

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Diverzita mikroorganismů rozpouštějících fosfor
v lučních a suťových půdách v povodích
Tatranských ples**

Diplomová práce

Bc. Sára Švehlová

Školitel: RNDr. Michal Choma, Ph.D.

České Budějovice 2024

Diplomová práce

Švehlová S., 2024: Diverzita mikroorganismů rozpouštějících fosfor v lučních a suťových půdách v povodích Tatranských ples [Diversity of phosphorus-solubilizing microorganisms in meadows and scree soils in the Tatra Mountains. Mgr. Thesis, in Czech] – p. 47, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this study was to assess diversity of phosphorus-solubilizing bacteria, in meadows and scree soils in the catchments of four glacial lakes in the High Tatras. The bacteria were isolated and incubated. Their production of organic acids, phosphorus release and change of pH in the medium were measured. Furthermore, the results were compared with a parallel study, which investigated phosphorus-solubilizing bacteria isolated from surfaces of stones from scree areas of the same sites.

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

V Českých Budějovicích, dne 11.4. 2024

Bc. Švehlová Sára

Ráda bych poděkovala mému školiteli RNDr. Michalu Chomovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a také za více trpělivosti, než bych si zasloužila. Dále patří můj dík kolegům z Pudní skupiny katedry Biologie Ekosystémů. V neposlední řadě děkuji mé rodině, přátelům a zejména mému partnerovi za podporu a trpělivost.

Obsah

1	Úvod	6
2	Literární rešerše	7
2.1	Půdní fosfor	7
2.2	Cyklus P v půdě.....	8
2.2.1	Zdroje P v půdě	8
2.2.2	Formy P v půdě	9
2.2.3	Biologické transformace P	10
2.3	Organické kyseliny	13
2.4	Změny v cyklu P v jezerech a povodích Tatranských ples	14
2.4.1	Změny cyklu P v lučních a suťových půdách v povodích Tatranských ples	16
3	Hypotézy	17
4	Materiály a metody	18
4.1	Lokality a odběr vzorků půd	18
4.2	Izolace bakterií	19
4.3	Detekce fosfor solubilizujících bakterií	19
4.3.1	Sekvence	20
4.3.1.1	PCR a sekvenace DNA	20
4.3.1.2	Určení získaných bakterií do druhů podle sekvencí	20
4.4	Inkubace	21
4.5	Analýza vzorků	21
4.5.1	Měření pH	21
4.5.2	Měření obsahu kyselin	21
4.5.3	Měření obsahu fosforečnanů	22
4.6	Vyhodnocení výsledků měření	22
5	Výsledky	23
5.1	Výsledky izolace a sekvenace izolovaných bakterií	23

5.2	Výsledky měření pH, obsahu fosforu a obsahu kyselin	23
5.3	Druhová diverzita izolovaných bakterií v povodích Tatranských ples	28
6	Diskuse	32
6.1	Izolace fosfor–solubilizujících bakterií	32
6.2	Solubilizace P pomocí produkce organických kyselin.....	33
6.3	Porovnání zkoumaných povodí	34
6.4	Porovnání výsledků z lučních a suťových půd.....	34
6.5	Porovnání výsledků se studií izolace fosfor–solubilizujících bakterií z kamenů.....	36
7	Závěr	38
8	Seznam použité literatury	39

1 Úvod

Fosfor je základní živinou pro všechny živé organismy, ve kterých je součástí nukleových kyselin a buněčných membrán. Také je zcela nezastupitelný v energetickém metabolismu. V půdě může fosfor existovat v organických a anorganických formách a jeho dostupnost pro organismy závisí na pH půdy, struktuře a mikrobiální aktivitě v půdě. Jezera ve Vysokých Tatrách jsou ekosystémy s přirozeně nízkým obsahem fosforu. Fosfor je v povodích těchto jezer hlavním limitujícím prvkem, ale v posledních dvou dekádách dochází k nárůstu jeho dostupnosti, což může mít za následek změnu chování celého ekosystému jezer.

Mechanismů, které mohou vést k pozorovaným zvýšeným koncentracím fosforu ve vodách tatranských jezer je několik. Ekosystémy ve Vysokých Tatrách byly v průběhu minulého století acidifikovány antropogenními emisemi sloučenin dusíku a síry a od té doby probíhá jejich zotavování. Fosfor se tak uvolňuje kvůli zvyšování pH acidifikovaných půd v okolí jezer z iontů, na které se v průběhu acidifikace navázal. Další příčinou může být klimatická změna, která se ve Vysokých Tatrách projevuje zejména zvýšením průměrné roční teploty, změnou roční distribuce srážek a snížením počtu dní se sněhovou pokrývkou, což podporuje zvětrávací procesy. Vyšší teplota vzduchu a půd také ovlivňuje růst a aktivitu mikroorganismů v půdách v povodí jezer.

Cílem diplomové práce je poskytnout přehled současného poznání v oblasti významu fosforu v ekosystémech, významu fosfor–solubilizujících mikroorganismů a jejich mechanismů, které vedou k uvolnění fosforu z minerálních sloučenin. Dalším cílem je ověření laboratorním experimentem, zda se v půdách v povodí jezer ve Vysokých Tatrách vyskytují fosfor–solubilizující organismy a jak se liší jejich druhová diverzita v lučních a suťových půdách. V neposlední řadě je cílem práce srovnat výsledky laboratorního experimentu s prací, která probíhala současně s touto, a která se zaměřovala na druhovou diverzitu bakterií z povrchu kamenů, odebraných z povodí jezer ve Vysokých Tatrách, a jejich schopnosti solubilizovat fosfor.

2 Literární rešerše

2.1 Půdní fosfor

Půda je nedílná součást terestrických ekosystémů a je výsledkem společného působení fyzikálních, chemických a biologických sil a procesů. Půda je komplexní a nesmírně složitý systém, ve kterém současně existuje mnoho mikroprostředí, lišící se v čase a prostoru, obývané různými druhy organismů. Jejich aktivita, především půdních mikroorganismů, je nezbytná pro plnění všech funkcí půdy, zejména pak fungování cyklů uhlíku, dusíku a fosforu (P), (Sylvia D. M., Fuhrmann J. J. and Hartel P. G., 1999).

Fosfor (P) je základní živinou pro všechny živé organismy, ve kterých je součástí nukleových kyselin a buněčných membrán. Také je zcela nezastupitelný v energetickém metabolismu. Podle Westheimera (1987) hraje P klíčovou roli v metabolismu tím, že poskytuje negativní náboj zúčastněným látkám. Tento negativní náboj pak pomáhá zabránit úniku těchto látek přes buněčnou membránu. Tímto způsobem P ovlivňuje procesy v buňkách, chrání integritu buněčných membrán a reguluje průchod látek dovnitř a ven z buněk. Zároveň dodává negativní náboj i buněčným polymerům a tím se znemožňuje vazba hydroxidů na tyto struktury a brání tak depolymerizaci (Ruttenberg, 2019; Sterner & Elser, 2002; Stevenson F. J., 1986).

V půdě může P existovat v organických a anorganických formách a jeho dostupnost pro organismy závisí na pH půdy, struktuře a mikrobiální aktivitě v půdě (viz. podkapitola Biologické transformace P). P je často limitujícím prvkem ve sladkovodních ekosystémech a v mořských ekosystémech. Některé typy půd, zejména tropické půdy, mohou také trpět nedostatkem P (Ruttenberg, 2019). P je také limitující v nově vznikajících nebo obnovovaných ekosystémech, což ovlivňuje jeho dostupnost pro rostliny a organismy (Brady & Weil, 2016; Stevenson F. J., 1986). Když se v těchto ekosystémech odstraní limitace P, má to velký dopad na fungování celého ekosystému, který se může zcela změnit (Stevenson F. J., 1986; Vitousek et al., 2010).

2.2 Cyklus P v půdě

2.2.1 Zdroje P v půdě

Primárním zdrojem P v ekosystémech je zvětrávání hornin obsahujících apatit, který se nachází ve většině hornin ve formě malých částic. Různé horniny obsahují různá množství P a zvětrávají různou rychlostí. Rychlost zvětrávání je ovlivněna složením horniny, klimatickými podmínkami a biologickými faktory, jako jsou kořeny rostlin, půdní mikroorganismy a jejich produkty. Nejvyšší rychlost zvětrávání je pozorována ve vlhkých a teplých oblastech (Coleman, Callahan and Crossley, 2017; Hana Šantrůčková *et al.*, 2018).

Zvětrávání může být fyzikální, chemické nebo biologické. Fyzikální zvětrávání je způsobeno větrem, tekoucí vodou, mrazem apod. K chemickému zvětrávání dochází působením látek rozpuštěných ve vodě, jako je například CO₂, organické i anorganické kyseliny. Biologické zvětrávání je způsobeno aktivitou živých organismů a kombinuje fyzikální a chemické faktory (Stevenson F. J., 1986; Brady N. C. and Weil R. R., 2002; Thomas Sims and Pierzynski, 2018).

Dekompozice organické hmoty je dalším důležitým zdrojem P dostupného pro organismy. P se může uvolnit z uhlíkatých molekul v půdní organické hmotě prostřednictvím enzymů zvaných fosfatázy, které rozštěpí esterovou vazbu, kterou je P vázán. Tímto způsobem uvolněný P může být znovu využit mikroorganismy nebo rostlinami. Recyklace P je zvláště důležitá v ekosystémech, kde je P limitujícím prvkem, například v mořských ekosystémech nebo v tropických deštných lesích (Newman, 1995).

Atmosférická depozice částic obsahujících P je také důležitým zdrojem P, zejména pro mořské ekosystémy a ekosystémy s extrémně nízkým obsahem P, jako jsou tropické deštné lesy (Brady & Weil, 2016).

2.2.2 Formy P v půdě

P je v půdě přítomný ve dvou základních formách – organické a minerální. Organický P je v půdě navázán zejména jako součást buněk živých organismů v nukleových kyselinách (DNA, RNA) a fosfolipidech v buněčných membránách. Do půdy se uvolňuje procesem dekompozice, kdy je organicky vázaný P uvolňován prostřednictvím enzymů fosfatáz (Hana Šantrůčková et al., 218 C.E.; Stevenson F. J., 1986). Anorganický P se vyskytuje ve formě fosforečnanů, v kyselých půdách nejčastěji fosforečnanů železa a hliníku, v zásaditých nejčastěji fosforečnanů vápníku. Pro organismy jsou obě tyto formy P ale dostupné jen jako rozpuštěný P ve formě fosforečnanových iontů, kterými jsou dihydrogenfosforečnan a hydrogenfosforečnan (Brady N. C. & Weil R. R., 2002; Cordell et al., 2009; Ruttenger, 2019; Stevenson F. J., 1986). P může být také fixován na jílové minerály, ze kterých je špatně dostupný pro půdní mikroorganismy (Barrow, 2015; Hana Šantrůčková et al., 2018).

Organická forma P je přítomna v biomase rostlin a živých organismů. A vedle toho, že je součástí nukleových kyselin a buněčných membrán, má také nepostradatelnou roli v energetickém metabolismu, kde je součástí ATP, NADP⁺ a NADPH. Některé organismy (například bakterie rodu *Acinetobacter*) jsou schopny P vázat do zásobních intercelulárních polyfosfátů, které využívají v případě nedostatku P v jejich okolí (Roewe et al., 2020). Organický P však není pro většinu organismů přímo dostupný, protože před jeho příjmem musí být mineralizován půdními mikroorganismy (viz. Zdroje P v půdě).

