

**Diverzita epilitických mikroorganismů schopných
rozpouštění fosforu v suťových polích v povodích
Tatranských ples**

Bakalářská práce

Kateřina Pávková

Školitel: RNDr. Michal Choma, Ph.D.

České Budějovice 2023

Bakalářská práce

Pávková K., 2023: Diverzita epilithických mikroorganismů schopných rozpouštění fosforu v suťových polích v povodích Tatranských ples [Diversity of phosphate solubilizing epilithic microorganisms in catchment area of lakes in Tatra mountains. Bc. Thesis, in Czech] – p. 33 Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Bakalářská práce se zabývá bakteriemi žijícími na povrchu kamenů v povodí čtyř ples ve Vysokých Tatrách. Cílem práce bylo zjistit, jestli se na povrchu kamenů v povodí ples ve Vysokých Tatrách nachází bakterie schopné rozpouštět anorganické fosforečnany, uvolňovat do svého okolí rozpustné formy fosforu, a tak přispívat ke zvyšování koncentrace fosforu v plesech. Bakterie byly izolovány a následně inkubovány. Byla sledována jejich produkce organických kyselin, solubilizace nerozpustných forem fosforu a změna pH v médiu.

The bachelor's thesis focuses on bacteria living on the surface of stones in the catchments of four glacial lakes in the High Tatras. The aim of the work was to find out if bacteria capable of dissolving inorganic phosphates, releasing phosphorus into their surroundings, and thereby contributing to increasing the phosphorus concentrations in the lakes, are found on the surface of the stones in the lakes' catchments in the High Tatras. The bacteria were isolated and incubated. Their production of organic acids, phosphorus release and the change in pH in the medium were measured.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů

V Českých Budějovicích, dne 13. dubna 2023

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Michalu Chomovi za vedení této práce a za trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Katedry biologie ekosystémů, kteří se na laboratorní práci podíleli.

Obsah

Bakalářská práce	2
Anotace:	2
1. Úvod.....	1
2. Rešerše	2
2.1. Význam fosforu v ekosystémech a základní informace o cyklu fosforu.....	2
2.1.1. Příčiny limitace ekosystémů fosforem	2
2.1.2. Cyklus fosforu	3
2.2. Dostupnost fosforu pro organismy a co ji ovlivňuje	6
2.3. Změny v cyklu fosforu v jezerech ve Vysokých Tatrách.....	7
2.4. Epilithické mikroorganismy	8
2.5. Význam mikroorganismů ve zpřístupňování fosforu pro ekosystémy	9
2.6. Mechanismy, kterými mikroorganismy získávají fosfor z obtížně přístupných zdrojů	9
3. Materiály a metody.....	11
3.1. Lokality a odběr vzorků kamenů	11
3.2. Izolace bakterií	11
3.3. Detekce fosfor solubilizujících bakterií.....	11
3.4. Sekvence	12
3.4.1. Izolace DNA.....	12
3.4.2. PCR a sekvence DNA	13
3.4.3. Určení získaných bakterií do druhů podle sekvencí.....	14
3.5. Inkubace.....	14
3.6. Analýza vzorků.....	14
3.6.1. Měření pH	14
3.6.2. Měření obsahu kyselin	15
3.6.3. Měření obsahu fosforečnanů	15
3.7. Vyhodnocení výsledků měření	15

4.	Výsledky.....	15
4.1.	Výsledky izolace a sekvenace izolovaných bakterií.....	15
4.2.	Výsledky měření pH, obsahu fosforu a obsahu kyselin.	17
5.	Diskuse	20
6.	Závěr.....	22
	Seznam použitých zdrojů:	23

1. Úvod

Fosfor (P) je v ekosystémech klíčovým prvkem. Má nepostradatelnou roli ve všech živých organismech, ve kterých je součástí nukleových kyselin a buněčných membrán. Také je zcela nezastupitelný v energetickém metabolismu. V mnoha ekosystémech je fosfor nedostatkovým – limitujícím prvkem. Primárním vstupem fosforu do ekosystému je zvětrávání hornin obsahujících fosfor, zejména apatitu. Dalším, ale zpravidla méně důležitým zdrojem fosforu může být atmosferická depozice. Pro dostupnost fosforu je důležitá mineralizace z organických forem.

Limitace fosforem má zásadní vliv na fungování ekosystémů a může mít mnoho příčin. Těmito příčinami může být nízký obsah fosforu v matečné hornině, bariéry, které brání organismům dostat se k fosforu v matečné hornině nebo vazba fosforu v půdě na různé ionty nebo koloidní částice, které jej činí biologicky nevyužitelným. Pokud je limitace ekosystému fosforem narušena, může to změnit fungování celého ekosystému. V tomto ohledu jsou velmi citlivé zejména vodní ekosystémy.

Jezera ve Vysokých Tatrách byla v průběhu minulého století acidifikována antropogenními emisemi sloučenin dusíku a síry. Nyní se z acidifikace zotavují. Zároveň se v nich však zvyšuje obsah fosforu, což vede ke změnám v jejich fungování. Zvyšování obsahu fosforu může mít více příčin. Kvůli zvyšování pH acidifikovaných půd v okolí jezer se zároveň fosfor uvolňuje z iontů, na které se v průběhu acidifikace navázal vlivem nízkého pH. Další příčinou můžou být klimatická změna, která se ve Vysokých Tatrách projevuje zejména zvýšením průměrné teploty, změnou ročního průběhu a intenzity srážek a prodloužením vegetační sezóny.

Vyšší teplota zároveň ovlivňuje rychlost růstu organismů, které žijí v půdách v povodí jezer i na kamenech v suťových polích. Některé z těchto mikroorganismů jsou schopné anorganicky vázaný fosfor z kamenů i z částic v půdách rozpouštět a uvolňovat. Uvolněný fosfor se následně může splachovat do jezer.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznání o významu fosforu v ekosystémech, význam mikroorganismů, které ho rozpouštějí a mechanismy, kterými ho uvolňují a ověřit laboratorním experimentem, jestli se na kamenech v povodí horských ples ve Vysokých 2 Tatrách nacházejí organismy schopné fosfor rozpouštět, a zjistit, jak intenzivně a jakým způsobem dokážou solubilizovat nerozpustné formy fosforu.

2. Rešerše

2.1. Význam fosforu v ekosystémech a základní informace o cyklu fosforu

Fosfor má v ekosystémech klíčovou roli. V živých organismech je zcela nepostradatelným prvkem. Je součástí nukleových kyselin (DNA, RNA) a fosfolipidových buněčných membrán. Má nezastupitelnou roli i v energetickém metabolismu, kde je součástí ATP a dalších sloučenin důležitých při energetickém metabolismu (např. NADP^+ , NADPH). Některé organismy jsou schopné fosfor ukládat do zásoby uvnitř buněk ve formě zásobních polyfosfátů, které využívají v případě nedostatku fosforu ve svém okolí (Brady a Weil 2002; Madigan a Martinko 2006).

2.1.1. Příčiny limitace ekosystémů fosforem

Fosfor je v mnohých ekosystémech prvkem limitujícím růst rostlin a dalších organismů. Limitace fosforem může mít mnoho příčin: matečná hornina chudá na fosfor, matečná hornina, která zvětrává tak pomalu, že se organismy fosfor v ní nemohou využít, půdní bariéry, které organismům brání se k fosforu z matečné horniny dostat, případně fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, díky kterým se P v půdě vyskytuje převážně v biologicky nevyužitelných formách (Vitousek et al. 2010).

Pokud je matečná hornina chudá na fosfor, je nedostatek fosforu i v celém ekosystému (Soderberg a Compton 2007; Vitousek et al. 2010). Limitace fosforem může nastat také v případě, že matečná hornina je sice dostatečně bohatá na fosfor, ale organismy, které na ní žijí, ho nejsou schopné využít, protože hornina zvětrává příliš pomalu, nebo také v případech, že je ekosystém výrazně obohacen dusíkem, takže jím přestane být limitován a začne se projevovat limitace fosforem (Aerts, Wallen, a Malmer 1992; Vitousek et al. 2010). Dostupný fosfor se také může vázat na půdní částice, často na koloidní částice nebo se váže na oxidy a hydroxidy železa, hliníku a hořčíku nebo se váže na vápník, se kterým tvoří nerozpustné fosforečnany, takže se stane nedostupným pro organismy. (Brady a Weil 2002; Miller, Schuur, a Chadwick 2001; Thompson et al. 2006). Příjem fosforu organismy je také ovlivněn dostupností dalších prvků, zejména dusíku (Treseder a Vitousek 2001)

Limitace fosforem může nastat také v případě, že fosfor sice je obsažen v matečné hornině, ale je pro organismy nepřístupný, protože je např. pod vysokou hladinou podzemní vody, pod příliš silnou vrstvou nerozložené biomasy (např. rašeliniště) nebo pod trvale zmrzlou vrstvou půdy (tundra, oblasti s celoročně promrzající půdou) nebo pod silnou vrstvou zvětralé půdy, ze které

byl již všechen fosfor vyčerpán (např. tropické deštné lesy) (Kitayama et al. 1997; Vitousek et al. 2010). Ve vodních ekosystémech limitace fosforem nastává také proto, že částice obsahující fosfor mají tendenci sedimentovat na dně, a tím dochází k ochuzování horních vrstev vodního sloupce, ve kterých často žije většina organismů. Dočasná limitace může také nastat, když je všechen dostupný fosfor imobilizován v organismech (Brady a Weil 2002; Herbert et al. 2018; Vitousek et al. 2010).

V ekosystémech, které jsou fosforem dlouhodobě limitovány má tato limitace velký význam. Když se do těchto ekosystémů dostane velké množství fosforu a ekosystém jím přestane být limitován, dojde k eutrofizaci ekosystému, což má velký dopad na fungování celého ekosystému, který se tak může zcela změnit (Filippelli 2008; Schindler 1977; Vitousek et al. 2010). Tyto změny jsou významné zejména ve vodních ekosystémech, kde zvýšený obsah fosforu způsobuje zvýšený růst sinic, které v tu chvíli nejsou nijak limitovány, protože dusík dokážou fixovat z atmosféry. Biomasa sinic ve vodním sloupci snižuje dostupnost světla pro organismy žijící pod hladinou, což má velký dopad zejména na vodní rostliny, které při nedostatku světla růst nemohou. Navíc některé druhy sinic produkují toxiny nebezpečné pro mnohé živočichy. Později biomasa odumírajících sinic klesá na dno a jejich rozklad může z vody následně vyčerpat kyslík nutný pro život většiny vodních organismů. Eutrofizace je problémem nejen ve sladkých vodách, ale i v mořích, zejména v okolí ústí velkých řek a může postihnout i zdroje pitné vody (Filippelli 2002; Sharpley a Menzel 1987; Schindler 1977).

