, 65 pp.
- Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT, Friesler J (1966) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem* 9:447
- Huang Z, Olson NA, You W, Haughland RP (1992) A sensitive competitive ELISA for 2,4-dinitrophenol using 3,6-fluorescein diphosphate as a fluorogenic substrate. *J Immunol Methods* 149:261–266
- Huang Z, You W, Haughland RP, Paragas VB, Olson NA (1993) A novel fluorogenic substrate for detecting alkaline phosphatase activity *in situ*. *J Histochem Cytochem* 41:313–317
- Hudson JJ, Taylor WD, Schindler DW (2000) Phosphate concentrations in lakes. *Nature* 406:54–56
- Christensson M, Blackall LL, Welander T (1998) Metabolic transformations and characterization of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:226–234
- Chróst RJ (1991) Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: Chróst RJ (ed) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer-Verlag, New York, p 29–59
- Chróst RJ, Albrecht D (1986) A method for determining enzymatically hydrolyzable phosphate EHP in natural waters. *Limnol Oceanogr* 31:662–667

- Chróst RJ, Overbeck J (1987) Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in lake Plußsee (north German eutrophic lake). *Microb Ecol* 13:229–248
- Istvánovics V, Pettersson K, Pierson D, Bell R (1993) Evaluation of phosphorus deficiency indicators for summer phytoplankton in Lake Erken. *Limnol Oceanogr* 37:890–900
- Jackson GA, Williams PM (1985) Importance of dissolved organic nitrogen and phosphorus to biological nutrient cycling. *Deep Sea Res* 32:223–235
- Jansson M, Olsson H, Pettersson K (1988) Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170:157–175
- Jones JG (1972) Studies on freshwater micro-organisms; phosphatase activity in lakes of differing degrees of eutrophication. *J Ecol* 60:777–791
- Kopáček J, Hejzlar J, Borovec J, Porcal P, Kotorová I (2000) Phosphorus inactivation by aluminium in the water column and sediments: a process lowering in-lake phosphorus availability in acidified watershed-lake ecosystems. *Limnol Oceanogr* 45:212–225
- Kopáček J, Hejzlar J, Kaða J, Porcal P (2003) Photochemical, chemical, and biological transformations of dissolved organic carbon and its effect on alkalinity production in acidified lakes. *Limnol Oceanogr* 48:106–117
- Kopřivík B (1982) *Biologie vodních bakterií*. Univerzita Palackého v Olomouci
- Kuenzler EJ, Perras JP (1965) Phosphatases of marine algae. *Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole* 128:271–284
- Kuo M-H, Blumenthal HJ (1961) Absence of phosphatase repression by inorganic phosphate in some microorganisms. *Nature* 190:29–31
- La Roche J, Geider RJ, Graziano LM, Murray H, Lewis K (1993) Induction of specific proteins in eukaryotic algae grown under iron-, phosphorus-, or nitrogen-deficient conditions. *J Phycol* 29:767–777
- Larison KD, BreMiller R, Wells SK, Clements I, Haughland RP (1995) Use of new fluorogenic phosphatase substrate in immunohistochemical applications. *J Histochem Cytochem* 43:77–83
- Lean DRS, Abbott AA, Pick FR (1987) Phosphorus Deficiency of Lake Ontario Plankton. *Can J Fish Aquat Sci* 44:2069–2076
- Lemmer H, Roth D, Schade M (1994) Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge. *Wat Res* 28:1341–1346