Minerální P je nejlépe dostupnou formou P pro organismy. Typicky je přítomen v půdách a ve vodě ve formě fosforečnanových iontů (PO_4^{3-}), ve formě dihydrogenfosforečnanu (H_2PO_4^-), dále ve formě hydrogenfosforečnanu (HPO_4^{2-}), které mohou být přijímány kořeny rostlin a jinými organismy buněčnými membránami. Dostupnost anorganického P však může být omezena v závislosti na typu půdy. Zejména je pak anorganický P omezen v půdách alkalických, vápenatých nebo s nízkým obsahem organické hmoty (Hana Šantrůčková et al., 218 C.E.; Stevenson F. J., 1986).

pH půdy je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících dostupnost P pro rostliny a další organismy. Kyselé prostředí vytváří podmínky pro přeměnu P do méně rozpustných forem, což snižuje jeho mobilitu a příjemnost pro rostliny. P se v půdním roztoku převážně vyskytuje ve formě aniontů H_2PO_4^-

(dihydrogenfosforečnan) a HPO_4^{2-} (hydrogenfosforečnan). V kyselém prostředí převažuje iont dihydrogenfosforečnan, který se snadno váže na oxidy železa (Fe) a hliníku (Al), které jsou v kyselých půdách často přítomny. Tato interakce vytváří fosforečnany s nízkou rozpustností, jako jsou železité a hlinité fosforečnany (Antoniadis et al., 2015; Barrow, 2015). Naopak v zásaditých půdách převažuje hydrogenfosforečnan, který může reagovat s vápníkem a vytvářet tak vápenaté fosfátové sloučeniny, které jsou také špatně rozpustné. Příklad takové sloučeniny je hydroxoapatit (Barrow, 2015; Hana Šantrůčková et al., 218 C.E.; Rawat et al., 2021; Spohn & Kuzyakov, 2013). Dostupnost P je tedy nejvyšší při neutrálním nebo mírně kyselém pH (při pH 6–7) (Barrow, 2015).

Mezi další faktory, které mohou ovlivnit dostupnost P pro organismy, patří přítomnost dalších živin, jako je dusík a draslík, a interakce mezi P a dalšími prvky v půdě. Pokud bude v půdním prostředí dostatek dusíku a draslíku, může to vyvolat větší konkurenci o P, což může vést až k jeho nedostatku z důvodu zrychleného příjmu rostlinami či mikroorganismy (George et al., 2016; Holtan et al., 1988; Thomas Sims & Pierzynski, 2018). P může být také fixován na jílové minerály, organickou hmotu a ionty dalších kovů, což může vést k jeho imobilizaci (Barrow, 2015; Rawat et al., 2021).

Dynamika dostupnosti P v půdním prostředí je tedy ovlivněna několika faktory a podmínkami. Zároveň je dostupnost P silně ovlivněna dynamikou a přítomností půdních mikroorganismů a rostlin.

2.2.3 Biologické transformace P

Dostupnost P v půdě je také významně ovlivněna řadou organismů, jako jsou rostliny nebo půdní mikroorganismy, kteří jsou zapojeni do cyklu P. Tyto organismy mohou buď zvyšovat nebo snižovat dostupnost P prostřednictvím různých procesů, včetně mineralizace, imobilizace a solubilizace. To zda organismy P v půdě mineralizují nebo imobilizují záleží především na obsahu organického P a dalších živin dostupných v půdním prostředí. Tento vztah je úzce spjat s ekologickou stechiometrií.

Poměr uhlíku a dusíku k P (C/N/P) v organickém materiálu hraje klíčovou roli v tom, jaký proces bude v půdě převládat. Vysoký poměr C/P může naznačovat, že organické látky jsou bohaté na uhlík a chudé na P, bude tedy docházet k imobilizaci (Stevenson F. J., 1986; Stevenson & Cole, 1999). Naopak pokud bude poměr C/P nízký,

bude docházet k mineralizaci P, protože organické látky budou bohaté na P a chudé na uhlík.

Procesy mineralizace a imobilizace P probíhají v půdě současně. To, zda dojde k mineralizaci (rozkladu) či k vazbě P do biomasy rostlin a mikroorganismů (imobilizaci), závisí především na obsahu P v rozkládajícím se organickém materiálu, (McGill and Cole, 1981). Zároveň faktory jako jsou pH, teplota a vlhkost půdy mají také vliv na střídání těchto dvou procesů. Půdní organismy mají specifické preference prostředí a tak se může stát, že za určitých podmínek preferují jednu aktivitu před tou druhou. Významnou roli ve střídání procesů mineralizace a imobilizace hraje také ekologická stechiometrie (Robert W. Sterner and James J. Elser, 2002). Celkově jsou interakce těchto faktorů klíčové pro dynamiku mineralizace organických sloučenin obsahujících P v půdě. Různé půdní podmínky mohou vést k rozdílným rychlostem a efektivitě tohoto procesu (Stevenson & Cole, 1999).

Kořeny rostlin jsou aktivními účastníky procesů ovlivňujících dostupnost P a tuto dostupnost ovlivňují pomocí snížení pH v rhizosféře, tvorbou CO₂, organických kyselin, protonů a enzymů (Bünemann 2015). Kromě toho se přizpůsobují dostupnosti P pomocí celkového tvaru kořenů i celé rostliny (McGill a Cole 1981; Wu et al. 2013). Při nedostatku P kořeny mohou změnit tvar a velikost svého kořenového systému – kořeny se stávají tenčími, delšími a větvenějšími na úkor nadzemní biomasy. Tato adaptace pomáhá rostlinám přežít v podmínkách, kde je P v půdě omezený. Rostliny mohou touto adaptací zvětšit plochu absorpce a zároveň mohou snadněji navázat symbiózní vztah s mykorrhizními houbami (George et al., 2016; McGill & Cole, 1981).

Mykorrhizní houby jsou schopny využívat P vázaný ve sloučeninách, z nichž by ho samotná rostlina nebyla schopna extrahovat. Tyto houby také rozšiřují povrch kořene, což zvyšuje efektivitu příjmu P rostlinou (Brady a Weil 2002; Wu et al. 2013).

Pokud dojde k uvolňování P z organického zásobníku (odumřelé části organismů), probíhá proces mineralizace. Rostliny a mikroorganismy mají schopnost produkovat enzymy fosfatázy, které štěpí fytyl, nukleové kyseliny nebo nukleoproteiny za současného uvolňování fosforečnanů (Paul and Clark, 1988; Ahmad *et al.*, 2019). Rostliny mohou reagovat na pokles koncentrace P v půdě tím, že samy vyloučí extracelulární fosfatázy, aby došlo k rychlejší a vyšší mineralizaci organických látek, a tedy navýšení koncentrace dostupného P v půdě. Některé látky (fosfolipidy, nukleové kyseliny) se rozkládají snadno, zatímco například inositolfosfáty jsou mineralizovány

pomalou. Fosforečnany, uvolněné mineralizací, mohou být přijímány buňkou a zabudovány do buněčných komponent (do nukleové kyselin, ATP, fosfolipidické membrány) – proces imobilizace (Arenberg & Arai, 2019; Zou et al., 1992).

Pokud se rozpustná forma P uvolňuje z minerální formy, probíhá proces solubilizace. Minerální sloučeniny obsahující P se často vyznačují svojí tendencí k nízké rozpustnosti. Mikroorganismy (zejména bakterie) ve srovnání s rostlinami projevují výrazně vyšší efektivitu při uvolňování anorganické formy P (Kishore et al. 2015; Zhu, Li a Whelan 2018). Existuje několik různých způsobů, kterými půdní mikroorganismy štěpí fosforečné materiály:

- 1) Uvolňování H^+ v důsledku příjmu kationů a produkce sideroforů.
- 2) Vznik chelátů Ca, Fe a Al reakcí s exopolysacharidy.
- 3) Produkce anorganických kyselin.
- 4) Produkce organických kyselin.

Mikroorganismy produkují protony (H^+ ionty) během svého metabolismu, což může snížit pH půdního roztoku a vést k solubilizaci P. Například v průběhu nitrifikace, kdy zdrojem dusíku je amonný kationt (NH_4^+), dochází k jeho přeměně na amoniak (NH_3) a v důsledku toho dojde k uvolnění H^+ (Jones & Oburger, 2011; Stevenson F. J., 1986). Tento uvolněný proton může mít za následek ovlivnění pH půdního roztoku (Hana Šantrůčková et al., 2018 C.E.; Rawat et al., 2021).

Siderofory jsou látky, které slouží k vázání kationtů, především železa, a odvádění těchto kationtů z fosforečnanů. Navázané kationty jsou poté nedostupné pro vazbu na P. Mikroorganismy je využívají nejen k zvyšování dostupnosti P, ale také k získávání železa v situacích, kdy je této živiny nedostatek. Siderofory jsou produkovány nejen mikroorganismy, ale i rostlinami (Cui et al., 2022; Jurkevitch et al., 1992).

Anorganické kyseliny působí na snižování pH půdního roztoku a rozpouštění fosforečnanů s menší efektivitou než organické kyseliny. Mikroorganismy využívají kyseliny, jako jsou chlorovodíková, dusičná, sírová a uhlíčitá. Bakterie s acidofilním a sírou oxidujícím charakterem také generují sirovodík jako vedlejší produkt svého metabolismu. Sirovodík je schopen vázat železité kationty z fosforečnanu železitého, což má za následek uvolnění fosforečnanového aniontu, který mohou organismy využít (Rawat et al. 2021).

Exopolysacharidy představují polymery sacharidů, které mohou vytvářet komplexy s kovovými ionty. Tímto způsobem omezují dostupnost těchto iontů

pro vazbu na fosforečnany, což v konečném důsledku zvyšuje dostupnost P pro organismy (Dar et al., 2021; Rawat et al., 2021; Turner et al., 2005).

Mikroorganismy jsou také schopny produkovat organické kyseliny, které snižují pH, což usnadňuje rozpouštění minerálních sloučenin P, zejména fosforečnanu vápenatého (CaCO_3). Organické kyseliny jsou také zapojeny do výměny aniontů v půdním prostředí a vznik těchto organických kyselin je spojen s fermentačními nebo oxidačními procesy organických sloučenin (Sylvia D. M., Fuhrmann J. J., and Hartel P. G., 1999; Harrold S. A. and Tabatabai M. A., 2006). Běžně se vyskytující organické kyseliny v půdě jsou: kyselina glukonová, 2-keto-glukonová, citronová, šťavelová, vinná, mléčná, jantarová, kyselina propionová, asparagová, kyselina askorbová, jablečná, kyselina fytoová a mravenčí (Adeleke et al., 2017; Jones et al., 2003). Tyto organické kyseliny jsou charakterizovány svou malou molekulární hmotností, kdy jejich molekulové řetězce obsahují maximálně šest uhlíkových atomů (Chen et al. 2006; Kishore et al. 2015; Rawat et al. 2021; Wei et al. 2018). Produkce těchto organických kyselin se liší mezi různými organismy a může se odlišovat i u jednoho bakteriálního druhu za obdobných podmínek kultivace (Chen et al. 2006).

2.3 Organické kyseliny

Půdní organické kyseliny (OA) jsou důležitou součástí celkové ekologie půdy zejména pro svou roli při detoxikaci kovů, napomáhání získávání živin kořeny rostlin a při solubilizaci minerálů, obsahující špatně dostupné půdní živiny (např. P) (Adeleke et al., 2017; Jones et al., 2003). Obecně se dají OA rozdělit do dvou skupin podle jejich molekulární hmotnosti. OA s vysokou molekulovou hmotností, které jsou velice špatně rozpustné a zcela nerozpustné ve vodě a OA s nízkou molekulovou hmotností, které jsou lépe rozpustné a mají obvykle jednu až tři karboxylové skupiny (Mimmo et al., 2008; Perminova et al., 2003). Mezi příklady OA s nízkou molekulovou hmotností patří: kyselina glukonová, 2-keto-glukonová, citronová, šťavelová, vinná, mléčná, jantarová, jablečná, propionová, mravenčí aj. (Adeleke et al., 2017).

Různé půdní mikroorganismy, zejména bakterie, produkují a uvolňují právě tyto organické kyseliny do půdního prostředí, zejména pro zpřístupnění špatně dostupných prvků – solubilizace (viz. Biologické transformace P). V posledních dvou desetiletích roste počet významných vědeckých studií, (Bonneville et al., 2011; Brucker et al., 2020;

Jain & Sharma, 2004; Marra et al., 2015; Pohlman & Mc Coll, 1986a; Saeid et al., 2018a; Seshadri et al., 2007; Sharma et al., 2013; Sverdrup, 2009), které potvrzují tento fakt a zabývají se jeho komplexní problematikou.

