

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Metodické a konceptuální důsledky přítomnosti
polyfosfátů v buněčné biomase půdních mikroorganismů**

Diplomová práce

Bc. Adéla Tupá

Školitel: RNDr. Petr Čapek, Ph.D.

České Budějovice 2024

Tupá, A., 2024: Metodické a konceptuální důsledky přítomnosti polyfosfátů v buněčné biomase půdních mikroorganismů. [Methodological and conceptual implications of the presence of polyphosphates in soil microbial biomass. Mgr. Thesis, in Czech.] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this study was to determine whether soil microorganisms contain polyphosphates and whether they are quantifiable. To assess the presence of polyphosphates in soil microbial biomass, I utilized a combination of growth experiment conducted without the addition of phosphorus to the growth medium, measurement of stoichiometric changes in microbial biomass, and staining of polyphosphates by Neisser method. Furthermore, I employed a laboratory experiment to determine whether polyphosphates are detectable by the fumigation-extraction method. My results prove the presence of polyphosphates in the biomass of soil microorganisms and indicate that the polyphosphates are detectable by the fumigation-extraction method. Presence of polyphosphates have important implications for microbial phosphorus measurement and the development of biogeochemical models of phosphorus mineralization and immobilization in soil.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 10.4. 2024

Adéla Tupá

Poděkování

Ráda bych poděkovala mému školiteli Petru Čapkovi za odborné vedení při psaní této diplomové práce a za čas, který mi vždy věnoval. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům půdní skupiny z katedry biologie ekosystémů. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině a přátelům.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární rešerše	3
2.1. Formy fosforu v půdním prostředí	3
2.2. Fosfor v biomase půdních mikroorganismů	3
2.3. Polyfosfáty	5
2.4. Biosyntéza a degradace polyfosfátů	6
2.4.1. Biosyntéza	6
2.4.2. Degradace polyfosfátů	7
2.4.3. Podmínky pro syntézu a degradaci	8
2.5. Stanovení fosforu v biomase půdních mikroorganismů	8
2.6. Detekce polyfosfátů	9
2.7. Cíle práce	10
2.8. Hypotézy	11
3. Materiál a metody	11
3.1. Výběr a popis lokalit	11
3.2. Odběr a zpracování vzorků	12
3.3. Laboratorní experiment	12
3.3.1. Základní analýzy	12
3.3.2. Návratnost polyfosfátů	14
3.3.3. Růstový experiment a fumigačně extrakční metoda	17
3.3.4. Barvení polyfosfátů	18
3.3.5. Statistické zpracování dat	19
4. Výsledky	19
4.1. Základní analýzy	19
4.2. Návratnost polyfosfátů	21
4.3. Růstový experiment	23

5. Diskuze	27
5.1. Přítomnost polyfosfátů v biomase půdních mikroorganismů.....	27
5.2. Návratnost polyfosfátů	29
6. Závěr.....	31
7. Seznam použité literatury	32

1. Úvod

Všechny mikroorganismy potřebují určité množství fosforu (P) ke svému růstu a vývoji. Prostředí, ve kterém žijí a ze kterého P získávají, však bývá různorodé a množství P v něm může být proměnlivé. V určitém období může být množství P více než dostatečné a jindy ho může být nedostatek (Brady & Weil, 2002). Mikroorganismy musí těmto výkyvům čelit, a proto si vyvinuly různé adaptační mechanismy. Jedním takovým mechanismem je tvorba zásob uvnitř buněk, aby byl P pro mikroorganismy dostupný, kdykoliv je ho potřeba. Těmito zásobními látkami jsou tzv. polyfosfáty (PolyP), které mohou tvořit signifikantní množství P z celkového P obsaženého v buňce (Egli & Zehnder, 1994). PolyP jsou sloučeniny P složené z různě dlouhých řetězců fosforečnanů (PO_4) a pospojované vysokoenergetickými (anhydridovými) vazbami, jejichž energie je stejná jako energie získávaná z adenosintrifosfátu (ATP). Znamená to, že PolyP nemusí sloužit jen jako zdroj P, ale mohou být mimo jiné využívány také jako zdroj energie.

Ve vodních ekosystémech je dokázáno, že existují bakterie, které umí PolyP vytvářet a akumulovat. Takové bakterie (např. *Candidatus Accumilibacter phosphati*) se využívají v čistíčkách odpadních vod (ČOV) a v systémech, které jsou založeny na biologickém odstraňování P z vody. Zda se PolyP vyskytují i v půdních ekosystémech a půdních mikroorganismech, není v současné době zcela jasné, avšak některé předchozí výzkumy poukazují na to, že by tomu tak být mohlo (Mason-Jones et al., 2021). Například Čapek a spol. (2016) zaznamenali při růstovém experimentu, že půdní mikrobiální společenstvo vykázalo růst, a to i na substrátu, v němž žádný přidaný P nebyl, což poukazuje na využití nějaké vnitřní zásoby P. Využití vnitřní zásoby P naznačuje i negativní korelaci mezi rychlostí růstu bez přítomnosti P a mikrobiálním poměrem uhlíku (C) ku fosforu C:P. Tento vztah však přímo nedokazuje kauzalitu. Kauzalita se dá prokázat v případě, že mikroorganismy zásoby P opravdu využívají a že jsou PolyP detekovatelné fumigačně extrakční metodou, která se používá ke stanovení obsahu živin (C, dusíku (N) a P) v půdních mikroorganismech.

Pokud by se prokázalo, že půdní mikroorganismy jsou schopné akumulovat a využívat PolyP, mělo by to zásadní vliv nejen při jejich růstu a přežití, ale také při tvorbě půdních biogeochemických modelů. Tyto modely jsou často založené na principech ekologické stechiometrie a nepočítají s tvorbou zásobních látek. Znamená to, že pokud mikroorganismy PolyP skutečně vytvářejí, modely říkají něco, co úplně neodpovídá skutečnosti. Mohou tak nadhodnocovat množství P, které je potřebné k růstu mikroorganismů (ke stavbě buněčných struktur jako je DNA, RNA, fosfolipidy a další), což například podhodnocuje

množství P, které se může zmineralizovat, vyplavit do půdy a být využito biomasou rostlin. To ovlivňuje nejen cyklus P v půdě, ale také cykly C i N přes produkci rostlin v ekosystému. Z toho důvodu jsem se rozhodla zabývat se právě možnou přítomností PolyP v biomase půdních mikroorganismů.