- Lien T, Knutsen G (1973) Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: properties and regulation of repressible phosphatases. *Physiol Plant* 28:291–298

- Lubián BM, Blasco J, Establier R (1992) A comparative study of acid and alkaline phosphatase activities in several strains of *Nannochloris* (*Chlorophyceae*) and *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*). *Br Phycol J* 27:119–130
- Manz W, Amenn R, Ludwig W, Vancanney M, Schleifer K-H (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacterioides in the natural environment. *Microbiol* 142:1097–1106
- Manz W, Wagner M, Amann R, Schleifer K-H (1994) *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat Res* 28:1715–1723
- Matagne RF, Loppes R, Deltour R (1976) Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. *J Bacteriol* 126:937
- Messer G, Ben-Shaul Y (1969) Fine structure of *Peridinium westii*, a freshwater dinoflagellate. *J Protozool* 16:272–280
- Mlejnková H (2000) Výskyt fyziologických skupin bakterií v říční vodě a sedimentu. Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, Praha
- Model MA, Burkhardt JK (2001) A standard for calibration and shading correction of a fluorescence microscope. *Cytometry* 44:309–316
- Moller M, Myklestad S, Haug A (1975) Alkaline phosphatase of the marine diatoms *Chaetoceros affinis* vr. *willei* (Gran.) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J Exp Mar Biol Ecol* 19:217–226
- Morris DP, Lewis WMJr (1992) Nutrient limitation of bacterioplankton growth in Lake Dillon, Colorado. *Limnol oceanogr* 37:1179–1192
- Muda M, Rao NN, Torriani A (1992) Role of PhoU in phosphate-transport and alkaline-phosphatase regulation. *J Bacteriol* 174:8057–8064
- Nalewajko C, Lean DRS (1980) Phosphorus. In: Morris I (ed) *Studies in ecology*. Vol. 7, The physiological ecology of phytoplankton. University of California Press, Berkeley, p 235–258
- Nedoma J, Porcalová P, Komárková J, Vyhnálek V (1993) A seasonal study of phosphorus deficiency in a eutrophic reservoir. *Freshwat Biol* 30:369–376
- Nedoma J, Štrojsová A, Vrba J, Komárková J, Šimek K (2003a) Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: fluorescence quantification and labelling kinetics. *Environ Microbiol* 5:462–472
- Nedoma J, Vrba J (2006) Specific activity of cell-surface acid phosphatase in different bacterioplankton morphotypes in an acidified mountain lake. *Environ Microbiol* 8:1271–1279

- Nedoma J, Vrba J, Štrojsová A, Šimek K, Znachor P (2003b) Možnosti využití analýzy obrazu při vyhodnocování mikrobiální biomasy a aktivity ve vzorcích přirozených vod. *Acta Facultatis Ecologiae* 10, Suppl.1 (2003):59-61
- Němec M, Horáková D (2002) *Základy mikrobiologie pro učitelské studium*. Masarykova univerzita v Brně, 233 pp.
- Ochs CA, Cole JJ, Likens GE (1995) Population dynamics of bacterioplankton in an oligotrophic lake. *J Plankton Res* 17:365–391
- Olsson H (1990) Phosphatase activity in relation to phytoplankton composition and pH in Swedish lakes. *Freshwat Biol* 23:353–362
- Olsson H (1991) Phosphatase activity in an acid, limed Swedish lake. In: Chróst RJ (ed) *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. Springer-Verlag, New York, p 206–219
- Overbeck J (1962) Untersuchungen zum Phosphathaushalt von Grünalgen. II Die Verwertung von Pyrophosphat und organisch gebundenen Phosphaten und ihre Beziehung zu den Phosphatasen von *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Brep. *Arch Hydrobiol* 58:281–308