Rychlost a efektivita solubilizace P uvolňovaného právě díky produkovanými nízkomolekulárními OA závisí na několika faktorech. Podle (Pohlman & Mc Coll, 1986b) je jeden z takových faktorů fakt, že trikarboxylové a dikarboxylové kyseliny jsou často účinnější v solubilizaci než kyseliny monokarboxylové. V pořadí trikarboxylová > dikarboxylová > monokarboxylová. Další faktor, kterým se zabývá studie od (Marra et al., 2015), souvisí s pH půdního roztoku. Podle této studie pH významně ovlivňuje růst solubilizujících bakterií i biochemické procesy, které mikroorganismy provádějí, a tedy i celkové množství kyselin, které produkují. V neposlední řadě se rychlost a efektivita solubilizace P mění v závislosti na přítomnosti různých rodů solubilizujících bakterií v půdě (Adeleke et al., 2017).

Obecně se na solubilizaci podílí např. bakterie rodu: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus* a *Caballeronia*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* aj. V širším měřítku se jedná o bakterie z kmene Proteobakterie, Firmicutes, Pseudomonadota a Aktinobakterie. Bylo zjištěno, že jednotlivé rody bakterií produkují různé kyseliny, ale ne vždy je to pravidlem. Například ve studii od (Calvaruso et al., 2006) rod *Bacillus* produkoval směs kyseliny mléčné a octové. Avšak výsledky studie (Saeid et al., 2018a) ukazují, že rod *Bacillus* produkoval jak kyselinu mléčnou a octovou, tak zároveň i kyselinu glukonovou, jantarovou i propionovou. Tyto rozdílné výsledky lze vysvětlit různými podmínkami kultivace – pH média, doba růstu bakterií, teplota, atd. Například pokud se bakterie nechají kultivovat při vyšší teplotě, je pravděpodobné, že celý proces růstu a následné produkce organických kyselin bude urychlen.

2.4 Změny v cyklu P v jezerech a povodích Tatranských ples

Jezera ve Vysokých Tatrách jsou ekosystémy s přirozeně nízkým obsahem P (Kaňa et al., 2023; Kopáček et al., 2004). P je v těchto oblastech limitujícím prvkem a jezera, která mají vyšší dostupnost P se vyznačují i vyšší primární produkcí. P se shromažďuje v jezerech z celého povodí a jeho nevýznamnějším zdrojem jsou mladé půdy, které jsou bohaté na apatit, suťové půdy a atmosférické depozice (Kopáček et al.,

2004, 2019), které jsou významným zdrojem P zejména pro ekosystémy, které jsou na P extrémně chudé. P se v atmosféře vyskytuje rozpuštěný v kapičkách vody, nebo navázaný na prachové částice (Brady & Weil, 2016).

V posledních dvou dekádách dochází k zrychlenému uvolňování P ve Vysokých Tatrách z mnoha příčin. (Kopáček et al., 2015) ve své práci prezentuje výzkum nárůstu obsahu P v povodí Tatranských ples, který je úzce spojený s acidifikací těchto půd vlivem depozic sloučenin dusíku a síry a následného zotavování se z acidifikace, kterou bylo toto území na přelomu osmdesátých a devadesátých let minulého století postiženo (Stuchlík et al., 2006). Zároveň poukazuje na klimatické změny, které mohou být důvodem rapidního uvolňování P do půd.

(Kopáček et al., 2015) ve své práci uvádí, že se koncentrace P v jezerech zvyšuje už od 90. let minulého století. Její nárůst má za následek eutrofizaci a zvýšení primární produkce v jezerech (Kopáček et al., 2004, 2011, 2015). Příčin zvyšování obsahu živin v jezerech může být více. Jeden z důvodů je ten, že jezera i jejich povodí byla v minulosti výrazně acidifikována (Stuchlík et al., 2006). Vazba P v kyselých půdách, zejména vazba na volné ionty železa a hliníku (Kaňa et al., 2011), závisí na obsahu organické hmoty a pH. Při zvýšení nebo snížení pH dochází k uvolňování P. Nárůst uvolňování P byl v tatranských půdách zaznamenán při hodnotách $\text{pH} > 3,5$ (Kopáček et al., 2015). Od té doby, co se depozice sloučenin dusíku a síry snížily, se začalo pH půd v povodí jezer zvyšovat a to způsobilo sníženou schopnost vazby P na oxidy hliníku a železa (Kopáček et al., 2006). Vyšší míra uvolňování P spojená se změnou pH byla pozorována v sušových půdách tatranských povodí, zatímco na lučních půdách nedosahovala tak vysokých hodnot (Kaňa & Kopáček, 2006; Kopáček et al., 2015).

Další příčinou nárůstu obsahu P v jezerech a povodích může být i klimatická změna (Kopáček et al., 2017, 2019). Z dat vyplývá, že za poslední dvě desetiletí let stoupla průměrná roční teplota v oblasti vysokých Tater až o 3°C . Zároveň se změnila i roční distribuce srážek, kdy jsou srážky v průměru méně časté, ale zato silnější. S oteplováním se také zvyšuje počet dní, kdy teplota kolísá okolo 0°C a snižuje se i počet dní se sněhovou pokrývkou. Častější kolísání okolo bodu mrazu způsobuje, že se ve štěrbinách hornin tvoří ledové krystaly, které opakovaně zamrzají a rozmrzají („freeze-thaw weathering“), což má za následek výrazné urychlení zvětrávání hornin. Úbytek sněhové pokrývky rovněž podporuje zvětrávací procesy, protože vrstva sněhu chrání horninu před slunečními paprsky, povětrnostními podmínkami a destabilizací

teplot (Kopáček et al., 2017, 2019) a to může úzce souviset s nárůstem P v těchto půdách.

V důsledku nárůstu průměrné roční teploty je také pravděpodobné zvýšení metabolismu a růstu mikroorganismů v půdách v povodích jezer. To může vést k rychlejší solubilizaci P půdními mikroorganismy – viz. Biologické transformace P (Kopáček et al., 2019; Wan et al., 2020).

2.4.1 Změny cyklu P v lučních a suťových půdách v povodích Tatranských ples

V povodích Tatranských jezer jsou přítomny luční a suťové půdy, které jsou svou charakteristikou zcela odlišné. Luční půdy, zejména ty ve vysokých nadmořských výškách, v povodí jezer jsou výrazně ovlivňovány přítomností rostlin, která je spojena s množstvím organické hmoty, rhizodepozicí a její přeměně půdními mikroorganismy (Jones & Hinsinger, 2008).

Na lučních půdách převládá suchá alpínská tundra s řídkou vegetací (obvykle dominují druhy rostlin: *Calamagrostis villosa*, *Festuca picta*, *Luzula luzuloides*). Díky této vegetaci dochází na lučních půdách k hromadění půdní organické hmoty, která je také spojena s vysokou biologickou aktivitou v rhizosféře – kořenové a mikrobiální dýchání (Jones & Hinsinger, 2008; Kaňa et al., 2023).

Oproti lučním půdám suťové půdy zcela postrádají vegetaci. Organická hmota v suťových půdách pravděpodobně pochází převážně z činnosti prokaryotických autotrofních organismů, jako jsou sinice a bakterie. Biomasa bakterií v suťových půdách je menší s porovnáním s biomasou bakterií z lučních půd, avšak jejich specifická aktivita (respirační a enzymatická) je vyšší (Kaňa et al., 2023).

Tato práce se zabývá srovnáním druhové diverzity fosfor–solubilizujících bakterií v lučních a suťových půdách v povodí Tatranských jezer. Zároveň je tato práce součástí širšího výzkumu, ve kterém probíhal i výzkum, který se zaměřoval na druhovou diverzitu bakterií, přítomných na povrchu kamenů v povodích jezer a jejich schopnosti solubilizovat P. Výsledky tohoto výzkumu se dají srovnat s výsledky této práce.

3 Hypotézy

- 1) V půdách povodí jezer ve Vysokých Tatrách se vyskytují bakterie, které jsou schopny rozpouštět minerální fosfor pomocí produkce organických kyselin.
- 2) Druhové složení fosfor–solubilizujících bakterií se liší mezi lučními půdami a suťovými půdami.
- 3) Suťové půdy budou mít velký překryv v druhové bohatosti s povrchy kamenů ze suti.

4 Materiály a metody

4.1 Lokality a odběr vzorků půd

Vysoké Tatry se nacházejí ve střední Evropě podél slovensko–polské hranice. Z této oblasti jsme vybrali 4 povodí jezer – Vyšné Wahlenbergovo (VW), Pusté (PU), Ladové (LA) a Velké Hincovo (VH). Vzorky půd byly odebrány ze suťových polí a přilehlých luk v září 2020 vždy ze suti a louky na třech odběrových místech v každém z povodí. Celkem bylo odebráno 24 vzorků půd (4 povodí x 3 odběrová místa x 2 varianty – louka/suť). Organominerální horizont lučních půd byl odebrán lopatkou z jamek 15 x 15 cm. Pro odebrání suťových půd byly v suťovém poli odstraněním kamenů vytvořeny jámy hluboké cca 0,5 m. Základní chemické parametry našich povodí popsal ve své studii (Kaňa et al., 2023; Kaštovská et. al., n.d.) a jsou podrobně popsány v tabulce **Tabulce 1**. V době vypracovávání mé diplomové práce byly vzorky půd již odebrány a tudíž jsem se na tomto kroku nepodílela.

Tabulka 1: Základní chemické parametry lučních a suťových půd v povodí VW, PU, LA, VH jezer podle (Kaňa et al., 2023; Kaštovská et.al., n.d.). (Pov a t.půd – povodí a typ půdy, P_{tot} – celková koncentrace fosforu, C_{tot} – celková koncentrace uhlíku, N_{tot} – celková koncentrace dusíku, v.h. PO₄ – vodný výluh PO₄, extr.P – extrahovatelný P, MBC – C v mikrobiální biomase).

Oblast	pH	P _{tot} (mg/g)	C _{tot} (mg/g)	N _{tot} (mg/g)	v.h. PO ₄ (ng/g)	extr.P (μgP/g)	MBC (μg/g)
VW louka	5,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2	43,1 ± 18,3	3,3 ± 1,5	108 ± 76	5,7 ± 2,5	1054 ± 491
VW suť	4,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	22,8 ± 2,1	1,7 ± 0,1	295 ± 17	55,1 ± 13,1	161 ± 9
PU louka	5,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	84,2 ± 24,2	5,7 ± 1,6	66,3 ± 58,3	3,1 ± 0,1	2178 ± 296
PU suť	4,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	31,3 ± 7,2	2,5 ± 0,4	265 ± 58	42,2 ± 12,7	197 ± 66
LA louka	4,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	123 ± 64	8,7 ± 4,3	129 ± 40	5,2 ± 1,1	3536 ± 1753
LA suť	4,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	34,7 ± 16,6	2,6 ± 1,1	300 ± 8	28,9 ± 11,1	148 ± 63
VH louka	4,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	57,2 ± 27,7	4,4 ± 2,0	121 ± 61	2,3 ± 1,3	2105 ± 548
VH suť	4,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2	34,1 ± 3,1	2,6 ± 0,2	203 ± 59	47,9 ± 5,81	187 ± 31

4.2 Izolace bakterií

1 g půdy byl vložen do sterilní kádinky a poté byl smíchán s 50 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl). Poté byly vzorky 1 minutu sonikovány a následně byly umístěny na horizontální třepačku, kde se třepaly 30 minut při 100 otáčkách za minutu. Poté byly ze směsi vytvořeny desítkové ředící řady ve třech opakováních pro každý vzorek půdy. V době vypracovávání mé diplomové práce byly izoláty již zpracovány a k dispozici (vypracovala laboratorní technička Mgr. Lenka Čapková), tudíž jsem se na tomto kroku nepodílela. Nicméně jsem si celý proces zkusila „nanečisto“ na jiných vzorcích půd.

4.3 Detekce fosfor solubilizujících bakterií

K detekci fosfor–solubilizujících bakterií byl použit Pikovskaya agar (PKV). Směs na jeden litr obsahovala 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).

Princip detekce bakterií, které jsou schopné solubilizovat fosfor, spočívá v tom, že médium obsahuje fosfor jen v nerozpustné formě – fosforečnan vápenatý. Přítomnost fosforečnanu vápenatého způsobuje zakalení agaru do bíla. V okolí bakteriálních kolonií, které jsou schopny fosforečnan rozpouštět, vzniká průhledná oblast (tzv. „halo effect“). Kolonie, kolem kterých se tento efekt vytvořil, jsme identifikovali jako fosfor–solubilizující bakterie a přenesli jsme je na nová PKV agar pomocí křížového roztěru, abychom získali čisté kultury. Z těchto kolonií byly následně vytvořeny glycerolové konzervy, které byly uloženy při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pro další analýzy. V době vypracovávání mé diplomové práce byly izoláty již zpracovány a k dispozici (vypracovala laboratorní technička Mgr. Lenka Čapková), tudíž jsem se na tomto kroku nepodílela. Nicméně jsem si celý proces zkusila „nanečisto“ na jiných vzorcích půd.