Cílem této diplomové práce bylo tedy zjistit přítomnost PolyP v biomase půdních mikroorganismů v půdách z povodí Plešného a Čertova jezera pomocí růstového experimentu kombinovaného s barvicími metodami a dále také zjistit, zda jsou PolyP v biomase mikroorganismů detekovatelné pomocí běžně používané fumigačně extrakční metody.

2. Literární rešerše

2.1. Formy fosforu v půdním prostředí

Fosfor je jedním z nezbytných prvků potřebných pro růst všech půdních mikroorganismů. Mikroorganismy ho získávají z půdního prostředí. V horninovém podloží se nachází P ve formě minerálu apatitu a jaké je jeho množství v půdě záleží na geologii daného místa. Půdní prostředí obsahuje různé formy P v proměnlivém množství, a to hlavně v závislosti právě na mineralogickém složení a na stupni zvětrávání mateřské horniny (Šimek, 2019). Celkové množství P ve většině půd dosahuje 0,1-1 mg P g⁻¹ suché půdy (v 0-20 cm). Půdní roztok obsahuje většinou 0,1-1 µg P ml⁻¹ (Šimek, 2019).

Fosfor, jenž se přenáší přes membránu, tedy ten, který je přímo dostupný rostlinám a mikroorganismům, je ve formě fosforečnanu. Fosforečnany se mohou pevně vázat na koloidní částice pomocí výměnných iontů jako jsou železo (Fe), hliník (Al), a mangan (Mn), procesem zvaným koadsorpcí. Fosfor tak vytváří vazby na hydroxy-oxidy Fe a Al či se adsorbuje na povrchy jílových minerálů. Dále se také P váže na volné ionty kovů v roztoku Fe, Al, případně vápník (Ca). Při nízkém pH dochází k vysrážení na Fe a Al fosforečnany a při vysokém pH na Ca fosforečnany. Všemi těmito procesy dochází k imobilizaci fosforečnanů a k jejich zneprístupnění pro mikroorganismy.

Dalším zdrojem P v půdě jsou organické sloučeniny P. Jejich zdrojem jsou především odumřelé buňky organismů. Fosfor z těchto sloučenin si mikroorganismy mohou zpřístupnit produkcí enzymů fosfatáz, které jsou schopné štěpit esterové vazby. Fosforu navázaného v biomase půdních mikroorganismů je v průměru 5–75 µg P g⁻¹ suché půdy. Celkově půdní mikroorganismy obsahují 2 - 5 % celkového organického P v půdě (Šimek, 2019).

Půdní prostředí je nejvíce heterogenní ve vertikálním směru. V opadovém horizontu se nachází hlavně organický P a v minerálním horizontu se nachází P anorganický adsorbovaný. Také množství P se s hloubkou mění. Dle Haygarth et al. (1998) se s rostoucí hloubkou snižuje koncentrace P. Obecně taktéž platí, že je dostupnost P v půdním prostředí oproti C a N malá (Zechmeister-Boltenstern et al., 2015).

2.2. Fosfor v biomase půdních mikroorganismů

V této a následující kapitole nebudu uvádět množství P v absolutních hodnotách, ale relativně k C a N jako molární poměr C:N:P. Chtěla bych tak poukázat na to, že stechiometrie může

do určité míry sloužit jako nepřímá metoda detekce PolyP. Důležité je, v jakém relativním množství se molekuly bohaté na P nachází uvnitř buňky. Existují totiž fyziologické limity, které jdou překročit pouze když buňka obsahuje PolyP. Všechny následující uvedené poměry jsou převzaty z knihy „Ecological Stoichiometry“ (Sterner & Elser, 2002).

Fosfor se uvnitř půdních mikroorganismů nachází v mnoha důležitých makromolekulách, například v podobě nukleových kyselin (DNA, RNA), ATP, koenzymů a fosfolipidů. Fosfor tak lze najít téměř ve všech buněčných strukturách a to v různém poměru k C a N. První takovou strukturou je buněčná stěna. U gram pozitivních bakterií se v buněčné stěně nachází pouze jedna extracelulární vrstva, která je tvořena peptidoglykanem, proteiny, polysacharidy a kyselinou teichoovou. Fosfor se tak v jejich buněčné stěně nachází v poměru 193:58:1. U gram negativních bakterií není poměr jasný, jelikož je jeho stanovení znemožněno velkou funkční plasticitou jejich buněčné stěny, ale dá se očekávat, že poměr nebude příliš nízký, například nižší, než je u DNA a RNA.

Pod buněčnou stěnou se nachází buněčná membrána, která je tvořena glycerolem nebo sfingosinem s navázanými mastnými kyselinami o různé délce a struktuře a také se zbytky fosforečnanů. Složení je díky vnějším podmínkám velice proměnlivé a s tím i samotný poměr C:N:P, avšak obecně se poměr uvádí jako 162:35:1.

U eukaryotických organismů se dále buněčná stěna napojuje na endoplazmatické retikulum, které má C:N:P poměr průměrně 120:23:1 a na Golgiho aparát, jehož C:N:P poměr je průměrně 97:16:1.

Další buněčnou strukturou jsou ribozomy. Eukaryotické ribozomy se skládají ze dvou podjednotek 40S a 60S. Každá podjednotka obsahuje 82 ribozomálních proteinů a 4 různé velké ribozomální RNA, malá podjednotka obsahuje 18S rRNA a velká podjednotka 5.8S, 5S a 28S rRNA. C:N:P poměr ribozomů eukaryot je obecně 27:7:2,1. Prokaryotické ribozomy se skládají z 55 proteinů a z malé podjednotky, obsahující 16S rRNA, a z velké podjednotky, obsahující 5S a 23S rRNA, ribozomální RNA. Obecný poměr C:N:P pro prokaryota je 18:6:1. Ribozomy jsou buněčné struktury nejbohatší na P, a proto mají nejnížší C:N:P poměr ze všech struktur.