- Pace ML, Cole JJ (1996) Regulation of bacteria by resources and predation tested in whole-lake experiments. *Limnol Oceanogr* 41:1448–1460
- Paragas VB, Zhang YZ, Haughland RP, Singer VL (1997) The ELF-97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent signal amplification method for FISH. *J Histochem Cytochem* 45:345–357
- Pettersson K (1980) Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus-deficiency indicators in Lake Erken. *Arch Hydrobiol* 89:54–87
- Pettersson K (1985) The availability of phosphorus and the species composition of the spring phytoplankton in Lake Erken. *Int Rev Hydrobiol* 70:527–546
- Pike LF (1975) Aerobic bacteria. In: Curds CR, Hawkes HA (eds) *Ecological Aspects of Used Water Treatment*, Vol 1. Academic Press, London, p 1–63
- Pomeroy RL, Sheldon JE, Sheldon WMJr, Peters F (1995) Limits to growth and respiration in the Gulf of Mexico. *Mar Ecol Prog Ser* 117:259–268
- Proctor LM, Fuhrman JA (1992) Mortality of marine bacteria in response to enrichments of the virus size fraction from seawater. *Mar Ecol Prog Ser* 87:283–293
- Redfield AC, Ketchum B, Richards F (1963) The influence of organisms on the composition of seawater. In: Hill MN (ed) *The Sea*. Wiley, p 26–77
- Reid TW, Wilson IB (1971) *E. coli* alkaline phosphatase. In: Boyer P (ed) *The Enzymes*. Academic Press, New York, p 373–415

- Rengefors K, Pettersson K, Blenckner T, Anderson DM (2001) Species-specific alkaline phosphatase activity in freshwater spring phytoplankton: application of a novel method. *J Plankton Res* 23:435–443
- Rivkin RB, Anderson MRA (1997) Inorganic nutrient limitation of oceanic bacterioplankton. *Limnol Oceanogr.* 42:730–740
- Rivkin RB, Swift E (1979) Diel and vertical patterns of alkaline phosphatase activity in the dinoflagellate *Pyrocystis noctiluca*. *Limnol oceanogr* 24:107–116
- Rosypal S, Hoďák K, Martinec T, Kocur M (1981) *Obečná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 749 pp.
- Scavia D, Laird GA (1987) Bacterioplankton in Lake Michigan: Dynamics, controls, and significance to carbon flux. *Limnol Oceanogr* 32:1017–1033
- Schmitter RE, Jurkiewicz AJ (1981) Acid phosphatase localization in PAS-bodies of *Gonyaulax*. *J Cell Sci* 51:15–23
- Shiah F, Ducklow HW (1994) Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 103:297–308
- Smith REH, Kalff J (1981) The effect of phosphorus limitation on algal growth rates: evidence from alkaline phosphatase. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38:1421–1427
- Snaird J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer K-H (1997) Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 63:2884–2896
- Straškrabová V, Hartman P, Macek M, Nedoma J, Šimek K, Vrba J (1996) *Mikrobiální ekologie vody*. Ministerstvo životního prostředí České republiky
- Suttle CA, Fuhrman JA, Capone DG (1990) Rapid ammonium cycling and concentration-dependent partitioning of ammonium and phosphate: Implication for carbon transfer in planktonic communities. *Limnol Oceanogr* 35:424–433
- Štrojsová A (2001) Detection and quantification of extracellular phosphatases in natural phytoplankton. Master thesis, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, 64 pp.