4.3.1 Sekvenace

Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Ultra Clean Microbial Kitu. Základní princip se zakládá na postupném rozkladu buněčných struktur s využitím kombinace chemických látek a mechanického působení pomocí zařízení nazvaného BidBeater. Buňky jsou rozpuštěny a následně je DNA oddělena pomocí centrifugace. DNA zůstává zachycena na křemičité membráně, která je poté omyta, aby došlo k odstranění zbytků buněčných složek a chemikálií použitých při jejich rozkladu. Nakonec je DNA uvolněna z membrány do zkumavky, kde je připravena k dalšímu využití (podle příručky DNeasy UltraClean Microbial Kit).

4.3.1.1 *PCR a sekvenace DNA*

Získaná genomová DNA byla sekvenována zvláště s dopředným (9bfm) i zpětným (1512uR) primerem, tak, aby byl pokryt celý gen 16S rRNA (Mühling et al., 2008). Po doběhnutí reakce byla účinnost PCR ověřena pomocí elektroforézy a následně byl produkt vyčištěn pomocí QIAquick PCR purification KITu (dle protokolu výrobce) a účinnost purifikace byla opět ověřena pomocí elektroforézy (30 min. při 100 V). Před sekvenací bylo potřeba PCR produkt přečistit a naředit tak, jak vyžadovala sekvenční firma SEQme. Amplikovaná DNA byla následně sekvenována Sangerovou metodou externí firmou (SEQme s. r. o.) jak v předním, tak ve zpětném směru.

4.3.1.2 *Určení získaných bakterií do druhů podle sekvencí*

Hrubá sekvenční data byla zpracována v programu GeneiousPrime. Protože pro sekvenaci byly použity dopředné i zpětné primery, obě výsledné sekvence pak byly pomocí programu GeneiousPrime spojeny v místě překrytí. Byla tak získána téměř celá oblast kódující 16SrRNA gen. Každá takto získaná unikátní sekvence byla taxonomicky anotována pomocí databázi NCBI Nucleotide Collection (NCBI 1988) za použití BLAST algoritmu (Altschul et al., 1990) prostřednictvím webového rozhraní (BLAST b.r.).

4.4 Inkubace

Z glycerolových konzerv bylo přeneseno 100 µl vzorku do tekutého Nutrient agaru. Směs na jeden litr obsahovala: 5 g kaseinového peptonu, 2,5 g kvasničného extraktu a 1 g dextrózy. Vzorky byly kultivovány za stálého třepání (135 ot/min) 2 dny. Poté byla změřena jejich optická denzita při vlnové délce 600 nm, vzorky byly poté naředěny, aby jejich optická denzita odpovídala 0,6. Izoláty byly poté přeočkovány do PKV tekutého média (stejné médium jako Pikovskaya agar, ale bez přidání agarové složky) tak, aby bylo zajištěno vždy podobné množství bakterií ve všech vzorcích. Izoláty se poté nechaly růst 7 dní při teplotě 25°C při stálém třepání, každý izolát ve třech opakováních, přičemž s každou sérií reálných vzorků byl inkubován také vzorek sterilního média jako kontrola.

4.5 Analýza vzorků

Poté byl ze všech vzorků odebrán *subsample* („podvzorek“), který byl použit k následujícím analýzám: měření pH, měření obsahu kyselin a měření obsahu fosforečnanů.

4.5.1 Měření pH

Všechny vzorky byly centrifugovány a následně bylo pH změřeno na pHmetru WTW pH 330i.

4.5.2 Měření obsahu kyselin

Do všech vzorků byl přidán acetolnitril (1,5 ml vzorku a 1,5 ml acetolnitrilu ve skleněné vialce), který v nich vysrážel bílkovinu. Následně byly vzorky vortexovány a přefiltrovány. 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 μ l vzorku. (Tuto specializovanou analýzu provedl laboratorní technik Mgr. Jan Bednář).

4.5.3 Měření obsahu fosforečnanů

Koncentrace rozpuštěných fosforečnanů byla měřena spektrofotometricky na analyzátoru FIA (Flow Injection Analyzer, Foss Tecator). (Tuto speciální analýzu provedla laboratorní technička Mgr. Kateřina Kučerová).

4.6 Vyhodnocení výsledků měření

Hodnoty obsahu fosforečnanů, obsahu měřených organických kyselin a pH byly porovnány s naměřenými výsledky kontrol díky dvouvýběrového t-testu v programu R studio (R studio b.r.). Korelace koncentrace rozpuštěného P na kyselosti média byla vyjádřena lineárním modelem v programu R studio (R studio b.r.).

5 Výsledky

5.1 Výsledky izolace a sekvenace izolovaných bakterií

Dohromady bylo k analýzám použito 323 vzorků, z tohoto celkového počtu bylo 17 vzorků vzorky kontrol a zbylých 306 byly izoláty bakterií ve třech opakováních. Dohromady bylo tedy testováno 102 unikátních vzorků. Ty byly podle podobnosti s referenčními sekvencemi přiřazeny k 58 taxonomickým jednotkám. Izoláty, které se lišily sekvencí, i když byly přiřazeny do stejného druhu, byly odlišeny číselným kódem, aby bylo zajištěno unikátní značení pro unikátní izoláty. U 8 testovaných izolátů se taxonomická anotace nepodařila.

Nejvíce kultivovaných vzorků bylo zařazeno do kmene Proteobakterií, u kterého bylo nalezeno 38 geneticky odlišných forem. Byl nalezen i jeden zástupce z kmene Firmicutes, Bakteroidetes a z kmene Aktinobakterií.

5.2 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**.

Tabulka 2: Výsledky naměřeného pH, rozpuštěného fosforu (mg/l) a obsahu kyselin (mg/l), uvedeny jen hodnoty se signifikantním rozdílem od kontroly (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). Kyselina jablečná není v tabulce uvedena. (2kegl – 2-keto-glukonová, k.cit. – citrónová, k.glu. – glukonová, k.ml. – mléčná, k.jan. – jantarová.)

Izolát	PO4	pH	2kegl	k.cit.	k.glu.	k.ml.	k.jan.
<i>Burkholderia</i> sp.	211 ± 49 *	5,5 ± 0,05 **					
<i>Caballeronia</i> sp.	31,3 ± 5,4 **	5,6 ± 0,2 *					
<i>Caballeronia udeis</i>	388 ± 42,9 **	6,9 ± 0,1 **			2760 ± 352 **		
<i>Collimonas pratensis</i> 1	1289 ± 245 *	4,3 ± 0,2 **	2007±1312 *	8,6 ± 0,4 **	5008 ± 639 **		

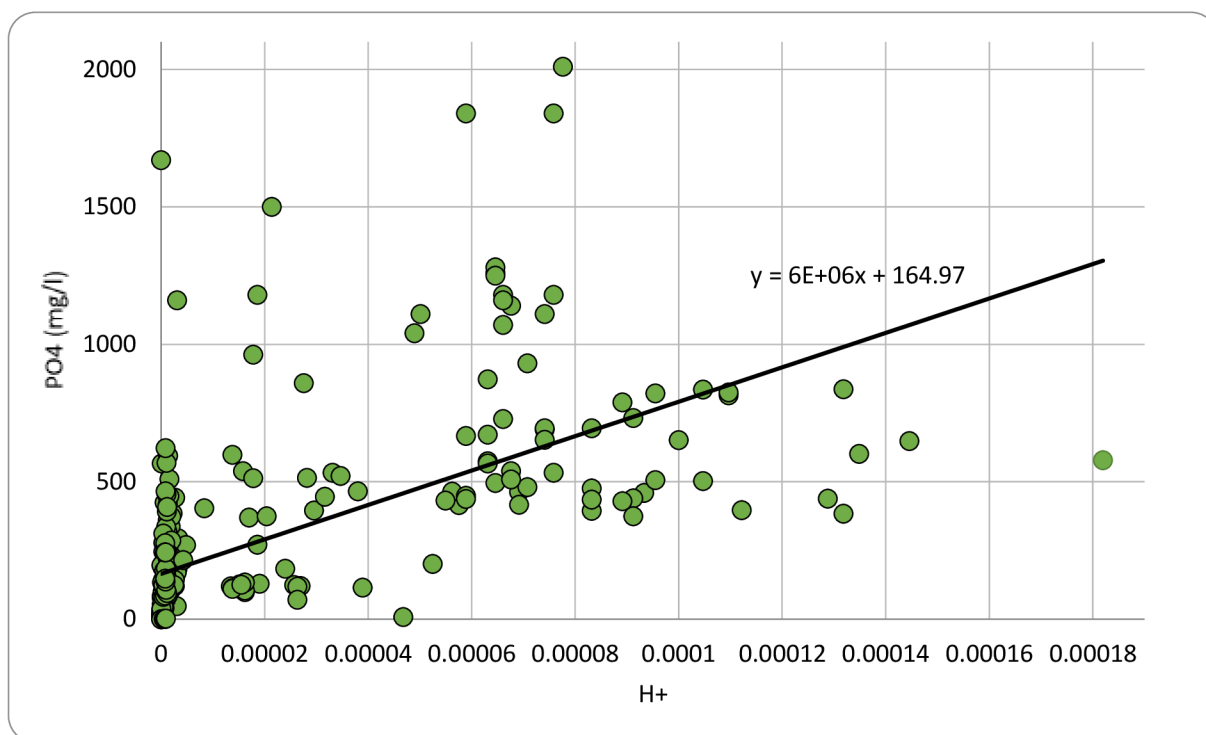
<i>Collimonas pratensis</i> 2	1150 ± 86 **	4,8 ± 0,1 **			1,5 ± 1,4 **		
<i>Collimonas pratensis</i> 3	911 ± 112 **	4 ± 0,04 **	8,3 ± 0,7 **	10 ± 0,2 **	7662 ± 8 **		
<i>Collimonas</i> sp. 1		4,1 ± 0,04 *					
<i>Collimonas</i> sp. 2							
<i>Collimonas</i> sp. 3	413 ± 31 **	5,8 ± 0,01 *		4418 ± 1278 *			17,3 ± 18,7 **
<i>Collimonas</i> sp. 4		4,1 ± 0,01 **				37,9 ± 21,7 **	
<i>Collimonas</i> sp. 5	267 ± 8,9 **	4,3 ± 0,2 **					
<i>Erwinia</i> sp.							
<i>Ewingella americana</i>	476 ± 48 **	4,1 ± 0,02 **		3483 ± 137 **	20,3 ± 2,5 *	230 ± 24 **	211 ± 19 **
<i>Ewingella</i> sp. 1	92,3 ± 17,3 *						
<i>Ewingella</i> sp. 2	93,3 ± 12,6 **	7,6 ± 0,1 **	3,9 ± 0,2 **				
<i>Frondehabitans sucicola</i>	461 ± 30 **			9,7 ± 1,6 *		193 ± 7,5 **	
<i>Moraxella</i> sp.	277 ± 31 **	4,8 ± 0,02 **	3,5 ± 0,6 *		4010 ± 631 **		
<i>Paenibacillus terrae</i>	109 ± 12**			14,3 ± 0,9 **	39,5 ± 3,2 **		3 ± 0,9 *
<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>							
<i>Pedobacter cryoconitis</i>		5,8 ± 0,1 **	9,5 ± 1,5 **			21,8 ± 3,5 **	
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>							
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>							
<i>Pseudomonas brenneri</i>					0,8 ± 0,3 **		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	194 ± 50,8 *						
<i>Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca</i>							
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	507 ± 66,1 **				8449 ± 872 **		
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	109 ± 29 *				2,6 ± 0,2 *		