2.1.2. Cyklus fosforu

Největší část cyklu fosforu v terestrických ekosystémech probíhá v půdě. V půdě se fosfor nachází v organické nebo anorganické formě. Fosfor vázaný v organické hmotě tvoří zhruba 30–70 % z celkového množství fosforu v půdě, v závislosti na množství půdní organické hmoty, přičemž se zvyšujícím se stářím půdy se poměr organického a anorganického fosforu zvyšuje (Menezes-Blackburn et al. 2018; Šantrůčková et al. 2018; Turner et al. 2007). Anorganický fosfor se vyskytuje ve formě fosforečnanů, v kyselých půdách nejčastěji fosforečnanů železa a hliníku, v zásaditých nejčastěji fosforečnanů vápníku. Organicky vázaný fosfor tvoří nejčastěji inositol fosfáty a fosfátové estery, nukleové kyseliny a fosfolipidy (Brady a Weil 2002; McLaughlin et al. 2011; Smeck 1985). Pro organismy je dostupný pouze fosfor rozpuštěný v půdním roztoku. Ten tvoří fosforečnanové ionty případně malé rozpustné organické molekuly. Většina forem fosforu v půdě není příliš mobilní, proto se z ekosystémů ztrácí jen velmi pomalu. Pokud ale dojde ke změnám v cyklu fosforu (například zvýšené erozi),

ztráty z ekosystému se mohou zvýšit, což může ovlivnit další ekosystémy, zejména vodní (Brady a Weil 2002; Kishore, Pindi, a Ram Reddy 2015).

V půdním roztoku bývá fosfor rozpuštěný ve formě dihydrogenfosforečnanu (H_2PO_4^-), dále ve formě hydrogenfosforečnanu (HPO_4^{2-}) nebo i ve formě organických sloučenin, ze kterých ho ale rostliny přijímají jen v omezené míře. Dihydrogenfosforečnan je pro rostliny pravděpodobně o něco dostupnější než hydrogenfosforečnan. Dihydrogenfosforečnan převažuje v kyselých půdách, hydrogenfosforečnan v zásaditých, v půdách s neutrálním pH jsou významné obě formy (Brady a Weil 2002; Weihrauch a Opp 2018).

Primárním zdrojem fosforu v ekosystémech je zvětrávání hornin obsahujících fosfor, zejména apatitu, který se ve formě malých částic nachází ve většině hornin (Pastore, Kernchen, a Spohn 2020). Ty mohou obsahovat různé množství fosforu a také zvětrávají různou rychlostí. Rychlost zvětrávání je ovlivňována složením a vlastnostmi dané horniny, klimatickými podmínkami (vlhkostí, teplotou, množstvím srážek) i biologicky (kořeny rostlin, půdními mikroorganismy a jejich produkty), přičemž nejvyšší je ve vlhkých a teplých oblastech (Newman 1995; Šantrůčková et al. 2018). Zvětrávání může být fyzikální (způsobené větrem, tekoucí vodou, mrazem apod.), chemické (způsobené zejména látkami rozpuštěnými ve vodě, jako je např. CO_2 nebo organické i anorganické kyseliny) nebo biologické (způsobené živými organismy), které kombinuje fyzikální (např. rostoucí kořeny rostlin) i chemické (uvolňování různých metabolitů – kyselin, CO_2 apod.) vlivy (Newman 1995; Wu et al. 2013).

Dalším důležitým zdrojem fosforu dostupného pro organismy je dekompozice organické hmoty (Brady a Weil 2002). Fosfor (fosfátová skupina) může být z uhlíkových molekul v půdní organické hmotě poměrně snadno uvolněn, obvykle bývá vázán pomocí esterové vazby, která lze rozštěpit bez narušení uhlíkové části molekuly. Půdní mikroorganismy (i kořeny některých rostlin) produkují enzymy – fosfatázy, které tuto esterovou vazbu štěpí (Brady a Weil 2002; Menezes-Blackburn et al. 2018; Šantrůčková et al. 2018; Treseder a Vitousek 2001). Poté může být opět využit mikroorganismy nebo rostlinami. Recyklace fosforu má velký význam zejména v ekosystémech, kde je fosfor nedostatkovým (limitujícím) prvkem, například v mořských ekosystémech nebo v tropických deštných lesích (Brady a Weil 2002; Newman 1995).

V některých ekosystémech je důležitá i atmosférická depozice částic obsahujících fosfor. Ta je významným zdrojem zejména pro mořské ekosystémy, případně další ekosystémy, které jsou na fosfor extrémně chudé, např. tropické deštné lesy (Brady a Weil 2002; Filippelli 2008;

Herbert et al. 2018). V atmosféře se fosfor vyskytuje ve formě prachových částic nebo rozpuštěný v kapičkách vody, které se nachází v atmosféře (Newman 1995).

V cyklu fosforu hraje významnou roli i člověk, který fosfor do ekosystémů dodává hnojením polí fosfátovými hnojivy. Velká část fosforu z nich se ale okamžitě naváže na půdní částice a stane se tak nedostupnou pro rostliny (Rawat et al. 2021). Proto bývá na pole ve formě fosfátových hnojiv aplikováno více fosforu, než jsou pěstované rostliny schopny využít. Schopnost půdy vázat fosfor se po několika letech nadměrného hnojení nasýtí a jeho dostupnost pro rostliny se tak zvýší, ale zároveň se začne masivně uvolňovat zejména do vody. (Brady a Weil 2002; Olander a Vitousek 2004; Šantrůčková et al. 2018). Lidskou činností se také zvyšuje eroze, a to jak u zemědělských půd, tak v lesích po vykácení i v mnoha dalších antropogenně narušených půdách (Brady a Weil 2002; Sharpley a Menzel 1987). Člověk také často přetváří vodní režim krajiny, který významně ovlivňuje cyklus fosforu. Dalším antropogenním zdrojem fosforu jsou chovy hospodářských zvířat a odpadní vody, ze kterých se při nesprávném zacházení může fosfor i další látky (např. dusičnany, ale i třeba patogeny) dostávat do prostředí (Brady a Weil 2002).

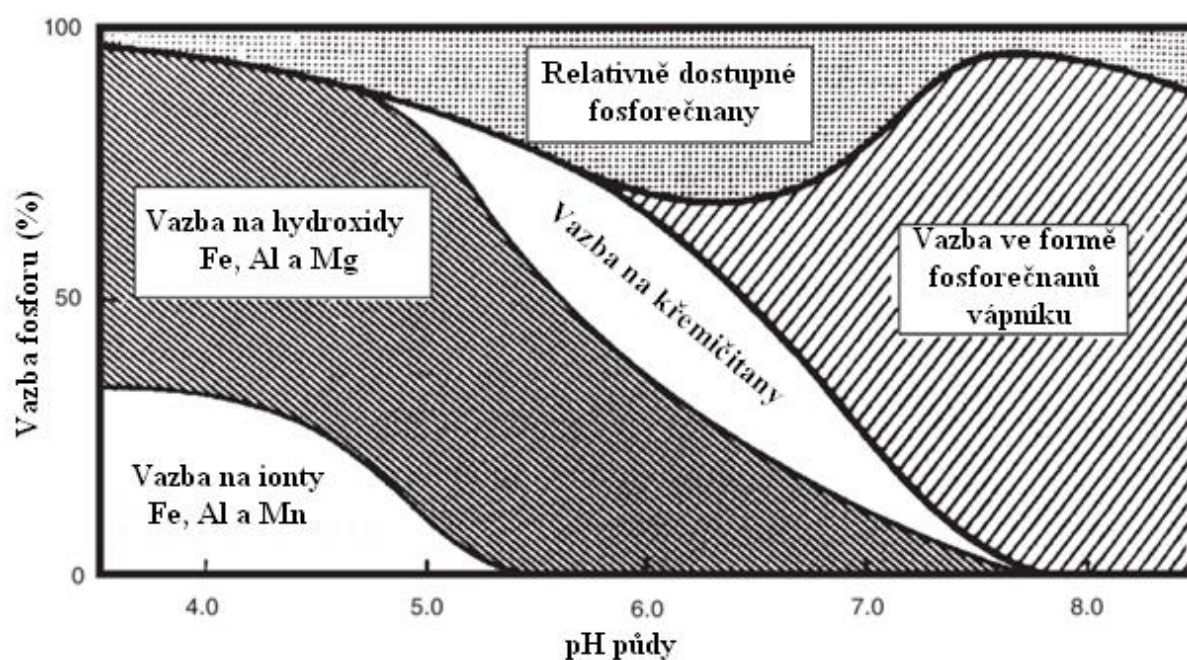
Z ekosystémů se fosfor ztrácí erozí pevných částic s navázaným fosforem (zejména z polí), vyplavováním rozpustné organické hmoty, na kterou je fosfor navázán, případně odstraněním biomasy, jejíž součástí fosfor je. Erozí se z půdy ztrácí převážně jemné jílové částice a částice organické hmoty, což jsou složky půdy, na kterých je vázána většina půdního fosforu (Brady a Weil 2002; Rhoton, Smeck, a Wilding 1979; Sharpley 1985; Sharpley a Menzel 1987). V půdě pak zůstávají větší, hrubší částice s nižším obsahem fosforu. V erodovaných částicích bývá dvakrát (i vícekrát) větší obsah fosforu než v původní půdě. Proto eroze hraje u mnohých zemědělských i jinak narušených půd (např. po požáru nebo vykácení lesa) velmi významnou roli při ztrátách fosforu (Brady a Weil 2002; Sharpley 1985).

Fosfor se může ztrácet z ekosystému i vyplavováním fosforu rozpuštěného v půdním roztoku, případně vázaného v rozpustné organické hmotě. To se však v přirozených ekosystémech děje jen výjimečně, protože fosfor je obvykle limitujícím prvkem (Brady a Weil 2002; Frossard et al. 2000; Šantrůčková et al. 2018).

2.2. Dostupnost fosforu pro organismy a co ji ovlivňuje

I když se fosfor v ekosystému nachází, ne vždy ho organismy dokážou přijmout a využít. Dostupnost fosforu pro organismy závisí na více faktorech. Rostliny jsou schopny využít jen fosfor rozpuštěný v půdním roztoku, kde je rozpuštěno pouze cca 0,1 – 1 % z celkového fosforu, který se v půdě nachází (Frossard et al. 2000; Rawat et al. 2021; Šantrůčková et al. 2018).