Mitochondrie, které mají jen eukaryota, mají proměnlivé množství P, zatímco poměr C:N je relativně stálý. Jaké množství P mají, záleží na tom, jak je mitochondrie velká a na míře její respirace. Čím více respiruje, tím vyšší je množství N, a proto je vyšší i poměr N:P.

Stechiometrie biomasy půdních mikroorganismů je definována jako relativní zastoupení C, N a P v biomase. Obecně se udává C:N:P poměr mikrobiální biomasy jako 42:6:1 (Xu et al., 2013). Předpokládá se, že mikroorganismy umí ve své biomase udržovat tento poměr stálý, tedy že umí být homeostatičtí. Zároveň jsou však mikroorganismy schopné se do určité míry přizpůsobit prostředí a poměr C:N:P do určité míry měnit. Je-li v půdním prostředí málo P, jednou z možností přizpůsobení je změna poměru makromolekul, tedy jejich relativního zastoupení v buňce. Znamená to, že například makromolekuly bohaté na P budou zastoupeny v menší míře. Takové změny mohou z dlouhodobějšího hlediska souviset až se změnou společenstva půdních mikroorganismů právě směrem ke druhům tolerantnějším a lépe přizpůsobeným na limitaci živin (Heuck et al., 2015). Jiným faktorem proměnlivosti stechiometrie je celkově fyziologický stav buněk, například exponenciální fáze buněčného cyklu. Při této fázi se snižuje C:P a N:P poměr, jelikož se v buňce zvyšuje zastoupení ribozomů a makromolekul bohatých na P, jako jsou nukleové kyseliny (Elser et al., 2000). Dalším možným mechanismem změny stechiometrie je akumulace zásobních látek, PolyP, které mohou být velmi významnou složkou buněčného P. Nachází-li se v mikrobiální biomase PolyP, stochiometrický poměr C:P a N:P by se měl snižovat. Schopnost akumulovat PolyP je však druhově specifická. Záleží, zda dané druhy mají enzymy, jež katalyzují syntézu PolyP a jsou-li vhodné vnitřní i vnější podmínky (viz kapitola 2.4.).

Některé mikroorganismy umí akumulovat velké množství PolyP, např. ve vláknech *Microthrix parvicella* objevili pomocí fluorescenční metody značné množství PolyP (Erhart et al., 1997). Množství PolyP v *Acinetobacter Johnsonii* dosahuje až 30 % ze suché váhy buňky (Kulaev et al., 1999). V *Microthrix parvicella* může být kolem 10 % PolyP ze suché váhy buňky (Nakamura et al., 1995). Dle Christ & Blank (2019) obsahovala, po ponechání na substrátu bez P a následném dodání P, *Saccharomyces cerevisiae* 28 % PolyP ze suché váhy buňky.

2.3. Polyfosfáty

Zásobní látkou P uvnitř buněk jsou PolyP. PolyP jsou polymery fosforečnanů, obsahující různé dlouhé řetězce fosforečnanů spojených vysokoenergetickými fosfoanhydridovými vazbami. Řadí se tak mezi makroenergetické sloučeniny, to znamená, že hydrolýza jejich fosfoanhydridových vazeb má stejnou energii jako hydrolýza ATP. PolyP mají tři strukturní podoby, a to lineární, cyklickou (tzv. metafosfáty) a rozvětvenou (tzv. ultrafosfáty). U živých organismů je nejčastější lineární konfigurace (Christ et al., 2020). PolyP slouží jako vnitřní

zdroj P a energie pro mikroorganismy, a to hlavně ve chvíli, kdy je externí zdroj P vyčerpán (Dawes, 1986).

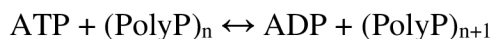
Nedílnou součástí PolyP molekuly jsou navázané kationty prvků (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ a další), bez nichž by se PolyP nemohly vůbec vytvářet. PolyP mají negativní náboj a musí se tak chemicky stabilizovat právě pomocí kationtů (van Groenestijn et al., 1988). Schopnost vázat kationty je důležitá také proto, že PolyP mohou vázat i těžké kovy jako je třeba zinek (Zn^{2+}), železo (Fe^{3+} ; Nguyen et al., 2019) a kadmium (Cd^{2+}). Díky těmto vazbám PolyP regulují dostupnost navázaných kovů a umí tak regulovat i jejich toxicitu pro buňku. Například buňky *Escherichia Coli* (Keasling & Hupf, 1996) a *Anacystis nidulans* (Keyhani et al., 1996) s vysokým množstvím PolyP byly tolerantnější k obsahu kadmia (Cd^{2+}), oproti těm s nízkým množstvím PolyP. Keasling (1997) ve své studii prokázal, že přítomnost některých těžkých kovů zvyšuje hydrolyzu PolyP na fosforečnany, které se mohou navázat na kovové ionty a mohou být následně transportovány ven z buňky.

V prokaryotické buňce se PolyP nacházejí v cytoplasmě, na povrchu buňky, v periplasmě a plazmatické membráně (Kulaev et al., 1999). V eukaryotické buňce se nachází v jádře, mitochondriích, cytoplasmě, buněčné stěně a v endoplazmatickém retikulu. PolyP se v buňce vyskytují také jako komplexy s poly-beta-hydroxybutyrátem (PHB). Takové komplexy hrají důležitou roli při vytváření iontových membránových kanálů a při regulaci propustnosti membrán, kdy selektivně propouští dvoumocné kationty, především Ca^{2+} (Reusch, 2000).