<i>Pseudomonas</i> sp. 2	124 ± 27 **				4 ± 2,9 *	4,7 ± 6,6 **	
<i>Pseudomonas</i> sp. 3	93,4 ± 10,2 **				3 ± 0,2 **		
<i>Pseudomonas</i> sp. 4							
<i>Pseudomonas</i> sp. 5	671 ± 154 *	4 ± 0,1 **					
<i>Pseudomonas</i> sp. 6					4,3 ± 29 *	20,1 ± 28,4 *	
<i>Pseudomonas</i> sp. 7				23,5 ± 0,5 **		26,3 ± 5,9 **	
<i>Pseudomonas</i> sp. 8	570 ± 104 *	4,2 ± 0,1 **	6001 ± 1436 *		2,9 ± 2,7 **		
<i>Pseudomonas</i> sp. 9							1,3 ± 1,4 *
<i>Rahnella</i> sp. 1							
<i>Rahnella</i> sp. 2	109 ± 26 *						
<i>Rahnella</i> sp. 3			3,9 ± 0,4 **				
<i>Rahnella</i> sp. 4							
<i>Rhodococcus</i> sp.	125 ± 3,3 **	4,6 ± 0,1 **				29,4 ± 25,8 *	2,2 ± 0,9 **
<i>Rouxiella</i> sp.	97,3 ± 11,3 **						
<i>Serratia liquefaciens</i>	111 ± 15 **						
<i>Serratia plymuthica</i>	155 ± 34 *	5,6 ± 0,1 **		14,3 ± 1,9 **			
<i>Serratia proteamaculans</i>	90,5 ± 5,3 **				1,9 ± 2,7 **		
<i>Serratia</i> sp.	107 ± 15 *						
uncultured bacterium 1					1,9 ± 1,4 **		
uncultured bacterium 2							
uncultured bacterium 3	135 ± 43 *						
uncultured bacterium 4	112 ± 16 *	4,8 ± X **			4,3 ± 1,7 **		
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 1							

<i>uncultured Burkholderiaceae bacterium 2</i>	198 ± 44 *	7 ± 0,1 **			826 ± 484 **		
<i>uncultured Burkholderiaceae bacterium 3</i>					3,8 ± 0,4 **		
<i>uncultured Burkholderiaceae bacterium 4</i>		7 ± 0,2 **			5,8 ± 2,1 *		
<i>uncultured Burkholderiaceae bacterium 5</i>			143 ± 43 *				
<i>uncultured Burkholderiaceae bacterium 6</i>	542 ± 38 **			3571 ± 105 **	73,5 ± 18,9 **		
<i>uncultured Burkholderiales bacterium 7</i>							
<i>uncultured Pseudomonas sp. 1</i>	123 ± 27 **				3,6 ± 0,2		
<i>uncultured Pseudomonas sp. 2</i>	388 ± 43 *						

Rozsah hodnot pH mezi naměřenými vzorky se pohyboval od 4 do 7,6. pH kontrol se pohybovaly průměrně okolo 6. Nejvyšší pH bylo naměřeno u izolátu *Ewingella* sp. 2 a dosahovalo hodnoty 7,6. Izolát ovšem nedosahoval nejnižší naměřené koncentrace fosforu. Na druhou stranu nejnižší pH bylo změřeno u izolátu *Collimonas pratensis* 3 dosahovalo hodnoty 4. U tohoto izolátu byla zároveň naměřena vysoká koncentrace uvolněného fosforu, který však nedosahoval naměřeného maxima.

Koncentrace rozpuštěného fosforu se pohybovala od 31,3 mg/l ± 5,4 do 1289 mg/l ± 245 a koncentrace fosforu v kontrolách byla 22,4 mg/l. Korelace mezi rozpuštěným PO₄ a pH byla signifikantní, ale stále vysoce variabilní (**Obrázek č. 1**). Z celkového počtu 58 izolátů 33 z nich průkazně zvýšilo koncentraci PO₄, ale jen 20 snížilo pH. Nejvíce fosforu do okolí média uvolňoval izolát *Collimonas pratensis* 1 s hodnotou 1289 mg/l ± 2445, tento izolát však nesnížil pH na hodnotu nejnižšího naměřeného. Zároveň produkoval 3 ze 6 naměřených kyselin (kys. citrónovou, glukonovou a 2-keta-glukonovou). Nejméně fosforu uvolnil izolát *Caballeronia* sp. s hodnotou 31,3 mg/l ± 5,4. Tento taxon snížil pH na hodnotu 5,6, ale neprodukoval žádnou z měřených kyselin.



Obrázek 1: Závislost koncentrace PO_4 na kyselosti média vyjádřenou v koncentraci H^+ ($p = 2.211e-12$, $r^2 = 0,1503$).

Z 58 unikátních taxonů 32 jich produkovalo alespoň jednu z měřených organických kyselin. Ze 32 taxonů produkujících kyseliny jich 19 produkovalo alespoň jednu kyselinu a 13 více než jednu. Nejvíce taxonů (21) produkovalo kyselinu glukonovou a naopak nejméně byla produkována kyselina jablečná, jejíž obsah průkazně nezvyšoval ani jeden vzorek z naměřených 323 (není uvedena v **Tabulce 2**).

Nejvíce různorodých kyselin produkovaly taxony *Collimonas pratensis 1 a 3*, které produkovaly kyseliny 2-keta-glukonovou, citrónovou a glukonovou. Produkce více druhů organických kyselin byla také zaznamenána u taxonů *Collimonas sp.*, *Ewingella americana*, *Pedobacter cryoconitis*, *Pseudomonas sp. 1, 2 a 3*, *uncultured Burkholderiaceae bacterium 2,4 a 6*. Druhy *Fronidhabitans sucicola*, *Rhodococcus sp. Paenibacillus terrae*, produkovaly vždy 2 z 6 měřených kyselin.

Žádné z měřených kyselin nebyly zaznamenány u *Burkholderia sp.*, *Caballeronia sp. 1, 2 a 3*, *Erwinia sp.*, *Ewingella sp.*, *Paraburkholderia aromaticivorans*, *Pseudomonas arsenicoxydans*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas chlororaphis subsp. Aurantiaca*, *Rahnella sp. 1, 2 a 4*, *Rouxiella sp.*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia sp.*, *uncultured bacterium 2 a 3*, *uncultured Burkholderiaceae bacterium 1, 4 a 7*, *uncultured Pseudomonas sp.*

5.3 Druhová diverzita izolovaných bakterií v povodích Tatranských ples

Dohromady bylo tedy testováno 102 unikátních vzorků, které byly přiřazeny k 58 taxonomických jednotkám, které byly nalezeny v povodí jezer – Vyšného Wahlenbergova jezera (VW), Pustého jezera (PU), Ladového jezera (LA) a Velkého Hincova (VH) jezera. Taxonomické jednotky *Pseudomonas* sp. 8 a *uncultured Burkholderiaceae bacterium* 7 se nacházely ve výčtu druhů ve všech povodích, ale ne na všech odebíraných místech.

Tabulka 3: Seznam druhů bakterií a jejich nálezy v jednotlivých povodích a typu půd (VW – Vyšné Wahlenbergovo jezero, PU – Pusté jezero, LA – Ladové jezero, VH – Velké Hincovo jezero), procento délky hledané sekvence, která je se shoduje s nalezenou sekvenací, procento nukleotidů, které jsou identické mezi hledanou sekvenací a sekvenací z databáze a odkaz na nejpodobnější sekvenaci z databáze BLAST.

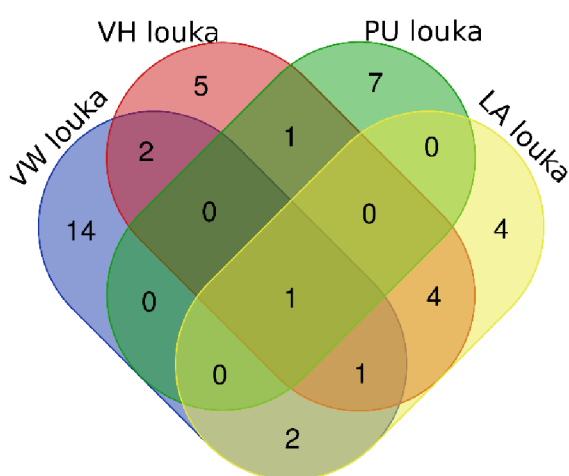
Izolát	Accession	% coverage	% ID	VW louka	VW suť	PU louka	PU suť	LA louka	LA suť	VW louka	VW suť
<i>Burkholderia</i> sp.	JQ723724.1	100	100	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caballeronia</i> sp.	MH018897.1	100	100	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Caballeronia udeis</i>	MK302235.1	100	100	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Collimonas pratensis</i> 1	OL636300.1	100	100	-	-	-	-	+		+	-
<i>Collimonas pratensis</i> 2	CP013234.1	100	99,93	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>Collimonas pratensis</i> 3	CP013236.1	100	100	-	-	-	-	+		+	-
<i>Collimonas</i> sp. 1	MT585902.1	100	100	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Collimonas</i> sp. 2	MH688789.1	99	99,64	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Collimonas</i> sp. 3	KY682043.1	100	99,78	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Collimonas</i> sp. 4	KU311394.1	99	100	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Collimonas</i> sp. 5	HQ231955.1	100	99,93	+	-	-	-	-	-	-	-

<i>Erwinia</i> sp.	MN989056.1	100	99,93	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Ewingella americana</i>	HQ256856.1	100	99,93	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Ewingella</i> sp. 1	MK602474.1	100	99,57	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ewingella</i> sp. 2	MK602493.1	100	100	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Fronihibitans sucicola</i>	KJ606845.1	100	99,98	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Moraxella</i> sp.	MT380814.1	100	99,78	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paenibacillus terrae</i>	KY616983.1	100	99,20	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>	CP051516.1	100	100	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pedobacter cryoconitis</i>	MW332370.1	100	99,78	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i>	MG675602.1	100	99,64	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	MW332370.1	100	99,71	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas brenneri</i>	HQ824860.1	100	100	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CP010945.1	100	99,78	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	EU169169.1	100	99,93	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	MG571697.1	100	99,85	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	KY681949.1	100	99,78	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 2	KF011705.1	100	99,85	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 3	MT555370.1	100	99,78	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 4	MT555388.1	100	100	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 5	KY681890.1	100	99,93	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 6	KY681897.1	100	100	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 7	KU342590.1	100	100	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. 8	CP080597.1	100	100	-	+	-	+	-	+	-	+

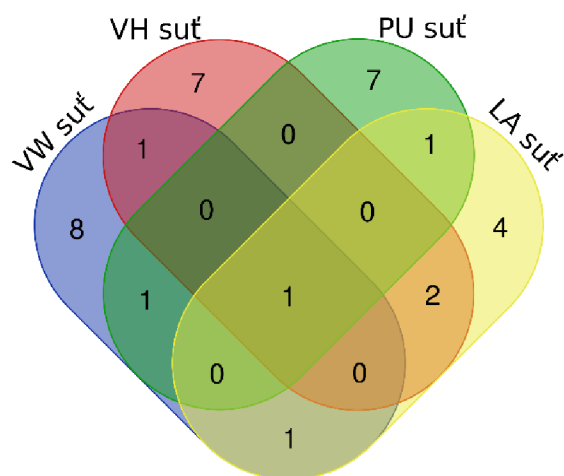
<i>Pseudomonas</i> sp. 9	KT580597.1	100	99,93	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rahnella</i> sp. 1	OM527251.1	100	99,93	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Rahnella</i> sp. 2	MK100818.1	100	99,86	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rahnella</i> sp. 3	MN989136.1	100	99,86	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Rahnella</i> sp. 4	AM419020.1	100	99,71	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp.	LC529485.1	100	99,92	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rouxiella</i> sp.	MN928716.1	100	99	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	KY614356.1	100	99,93	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia plymuthica</i>	KX035053.1	100	99,86	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Serratia proteamaculans</i>	KY681890.1	100	99,93	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	KY041847.1	100	99,71	+	-	-	-	-	-	-	-
uncultured bacterium 1	KT029505.1	100	99,86	-	-	-	+	-	-	-	-
uncultured bacterium 2	FJ466234.1	100	99,35	-	-	-	-	+	-	-	-
uncultured bacterium 3	JQ678546.1	100	99,79	-	-	-	+	-	-	+	-
uncultured bacterium 4	LC093150.1	100	100	-	-	-	-	-	-	-	+
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 1	MW055807.1	100	100	+	-	-	-	-	-	-	-
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 2	MT002698.1	100	100	+	+	+	+	+	+	+	+
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 3	MT002701.1	100	99,64	+	-	-	-	-	-	-	-
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 4	MW055741.1	100	99,85	-	-	+	-	-	-	+	+
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 5	MW055740.1	100	99,78	-	-	+	-	-	-	-	+
uncultured <i>Burkholderiaceae</i> bacterium 6	MW055785.1	100	99,78	-	-	+	-	-	-	-	-
uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium 7	LC213287.0	100	100	-	+	-	-	+	+	+	+

Nejvíce druhů bylo nalezeno v povodí VW jezera, kde bylo nalezeno 31 druhů bakterií a zároveň z tohoto počtu bylo nejvíce i unikátních druhů – 22. V povodí Ladového jezera bylo nalezeno 16 druhů bakterií a 5 unikátních druhů. Povodí PU jezera obsahovalo 8 unikátních druhů a nejméně unikátních druhů obsahovalo povodí VH jezer – 7 druhů.