Dostupnost fosforu je nejvyšší při neutrálním nebo mírně kyselém pH (při pH 6–7). V zásaditých půdách se váže na vápník, se kterým tvoří nerozpustné fosforečnany, v kyselých tvoří nerozpustné fosforečnany železa, hliníku a manganu a také se váže na hydroxidy železa, hliníku a hořčíku (Obr. 1). Fosfor se také váže na jílové minerály, organickou hmotu a ionty dalších kovů, čímž je také imobilizován. (Barrow 1983; Brady a Weil 2002; Kishore et al. 2015; Rawat et al. 2021; Šantrůčková et al. 2018).



Obr. 1: Závislost vazby fosforu v půdě na pH půdy (Mcdowell 2005 upraveno)

Organismy (mikroorganismy i kořeny rostlin) jsou schopné dostupnost fosforu cíleně ovlivňovat. Kořeny rostlin ji ovlivňují prostřednictvím snížením pH v rhizosféře, produkcí CO_2 , organických kyselin a protonů i enzymů (Bünemann 2015). Některé rostliny dokážou produkovat i fosfatázy uvolňující fosfor z organické hmoty. Kromě toho dostupnosti fosforu přizpůsobují celkový tvar kořenů i celé rostliny (McGill a Cole 1981; Wu et al. 2013). V případě nedostatku fosforu rostlina zvětšuje povrch kořenového systému, kořeny jsou tenčí, delší,

rozvětvenější, rostlina zvětšuje velikost kořenů na úkor nadzemní biomasy. Dostupnost fosforu pro rostliny mohou zvyšovat i mykorhizní houby, které jsou schopné využít i fosfor vázaný ve sloučeninách, ze kterých by ho samotná rostlina nebyla schopná získat. Mykorhizní houby také zvyšují povrch kořene a tím i plochu, ze které kořen přijímá živiny (Brady a Weil 2002; Wu et al. 2013). Mikroorganismy dostupnost fosforu ovlivňují dekompozicí organické hmoty a jeho mineralizací, imobilizací uvnitř svých buněk a rozpouštěním anorganických forem fosforu (Brady a Weil 2002; Rawat et al. 2021; Šantrůčková et al. 2018).

2.2. Změny v cyklu fosforu v jezerech ve Vysokých Tatrách

Tatranská jezera představují ekosystémy s přirozeně nízkým obsahem fosforu (Kopáček et al. 2004). Fosfor je v nich hlavním limitujícím prvkem. Jezera, která mají vyšší dostupnost fosforu, mají i vyšší primární produkci (Kopáček et al. 2004). V jezerech se shromažďuje fosfor z celého povodí. Nejvýznamnějším zdrojem fosforu v povodí jsou půdy, které jsou poměrně mladé a bohaté na apatit, dále suťová pole a také atmosféra. V atmosféře se nachází fosfor z blízkých lokalit i ze vzdálených zdrojů (Kopáček et al. 2019).

Atmosférou se přenáší zejména hrubší organické i anorganické částice, které mohou být rozpustné i nerozpustné ve vodě. Podíl rozpustných forem fosforu (a tedy dostupných pro organismy) v částicích přenášených atmosférou představuje 2 – 80% (Kopáček et al. 2011; Mahowald et al. 2008). Vodou z povodí jezera se do jezera dostávají především rozpustné formy fosforu (Kopáček et al. 2011).

Od 90. let minulého století se obsah fosforu v jezerech zvyšuje (Kopáček et al. 2015). To má za následek eutrofizaci a zvyšování primární produkce v jezerech. Eutrofizace jezer je problémem nejen ve Vysokých Tatrách, ale i v dalších horských jezerech na severní polokouli (Camarero a Catalan 2012; Homyak, Sickman, a Melack 2014; Stoddard et al. 2016).

Příčin zvyšování obsahu živin v jezerech může být více. Jeden z důvodů je ten, že jezera i jejich povodí byla v minulosti výrazně acidifikována antropogenními depozicemi sloučenin dusíku a síry v atmosféře. Okyselení půdy způsobilo, že se fosfor v půdě více vázal na zejména hydroxidy i volné ionty hliníku a železa. Okyselení atmosféry může také způsobit rozpouštění ve vodě nerozpustných částic fosforu, které se v atmosféře nachází, což může zvýšit dostupnost fosforu z atmosféry pro organismy (Herbert et al. 2018). Od té doby, co se emise těchto sloučenin snížily, se začalo pH půd v povodí jezer zvyšovat. Díky tomu se navázaný fosfor začal uvolňovat a tím i více vyplavovat do jezer (Kopáček et al. 2015; Stoddard et al. 2016).

Další příčinou zvyšování obsahu fosforu mohou být atmosférické depozice fosforu (Camarero a Catalan 2012; Vicars, Sickman, a Ziemann 2010). Ty jsou ale ve střední Evropě poměrně stabilní, což znamená, že pravděpodobně nejsou příčinou zvyšujícího se obsahu fosforu v jezerech (Kopáček et al. 2015, 2019).

Další příčinou může být klimatická změna. Vyšší teplota způsobuje intenzivnější chemické procesy v půdě a tím urychluje zvětrávání (Riebe, Kirchner, a Finkel 2004; White et al. 1999). Klimatická změna způsobuje častější silné deště, které mohou vést k rychlejší erozi půdy, oteplování je příčinou delšího období bez sněhové pokrývky, která chrání povrch horniny před silnými výkyvy teplot. S tím souvisí i častější kolísání teplot okolo bodu mrazu, takže se ve štěrbinách horniny tvoří ledové krystaly, které ji poškozují a které jsou v průběhu kolísání teplot okolo bodu mrazu doplňovány zatékající vodou. Díky narušení horniny jsou častější sesuvy svahů a výraznější disturbance sutí pod svahy. To je také příčinou rychlejšího zvětrávání sutí (Kopáček et al. 2017; Millot et al. 2002; White et al. 1999). Rychlejší zvětrávání horniny způsobuje obnažování nezvětralého povrchu horniny, který často obsahuje částice apatitu, které jsou významným zdrojem fosforu (Kopáček et al. 2019).

V reakci na oteplování je pravděpodobný rychlejší metabolismus i růst mikroorganismů žijících v půdách i na kamenech v suťových polích. S tím může být spojena i rychlejší solubilizace fosforu mikroorganismy (Donhauser a Frey 2018; Frey et al. 2010; Kopáček et al. 2019; Wu et al. 2013).

2.2. Epilitické mikroorganismy

Na povrchu kamenů žijí specifická společenstva mikroorganismů, která jsou závislá na depozici živin z okolí, zejména prostřednictvím atmosférických depozic, případně prostřednictvím stékající vody. Oproti půdním organismům jsou vystaveny povětrnostním vlivům, vysychání, mrazu, intenzivnímu slunečnímu záření, výkyvům teplot a mnoha dalším vlivům proti kterým jsou organismy žijící v půdě chráněny. Často rostou pomalu a za nepříznivých podmínek tvoří spory, které jim je umožní přežít. Také tvoří nejrůznější ochranné látky – pigmenty chránící proti záření a extracelulární polymerní látky, které drží celé společenstvo mikroorganismů pohromadě, upevňují je k povrchu a napomáhají zachycování vlhkosti. Tato společenstva se skládají z mnoha různých organismů – žijí v nich bakterie, houby (lichenizované i nelichenizované), sinice i řasy, které spolu interagují. Mnohé z nich jsou vzájemně symbiotické. Některé z nich žijí i pod povrchem kamenů a interagují s těmi, co jsou na povrchu. Epilitické organismy zároveň mění povrch, na kterém žijí. Produkci CO_2 během respirace i

cíleným vylučováním kyselin okyselují povrch kamene, čímž ho naleptávají a tím získávají z horniny prvky, které potřebují k životu (např. fosfor, železo, mangan, hořčík i další prvky) (Breitenbach et al. 2022; Gorbushina 2007; Gorbushina a Broughton 2009)

2.3. Význam mikroorganismů ve zpřístupňování fosforu pro ekosystémy

Mikroorganismy hrají v ekosystémech zásadní roli ve zpřístupňování fosforu. Organicky vázaný fosfor uvolňují při dekompozici organické hmoty. Hrají klíčovou roli při jeho mineralizaci i imobilizaci (Bünemann, Prusisz, a Ehlers 2011; Kishore et al. 2015). Z organické hmoty je fosfor uvolňován prostřednictvím fosfatáz, které produkují především právě mikroorganismy, zejména bakterie, ale i houby, včetně některých mykorrhizních hub. Organismy schopné získávat fosfor z organické hmoty jsou významné zejména v ekosystémech limitovaných fosforem (Kishore et al. 2015; Šantrůčková et al. 2018).

Anorganické sloučeniny obsahující fosfor bývají jen velmi obtížně rozpustné. Mikroorganismy uvolňují fosfor mnohem účinněji než rostliny, a to jak z organické hmoty, tak anorganicky vázaný (Kishore et al. 2015; Zhu, Li, a Whelan 2018). Obsah fosforu v mikroorganismech je až 10x vyšší než v rostlinách. Rozpouštění anorganicky vázaného fosforu je pro mikroorganismy energeticky náročné, proto bývají v půdě s dostatkem fosforu potlačovány konkurenčně silnějšími a rychleji rostoucími druhy bakterií (Kishore et al. 2015; Šantrůčková et al. 2018).

2.4. Mechanismy, kterými mikroorganismy získávají fosfor z obtížně přístupných zdrojů

Půdní mikroorganismy jsou schopné zvyšovat dostupnost anorganicky vázaného fosforu. Z anorganických sloučenin ho získávají zejména pomocí produkce organických kyselin, protonů (H^+ iontů) a sideroforů, v menší míře i produkcí anorganických kyselin a exopolysacharidů (Kishore et al. 2015; Rawat et al. 2021).

Bakterie schopné solubilizace fosforu patří do mnoha různých nepříbuzných skupin. Studovány jsou obvykle jen ty, které jsou schopné kultivace v laboratorních podmínkách. Nejčastěji studovanými skupinami, do kterých patří druhy schopné solubilizace fosforu jsou: bakterie rodu *Rhizobium* (kmen Proteobacteria, třída Alphaproteobacteria) a jemu příbuzné rody, bakterie rodu *Pseudomonas* (kmen Proteobacteria, třída Gammaproteobacteria) a jemu příbuzné rody, bakterie rodu *Burkholderia* (kmen Proteobacteria, třída Betaproteobacteria), bakterie rodů *Bacillus* (kmen Firmicutes, třída Bacilli) a *Paenibacillus* (kmen Firmicutes, třída Bacilli) a jim

příbuzné rody a někteří zástupci čeledi Enterobacteriaceae (kmen Proteobacteria, třída Gammaproteobacteria) (Kämpfer 2007; Madigan a Martinko 2006; Maughan a Van der Auwera 2011).