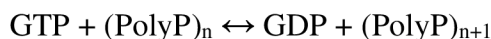
2.4. Biosyntéza a degradace polyfosfátů

2.4.1. Biosyntéza

Důležitým enzymem katalyzujícím biosyntézu PolyP v bakteriích je PolyP kináza (PPK1). Katalyzuje přenos energeticky bohatých zbytků fosfátů z ATP do PolyP a zpět (Murata et al., 1988), tedy spojuje energeticky bohaté zásobníky.

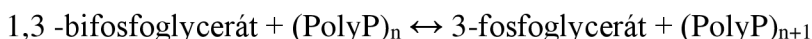


K tomuto procesu vyžaduje Mg^{2+} (Harold, 1966). Tento enzym byl poprvé objeven ve studii Yoshida a Yamata, (1953) a následně izolován z *Escherichia coli* a popsán ve studii Kornberg et al. (1956). PPK1 je enzym vázaný na membránu a je zodpovědný za syntézu dlouhých PolyP řetězců (Kulaev et al., 1999). PPK2 katalyzuje syntézu PolyP z ATP či GTP.



K syntéze PolyP potřebuje Mn^{2+} . PPK2 umí také katalyzovat degradaci PolyP, kdy se využijí fosforečnany z PolyP na tvorbu GTP z GDP (Zhang et al., 2002). PPK2 využívá PolyP k tvorbě GTP rychlostí 75krát větší, než je syntéza PolyP z GTP. Oproti tomu PPK1 syntetizuje PolyP z ATP rychlostí 4krát větší, než je tvorba ATP z PolyP (Ishige et al., 2002).

Dalším enzymem katalyzujícím biosyntézu PolyP je 1,3-bifosfoglycerát PolyP fosfotransferáza (Edwin A. Dawes, 1986).

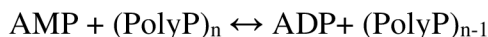


V kvasinkách jsou PolyP syntetizovány z plazmatické ATP pomocí VTC komplexu (Hothorn et al., 2009), který je zabudován v membráně vakuol (Cohen et al., 1999).

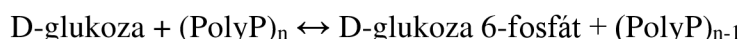
2.4.2. Degradace polyfosfátů

Existuje mnoho enzymů katalyzujících degradaci PolyP. Jedním z nich je i PolyP kináza (PPK1, PPK2). Jak již bylo řečeno výše, tento enzym katalyzuje biosyntézu PolyP z ATP, ale zároveň se také může účastnit degradace PolyP, kdy se využijí odtržené fosforečnany na syntézu ATP či GTP (Harold 1966).

Adenosin monofosfát fosfotransferáza (AMP fosfotransferáza) je enzym katalyzující syntézu PolyP v mykobakteriích a corynebakteriích.



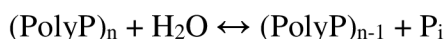
D-glukoza 6-fosfát fosfotrasferáza (PolyP glukokináza) je enzym specifický pro přenos fosfátové skupiny na glukozu, tvoří se tak D-glukoza 6-fosfát.



Objevením tohoto enzymu se poukázalo na to, že vysokoenergetické fosfátové zbytky z PolyP mohou být využívány přímo i bez účasti ADP-ATP systému. Znamená to, že v některých případech mohou PolyP zaujímat funkci ATP (Rose et al., 1983).

PolyP fruktokináza je enzym, díky němuž lze využívat jak PolyP, tak ATP na fosforylaci fruktózy na fruktózu-6-fosfát.

Polyfosfosfatázy (PPX) jsou enzymy katalyzující hydrolýzu dlouhých řetězců PolyP na fosforečnany.



2.4.3. Podmínky pro syntézu a degradaci

Syntéza a degradace PolyP je obecně ovlivněna energetickým stavem buňky a množstvím extracelulárního fosforečnanu. Bylo ukázáno, že PolyP jsou syntetizovány během energeticky bohatých růstových podmínek a degradovány během energeticky chudých podmínek. Ahn & Kornberg, (1990) ve své studii ukázali, že vysoké koncentrace ATP stimulovaly *in vitro* syntézu PolyP pomocí PPK1. Dále jsou k stimulaci syntézy PolyP třeba vhodné oxické podmínky a kationty Mg^{2+} a K^+ . PolyP se obecně akumulují během stacionární fáze mikrobiálního růstu a spotřebovávají během exponenciální fáze. K ukládání PolyP může také docházet ve chvíli, kdy je růst mikrobiální biomasy limitován nedostatkem N či síry (S) a naopak k rozkladu PolyP dochází při nadbytku C a N (Dawes & Senior, 1973).

2.5. Stanovení fosforu v biomase půdních mikroorganismů

Ke stanovení P v biomase půdních mikroorganismů (MBP) se využívá fumigačně extrakční metoda. Půda je vystavena parám chloroformu ($CHCl_3$), čímž dochází k usmrcení půdních mikroorganismů a k vylití jejich buněčného obsahu do půdního prostředí. Ten je extrahován pomocí 0,5 M hydrogenuhličitan sodného ($NaHCO_3$). Vzniklý extrakt se okyselí pomocí kyseliny sírové (H_2SO_4) a přefiltruje (Brookes et al., 1982). Následně se P měří ve formě SRP, což je reaktivní rozpuštěný P. Měří se nárůst SRP oproti pozadí, protože se principiálně předpokládá, že nějaká část z vylitých buněk (resp. z mikrobiální biomasy) přechází právě do této extrahovatelné formy. Z půdy však nelze vyextrahovat veškeré množství mikrobiálního P ve formě SRP, a proto se musí využívat korekční faktor (k_{ep}). Tento faktor říká, kolik SRP lze vyextrahovat pomocí daného extrakčního činidla z mikrobiální biomasy dané půdy. Nejběžněji používaný korekční faktor je 0,4, to znamená, že 40 % veškerého mikrobiálního P lze vyextrahovat z půdy exponované parám $CHCl_3$ jako SRP. Zbytek není možné stanovit, jelikož je část P navázaná ve stabilních organických sloučeninách, které nejdou vyextrahovat, anebo nepřecházejí do formy SRP.