Variabilita druhů jednotlivých bakterií se vyskytovala také mezi lučními půdami a suťovými poli. Nejčastější bakterie nalezená na louce i v suti zároveň byla *uncultured Burkholderiaceae bacterium 2*, která se na lučních půdách i v suťových polích nalézala v povodích všech jezer – VH, PU, LA i VH. Další bakterie, které byly nalezeny na louce i v suti, avšak jen v nějakých povodích, byly *Caballeronia udeis* (VW louka, VH louka, LA suť), *Collimonas pratensis 2* (VW louka, LA louka i suť, VH louka) a *Collimonas sp. 1* (LA louka i suť, VH louka i suť). V lučních půdách (konkrétně v povodích LA a VH) se nejčastěji vyskytovala bakterie *Collimonas pratensis 1* a v suťových polích (ve všech povodích jezer) *Pseudomonas sp. 8*.



Obrázek 2: Vennův diagram pro luční půdy v povodí jezer – VW, VH, LA, PU.



Obrázek 3: Vennův diagram pro suťové půdy v povodí jezer – VW, VH, LA, PU.

6 Diskuse

6.1 Izolace fosfor–solubilizujících bakterií

Ze vzorků půd odebraných v povodích čtyřech tatranských ples se podařilo získat izoláty fosfor–solubilizujících bakterií, které byly přiřazeny k 58 unikátním taxonomickým jednotkám. Nejvíce izolátů patřilo do kmene Proteobakterií ovšem byl nalezen i zástupce z kmene Firmicutes, Bakteroidetes a z kmene Aktinobakterií a řada předchozích studií potvrzuje, že zástupci těchto kmenů jsou schopni solubilizovat minerální fosfor (Amri et al., 2023; Chen et al., 2006; Kishore et al., 2015; Pan & Cai, 2023; Saeid et al., 2018a, 2018b; Seshadri et al., 2007; Silva et al., 2023).

Našli jsme osm různých izolátů, které patřily do čeledi Burkholderiaceae, což je rozsáhlá skupina bakterií, která obsahuje mnoho rozmanitých zástupců s různými ekologickými strategiemi. Část z nich je přiřazována do skupiny fosfor–solubilizujících bakterií (Coenye, 2014) a to podporují i naše výsledky, jelikož izolát *uncultured Burkholderiaceae bacterium 2*, ze skupiny Burkholderiaceae, se vyskytoval napříč všemi půdami (s výjimkou na 3 odběrových míst) a povodími. Poté jsme našli 15 izolátů, patřící do rodu *Pseudomonas*, patřící do čeledě Pseudomonadaceae, které byly uváděny jako půdní bakterie se schopností rozpouštět fosfor již dříve (Browne et al., 2009; Buch et al., 2008; K.-K. Lee et al., 2012; Miller et al., 2010). Izoláty *Pseudomonas* sp. 8, 4 a 7, jsme našli pouze v suťových půdách a v lučních půdách jsme našli druhy *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca*, *P. arsenicoxydans*, *P. brenneri*, *P. brassicacearum* a *P. rhodesiae*.

Literatura dále uvádí rody, které jsou typické pro solubilizaci P, a to rod *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Paenibacillus*, *Rahnella* a *Rhizobium*. Nejde o výpis všech rodů podílejících se na solubilizaci P, nýbrž výpis rodů, které se nejvíc citují v literatuře (Kämpfer, 2007; Rodríguez & Fraga, 1999). Z těchto jsme našli 3 zástupce rodu *Ewingella*, 1 zástupce rodu *Paenibacillus* a 4 zástupce rodu *Rahnella*.

Ovšem část fosfor–solubilizujících bakterií nepatří mezi rychle rostoucí a některé z našich izolovaných bakterií tak nedokázaly, za dobu inkubace, vytvořit viditelné kolonie s „halo effectem“. Zároveň jsou mnohé druhy fosfor–solubilizujících bakterií citlivé na laboratorní podmínky a mají specifické nároky pro svůj růst (např. přítomnost symbiontů, specifické rozmezí pH atd.) (Goswami et al., 2019; Khan et al., 2013; Mehta

& Nautiyal, 2001). Nebyli jsme tedy schopni vystihnout celkovou diverzitu bakterií, které se na místech odběrů vyskytovaly. Pro lepší zachycení celkové diverzity bakterií by se mohlo modifikovat kultivační médium (např. snížením koncentrace glukózy – např. na 1g, nebo nahrazením glukózy za složitější uhlíkatou sloučeninu), aby se vytvořily ideální podmínky i pro pomalu rostoucí bakterie.

6.2 Solubilizace P pomocí produkce organických kyselin

Zaznamenali jsme produkci 5 ze 6 testovaných kyselin: kyselinu glukonovou, citrónovou, mléčnou, jantarovou a 2-keto-glukonová. K. jablečná nebyla produkována žádným z testovaných izolátů.

Nejčastěji detekovaná byla kyselina glukonová, které je v mnoha studiích často spojována s procesem solubilizace P (Adeleke et al., 2017; Bray & Kurtz, 1945; Dwidya Prijambada et al., 2009; Jones et al., 2003; Mimmo et al., 2008; Prijambada et al., 2009). (Mardad et al., 2013) ve své studii uvádí k. glukonovou jako nejčastěji detekovanou napříč všemi vybranými taxony a právě tato kyselina byla nejvíce spojována se zvýšením koncentrace solubilizovaného P, což je v souladu s našimi výsledky. Naopak studie od (Rodriguez et al., 2004), uvádí, že nebyl nalezen důkaz k podpoře faktu, že produkce kys. glukonové je přímo úměrná s obsahem solubilizovaného P. (Rodriguez et al., 2004) dále uvádí, že nezaznamenal na agarových plotnách kolonie, které by vytvářely „halo effect“, a po změření koncentrace P bylo zjištěno, že je obsah rozpuštěného P velice nízký. Rozdílné výsledky mezi studiemi mohou být ovlivněny přítomností různých kmenů bakterií, citlivostí HPLC metody a výběrem měřených kyselin.

Kyselina, kterou jsme nebyli schopni detekovat vůbec, byla kyselina jablečná. Produkce kyseliny jablečné byla potvrzena zejména pro rody *Bacillus* a *Pseudomonas*. Dřívější studie (Akintokun et al., 2007; Charana Walpola, 2012; Kumar et al., 2018; Rodríguez & Fraga, 1999; T. Nikitha et al., 2017) prezentují výzkumy, které průkazně potvrzují, že rod *Pseudomonas* produkoval kyselinu jablečnou ve vyšším nebo ekvivalentním množství jako kyselinu glukonovou (Kaur et al., 2021). Důvodem, proč jsme kyselinu jablečnou nedetekovali, může být několik. Prvním z důvodů může být nedostatečný čas inkubace bakterií, aby mohlo dojít k produkci kyseliny jablečné. Dalším důvodem může být druhová diverzita bakteriálních kolonií. (Kaur et al., 2021) uvádí, že kys. jablečnou produkuje zejména druh bakterie *Bacillus*, který jsme my nazeznamenali.

Jsou i další rody bakterií, které jsou schopny produkovat kys. jablečnou, ale její produkce se mění v průběhu inkubace (Dwidya Prijambada et al., 2009). Mohli jsme tedy měřit koncentraci kys. jablečné zrovna v době, kdy její produkce nebyla vysoká.

Solubilizace P souvisela se snížením pH (viz. **Obrázek 1**) a většina izolátů, která produkovala alespoň jednu kyselinu, snižovala pH média a tím pádem se zvyšovala koncentrace rozpuštěného P. Nicméně jsme našli i izoláty (*Burkholderia* sp, *Caballeronia* sp. , *Collimonas* sp. 5, *Pseudomonas* sp. 5, *Serratia* sp), u kterých jsme pozorovali snížení pH i rozpuštění P, ale neprodukovali žádnou z měřených kyselin. Za vysvětlením může stát fakt, že tyto taxony mohly produkovat organické kyseliny, které jsme neměřili – např. kys. vinnou, šťavelovou, mravenčí a octovou. Toto tvrzení podporují výsledky studie od (Behera et al., 2017), která uvádí, že taxon *Serratia* sp. produkoval ve velké míře právě kyselinu octovou. Dalším důvodem může být i to, že solubilizace P byla provedena např. uvolňováním H⁺, produkcí sideroforů, vzniku chelátů a produkcí anorganických kyselin (Cui et al., 2022; Kishore et al., 2015; Rawat et al., 2021).

6.3 Porovnání zkoumaných povodí

Překryv nalezených izolátů mezi jednotlivými povodími byl malý, jelikož jsme získali pouze jeden izolát, který byl nalezen napříč všemi povodími. Podstatná část izolátů (36 z 58) se nacházela vždy jen v jednom povodí. Tento malý překryv v druhovém složení mezi povodími mohl být způsoben nedostatečným ovzorkováním jednotlivých povodí. Pro lepší podchycení celkové diverzity bakterií v povodí jezer by se mohl použít intenzivnější vzorkovací systém, nicméně detailnější systém pro vzorkování je těžké provést. Suťové půdy se jen velmi těžko hledají, jelikož jsou nerovnoměrně rozmístěné pod kameny. Zároveň se odběry provádějí v jádrové oblasti NP a výčet míst pro odběr je omezený.

6.4 Porovnání výsledků z lučních a suťových půd

V povodí jezer (VW, PU, LA a VH) byla odběrová místa rozdělena do skupin podle pokryvu půdy, které zahrnují půdy: luční (alpínské louky) a suťové (půdy pod suťovými poli bez vegetace). Oba typy půd se v povodí jezer vyskytují současně

a zároveň se udává, že suťové půdy mohou být významný zdroj P (Kaňa et al., 2023). Izolátů bakterií, které se vyskytovaly čistě v lučních půdách jsme našli 29 a izolátů pouze ze suťových půd 19. Izoláty, které se nacházely v obou skupinách současně bylo 10 – viz. **Tabulka 3**.

Luční půdy v povodí jezer měly větší druhovou diverzitu bakterií než půdy ze suťových polí. To lze vysvětlit tím, že luční půdy jsou bohatější na živiny a teplota nepodléhá častým výkyvům (v suťových polích často dochází k rozmrzání a zpětnému zamrzání krystalků ledu – freeze-thaw weathering) (Kopáček et al., 2019). Zároveň jsme předpokládali, že tyto izoláty budou nějakým způsobem vázány na rostliny nebo na rhizosféru, ve které se vyskytují i jiné organismy (např. houby a Archea). Existuje skupina bakterií, označována jako ‚*plant growth promoting rhizobacteria*‘ (PGPR) (Kloepper J. W., 1978), do které patří např. *Burkholderia*, *Erwinia*, *Serratia* a *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga, 1999). Pokud srovnáme tento výčet kmenů s našimi výsledky, můžeme konstatovat, že bakterie, které jsme našli na lučních půdách (kmeny *Burkholderia*, *Erwinia*, *Serratia* a *Flavobacterium*) mohou patřit do právě zmiňované skupiny PGPR a mohou být vázány právě na vegetaci. Např. (Xu et al., 2012) našel ve své studii totožnou bakterii druhu *Collimonas* sp. 5, která se vyskytovala v oblasti s hustou vegetací bez velkých stromů, což odpovídá i našim výsledkům. Další totožná bakterie druhu *Paraburkholderia aromaticivorans* byla nalezena v Alpách ve smíšeném lesním porostu s podobnou nadmořskou výškou jako naše vybraná místa (França et al., 2016). Další totožné bakterie byly nalezené např. z lučních půd v horách ve Švédsku (Bjerketorp et al., 2021) nebo z lučních půd v Polsku (Szymańska et al., 2016).