Organické kyseliny zvyšují dostupnost fosforu snížením pH, což usnadňuje rozpouštění zejména fosforečnanu vápenatého (CaCO_3), dále navázáním kationtů, které se na fosfát vážou a výměnou aniontů kyselin za fosfátovou skupinu PO_4^{3-} . Organické kyseliny jsou produkovány pomocí fermentace nebo oxidace organických sloučenin, zejména glukózy. Nejčastěji jde o kyselinu glukonovou, 2-ketoglukonovou, citrónovou, šťavelovou, vinnou, mléčnou, jantarovou, propionovou, asparagovou, askorbovou, jablečnou, fytovou a mravenčí. Jedná se o malé, nízkomolekulární kyseliny, jejich řetězce mají maximálně šest atomů uhlíku (Chen et al. 2006; Kishore et al. 2015; Rawat et al. 2021; Wei et al. 2018). Produkce organických kyselin se mezi různými organismy liší, může se lišit i v rámci jednoho druhu bakterií a to i při stejných podmínkách kultivace (Chen et al. 2006).

Produkce H^+ iontů (protonů) snižuje pH půdního roztoku. Probíhá obvykle v případě, když zdrojem dusíku je amonný kation (NH_4^+). Ten se v buňce přemění na amoniak (NH_3), přičemž se uvolní H^+ (Gai 2016; Rawat et al. 2021; Zhu et al. 2018).

Siderofory slouží k navázání kationtů, zejména železa a jejich vyvázání z fosforečnanů. Navázané kationty se pak nemůžou vázat na fosfor. Mikroorganismy je používají nejen ke zvýšení dostupnosti fosforu, ale i k získávání železa při jeho nedostatku. Siderofory jsou produkovány nejen mikroorganismy ale i rostlinami (Rawat et al. 2021; Toscano-Verduzco et al. 2020).

Anorganické kyseliny snižují pH půdního roztoku a rozpouštějí fosforečnany s nižší účinností než organické kyseliny. Mikroorganismy využívají kyselinu chlorovodíkovou, dusičnou, sírovou a uhličitou. Acidofilní a síru oxidující bakterie produkují také sirovodík jako vedlejší produkt metabolismu. Sirovodík také dokáže vázat železitě kationty z fosforečnanu železitého, přičemž se uvolňuje fosforečnanový anion, který organismy dokážou využít (Rawat et al. 2021).

Exopolysacharidy jsou polymery sacharidů, které jsou schopné tvořit komplexy s kovovými ionty. Tím sniží jejich dostupnost pro vazbu na fosforečnan, a tak zvyšují dostupnost fosforu pro organismy (Rawat et al. 2021; Yi, Huang, a Ge 2008).

3. Stanovení hypotéz

Před provedením výzkumu byly stanoveny dvě hypotézy:

Hypotéza 1: Na kamenech v povodí jezer ve Vysokých Tatrách vyskytují bakterie schopné solubilizace fosforu.

Hypotéza 2: Tyto bakterie solubilizují fosfor pomocí produkce organických kyselin, které uvolňují do svého okolí.

4. Materiály a metody

2.3. Lokality a odběr vzorků kamenů

Vzorky byly odebrány ze suťových polí v povodí čtyř ledovcových ples ve Vysokých Tatrách. Jednalo se o Vyšné Wahlenbergovo (WV), Pusté (PU), Ľadové (LA) a Velké Hincovo (VH) pleso. Odběr byl proveden v září 2020. V rámci každého povodí byla vybrána tři suťová pole, na kterých byl odebrán směsný vzorek kamenů o maximálním nejdelším rozměru 5 cm z plochy 20 x 20 m. Odebrány byly pouze kameny bez viditelných nárostů mechů nebo lišejníků.

2.4. Izolace bakterií

Kameny byly vloženy do sterilní kádinky o objemu 1000 ml tak, že dosahovaly zhruba po rysku 500 ml. Poté byly zality 500 ml sterilního fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl). Efektivita izolace byla zvýšena sonikací po dobu 1 min a následným třepáním na horizontální třepačce po dobu 30 minut při 100 otáčkách za minutu. Z výluhu byly vytvořeny desítkové ředící řady v rozmezí koncentrací 10^{-1} – 10^{-3} ve třech opakováních pro každý výluh reprezentující jedno suťové pole.

2.5. Detekce fosfor solubilizujících bakterií

Pro detekci bakterií schopných solubilizace fosforu byl použit Pikovskaya (PKV) agar, který na 1 l obsahuje 10 g glukózy, 5 g fosforečnanu vápenatého ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 0,5 g síranu amonného ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0,2 g chloridu sodného (NaCl), 0,2 g chloridu draselného (KCl), 0,5 g kvasničného extraktu, 0,002 g síranu manganatého (MnSO_4), 0,002 g síranu železnatého (FeSO_4), 1000 ml vody a 15 g agaru. (Pikovskaya 1948). Agar se do média nepřidává, pokud potřebujeme médium tekuté. Princip metody spočívá v tom, že médium obsahuje fosfor pouze v nerozpustné formě – ve formě fosforečnanu vápenatého. Fosforečnan vápenatý způsobuje bílé zakalení agaru. Okolo kolonií bakterií, které ho umí rozpouštět, se vytvoří „clear zone“, tedy oblast, která zakalená není. Bakterie, které fosforečnan vápenatý rozpustit neumí, mají

problém na tomto médiu vyrůst, protože mají nedostatek fosforu a pokud vyrostou, „clear zone“ kolem sebe netvoří.

Kolonie, které kolem sebe vytvořily „clear zone“ byly přeneseny na nový PKV agar a vyčištěny pomocí křížového roztěru. Z těchto jednodruhových kolonií byly vytvořeny glycerolové konzervy, které byly uskladněny při -80°C do dalšího použití.

2.6. Sekvence

2.6.1. Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Ultra Clean Microbial Kit. Princip metody spočívá v postupném rozpuštění a rozložení buňky pomocí kombinace chemikálií a mechanického působení na BidBeateru. Buněčné komponenty se rozpustí a jsou poté od DNA odděleny pomocí centrifugace. DNA zůstane navázána na křemičité membráně, kde se promyje, aby v ní nezůstaly zbytky buněčných částí a chemikálií používaných k jejich rozkladu. Nakonec se DNA z membrány uvolní do zkumavky, kde je připravená k dalšímu použití (DNeasy UltraClean Microbial Kit Handbook).

Postup:

1. 1,8 ml mikrobiální kultury (pokud byla pěstována v tekutém médiu) dáme do mikrozkuavky a centrifugujeme po dobu 30 s rychlostí 10 000 x g. Některé typy kultur je nutné centrifugovat déle. Pomocí pipety odstraníme supernatant.
2. Buňky, které sedimentovaly na dně mikrozkuavky byly rozmíchány v 300 μl roztoku PowerBead Solution pomocí vortexu. Pokud byla kultura pěstována na pevném médiu, rovnou ji smícháme s tímto roztokem (bez centrifugace). Tento roztok zajišťuje rovnoměrnou distribuci mikrobiálních buněk v celém objemu.
3. Do zkumavek bylo přidáno 50 μl roztoku Solution SL. Tento roztok obsahuje látky, které způsobí lýzi buněk.
4. Vzorky byly následně vloženy na 30 s do mlýnku.
5. Vzorky byly centrifugovány po dobu 1 min rychlostí 13 000 x g. DNA zůstane v supernatantu a zbytky buněk sedimentují na dně.
6. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkuavky o objemu 2 ml.
7. K supernatantu bylo přidáno 100 μl roztoku Solution IRS. Směs byla promíchána na vortexu a pak inkubována při teplotě 4°C po dobu 5 minut.
8. Vzorky byly centrifugovány po dobu 1 minuty rychlostí 13 000 x g.

9. Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml. Supernatant obsahuje DNA, sediment zbytky buněk.
10. Do mikrozkušavek se supernatantem bylo přidáno 900 µl roztoku Solution SB a obsah mikrozkušavek byl promíchán na vortexu po dobu 5 s. Roztok Solution SB umožňuje navázání DNA na křemičitou membránu.
11. 700 µl této směsi bylo přeneseno na křemičitou membránu a následně centrifugováno po dobu 1 min rychlostí 13 000 x g. Poté byla slita tekutina, která se protékla membránou, na membránu byl přidán zbytek směsi. Vzorky byly znovu centrifugovány po dobu 1 min rychlostí 13 000 x g. Po slití tekutiny, která protékla membránou byly vzorky centrifugovány ještě jednou. Kapalina, která protékla, byla opět slita. Zbytky kapaliny na membráně byly vybrány mikropipetou. DNA se v tomto kroku naváže na membránu a odstraní se z ní většina přebytečné kapaliny.
12. Na membránu bylo přidáno 300 µl roztoku Solution CB a vzorky byly centrifugovány po dobu 30 s rychlostí 10 000 x g. Roztok Solution CB slouží k odstranění zbytků solí a dalších zbytkových látek z membrány.
13. Byla slita kapalina, která protékla membránou a vzorky byly znovu centrifugovány po dobu 1 minuty rychlostí 10 000 x g.
14. Membrána se vzorkem byla přenesena do nové mikrozkušavky o objemu 2 ml.
15. Na membránu bylo přidáno 50 µl roztoku Solution EB.
16. Vzorky byly centrifugovány rychlostí 13 000 x g po dobu 1 minuty. Roztok Solution EB slouží k uvolnění DNA navázané na membráně a jejímu vymytí z membrány.
17. Nakonec byla ze zkumavky odstraněna křemičitá membrána. DNA zůstala na dně zkumavky.
18. Koncentrace izolované DNA byla změřena na přístroji QUANTUS.

(Zdroj: DNeasy UltraClean Microbial Kit Handbook)(DN Easy b.r.)

2.6.2. PCR a sekvenace DNA

Ze získané genomové DNA byl za pomoci univerzálního páru primerů 9bfm a 1512uR amplifikován úsek DNA, který pokrývá podstatnou část genu pro 16S rRNA (Mühling et al. 2008). Program reakce byl následující: denaturace (95°C po dobu 3 min); následně 30 cyklů sestávajících z denaturace (95°C po dobu 3 min), nasedání primerů (52°C po dobu 1 min) a syntézy DNA (72°C po dobu 90 s). Program byl zakončen závěrečnou syntézou (72°C po dobu 10 min).