Část P, který přechází do formy SRP se může adsorbovat (viz kapitola 2.1.), a proto se dělá také korekce na adsorbci. Do extraktu se přidává KH_2PO_4 o známé koncentraci P. Přidává se do extrakčního činidla, jelikož Brookes et al., 1982 předpokládá, že k adsorbci P dochází jen během extrakce.

SRP se stanovuje metodou absorpční spektrofotometrie. Využívá se reakce fosforečnanů s molybenanem amonným a vinanem antimonylo-draselným v určitém rozmezí

pH za vzniku komplexní sloučeniny. Ta je redukována kyselinou askorbovou za vzniku fosfoantimonylomolybdenanové modři, jejíž absorbance je při určité vlnové délce přímo úměrná koncentraci fosforečnanů.

Obsah P v biomase půdních mikroorganismů se následně vypočítá jako rozdíl mezi koncentrací SRP ve fumigovaném a nefumigovaném vzorku, který se koriguje na to, kolik fosforečnanu se adsorbuje, a také kolik ho lze extrahovat. Vzorec je následující:

$$MBP = \frac{F - NF}{\text{Korekce na sorpci} \times k_{ep}}$$

$$\text{Korekce na sorpci} = \frac{(NF + PO_4) - NF}{PO_4}$$

V této rovnici značí F množství SRP ve fumigovaném vzorku, NF je množství SRP v nefumigovaném vzorku, $NF + PO_4$ je množství SRP v nefumigovaném vzorku s přidavkem PO_4 , PO_4 je množství přidaného P – KH_2PO_4 a k_{ep} značí korekční faktor.

V praktické části se budu zabývat tím, zda část vyextrahovaných fosforečnanů může pocházet z PolyP. Zkusím to zjistit přidavky PolyP do různých kroků fumigačně extrakční metody (viz kapitola 3.3.2.).

2.6. Detekce polyfosfátů

PolyP mohou být v buňce detekovány pomocí barvení. Využívají se fluorescenční barviva, jako je například DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol; Kulakova et al., 2011). DAPI se využívá hlavně na barvení DNA, která se vyznačuje modrou fluorescencí. DAPI barvivo se váže na negativní náboj DNA. Jelikož mají PolyP také negativní náboj, DAPI je schopná se na ně vázat. Oproti DNA se fluorescence PolyP vyznačuje žlutou/žluto-zelenou fluorescencí (Tijssen et al., 1982). Po nabarvení některých buněk však nemusí být zcela jasné, co přesně jsou PolyP a co DNA, jelikož jsou půdní buňky velice malé. Barvení PolyP pomocí DAPI se tak využívá spíše na bakterie akumulující PolyP ve vodních ekosystémech (Li & Dittrich, 2019) a na hyfy arbuskulárně mykorhizních hub (Funamoto et al., 2007), jelikož jsou jejich buňky lépe vidět pod optickým mikroskopem.

Dále jde využít metoda „enzyme affinity labeling with polyphosphate binding domain (PPBD)“, kdy se využívá afinita enzymu exopolyfosfatáza (PPX) k PolyP. K nabarvení

se využívá barvivo Alexa 488, které je vidět při laserové skenovací mikroskopii. Tato metoda dokáže detekovat hlavně dlouhé řetězce PolyP, a to řetězce delší než s 35 fosfátovými zbytky. Kratší řetězce je touto metodou obtížnější detekovat, jelikož je u nich nižší afinita než u dlouhých řetězců (Saito et al., 2005).

PolyP se barví také Neisserovou metodou (Eikelboom & van Buijsen, 1981) s využitím methylenové modři či toluidinové modři O, která se však váže pouze na kratší řetězce PolyP (Christ et al., 2020).

Další metodou je tetracyklinové barvení. K barvení PolyP se využívá antibiotický tetracyklinový hydrochlorid. Tetracyklin a jeho deriváty bývají využívány v medicíně k označení vápníku ukládaného v zubech a kostech a také jako značení pro dvojmocné kationty spojené s membránou, jako jsou Ca^{2+} a Mg^{2+} . Jakmile se tetracyklin naváže na tyto kationty zvýší se jeho fluorescence. Tento efekt byl využit k vytvoření nové fluorescenční metody na barvení PolyP (Günther et al., 2009).

PolyP lze také detekovat dle jejich specifických enzymů. Například PPK enzymovou metodou, která využívá PPK opačné reakce, kdy se PolyP rozloží na ATP, a to je následně kvantifikováno luciferázovým testem. Tato metoda je však citlivější pouze na řetězce PolyP delší než s 60 fosfátovými zbytky (Ault-Riché et al., 1998). Další možností je využití PPX enzymové metody, kdy se využívá hydrolýzy PolyP na fosforečnany, které jsou následně determinovány nabarvením malachitovou zelení a následným měřením na spektrofotometru. Tato metoda je nejvhodnější na determinaci krátkých PolyP řetězců (Ohtomo et al., 2008).

Metod kvantifikace je mnoho a v této práci jsem zvolila Neisserovu metoda barvení, jelikož je to jedna z nejpoužívanějších a nejdostupnějších metod.

2.7. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit přítomnost polyfosfátů v biomase půdních mikroorganismů pomocí barvicích metod kombinovaných s růstovými experimenty. Dalším cílem bylo zjistit, zda jsou polyfosfáty detekovatelné běžně používanou fumigačně extrakční metodou.

2.8. Hypotézy

Některá společenstva půdních mikroorganismů obsahují polyfosfáty, zejména v půdách s vysokou koncentrací dostupného fosforu.

Obsahují-li mikroorganismy polyfosfáty, při růstovém experimentu s přidavkem růstového média bez fosforu vykáží růst. Dojde k vyčerpání polyfosfátů v buňce a kvůli tomu zaznamenáme změnu ve stechiometrii i v barvě mikrobiálního společenstva.

V půdě bude docházet k depolymerizaci polyfosfátů, a proto bude určitá část detekovatelná jako reaktivní rozpuštěný fosfor.