- Štrojsová A, Nedoma J, Štrojsová M, Cao X, Vrba J (2008) The role of cell-surface-bound phosphatases in species competition within natural phytoplankton assemblage: an *in situ* experiment. *J Limnol* 67:128–138
- Štrojsová A, Vrba J, Nedoma J, Komárková J, Znachor P (2003) Seasonal study of extracellular phosphatase expression in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. *Eur J Phycol* 38:295–306

- Štrojsová A, Vrba J (2006) Phytoplankton extracellular phosphatases: Investigation using the ELF (Enzyme Labelled Fluorescence) Technique. *Pol J Ecol* 54:715-723
- Štrojsová A, Vrba J (2009) Short-term variation in extracellular phosphatase activity: possible limitations for diagnosis of nutrient status in particular algal populations. *Aquat Ecol* 43:19–25
- Tabor PS, Niehof RA (1985) Improved microautoradiographic method to determine individual microorganisms active in substrate uptake in natural waters. *Appl Environ Microbiol* 44:945–953
- Thingstad TF, Skjoldal EF, Bohne RA (1993) Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. *Mar Ecol Prog Ser* 99:239–259
- Telford WG, Cox WG, Singer VL (2001) Detection of endogenous and antibody-conjugated alkaline phosphatase with ELF-97 phosphate in multicolor flow cytometry applications. *Cytometry* 43:117–125
- Thomas WH (1970) On nitrogen deficiency in tropical Pacific oceanic phytoplankton: Photosynthetic parameters in poor and rich water. *Limnol Oceanogr* 15:386–394
- Topiwala H, Sinclair CG (1971) Temperature relationship in continuous culture. *Biotechnol Bioeng* 13:795–813
- Uchida T (1992) Alkaline phosphatase and nitrate reductase activities in *Prorocentrum micans*. *Bull Plankton Soc Jpn* 38:85–92
- Úlehlová B (1976) *Microbial Decomposers and Decomposition Processes in Wetlands*. Academia, Praha
- Vadstein O, Olsen Y (1989) Chemical composition and phosphate-uptake kinetics of limnetic bacterial communities cultured in chemostats under phosphorus limitation. *Limnol Oceanogr* 34:939–946
- Van Boekel WHM, Veldhuis MJW (1990) Regulation of alkaline phosphatase synthesis in *Phaeocystis* sp.. *Mar Ecol Prog Series* 61:281–289
- Van Niel EWJ, Appeldoorn KJ, Zehnder AJB, Kortstee GJJ (1998) Inhibition of anaerobic phosphate release by nitric oxide in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64:2925–2930
- Van Ommen Kloeke F, Geesey GG (1999) Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microb Ecol* 38:201–214
- Vodrážka Z, Rauch P, Káš J (1991) *Enzymologie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 245 pp.

- Vrba J, Cao X, Song Ch, Zhou Y, Štrojsová A, Znachor P, Zapomělová E (2009) Extracellular phosphatases produced by phytoplankton and other sources in shallow eutrophic lakes (Wuhan, China): taxon-specific versus bulk activity. *Limnology* 10:95–104
- Vrba J, Komárková J, Vyhnálek V (1993) Enhanced activity of alkaline phosphatases – phytoplankton response to epilimnetic phosphorus depletion. *Wat Sci Technol* 28:15–24
- Vrba J, Kopáček J, Fott J, Kohout L, Nedbalová L, Pražáková M, Soldán T, Schaumburg J (2003a): Long-term studies (1871-2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). *Sci Total Environ* 310:73–85.
- Vrba J, Kopáček J, Straškrabová V, Hejzlar J, Šimek K (1996) Limnological research of acidified lakes of the Šumava Mountains: trophic status and dominance of microbial foodwebs. *Silva Gabreta* 1:151–164
- Vrba J, Nedoma J, Kohout L, Kopáček J, Nedbalová L, Ráčková P, Šimek K (2003b): Massive occurrence of heterotrophic filaments in acidified lakes: seasonal dynamics and composition. *FEMS Microbiol Ecol* 46:281–294
- Vrba J, Nedoma J, Šimek K, Sed'a J (1992) Microbial decomposition of polymer organic matter related to plankton development in a reservoir: activity of α -, β -glucosidase, and β -N-acetylglucosaminidase and uptake of N-acetylglucosamine. *Arch Hydrobiol* 126:139–211
- Vrba J, Vyhnálek V, Hejzlar J, Nedoma J (1995) Comparison of phosphorus deficiency indices during a spring phytoplankton bloom in a eutrophic reservoir. *Freshwat Biol* 33:73–81
- Wetzel RG (2001) *Limnology. Lake and River Ecosystems*, 3rd edn. London: Academic Press
- Wynne D (1977) Alternations in activity of phosphatase during the *Peridinium* bloom in Lake Kinneret. *Physiol Plant* 40:219–224
- Wynne D (1981) The role of phosphatases in the metabolism of *Peridinium cinctum* from the lake Kinneret. *Hydrobiologia* 83:93–99