Úspěšnost PCR byla ověřena pomocí elektroforézy a výsledný produkt byl purifikován.

Purifikace slouží k získání čisté DNA po dokončení PCR. Slouží k vyčištění DNA od primerů, nukleotidů, polymerázy a dalších látek používaných při PCR reakci. K purifikaci byl použit QIAquick PCR purification KIT.

Úspěšnost purifikace byla opět ověřena elektroforézou. Amplikonová DNA byla sekvenována metodou Sangerova sekvenování externím dodavatelem (SEQme s. r. o.) Amplikony byly sekvenovány v dopředném i zpětném směru

2.6.3. Určení získaných bakterií do druhů podle sekvencí

Hrubá sekvenační data byla zpracována pomocí programu GeniousPrime. Spojením dvojic zpětných a dopředných sekvencí byly získány sekvence cílových ampliconů 16S rRNA genů. Ke každé unikátní sekvenci bylo přiřazeno taxonomické zařazení porovnáním s databází NCBI Nucleotide Collection (NCBI 1988) za použití BLAST algoritmu (Altschul et al. 1990) prostřednictvím webového rozhraní (BLAST b.r.)

2.7. Inkubace

Z glycerolových konzerv bylo přeneseno 100 µl do tekutého Nutrient agaru (na 1 l obsahuje: 5 g kaseinového peptonu, 2,5 g kvasničného extraktu a 1 g dextrózy) a kultivováno za stálého třepání 2 dny, změřena optická denzita při vlnové délce 600 nm a podle toho byly vzorky naředěny tak, aby optická denzita bakterií v médiu byla 0,6. Podle toho byly bakterie přeočkovány do PKV tekutého média tak, aby do média bylo zaočkováno vždy podobné množství bakterií. V PKV médiu byly bakterie pěstovány po dobu 7 dní při teplotě 25°C. S každou sérií vzorků byl inkubován i slepý vzorek (kontrola) – čisté sterilní médium, do kterého nebyly zaočkovány žádné bakterie.

2.8. Analýza vzorků

Po inkubaci byl ze vzorků (i kontrolních) odebrán podzvorek média pro potřeby měření obsahu kyselin, pak byly vzorky centrifugovány a bylo v nich změřeno pH. Poté byly vzorky filtrovány, zmrazeny a uskladněny. Nakonec v nich byl změřen obsah fosforečnanů.

2.8.1. Měření pH

pH bylo změřeno na pHmetru WTW pH 330i.

2.8.2. Měření obsahu kyselin

Vzorky byly upraveny pomocí acetonitrilu (1,5 ml vzorku a 1,5 ml acetonitrilu ve skleněné vialce), aby se vysrážely bílkoviny ze vzorku. Poté byly vzorky vortexovány a přefiltrovány. Poté bylo ke 400 µl přefiltrovaného vzorku přidáno 590 µl destilované vody a 10 µl interního standardu (kyselina fumarová o koncentraci 1 µg/ml)

Obsah kyselin byl změřen pomocí UHPLC/MS analýzy na chromatografu UHPLC Elute (Bruker), QTOF Compact (Bruker) v koloně Arion C18 Polar Plus (150 mm, 2,1 mm, 2,2 µm) při teplotě 30°C. Mobilní fáze se skládá z: 95% H₂O, 5% acetonitrilu, 0,04% kyseliny mravenčí. Bylo dávkováno 10 µl vzorku.

2.8.3. Měření obsahu fosforečnanů

Koncentrace rozpuštěných fosforečnanů byla měřena spektrofotometricky na analyzátoru FIA (Flow Injection Analyzer, Foss Tecator)

2.9. Vyhodnocení výsledků měření

Naměřené hodnoty obsahu fosforu, kyselin a pH ve vzorcích byly porovnány s naměřenými výsledky kontrol pomocí dvouvýběrového t-testu v programu R studio (R studio b.r.).

3. Výsledky

3.2. Výsledky izolace a sekvenace izolovaných bakterií

Celkem bylo nalezeno 52 izolátů, které byly podle podobnosti s referenčními sekvencemi přiřazeny k 28 taxonomickým jednotkám. Izoláty, které se lišily, i když byly přiřazeny do stejného druhu, byly odlišeny čísly. Jeden ze vzorků se osekvenovat nepodařilo. Výčet všech druhů a informace, ve kterém povodí se dané druhy nacházely, je uveden v Tabulce 1. Nejvíce kultivovaných vzorků bylo zařazeno do druhu *Caballeronia mineralivorans*, u kterého byly nalezeny 4 geneticky odlišné formy. Z těch byly tři nalezeny v povodí LA, dvě v povodí VW, jedna v povodí PU a jedna v povodí VH. Forma, která se nacházela v povodí Velkého Hincova plesa se nenacházela v žádném jiném. Nejvíce druhů bylo nalezeno v povodí PU, kde bylo nalezeno 12 druhů, z toho 9 nebylo nalezeno v žádném jiném povodí.

Pouze taxonomické jednotky *Caballeronia mineralivorans* a *Burkholderia* sp. se nacházely ve všech povodích současně, přičemž *Caballeronia mineralivorans* v povodí VH byla odlišná od

bakterií stejného druhu v ostatních povodích. *Burkholderia* sp. 4 se nacházela pouze v povodí PU a *Burkholderia* sp. 2 se nacházela pouze v povodí WV.

Tabulka 1: seznam druhů a jejich nálezy v jednotlivých povodích (WV – Vyšné Wahlenbergovo jezero, PU – Pusté jezero, LA – Ľadové jezero, VH – Velké Hincovo jezero)

Druh	%coverage	%ID	accession	VW	PU	LA	VH
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 1	100	100	MT555326.1	+	+	+	-
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 2	100	99.92	MT555326.1	+	-	+	-
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 3	100	99.3	MT555326.1	-	-	+	-
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 4	100	99.78	MT555326.1	-	-	-	+
uncultured bacterium 1	100	99.49	MT362452.1	+	-	-	-
uncultured bacterium 2	99	100	LC093150.1	-	+	-	-
uncultured bacterium 3	100	99.26	KX509287.1	-	+	-	-
uncultured bacterium 4	100	99.42	MT362452.1	-	+	-	-
uncultured bacterium 5	100	99.79	JQ678546.1	-	+	-	-
uncultured bacterium 6	100	100	LC093150.1	-	-	-	+
<i>Frondihabitans</i> sp. 1	95	99.85	MK135915.1	+	-	+	-
<i>Frondihabitans</i> sp. 2	95	99.77	MK135915.1	-	-	+	-
<i>Frondihabitans</i> sp. 3	100	100	HG796186.1	-	-	-	+
<i>Caballeronia udeis</i>	100	100	MK302235.1	+	+	-	-
<i>Burkholderia</i> sp. 1	100	100	KY681960.1	+	+	-	+
<i>Burkholderia</i> sp. 2	100	99.78	KY681960.1	+	-	-	-
<i>Burkholderia</i> sp. 3	100	99.93	KY681960.1	-	-	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. 4	100	100	KY681969.1	-	+	-	-
uncultured Burkholderiales bacterium 1	100	100	LC213287.1	+	-	-	+
uncultured Burkholderiales bacterium 2	100	100	LC213280.1	-	-	-	+
uncultured Burkholderiaceae bacterium	100	99.77	MT002698.1	-	+	-	-
<i>Kitasatospora mediocidica</i>	100	99.83	NR_112444.1	-	+	-	-
uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	100	100	KM656395.1	-	+	-	-
<i>Sphingomonas</i> sp.	100	100	CP037913.1	-	+	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	100	99.93	CP080597.1	-	-	+	-

<i>Pseudomonas sp. 2</i>	100	99.92	CP052856.1	-	-	+	-
<i>Pseudomonas sp. 3</i>	100	99.93	LC040881.1	-	-	+	-
Bez názvu	-	-	-	+	-	-	-

3.3. Výsledky měření pH, obsahu fosforu a obsahu kyselin.

Výsledky měření pH, obsahu kyselin a obsahu rozpuštěného fosforu pro jednotlivé druhy jsou uvedeny v Tabulce 2. Pouze pět vzorků průkazně nezvyšovalo obsah rozpuštěného fosforu v médiu. pH se oproti kontrolám v některých vzorcích nezměnilo, v některých se průkazně snížilo a některé vzorky ho průkazně zvyšovaly.

Rozsah pH ve vzorcích byl od 3,98 do 8,02, pH kontrol bylo v průměru 6,10.

Nejnižší pH bylo naměřeno u bakterie *Fronidhabitans sp. 3* nalezené v povodí Velkého Hincova plesa, která snížila pH na 3,98. Nejvyšší pH bylo naměřeno u uncultured Burkholderiaceae bacterium z povodí Pustého plesa, která zvyšovala pH média na 8,02. Koncentrace fosforu v médiu u tohoto vzorku byly nejnižší ze všech vzorků – 6,22 mg/l.

Koncentrace rozpuštěného fosforu se pohybovala od 6,22 mg/l do 553,3 mg/l koncentrace fosforu v kontrolách byl 9,86 mg/l.

Nejvíce fosforu rozpouštěl izolát *Pseudomonas sp. 2* nalezený v povodí Ladového plesa, který zvýšil koncentraci fosforu v médiu na 553,3 mg/l. Ten snižoval pH na 4,13.

Nejvíce vzorků produkovalo kyselinu citrónovou, kterou produkovalo 9 vzorků, nejméně vzorků produkovalo kyselinu jantarovou, jejíž obsah průkazně zvyšoval pouze jeden vzorek. Kyseliny jantarová a glukonová se v malém množství nacházely i v kontrolách, v některých vzorcích obsah těchto kyselin v médiu oproti kontrolám poklesl. Nejvíce různých kyselin produkoval jeden z izolátů zařazený jako *Fronidhabitans sp. 1*, který produkoval všechny měřené kyseliny s výjimkou kyseliny 2-ketoglukonové. Žádné z měřených kyselin nebyly zaznamenány u izolátů *Caballeronia mineralivorans 3* a 4, uncultured bacterium 5, *Burkholderia sp. 2, 3*, a 4, uncultured Burkholderiales bacterium 2, *Pseudomonas sp. 3* a u vzorku, který nebyl taxonomicky zařazen. Izolát uncultured bacterium 5 ovšem snížil pH média na 5,95 (neprůkazně) a zvýšil obsah fosforu v médiu na 100 mg/l.