3. Materiál a metody

3.1. Výběr a popis lokalit

Na odběry vzorků jsem vybrala dvě výzkumné lokality na území Národního parku (NP) Šumava, povodí Plešného (PL) a Čertova jezera (CT). Povodí Plešného a Čertova jezera bylo v minulosti ovlivněno disturbancemi. CT bylo disturbováno vichřicí, při které bylo polámáno asi 10 % stromů (Kopáček et al., 2020). PL bylo v letech 2004 - 2008 napadeno lýkožroutem (*Ips typographus*), což způsobilo odumření velké části porostu (> 80 %; Kopáček et al., 2017). V povodí obou jezer lze najít mozaiku různých fází regenerace lesa. Z každého povodí jsem vybrala 3 plochy tak, aby byl zastoupený větší odrostlý les, dále rozpadlý les a regenerující se les. Tyto plochy jsem vybrala, protože by měly vykazovat gradient zvyšující se dostupnosti P, od nejstaršího porostu, přes rozpadlý porost, po nejmladší. Druhým důvodem výběru těchto lokalit byl fakt, že povodí CT je obecně chudší na P, zatímco v povodí PL je P více a dochází k jeho vyplavování.

NP Šumava se nachází na hranicích České republiky, Německa (Bavorsko) a Rakouska. První lokalitou je povodí PL, které se nachází na 48°47' s.š. a 13°52' v.d., v nadmořské výšce 1090 m.n.m. Jeho horninové podloží je tvořeno převážně granitem (žulou). Půdy povodí PL jsou řazeny do kategorie kambizemí a podzolů. Typický lesní podrost zde tvoří smrk ztepilý (*Picea abies*) s příměsí buku lesního (*Fagus sylvatica*) a náletové dřeviny jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*; Svoboda et al., 2006). Druhou lokalitou je povodí CT nacházející se na 49°10' s.š. a 13°11' v.d., v nadmořské výšce 1030 m.n.m. Jeho horninové podloží je převážně tvořeno slídovými břidlicemi (muskovitá rula) s intruzemi křemene. Půdy

povodí CT jsou řazeny do kategorie kambizemí. Dominující vegetace je zde tvořena smrkem ztepilým (*Picea abies*) s příměsí buku lesního (*Fagus sylvatica*; Svoboda et al., 2006).

3.2. Odběr a zpracování vzorků

Vzorky jsem odebrala na přelomu května/června roku 2022 z výzkumných ploch v povodí Plešného a Čertova jezera. Na obou povodích jsem vybrala 3 plochy (viz kapitola 3.1.) a na každé ploše jsem vytvořila směsný vzorek ze 3 míst v rámci plochy tak, aby byl reprezentativní. Takto jsem odebrala vzorky ze 2 horizontů – z opadového (O) a humusového (A) horizontu, celkem to dělá 12 půdních vzorků (2 povodí x 3 plochy x 2 horizonty). Vzorky byly následně proseté přes síto s velikostí ok 5 mm a uloženy do lednice při 4 °C až do začátku vlastního experimentu. Všechny analýzy a experimenty popsané níže jsem pro každý odebraný vzorek dělala ve 3 opakováních.

3.3. Laboratorní experimenty

3.3.1. Základní analýzy

3.3.1.1. Sušina + pH

Do předem zvážené hliníkové váženky jsem navážila přibližně 3 g půdy, znovu celé zvažila a uložila do sušárny při 105 °C do druhého dne. Druhý den jsem váženky i s vysušenou půdou zvažila. Sušinu jsem stanovovala z pouze jednoho laboratorního opakování. Sušinu (dw) jsem počítala podle vzorce:

$$dw = \frac{(\text{suchá půda} + \text{váženka}) - \text{váženka}}{(\text{vlhká půda} + \text{váženka}) - \text{váženka}}$$

Do 100 ml NTS lahví jsem navážila 8 g půdy a přidala 20 ml destilované vody (ředění 1:2,5) a následně jsem lahve umístila na horizontální třepačku a nechala třepat po 30 minut. Roztok jsem nechala ustálit přibližně 30 minut a následně jsem pH metrem (Xylem Analytics, Weilheim, Německo) postupně změřila pH.

3.3.1.2. Aktivita fosfatáz

Do kádinek jsem navážila 0,25 g půdy a přidala 25 ml citrátového pufru o pH 4, které odpovídá pH půdních vzorků. Vzorky jsem vložila do ultrazvukové lázně a nechala je sonikovat po 4 minuty. Dále jsem vzorky pomocí kuchyňského sítko přefiltrovala do plastových

nádobek. Do nich jsem vložila magnet a nechala je míchat. Následně jsem pipetovala na destičku, nejprve jednotlivě 50 µl vody, 50 µl kalibračních roztoků (v koncentracích 5, 25, 50 µM/L) a 50 µl substrátových roztoků pro fosfatázu (v koncentracích 5, 50, 100 µmol g⁻¹), poté jsem do každého z nich napipetovala 200 µl vzorku. Vzorky byly následně vloženy do spektrofotometru (TECAN Infinite F200) a byla měřená fluorescence vzorků v intervalech 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240 (min).

Při této metodě se měří fluorescence. K organické sloučenině s navázanou funkční skupinou (fosfátovou) se přidá vzorek. Fosfatáza obsažená ve vzorku začne odštěpovat fosfátové skupiny, čímž se aktivuje fluorescenční barvivo. Tím, že se měří tato fluorescence, měří se tak koncentrace produktů enzymatické reakce v čase. Na tento vzrůst produktu se fituje model, který popisuje aktivitu enzymu. Já jsem fitovala kompetitivně - inhibiční model, jelikož jsou fosfatázy často inhibovány svým produktem (Čapek et al., 2021). Rovnice modelu je následující:

$$t = -\frac{1}{V_{max}} \times \left\{ K_M \times \left[\frac{(S_0 + SRP_0)}{K_i} + 1 \right] \times \ln \left[\frac{(S_0 + P(t))}{S_0} \right] - P(t) \times \left(1 - \frac{K_M}{K_i} \right) \right\}$$

kde V_{max} značí konstantu maximální reakční rychlosti, K_M konstantu afinity, S_0 je počáteční koncentrace substrátu, SRP_0 je počáteční koncentrace SRP, K_i značí inhibiční konstantu a $P(t)$ je koncentrace reakčního produktu v čase. Nelineární regresi jsem odhadovala V_{max} , K_M a K_i . V_{max} se v literatuře běžně označuje jako potenciální enzymatická aktivita.