Izoláty odebrané ze suťových polí se s místy svého výskytu také shodovaly s ostatními studii. Druh *Pseudomonas brenneri* ve své studii objevil (Y. M. Lee et al., 2011) na alpském ledovci v pohoří Ötztalských Alp. (Park et al., 2021) našel v subarktické oblasti Aljašky druh *Pseudomonas* sp., který se shoduje s naším nalezeným izolátem. Místa odběru půd, popsanych v těchto studiích, jsou podobná s našimi odběrovými místy v suťových polích. Nacházejí se ve vysokých nadmořských výškách s minimem (nebo absencí) vegetace a průměrné roční teploty se pohybují okolo bodu mrazu. Nelze ovšem předpokládat, že nalezené bakterie ze suťových půd se vyskytují jen v extrémních podmínkách bez vegetace, protože byly nalezeny i v travním porostu na Aljašce a v boreálním lese v Estonsku (Park & Kim, 2015; Pent et al., 2017).

6.5 Porovnání výsledků se studií izolace fosfor-solubilizujících bakterií z kamenů

Stejnou studii vypracovala i (Pávková, 2023) s rozdílem, že bakterie nebyly izolované z půd, ale z povrchu kamenů, odebraných v totožný datum na stejných lokalitách – Wahlenbergova jezero (VW), Pusté jezero (PU), Ladové jezera (LA) a Velké Hincovo (VH) jezero.

Pokud srovnáme výčet našich izolátů (z lučních i suťových půd) s výsledky od (Pávková, 2023), nalezneme shodu 6 izolátů. Konkrétně se jedná o *Caballeronia udeis*, *Pseudomonas* sp. 8, *uncultured bacterium* 3, *uncultured bacterium* 4, *uncultured Burkholderiaceae bacterium* 2 a *uncultured Burkholderiales bacterium* 7. Izolát *Caballeronia udeis* se vyskytoval v luční půdě i na kamenech v povodí VW jezera. Izolát *uncultured Burkholderiaceae bacterium* 2 se vyskytoval v luční i suťové půdě ve všech povodích, zatímco vyizolovaný taxon z kamenů se vyskytoval pouze v povodí PU jezera. Podrobné srovnání výsledků lze vyčíst z **Tabulky 4**.

Tabulka 4: Srovnání našich výsledných izolátů a výsledných izolátů od (Pávková, 2023) odebraných ze suťových polí v povodí Tatranských jezer (VW – Vyšné Wahlenbergovo jezero, PU – Pusté jezero, LA – Ladové jezero, VH – Velké Hincovo jezero).

Izolát	<i>Caballeronia udeis</i>			<i>Pseudomonas</i> sp. 8			<i>uncultured bacterium</i> 3			<i>uncultured bacterium</i> 4			<i>Uncultured Burkholderiaceae bacterium</i> 2			<i>uncultured Burkholderiales bacterium</i> 7		
	půdy- suť	půdy- louka	kameny	půdy- suť	půdy- louka	kameny	půdy- suť	půdy- louka	kameny	půdy- suť	půdy- louka	kameny	půdy- suť	půdy- louka	kameny	půdy- suť	půdy- louka	kameny
VW	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
PU	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
LA	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
VH	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+

V kontrastu s našimi výsledky koncentrace PO₄, hodnot pH a obsahu koncentrací měřených kyselin s výsledky od (Pávková, 2023) lze vyčíst několik zajímavých věcí. Všechny společné izoláty, až na *uncultured Burkholderiales bacterium* 7, průkazně zvyšovaly koncentraci PO₄. Hodnoty jsou si podobné, ale ve dvou případech se hodnoty koncentrace PO₄ liší až několikanásobně. Naše výsledky ukazují, že u izolátu

Caballeronia udeis byla koncentrace PO_4 naměřena $388 \text{ mg/l} \pm 42,9$, zatímco v práci od Pávkové byla koncentrace naměřena $48 \text{ mg/l} \pm 23,7$. Vyšší rozdíl mezi hodnotami byl zaznamenán u izolátu *uncultured Burkholderiaceae bacterium 2*, kdy jsme my naměřili hodnotu $198 \text{ mg/l} \pm 43,9$ a Pávková $6,2 \text{ mg/l} \pm 1,8$. Hodnoty naměřeného P se pravděpodobně liší z důvodu, že koncentrace rozpuštěného P v průběhu inkubace kolísá. Dále mohou různé výsledky souviset s laboratorními podmínkami a precizností laboratorní práce.

Rozdíly hodnot pH se u *Caballeronia udeis*, *Pseudomonas* sp. 8, *uncultured Burkholderiaceae bacterium 2* nijak zvlášť nelišily. U zbývajících izolátů *uncultured bacterium 3* a *uncultured Burkholderiales bacterium 7* jsme zjistili, že izoláty průkazně nesnižují pH a proto je nemůžeme srovnat s hodnotami od Pávkové. Produkce měřených organických kyselin byla značně rozdílná pro oba výzkumy a naměřené koncentrace spolu vůbec nekorelují. Jeden z důvodů, proč se hodnoty pH a hodnoty koncentrací kyselin mohou lišit je ten, že uvedené izoláty mohly v době měření produkovat rozdílné organické kyseliny, nebo že se rychlost růstu kultivovaných izolátů mezi sebou lišila. Rozdíl může také hrát preciznost měření. Podrobné srovnání obsahu koncentrace PO_4 , pH a koncentrace měřených organických kyselin lze najít v **Tabulce 5**.

Tabulka 5: Srovnání našich výsledků obsahu koncentrace PO_4 (mg/l), pH a koncentrace měřených organických kyselin (mg/l) s výsledky od (Pávková, 2023).

		PO_4	pH	Kyselina 2-keto-glukonová	Kyselina citrónová	Kyselina glukonová	Kyselina mléčná	Kyselina jablečná	Kyselina jantarová
<i>Caballeronia udeis</i>	půdy	388 ± 43	$6,9 \pm 0,1$			2760 ± 352			
	kameny	48 ± 24	$6,4 \pm 0,3$			$2,6 \pm 7,7$			
<i>Pseudomonas</i> sp. 8	půdy	570 ± 104	$4,2 \pm 0,1$	6000 ± 1436		$2,9 \pm 2,7$			
	kameny	$553 \pm 7,4$	$3,9 \pm 0,2$	3884 ± 333			201 ± 14		
<i>uncultured bacterium 3</i>	půdy	135 ± 43							
	kameny	$100 \pm 3,2$	$6 \pm 0,1$						
<i>uncultured bacterium 4</i>	půdy	112 ± 16	$4,8 \pm X$			$4,3 \pm 1,7$			
	kameny	$81,7 \pm 3,6$	$6,1 \pm 0,1$		$4,3 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,7$			
<i>uncultured Burkholderiaceae bacterium 2</i>	půdy	198 ± 44	$7 \pm 0,1$			826 ± 484			
	kameny	$6,2 \pm 1,8$	$8,1 \pm 0,1$	175 ± 151	$6,1 \pm 1,5$				
<i>uncultured Burkholderiales bacterium 7</i>	půdy								
	kameny	189 ± 131	$5,6 \pm 0,8$	$36,8 \pm 57,3$			$4,2 \pm 6,9$	$3,4 \pm 4,1$	$6,3 \pm 7,6$

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se v půdách v povodí jezer ve Vysokých Tatrách vyskytují fosfor – solubilizující organismy a jak se liší jejich druhová diverzita v lučních a suťových půdách. V neposlední řadě bylo cílem práce srovnat výsledky s prací, která probíhala současně s touto, a která se zaměřovala na druhovou diverzitu bakterií z povrchu kamenů, odebraných z povodí jezer ve Vysokých Tatrách, a jejich schopnost solubilizovat fosfor. Můžeme potvrdit z inkubace a následného měření, že v povodí Tatranských jezer se vyskytují bakterie schopné rozpouštět fosfor díky produkci organických kyselin. Bylo zároveň potvrzeno, že druhová diverzita těchto bakterií se liší v závislosti na typu odebrané půdy – luční a suťová. Poslední hypotézu lze potvrdit jen z části, jelikož se naše výsledky jen částečně shodují s výsledky ze studie od (Pávková, 2023).

Pro lepší odhadnutí celkové diverzity bakterií v povodí jezer by se mohl použít intenzivnější vzorkovací systém a modifikované kultivační médium. K přesnějšímu popisu jejich schopnosti produkce organických kyselin a solubilizace P by pomohlo využít dlouhodobější inkubační experiment s opakovaným měřením koncentrace rozpuštěného P, pH a organických kyselin.

8 Seznam použité literatury

- Adeleke, R., Nwangburuka, C., & Oboirien, B. (2017). Origins, roles and fate of organic acids in soils: A review. In *South African Journal of Botany* (Vol. 108, pp. 393–406). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.09.002>
- Akintokun, A. K., Akande, G. A., Akintokun, P. O., Popoola, T. O. S., & Babalola, A. O. (2007). Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *International Journal of Soil Science*, 2(4). <https://doi.org/10.3923/ijss.2007.301.307>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3). [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amri, M., Rjeibi, M. R., Gatrouni, M., Mateus, D. M. R., Asses, N., Pinho, H. J. O., & Abbes, C. (2023). Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. *Microorganisms*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030783>
- Antoniadis, V., Hatzis, F., Bachtsevanidis, D., & Koutroubas, S. D. (2015). Phosphorus Availability in Low-P and Acidic Soils as Affected by Liming and P Addition. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(10). <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1033539>
- Arenberg, M. R., & Arai, Y. (2019). Uncertainties in soil physicochemical factors controlling phosphorus mineralization and immobilization processes. In *Advances in Agronomy* (Vol. 154). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2018.11.005>
- Barrow, N. J. (2015). Barrow, N. J. 1983. A mechanistic model for describing the sorption and desorption of phosphate by soil. *Journal of soil science*, 34, 733-750. Reflections by N. J. Barrow. *European Journal of Soil Science*, 66(1). <https://doi.org/10.1111/ejss.12197>
- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1). <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>
- Bjerketorp, J., Levenfors, J. J., Nord, C., Guss, B., Öberg, B., & Broberg, A. (2021). Selective Isolation of Multidrug-Resistant *Pedobacter* spp., Producers of Novel Antibacterial Peptides. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642829>

- Bonneville, S., Morgan, D. J., Schmalenberger, A., Bray, A., Brown, A., Banwart, S. A., & Benning, L. G. (2011). Tree-mycorrhiza symbiosis accelerate mineral weathering: Evidences from nanometer-scale elemental fluxes at the hypha-mineral interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(22). <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.08.041>
- Brady N. C., & Weil R. R. (2002). *The Nature and Properties of Soils* (thirteenth edition). Pearson Education Ltd.
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2016). Nature and Properties of Soils, The 15th Edition. *Pearson Education*.
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59(1). <https://doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Browne, P., Rice, O., Miller, S. H., Burke, J., Dowling, D. N., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2009). Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology*, 43(1). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.06.010>
- Brucker, E., Kernchen, S., & Spohn, M. (2020). Release of phosphorus and silicon from minerals by soil microorganisms depends on the availability of organic carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107737>
- Buch, A., Archana, G., & Naresh Kumar, G. (2008). Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Research in Microbiology*, 159(9–10). <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.09.012>
- Calvaruso, C., Turpault, M. P., & Frey-Klett, P. (2006). Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: A budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1258-1266.2006>
- Charana Walpola, B. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37). <https://doi.org/10.5897/ajmr12.889>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>