Tabulka 2: výsledky inkubace a měření pH, obsahu kyselin a rozpuštěného fosforu (průměr ze vzorků náležících k danému izolátu a statistická odchylka). Žlutě jsou označeny vzorky, které se od kontrol ve vyhodnocení t-testu v dané charakteristice průkazně lišily ($p < 0,05$). Šedě jsou označeny izoláty, které byly inkubovány vícekrát a v některých opakováních se od kontrol průkazně lišily ($p < 0,05$) a v jiných ne.

Druh	pH	Kyselina 2-ketoglukonová (μl/ml)	Kyselina citrónová (μl/ml)	Kyselina glukonová (μl/ml)	Kyselin a mléčná (μl/ml)	Kyselin a jablečná (μl/ml)	Kyselina jantarová (μl/ml)	Fosfor (mg/l)
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 1	6.368 ± 0.268	0	0	0	0	0	0	78.6 ± 19.8
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 2	5.502 ± 0.851	1.54 ± 1.91	4.46 ± 4.91	0	56.9 ± 62.4	6.54 ± 7.87	11.955 ± 15.459	236 ± 198
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 3	6.03 ± 0.02	0	0	0	0	0	0	88.1 ± 3.51
<i>Caballeronia mineralivorans</i> 4	6.16 ± 0.078	0	0	0	0	0	0	60.6 ± 12.8
uncultured bacterium 1	4.533 ± 0.196	0	7.65 ± 1.94	1.30 ± 0.766	0	9.66 ± 6.47	23.319 ± 19.206	241 ± 18.6
uncultured bacterium 2	6.09 ± 0.017	0	4.31 ± 0.991	1.81 ± 0.653	0	0	0	81.667 ± 3.612
uncultured bacterium 3	4.933 ± 0.966	0.594 ± 1.030	0.983 ± 1.70	406 ± 557	0	3.69 ± 6.39	20.141 ± 12.799	115 ± 102
uncultured bacterium 4	4.31 ± 0.044	1.30 ± 1.13	5.11 ± 0.902	0	20.6 ± 17.97	3.578 ± 3.101	16.116 ± 7.179	261 ± 11.6
uncultured bacterium 5	5.95 ± 0.017	0	0	0	0	0	0	100 ± 3.16

uncultured bacterium 6	6.29 ± 0.009	0	9.36 ± 0.323	0	0	0	0	97.2 ± 2.01
<i>Frondihabitans</i> sp. 1	5.183 ± 1.118	0	4.97 ± 5.47	0.366 ± 0.896	28.1 ± 31.5	3.731 ± 4.147	8.411 ± 9.550	237 ± 170
<i>Frondihabitans</i> sp. 2	4.207 ± 0.021	4.252 ± 0.270	16.545 ± 6.010	17.463 ± 2.395	23.4 ± 1.97	0.00	0.00	260 ± 5.13
<i>Frondihabitans</i> sp. 3	3.983 ± 0.012	1.466 ± 0.038	0	6.633 ± 1.776	42.1 ± 1.49	4.854 ± 0.119	0	349 ± 8.89
<i>Caballeronia udeis</i>	6.37 ± 0.340	0	0	2.56 ± 7.68	0	0	0	48.0 ± 23.7
<i>Burkholderia</i> sp. 2	6.11 ± 0.040	0	0	0	0	0	0	58.0 ± 1.72
<i>Burkholderia</i> sp. 3	6.12 ± 0.080	0	0	0	0	0	0	72.1 ± 21.8
<i>Burkholderia</i> sp. 4	6.03 ± 0.021	0	0	0	0	0	0	85.0 ± 2.81
uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium 1	5.595 ± 0.787	36.796 ± 57.292	0	0	4.195 ± 6.863	3.590 ± 4.158	6.331 ± 7.556	189 ± 131
uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium 2	6.10 ± 0.021	0	0	0	0	0	0	79.267 ± 7.146
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium	8.02 ± 0.125	175.379 ± 151.922	6.067 ± 1.499	0.00	0.00	0.00	0.00	6.223 ± 1.789
<i>Kitasatospora mediocidica</i>	4.48 ± 0.086	0	12.780 ± 0.872	1.225 ± 0.103	0.00	11.2 ± 0.362	0.00	118 ± 5.196
uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	5.73 ± 1.51	1554.431 ± 1436.036	1.364 ± 1.208	3.143 ± 0.846	92.0 ± 159	2.080 ± 1.829	0	195.567 ± 250.202
<i>Sphingomonas</i> sp.	5.33 ± 0.097	0	0	0.433 ± 0.750	0	0	0	15.8 ± 4.693
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	3.90 ± 0.180	2931 ± 262	0	0	241 ± 71.3	0	0	438 ± 7.371

<i>Pseudomonas</i> sp. 2	4.13± 0.216	3884 ± 333	0	0	201 ± 14.4	0	0	553 ± 7.37
<i>Pseudomonas</i> sp. 3	6.27 ± 0.047	0	0	0	0	0	0	48.3 ± 6.01
Bez názvu	6.00±0.006	0	0	0	0	0	0	75.1 ± 5.10
Kontrola	6.10 ±0.108	0	0	1.74 ± 2.73	0	0	8.40±3.45	9.86±1.28

4. Diskuse

Izolace jednotlivých solubilizujících bakterií ze vzorků kamenů ze suťových polí sledovaných povodí Tatranských ples byla úspěšná.

Nejvíce izolátů bylo zařazeno do druhu *Caballeronia mineralivorans*. Bakterie tohoto rodu jsou známé jako bakterie schopné rozpouštět anorganické fosfáty již z dřívějších studií (Ndlovu et al. 2023; Noh et al. 2021). Izoláty zařazené do tohoto druhu kyseliny neprodukovaly, s výjimkou jednoho vzorku z povodí VW, který produkoval kyselinu mléčnou a citrónovou.

Čtyři z izolátů patřily do rodu *Pseudomonas*. Bakterie rodu *Pseudomonas* byly uváděny jako půdní bakterie se schopností rozpouštět fosfor již dříve (Buch, Archana, a Naresh Kumar 2008; Kishore et al. 2015; Miller et al. 2010; Noh et al. 2021; Zhao et al. 2014).

Další izoláty pařily do řádu Burkholderiales – 4 různé izoláty s názvem *Burkholderia* sp. 1 – 4, 2 různé izoláty s názvem uncultured *Burkholderiales* bacterium 1 a 2 a jeden s názvem uncultured *Burkholderiaceae* bacterium. Přestože jsou zástupci této skupiny často uváděni jako půdní mikroorganismy solubilizující fosforečnany (Kishore et al. 2015; Rawat et al. 2021; Zhao et al. 2014), ani jeden vzorek výrazně nesnižoval pH, ani nerozpouštěl fosforu více než ostatní izoláty. Vzorek uncultured *Burkholderiaceae* bacterium naopak pH média zvýšil na 8,02 a obsah fosforu v médiu byl u tohoto vzorku nejnižší ze všech vzorků.

Organické kyseliny jsou uváděny jako nejčastější způsob solubilizace fosfátů. Vzorky byly testovány na přítomnost kyseliny citrónové, glukonové, mléčné, jablečné, jantarové a 2-ketoglukonové, protože tyto kyseliny jsou produkovány nejčastěji. (Rawat et al. 2021).

Některé bakterie ale neprodukovaly žádné kyseliny ani nesnižovaly pH, přestože fosfor průkazně rozpouštěly, i když obvykle v menším množství než bakterie, které pH snižovaly.

Jeden z izolátů *Caballeronia mineralivorans* 1 průkazně zvyšoval pH na 6,61 (průměrné pH kontrol bylo 6,10), zároveň zvyšoval koncentraci fosforu v médiu na 101,1 mg/l a neprodukoval žádnou z měřených kyselin. Chen et al. (2006) a Sperber (1958) také zaznamenali solubilizaci P aniž by došlo k produkci kyselin nebo snížení pH. Je možné, že bakterie rozpouštěla fosfor nějakým jiným mechanismem než tvorbou kyselin, např. tvorbou sideroforů nebo exopolysacharidů (Rawat et al. 2021; Toscano-Verduzco et al. 2020; Yi et al. 2008), i když Toscano-Verduzco et al. (2020) zaznamenali tvorbu exopolysacharidů pouze za současné produkce organických kyselin a snížení pH média.

Izolát uncultured bacterium 5 snížil pH média na 5,95 (neprůkazně) a zvýšil obsah fosforu v médiu na 100 mg/l. Je možné, že produkoval jiné kyseliny, než které byly v médiu měřeny. Také mohl solubilizovat fosfor pomocí jiných mechanismů (exopolysacharidů nebo sideroforů) (Rawat et al. 2021).

U dvou vzorků *Pseudomonas* sp. 1 a *Pseudomonas* sp. 2 byla naměřena produkce kyseliny 2-ketoglukonové a u *Pseudomonas* sp. 1 ještě produkce kyseliny mléčné. *Pseudomonas* sp. 2 rozpouštěla ze všech izolátů nejvíce fosforu. Vzorky *Pseudomonas* sp. 3 a uncultured *Pseudomonas* sp. kyseliny neprodukovaly. Miller et al. (2010) uvádějí produkci kyseliny glukonové a kyseliny 2-ketoglukonové, o produkci kyseliny mléčné, která byla naměřena v jednom ze vzorků se nezmiňují. Žádný z izolátů kyselinu glukonovou neprodukoval.

Bakterie, které byly zařazeny do stejné taxonomické jednotky, a byly nalezeny opakovaně, byly inkubovány několikrát, pokaždé z jiného vzorku, aby byla zachycena variabilita v rámci taxonomických jednotek. Mezi jednotlivými vzorky jedné taxonomické jednotky byla zaznamenána poměrně velká variabilita. Jeden ze dvou izolátů *Frondihabitans* sp. 1 zvyšoval obsah fosforečnanů na 82,27 mg/l a pH média bylo 6,20, druhý izolát *Frondihabitans* sp. snížil pH média na 4,16 a zvýšil obsah fosforečnanů na 393 mg/l.

Byly izolované a osekvenované pouze bakterie, které byly schopné růst na agarovém Pikovskaya médiu při teplotě cca 25°C a to poměrně rychle rostoucí (takové, které byly schopné během jednoho týdne v těchto podmínkách vytvořit viditelné kolonie tvořící „clear zone“). Velká část epilitických bakterií však roste velmi pomalu, ty při takto krátké době inkubace ani nemohly být zaznamenány. Mnohé také potřebují specifické podmínky pro svůj růst (např.

přítomnost symbiontů), protože společenstva epilithických bakterií jsou velmi specifická a komplexní (Gorbushina 2007; Gorbushina a Broughton 2009).

5. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jestli se na kamenech v povodí ples ve Vysokých Tatrách nachází bakterie, které jsou schopné rozpouštět anorganické fosforečnany a uvolňovat do svého prostředí fosfor, a tak přispívat ke zvyšování obsahu fosforu v plesech.

Obě hypotézy byly potvrzeny, neboť výsledky inkubace a měření rozpuštěného fosforu v médiích potvrzují, že bakterie izolované z kamenů v povodí ples jsou schopné rozpouštět fosforečnan vápenatý pomocí organických kyselin. Ne vždy je však rozpouštění fosforečnanu spojeno s produkcí organických kyselin a poklesem pH v médiu, což je v souladu s výsledky předchozích výzkumů (Chen et al. 2006; Kim, McDonald, a Jordan 1997; Sperber 1958).

Byly inkubovány pouze rychle rostoucí bakterie, které tvoří jen malou část epilithických organismů. Proto by pro lepší pochopení diverzity těchto organismů bylo vhodné provést také dlouhodobější inkubační experiment s různým složením média a nastavením dalších podmínek.

Seznam použitých zdrojů:

Aerts, Rien, Bo Wallen, a Nils Malmer. 1992. „Growth-Limiting Nutrients in Sphagnum-Dominated Bogs Subject to Low and High Atmospheric Nitrogen Supply". *Journal of Ecology* 80(1):131–40. doi: 10.2307/2261070.

Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, a David J. Lipman. 1990. „Basic Local Alignment Search Tool". *Journal of Molecular Biology* 215(3):403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Barrow, N. J. 1983. „A Mechanistic Model for Describing the Sorption and Desorption of Phosphate by Soil". *Journal of Soil Science* 34(4):733–50. doi: 10.1111/j.1365-2389.1983.tb01068.x.

BLAST. b.r. „BLAST: Basic Local Alignment Search Tool". Získáno 6. duben 2023 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Brady, Nyle C., a Ray R. Weil. 2002. *The nature and properties of soils*. 13th ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall.

Breitenbach, Romy, Ruben Gerrits, Polina Dementyeva, Nicole Knabe, Julia Schumacher, Ines Feldmann, Jörg Radnik, Masahiro Ryo, a Anna A. Gorbushina. 2022. „The Role of Extracellular Polymeric Substances of Fungal Biofilms in Mineral Attachment and Weathering". *Npj Materials Degradation* 6(1):1–11. doi: 10.1038/s41529-022-00253-1.

Buch, Aditi, G. Archana, a G. Naresh Kumar. 2008. „Metabolic Channeling of Glucose towards Gluconate in Phosphate-Solubilizing *Pseudomonas Aeruginosa* P4 under Phosphorus Deficiency". *Research in Microbiology* 159(9):635–42. doi: 10.1016/j.resmic.2008.09.012.

Bünemann, Else K., Bartłomiej Prusisz, a Knut Ehlers. 2011. „Characterization of Phosphorus Forms in Soil Microorganisms". S. 37–57 in *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling, Soil Biology*, editoval E. Bünemann, A. Oberson, a E. Frossard. Berlin, Heidelberg: Springer.

Bünemann, Else Katrin. 2015. „Assessment of Gross and Net Mineralization Rates of Soil Organic Phosphorus – A Review". *Soil Biology and Biochemistry* 89:82–98. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.06.026.

Camarero, L., a J. Catalan. 2012. „Atmospheric Phosphorus Deposition May Cause Lakes to Revert from Phosphorus Limitation Back to Nitrogen Limitation". *Nature Communications* 3(1):1118. doi: 10.1038/ncomms2125.

DN Easy. b.r. „DNeasy UltraClean Microbial Kit Handbook - QIAGEN". Získáno 1. duben 2023 (<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=a733f3a9-5a8b-4003-b28e-55bb050bad1e&lang=en>).

Donhauser, Johanna, a Beat Frey. 2018. „Alpine soil microbial ecology in a changing world". *FEMS Microbiology Ecology* 94(9):fiy099. doi: 10.1093/femsec/fiy099.

Filippelli, Gabriel M. 2002. „The Global Phosphorus Cycle". *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 48(1):391–425. doi: 10.2138/rmg.2002.48.10.

Filippelli, Gabriel M. 2008. „The Global Phosphorus Cycle: Past, Present, and Future". *Elements* 4(2):89–95. doi: 10.2113/GSELEMENTS.4.2.89.

Frey, Beat, Stefan R. Rieder, Ivano Brunner, Michael Plötze, Stefan Koetzsch, Aleš Lapanje, Helmut Brandl, a Gerhard Furrer. 2010. „Weathering-Associated Bacteria from the Damma Glacier Forefield: Physiological Capabilities and Impact on Granite Dissolution". *Applied and Environmental Microbiology* 76(14):4788–96. doi: 10.1128/AEM.00657-10.

Frossard, E., L. M. Condron, A. Oberson, S. Sinaj, a J. C. Fardeau. 2000. „Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils". *Journal of Environmental Quality* 29(1):15–23. doi: 10.2134/jeq2000.00472425002900010003x.

Gaind, Sunita. 2016. „Phosphate Dissolving Fungi: Mechanism and Application in Alleviation of Salt Stress in Wheat". *Microbiological Research* 193:94–102. doi: 10.1016/j.micres.2016.09.005.

Gorbushina, Anna A. 2007. „Life on the Rocks". *Environmental Microbiology* 9(7):1613–31. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x.

Gorbushina, Anna A., a William J. Broughton. 2009. „Microbiology of the Atmosphere-Rock Interface: How Biological Interactions and Physical Stresses Modulate a Sophisticated

Microbial Ecosystem". *Annual Review of Microbiology* 63(1):431–50. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073349.

Herbert, R. J., M. D. Krom, K. S. Carslaw, A. Stockdale, R. J. G. Mortimer, L. G. Benning, K. Pringle, a J. Browse. 2018. „The Effect of Atmospheric Acid Processing on the Global Deposition of Bioavailable Phosphorus From Dust". *Global Biogeochemical Cycles* 32(9):1367–85. doi: 10.1029/2018GB005880.

Homyak, Peter M., James O. Sickman, a John M. Melack. 2014. „Pools, Transformations, and Sources of P in High-Elevation Soils: Implications for Nutrient Transfer to Sierra Nevada Lakes". *Geoderma* 217–218:65–73. doi: 10.1016/j.geoderma.2013.11.003.

Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. A. Lai, a C. C. Young. 2006. „Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities". *Applied Soil Ecology* 34(1):33–41. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.12.002.

Kämpfer, P. 2007. „Taxonomy of Phosphate Solublizing Bacteria". S. 101–6 in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Developments in Plant and Soil Sciences*, editoval E. Velázquez a C. Rodríguez-Barrueco. Dordrecht: Springer Netherlands.

Kim, K. Y., G. A. McDonald, a D. Jordan. 1997. „Solubilization of Hydroxyapatite by Enterobacter Agglomerans and Cloned Escherichia Coli in Culture Medium". *Biology and Fertility of Soils* 24(4):347–52. doi: 10.1007/s003740050256.

Kishore, N., Pavan K. Pindi, a S. Ram Reddy. 2015. „Phosphate-Solubilizing Microorganisms: A Critical Review". S. 307–33 in *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*, editoval B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, a K. V. Krishnamurthy. New Delhi: Springer India.

Kitayama, Kanehiro, Edward A. G. Schuur, Donald R. Drake, a Dieter Mueller-Dombois. 1997. „Fate of a Wet Montane Forest During Soil Ageing in Hawaii". *Journal of Ecology* 85(5):669–79. doi: 10.2307/2960537.

Kopáček, J., J. Kaňa, H. Šantrůčková, T. Pícek, a E. Stuchlík. 2004. „Chemical and Biochemical Characteristics of Alpine Soils in the Tatra Mountains and Their Correlation with Lake Water Quality". *Water, Air, and Soil Pollution* 153(1):307–28. doi: 10.1023/B:WATE.0000019948.23456.14.

Kopáček, Jiří, Josef Hejzlar, Jiří Kaňa, Stephen A. Norton, a Evžen Stuchlík. 2015. „Effects of Acidic Deposition on in-Lake Phosphorus Availability: A Lesson from Lakes Recovering from Acidification". *Environmental Science & Technology* 49(5):2895–2903. doi: 10.1021/es5058743.

Kopáček, Jiří, Josef Hejzlar, Jaroslav Vrba, a Evžen Stuchlík. 2011. „Phosphorus Loading of Mountain Lakes: Terrestrial Export and Atmospheric Deposition". *Limnology and Oceanography* 56(4):1343–54. doi: 10.4319/lo.2011.56.4.1343.

Kopáček, Jiří, Jiří Kaňa, Svetlana Bičárová, Janice Brahney, Tomáš Navrátil, Stephen A. Norton, Petr Porcal, a Evžen Stuchlík. 2019. „Climate Change Accelerates Recovery of the Tatra Mountain Lakes from Acidification and Increases Their Nutrient and Chlorophyll a Concentrations". *Aquatic Sciences* 81(4):70. doi: 10.1007/s00027-019-0667-7.

Kopáček, Jiří, Jiří Kaňa, Svetlana Bičárová, Ivan J. Fernandez, Josef Hejzlar, Marie Kahounová, Stephen A. Norton, a Evžen Stuchlík. 2017. „Climate Change Increasing Calcium and Magnesium Leaching from Granitic Alpine Catchments". *Environmental Science & Technology* 51(1):159–66. doi: 10.1021/acs.est.6b03575.

Madigan, Michael T., a John M. Martinko. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River: Pearson Education.

Mahowald, Natalie, Timothy D. Jickells, Alex R. Baker, Paulo Artaxo, Claudia R. Benitez-Nelson, Gilles Bergametti, Tami C. Bond, Ying Chen, David D. Cohen, Barak Herut, Nilgun Kubilay, Remi Losno, Chao Luo, Willy Maenhaut, Kenneth A. McGee, Gregory S. Okin, Ronald L. Siefert, a Seigen Tsukuda. 2008. „Global Distribution of Atmospheric Phosphorus Sources, Concentrations and Deposition Rates, and Anthropogenic Impacts". *Global Biogeochemical Cycles* 22(4). doi: 10.1029/2008GB003240.

Maughan, Heather, a Geraldine Van der Auwera. 2011. „Bacillus Taxonomy in the Genomic Era Finds Phenotypes to Be Essential Though Often Misleading". *Infection, Genetics and Evolution* 11(5):789–97. doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.001.

McGill, W. B., a C. V. Cole. 1981. „Comparative Aspects of Cycling of Organic C, N, S and P through Soil Organic Matter". *Geoderma* 26(4):267–86. doi: 10.1016/0016-7061(81)90024-0.