3.3.1.3. Obsah uhlíku a dusíku v biomase půdních mikroorganismů

Mikrobiální biomasa C (MBC) a N (MBN) se zjišťuje stejně jako P, fumigačně extrakční metodou. Místo SRP se jako analyt měří rozpuštěný organický uhlík (DOC) a celkový rozpuštěný dusík (DN) v extraktu 0,5 M síranu draselného.

Při kvantifikaci mikrobiálního C a N se dělají 2 ošetření – nefumigované a fumigované. Na nefumigované vzorky jsem navázila 5 g půdy do centrifugačních zkumavek a následně extrahovala pomocí 20 ml 0,5 M K₂SO₄ na horizontální třepačce po dobu 60 minut. Dále jsem dala vzorky centrifugovat na 15 minut. Vzorky jsem poté přefiltrovala přes skleněný filtr a uchovala zmražené k následnému stanovení. Všechny vzorky jsem stanovovala na TOC/TN analyzátoru (LiquicTOC II, Elementar, Německo).

Na fumigované vzorky jsem navázila 5 g půdy do centrifugačních zkumavek a dala je fumigovat. Vložila jsem je do exsikátoru s vlhkým filtračním papírem, s kádinkou

s chloroformem a skleněnými kousky. Exsikátor jsem nechala 15 minut evakuovat a následně ho uzavřela. Vzorky se nechají takto fumigovat po 24 h. Druhý den jsem vzorky opakovaně evakuovala, abych z nich odstranila chloroform. Dále jsem je extrahovala a zpracovávala stejným způsobem jako vzorky nefumigované. MBC a MBN jsem následně počítala jako rozdíl koncentrací DOC/DN fumigovaných a nefumigovaných vzorků. Tento rozdíl jsem následně korigovala korekčními faktory, pro C jsem použila hodnotu 0,36 (Vance et al., 1987) a pro N 0,54 (Joergensen & Mueller, 1996).

3.3.2. Návratnost polyfosfátů

Ke zjištění návratnosti PolyP z půdy ve formě SRP jsem využila běžně využívanou fumigačně extrakční metodu s tím, že jsem do ní přidala několik ošetření s přidavkem PolyP. Při fumigačně extrakční metodě se vzorky běžně ošetřují třemi způsoby. Prvním je okamžitá extrakce vzorků (nefumigované vzorky, NF), při druhém se vzorky nejprve nechají fumigovat a poté se extrahují (fumigované vzorky, FF) a při třetím se do vzorků přidává známé množství PO_4 a poté se vzorky hned extrahují (korekce na sorpci, NF + PO_4).

Na fumigované vzorky jsem si navázila 3 g přirozeně vlhké půdy a fumigovala je stejným způsobem, jak bylo uvedeno v kapitole 3.3.1.3. Další den po odsátí chloroformu jsem vzorky extrahovala 45 ml 0,5 M NaHCO_3 na horizontální třepačce po dobu 60 minut. Poté jsem vzorky nechala 15 minut centrifugovat. Následně jsem ze suspenze odebrala 20 ml do 100 ml NTS. Do všech vzorků jsem dále postupně přidala 1,4 ml 4,5 M H_2SO_4 a nechala je stát při pokojové teplotě po 24 h. Další den jsem vzorky přefiltrovala přes filtrační papír a připravila je na spektrofotometrické stanovování. Ze zfiltrovaných extraktů jsem napipetovala 10 ml do 20 ml zkumavek. Poté jsem přidala 0,8 ml roztoku molybdenanu amonného s vinanem antimonylo-draselným a 1,6 ml kyselina askorbové a důkladně jsem vzorek promíchala. Po 1 hodině jsem změřila absorbanci vzorků při 886 nm na spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

K depolymerizaci PolyP na PO_4 může teoreticky docházet v různých částech fumigačně extrakční metody. Depolymerizace může být abiotická či biotická. K abiotické depolymerizaci může docházet jak v půdě, tak v okyseleném extraktu bez pomoci enzymů. Její dominanci však očekávám v okyseleném extraktu, jelikož příliš nízké pH snižuje aktivitu enzymů na minimum. Naopak k biotické depolymerizaci dochází především v půdě, kde po fumigaci dojde k vylití enzymů z buňky, které zde mohou rozkládat PolyP.

Abych zjistila, zda se PolyP depolymerizují a zda více abioticky či bioticky, přidala jsem k základním ošetřením fumigačně extrakční metody ještě 4 další ošetření, a to s přísávkou PolyP.

Při 1. a 2. ošetření vzorků jsem přidávala PolyP do fumigované (FF + PP) a nefumigované půdy (NF + PP). Přidávala jsem 10 μmol P ve formě PolyP (ve formě roztoku Grahamovi soli – polyfosforečnanu sodného (NaPO₃)_n) na 1 g suchého podílu půdy. Při 3. a 4. ošetření vzorků jsem přidávala PolyP do extraktu před okyselením jak fumigovaného (FF + PE), tak nefumigovaného vzorku (NF + PE). Abych přidala stejné množství PolyP do těchto okyselených extraktů, musela jsem PolyP zředit na 4/9 původního roztoku. Na začátku experimentu jsem totiž PolyP přidávala do půdy extrahované 45 ml extrakčního činidla a v tomto kroku pouze do 20 ml, což je 4/9 alikvot původního objemu extrakčního činidla. Se všemi vzorky jsem pracovala stejným způsobem jako při fumigačně extrakční metodě.