- Coenye, T. (2014). The family Burkholderiaceae. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (Vol. 9783642301971). https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_239
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2). <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Cui, K., Xu, T., Chen, J., Yang, H., Liu, X., Zhuo, R., Peng, Y., Tang, W., Wang, R., Chen, L., Zhang, X., Zhang, Z., He, Z., Wang, X., Liu, C., Chen, Y., & Zhu, Y. (2022). Siderophores, a potential phosphate solubilizer from the endophyte *Streptomyces* sp. CoT10, improved phosphorus mobilization for host plant growth and rhizosphere modulation. *Journal of Cleaner Production*, 367. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133110>
- Dar, A., Zahir, Z. A., Iqbal, M., Mehmood, A., Javed, A., Hussain, A., Bushra, & Ahmad, M. (2021). Efficacy of rhizobacterial exopolysaccharides in improving plant growth, physiology, and soil properties. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8). <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09286-6>
- Dwidya Prijambada, I., Widada, J., Kabirun, S., & Widiyanto, D. (2009). Secretion of Organic Acids by Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Oxisols. In *J. Tanah Trop* (Vol. 14, Issue 3).
- França, L., Sannino, C., Turchetti, B., Buzzini, P., & Margesin, R. (2016). Seasonal and altitudinal changes of culturable bacterial and yeast diversity in Alpine forest soils. *Extremophiles*, 20(6). <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0874-2>
- George, T. S., Hinsinger, P., & Turner, B. L. (2016). Phosphorus in soils and plants – facing phosphorus scarcity. *Plant and Soil*, 401(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2846-9>
- Goswami, S. P., Dubey, A. N., & Singh, N. (2019). Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. *International Journal of Chemical Studies*, 3(7).
- Hana Šantrůčková, Eva Kaštovská, Jiří Bárta, Ladislav Miko, & Karel Tajovský. (218 C.E.). *Ekologie půdy*. NATURA.
- Holtan, H., Kamp-Nielsen, L., & Stuanes, A. O. (1988). Phosphorus in soil, water and sediment: an overview. *Hydrobiologia*, 170(1). <https://doi.org/10.1007/BF00024896>
- Jain, N., & Sharma, D. K. (2004). Biohydrometallurgy for nonsulfidic minerals - A review. *Geomicrobiology Journal*, 21(3). <https://doi.org/10.1080/01490450490275271>

- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G., & Van Hees, P. A. W. (2003). Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248(1–2). <https://doi.org/10.1023/A:1022304332313>
- Jones, D. L., & Hinsinger, P. (2008). The rhizosphere: Complex by design. *Plant and Soil*, 312(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9774-2>
- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). *Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_7
- Jurkevitch, E., Hadar, Y., & Chen, Y. (1992). Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1). <https://doi.org/10.1128/aem.58.1.119-124.1992>
- Kämpfer, P. (2007). Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_13
- Kaňa, J., Kaštovská, E., Choma, M., Čapek, P., Tahovská, K., & Kopáček, J. (2023). Undeveloped till soils in scree areas are an overlooked important phosphorus source for waters in alpine catchments. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42013-4>
- Kaňa, J., & Kopáček, J. (2006). Impact of soil sorption characteristics and bedrock composition on phosphorus concentrations in two Bohemian Forest lakes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 173(1–4). <https://doi.org/10.1007/s11270-005-9065-y>
- Kaňa, J., Kopáček, J., Camarero, L., & Garcia-Pausas, J. (2011). Phosphate Sorption Characteristics of European Alpine Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 75(3). <https://doi.org/10.2136/sssaj2010.0259>
- Kaštovská et.al. (n.d.). *in preparation*.
- Kaur, C., Selvakumar, G., & Upreti, K. K. (2021). Organic acid profiles of phosphate solubilizing bacterial strains in the presence of different insoluble phosphatic sources under in vitro buffered conditions. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(2), 1006–1015. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.2.59>
- Khan, M. S., Ahmad, E., Zaidi, A., & Oves, M. (2013). Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: Importance in crop production. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_10
- Kishore, N., Pindi, P. K., & Reddy, S. R. (2015). Phosphate-solubilizing microorganisms: A critical review. In *Plant Biology and Biotechnology: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement* (Vol. 1). https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12

- Kloepper J. W. (1978). Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie. *Proc. of the 4th Interne, INRA*, 879–882.
- Kopáček, J., Hejzlar, J., Kaňa, J., Norton, S. A., & Stuchlík, E. (2015). Effects of acidic deposition on in-lake phosphorus availability: A lesson from lakes recovering from acidification. *Environmental Science and Technology*, 49(5). <https://doi.org/10.1021/es5058743>
- Kopáček, J., Hejzlar, J., Vrba, J., & Stuchlík, E. (2011). Phosphorus loading of mountain lakes: Terrestrial export and atmospheric deposition. *Limnology and Oceanography*, 56(4). <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.4.1343>
- Kopáček, J., Kaňa, J., Bičárová, S., Brahney, J., Navrátil, T., Norton, S. A., Porcal, P., & Stuchlík, E. (2019). Climate change accelerates recovery of the Tatra Mountain lakes from acidification and increases their nutrient and chlorophyll a concentrations. *Aquatic Sciences*, 81(4). <https://doi.org/10.1007/s00027-019-0667-7>
- Kopáček, J., Kaňa, J., Bičárová, S., Fernandez, I. J., Hejzlar, J., Kahounová, M., Norton, S. A., & Stuchlík, E. (2017). Climate Change Increasing Calcium and Magnesium Leaching from Granitic Alpine Catchments. *Environmental Science and Technology*, 51(1). <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03575>
- Kopáček, J., Kaňa, J., Šantrůčková, H., Pícek, T., & Stuchlík, E. (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(1–4). <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000019948.23456.14>
- Kopáček, J., Stuchlík, E., & Hardekopf, D. (2006). Chemical composition of the Tatra Mountain lakes: Recovery from acidification. *Biologia*, 61(S18). <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0117-6>
- Kumar, A., Kumar, A., & Patel, H. (2018). Role of Microbes in Phosphorus Availability and Acquisition by Plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(05). <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.161>
- Lee, K.-K., Mok, I.-K., Yoon, M.-H., Kim, H.-J., & Chung, D.-Y. (2012). Mechanisms of Phosphate Solubilization by PSB (Phosphate-solubilizing Bacteria) in Soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 45(2), 169–176. <https://doi.org/10.7745/kjssf.2012.45.2.169>
- Lee, Y. M., Kim, S. Y., Jung, J., Kim, E. H., Cho, K. H., Schinner, F., Margesin, R., Hong, S. G., & Lee, H. K. (2011). Cultured bacterial diversity and human impact on alpine glacier cryoconite. *Journal of Microbiology*, 49(3). <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0232-0>

- Mardad, I., Serrano, A., & Soukri, A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7(8), 626–635. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1431>
- Marra, L. M., de Oliveira-Longatti, S. M., Soares, C. R. F. S., de Lima, J. M., Olivares, F. L., & Moreira, F. M. S. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2). <https://doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102>
- McGill, W. B., & Cole, C. V. (1981). Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26(4). [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(81\)90024-0](https://doi.org/10.1016/0016-7061(81)90024-0)
- Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, 43(1). <https://doi.org/10.1007/s002840010259>
- Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., & O’Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x>
- Mimmo, T., Ghizzi, M., Marzadori, C., & Gessa, C. E. (2008). Organic acid extraction from rhizosphere soil: Effect of field-moist, dried and frozen samples. *Plant and Soil*, 312(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9574-8>
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., & Joint, I. (2008). Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal*, 2(4). <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.97>
- Pan, L., & Cai, B. (2023). Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>
- Park, H. J., & Kim, D. (2015). Isolation and characterization of humic substances-degrading bacteria from the subarctic Alaska grasslands. *Journal of Basic Microbiology*, 55(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300087>

- Park, H. J., Lee, Y. M., Do, H., Lee, J. H., Kim, E., Lee, H., & Kim, D. (2021). Involvement of laccase-like enzymes in humic substance degradation by diverse polar soil bacteria. *Folia Microbiologica*, 66(3), 331–340. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00847-9>
- Pávková, K. (2023). *Diverzita epilitických mikroorganismů schopných rozpouštění fosforu v suťových polích v povodích Tatranských ples Bakalářská práce.*
- Pent, M., Põldmaa, K., & Bahram, M. (2017). Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00836>
- Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kudryavtsev, A. V., Kulikova, N. A., Abbt-Braun, G., Hesse, S., & Petrosyan, V. S. (2003). Molecular weight characteristics of humic substances from different environments as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation. *Environmental Science and Technology*, 37(11). <https://doi.org/10.1021/es0258069>
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17.
- Pohlman, A. A., & Mc Coll, J. G. (1986a). Kinetics of Metal Dissolution from Forest Soils by Soluble Organic Acids. *Journal of Environmental Quality*, 15(1). <https://doi.org/10.2134/jeq1986.00472425001500010020x>
- Pohlman, A. A., & Mc Coll, J. G. (1986b). Kinetics of Metal Dissolution from Forest Soils by Soluble Organic Acids. *Journal of Environmental Quality*, 15(1), 86–92. <https://doi.org/10.2134/jeq1986.00472425001500010020x>
- Prijambada, I. D., Widada, J., Kabirun, S., & Widiyanto, D. (2009). Secretion of Organic Acids by Phosphate Solubilizing Bacteria. *JOURNAL OF TROPICAL SOILS*, 14(3). <https://doi.org/10.5400/jts.2009.v14i3.245-251>
- R studio. (n.d.). *b.r.* (Získáno 10.3.2024). *Posit.*
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4–5). [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., & Bashan, Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, *91*(11). <https://doi.org/10.1007/s00114-004-0566-0>
- Roewe, J., Stavrides, G., Strueve, M., Sharma, A., Marini, F., Mann, A., Smith, S. A., Kaya, Z., Strobl, B., Mueller, M., Reinhardt, C., Morrissey, J. H., & Bosmann, M. (2020). Bacterial polyphosphates interfere with the innate host defense to infection. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17639-x>
- Ruttenberg, K. C. (2019). Phosphorus cycle. In *Encyclopedia of Ocean Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10807-3>
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018a). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, *23*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018b). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, *23*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112897>
- Seshadri, S., Ignacimuthu, S., Vadivelu, M., & Lakshminarasimhan, C. (2007). Inorganic phosphate solubilization by two insect pathogenic *Bacillus* sp. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_56
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. In *SpringerPlus* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Silva, L. I. da, Pereira, M. C., Carvalho, A. M. X. de, Buttrós, V. H., Pasqual, M., & Dória, J. (2023). Phosphorus-Solubilizing Microorganisms: A Key to Sustainable Agriculture. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/agriculture13020462>
- Spohn, M., & Kuzyakov, Y. (2013). Phosphorus mineralization can be driven by microbial need for carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, *61*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.02.013>
- Sterner, R. W., & Elser, J. J. (2002). Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere: Robert W. Sterner, James J. Elser, Peter Vitousek. In *Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA*.
- Stevenson F. J. (1986). *Cycles of Soil Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*. A Wiley-Interscience Publication.
- Stevenson, F. J., & Cole, M. A. (1999). Soil carbon budgets and role of organic matter in soil fertility. In *Cycles of Soil*.

- Stuchlík, E., Kopáček, J., Fott, J., & Hořická, Z. (2006). Chemical composition of the Tatra Mountain lakes: Response to acidification. *Biologia*, 61(S18). <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0116-7>
- Sverdrup, H. (2009). Chemical weathering of soil minerals and the role of biological processes. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 23, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.12.001>
- Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., & Hryniewicz, K. (2016). Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. - community structure and metabolic potential. *Microbiological Research*, 192, 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.012>
- T. Nikitha, M. S., B. Sadhana, E. U. B. R., & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4). <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>
- Thomas Sims, J., & Pierzynski, G. M. (2018). Chemistry of phosphorus in soils. In *Chemical Processes in Soils*. <https://doi.org/10.2136/sssabookser8.c2>
- Turner, B. L., Cade-Menun, B. J., Condon, L. M., & Newman, S. (2005). Extraction of soil organic phosphorus. *Talanta*, 66(2 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.11.012>
- Vitousek, P. M., Porder, S., Houlton, B. Z., & Chadwick, O. A. (2010). Terrestrial phosphorus limitation: Mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. In *Ecological Applications* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1890/08-0127.1>
- Wan, W., Qin, Y., Wu, H., Zuo, W., He, H., Tan, J., Wang, Y., & He, D. (2020). Isolation and Characterization of Phosphorus Solubilizing Bacteria With Multiple Phosphorus Sources Utilizing Capability and Their Potential for Lead Immobilization in Soil. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00752>
- Xu, C. W., Yang, M. Z., Chen, Y. J., Chen, L. M., Zhang, D. Z., Mei, L., Shi, Y. T., & Zhang, H. B. (2012). Changes in non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria inhabiting rhizosphere soils of an invasive plant *Ageratina adenophora*. *Applied Soil Ecology*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.021>
- Zou, X., Binkley, D., & Doxtader, K. G. (1992). A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147(2). <https://doi.org/10.1007/BF00029076>