McLaughlin, Mike J., Therese M. McBeath, Ron Smernik, Sam P. Stacey, Babasola Ajiboye, a Chris Guppy. 2011. „The Chemical Nature of P Accumulation in Agricultural Soils—

Implications for Fertiliser Management and Design: An Australian Perspective". *Plant and Soil* 349(1):69–87. doi: 10.1007/s11104-011-0907-7.

Menezes-Blackburn, Daniel, Courtney Giles, Tegan Darch, Timothy S. George, Martin Blackwell, Marc Stutter, Charles Shand, David Lumsdon, Patricia Cooper, Renate Wendler, Lawrie Brown, Danilo S. Almeida, Catherine Wearing, Hao Zhang, a Philip M. Haygarth. 2018. „Opportunities for Mobilizing Recalcitrant Phosphorus from Agricultural Soils: A Review". *Plant and Soil* 427(1):5–16. doi: 10.1007/s11104-017-3362-2.

Miller, Aaron J., Edward A. G. Schuur, a Oliver A. Chadwick. 2001. „Redox Control of Phosphorus Pools in Hawaiian Montane Forest Soils". *Geoderma* 102(3):219–37. doi: 10.1016/S0016-7061(01)00016-7.

Miller, Simon H., Patrick Browne, Claire Prigent-Combaret, Emeline Combes-Meynet, John P. Morrissey, a Fergal O’Gara. 2010. „Biochemical and Genomic Comparison of Inorganic Phosphate Solubilization in *Pseudomonas* Species". *Environmental Microbiology Reports* 2(3):403–11. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x.

Millot, Romain, Jérôme Gaillardet, Bernard Dupré, a Claude Jean Allègre. 2002. „The Global Control of Silicate Weathering Rates and the Coupling with Physical Erosion: New Insights from Rivers of the Canadian Shield". *Earth and Planetary Science Letters* 196(1):83–98. doi: 10.1016/S0012-821X(01)00599-4.

NCBI, Nucleotide Collection. 1988. „Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information"; Získáno 6. duben 2023 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

Ndlovu, Siphelele, Terence N. Suinyuy, María A. Pérez-Fernández, a Anathi Magadlela. 2023. „Encephalartos Natalensis, Their Nutrient-Cycling Microbes and Enzymes: A Story of Successful Trade-Offs". *Plants* 12(5):1034. doi: 10.3390/plants12051034.

Newman, E. I. 1995. „Phosphorus Inputs to Terrestrial Ecosystems". *Journal of Ecology* 83(4):713–26. doi: 10.2307/2261638.

Noh, Hyun-Ju, Yerin Park, Soon Gyu Hong, a Yung Mi Lee. 2021. „Diversity and Physiological Characteristics of Antarctic Lichens-Associated Bacteria". *Microorganisms* 9(3):607. doi: 10.3390/microorganisms9030607.

Olander, Lydia P., a Peter M. Vitousek. 2004. „Biological and Geochemical Sinks for Phosphorus in Soil from a Wet Tropical Forest". *Ecosystems* 7(4):404–19. doi: 10.1007/s10021-004-0264-y.

Pastore, Giovanni, Sarmite Kernchen, a Marie Spohn. 2020. „Microbial Solubilization of Silicon and Phosphorus from Bedrock in Relation to Abundance of Phosphorus-Solubilizing Bacteria in Temperate Forest Soils". *Soil Biology and Biochemistry* 151:108050. doi: 10.1016/j.soilbio.2020.108050.

Pikovskaya, R. 1948. „Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species".

R studio. b.r. „R Studio". *Posit. Získáno* 6. duben 2023 (<http://www.rstudio.com/>).

Rawat, Pratibha, Sudeshna Das, Deepti Shankhdhar, a S. C. Shankhdhar. 2021. „Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake". *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21(1):49–68. doi: 10.1007/s42729-020-00342-7.

Rhoton, F. E., N. E. Smeck, a L. P. Wilding. 1979. „Preferential Clay Mineral Erosion from Watersheds in the Maumee River Basin". *Journal of Environmental Quality* 8(4):547–50. doi: 10.2134/jeq1979.00472425000800040021x.

Riebe, Clifford S., James W. Kirchner, a Robert C. Finkel. 2004. „Sharp Decrease in Long-Term Chemical Weathering Rates along an Altitudinal Transect". *Earth and Planetary Science Letters* 218(3):421–34. doi: 10.1016/S0012-821X(03)00673-3.

Sharpley, A. N. 1985. „The Selection Erosion of Plant Nutrients in Runoff". *Soil Science Society of America Journal* 49(6):1527–34. doi: 10.2136/sssaj1985.03615995004900060039x.

Sharpley, A. N., a R. G. Menzel. 1987. „The Impact of Soil and Fertilizer Phosphorus on the Environment". S. 297–324 in *Advances in Agronomy*. Roč. 41, editoval N. C. Brady. Academic Press.

Schindler, D. W. 1977. „Evolution of Phosphorus Limitation in Lakes | Science". 260–62. doi: <https://doi.org/10.1126/science.195.4275.260>.

Smeck, Neil E. 1985. „Phosphorus Dynamics in Soils and Landscapes". *Geoderma* 36(3):185–99. doi: 10.1016/0016-7061(85)90001-1.

Soderberg, Keir, a John S. Compton. 2007. „Dust as a Nutrient Source for Fynbos Ecosystems, South Africa". *Ecosystems* 10(4):550–61. doi: 10.1007/s10021-007-9032-0.

Sperber, J. I. 1958. „The Incidence of Apatite-Solubilizing Organisms in the Rhizosphere and Soil". *Australian Journal of Agricultural Research* 9(6):778–81. doi: 10.1071/ar9580778.

Stoddard, John L., John Van Sickle, Alan T. Herlihy, Janice Brahney, Steven Paulsen, David V. Peck, Richard Mitchell, a Amina I. Pollard. 2016. „Continental-Scale Increase in Lake and Stream Phosphorus: Are Oligotrophic Systems Disappearing in the United States?" *Environmental Science & Technology* 50(7):3409–15. doi: 10.1021/acs.est.5b05950.

Šantrůčková, Hana, Eva Kaštovská, Jiří Bárta, Ladislav Miko, a Karel Tajovský. 2018. *Ekologie půdy*. Vydání první. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Thompson, Aaron, Oliver A. Chadwick, Sarah Boman, a Jon Chorover. 2006. „Colloid Mobilization During Soil Iron Redox Oscillations". *Environmental Science & Technology* 40(18):5743–49. doi: 10.1021/es061203b.

Toscano-Verduzco, Felipe A., Pedro A. Cedeño-Valdivia, Wilberth Chan-Cupul, Hermina A. Hernández-Ortega, Esaú Ruiz-Sánchez, Edelmira Galindo-Velasco, a Elia Cruz-Crespo. 2020. „Phosphates solubilization, indol-3-acetic acid and siderophores production by *Beauveria brongniartii* and its effect on growth and fruit quality of *Capsicum chinense*". *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 95(2):235–46. doi: 10.1080/14620316.2019.1662737.

Treseder, Kathleen K., a Peter M. Vitousek. 2001. „Effects of Soil Nutrient Availability on Investment in Acquisition of N and P in Hawaiian Rain Forests". *Ecology* 82(4):946–54. doi: 10.1890/0012-9658(2001)082[0946:EOSNAO]2.0.CO;2.

Turner, Benjamin L., Leo M. Condon, Sarah J. Richardson, Duane A. Peltzer, a Victoria J. Allison. 2007. „Soil Organic Phosphorus Transformations During Pedogenesis". *Ecosystems* 10(7):1166–81. doi: 10.1007/s10021-007-9086-z.

Vicars, William C., James O. Sickman, a Paul J. Ziemann. 2010. „Atmospheric Phosphorus Deposition at a Montane Site: Size Distribution, Effects of Wildfire, and Ecological Implications". *Atmospheric Environment* 44(24):2813–21. doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.04.055.

Vitousek, Peter M., Stephen Porder, Benjamin Z. Houlton, a Oliver A. Chadwick. 2010. „Terrestrial Phosphorus Limitation: Mechanisms, Implications, and Nitrogen–Phosphorus Interactions". *Ecological Applications* 20(1):5–15. doi: 10.1890/08-0127.1.

Wei, Yuquan, Yue Zhao, Mingzi Shi, Zhenyu Cao, Qian Lu, Tianxue Yang, Yuying Fan, a Zimin Wei. 2018. „Effect of Organic Acids Production and Bacterial Community on the Possible Mechanism of Phosphorus Solubilization during Composting with Enriched Phosphate-Solubilizing Bacteria Inoculation". *Bioresource Technology* 247:190–99. doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.092.

Weihrauch, Christoph, a Christian Opp. 2018. „Ecologically Relevant Phosphorus Pools in Soils and Their Dynamics: The Story so Far". *Geoderma* 325:183–94. doi: 10.1016/j.geoderma.2018.02.047.

White, Art F., Alex E. Blum, Thomas D. Bullen, Davison V. Vivit, Marjorie Schulz, a John Fitzpatrick. 1999. „The Effect of Temperature on Experimental and Natural Chemical Weathering Rates of Granitoid Rocks". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(19):3277–91. doi: 10.1016/S0016-7037(99)00250-1.

Wu, Yan-hong, Jun Zhou, Dong Yu, Shou-qin Sun, Ji Luo, Hai-jian Bing, a Hong-yang Sun. 2013. „Phosphorus Biogeochemical Cycle Research in Mountainous Ecosystems". *Journal of Mountain Science* 10(1):43–53. doi: 10.1007/s11629-013-2386-1.

Yi, Yanmei, Weiyi Huang, a Ying Ge. 2008. „Exopolysaccharide: A Novel Important Factor in the Microbial Dissolution of Tricalcium Phosphate". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(7):1059–65. doi: 10.1007/s11274-007-9575-4.

Zhao, Ke, Petri Penttinen, Xiaoping Zhang, Xiaoling Ao, Maoke Liu, Xiumei Yu, a Qiang Chen. 2014. „Maize Rhizosphere in Sichuan, China, Hosts Plant Growth Promoting Burkholderia Cepacia with Phosphate Solubilizing and Antifungal Abilities". *Microbiological Research* 169(1):76–82. doi: 10.1016/j.micres.2013.07.003.

Zhu, Jing, Min Li, a Mick Whelan. 2018. „Phosphorus Activators Contribute to Legacy Phosphorus Availability in Agricultural Soils: A Review". *Science of The Total Environment* 612:522–37. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.095.