Návratnosti PolyP jsem následně počítala dle následujícího obecného vzorce:

$$\text{Návratnost} = \frac{SRP_p - SRP}{PP \times k_{ep}} \times 100$$

ve kterém *PP* značí množství přidávaného P ve formě PolyP, *SRP_p* značí množství SRP s přísávkou PolyP, *SRP* je koncentrace SRP v půdě bez přísávkou PolyP a *k_{ep}* je návratnost PO₄, která se odhaduje v rámci fumigačně extrakční metody. Podle schématu na obrázku 1 jsem počítala čtyři různé návratnosti, které označuji jako *nPP*, *fPP*, *nPE* a *fPE*. Návratnost PolyP z nefumigované půdy (*nPP*) jsem počítala dle tohoto vzorce:

$$nPP = \frac{(NF + PP) - NF}{PP \times k_{ep}} \times 100$$

Návratnost PolyP z fumigované půdy (*fPP*) jsem počítala dle vzorce:

$$fPP = \frac{(F + PP) - F}{PP \times k_{ep}} \times 100$$

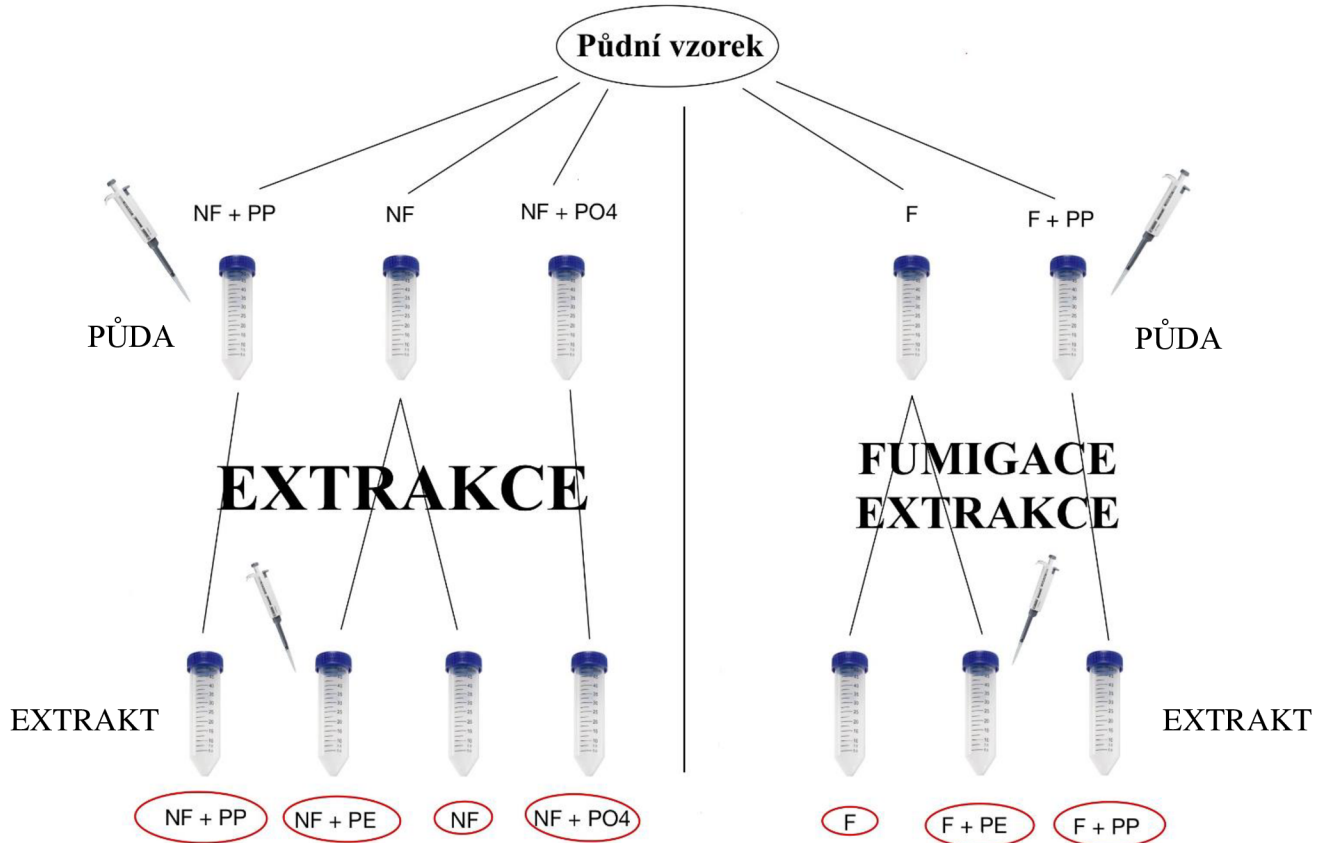
Návratnost PolyP z nefumigovaných extraktů jsem počítala dle vzorce:

$$nPE = \frac{(NF + PE) - NF}{PP} \times 100$$

Návratnost PolyP z fumigovaných extraktů jsem počítala dle vzorce:

$$fPE = \frac{(F + PE) - F}{PP} \times 100$$

U posledních dvou vzorců chybí k_{ep} , protože se P v půdním extraktu nemá na co vázat.



Obr. 1: Obrázek znázorňuje schéma experimentu na kvantifikaci návratnosti PolyP z půdy a půdních extraktů. Horní řada zobrazuje vzorky půdní, dolní řada zobrazuje extrakty. Levá půlka schématu znázorňuje část experimentu, ve které vzorky nebyly fumigované a pravá půlka schématu znázorňuje část experimentu, ve které byly vzorky fumigované. V horní řadě zleva jsou zobrazeny půdní vzorky před extrakcí – nefumigované s přidavkem PolyP do půdy (NF + PP), nefumigované (NF), nefumigované s přidavkem PO_4 (NF + PO_4) a následují půdní vzorky před extrakcí a fumigací – fumigované (F), fumigované s přidavkem PolyP do půdy (F + PP). V dolní řadě pak k horním vzorkům přibyly další dvě ošetření. Půdní extrakt NF a FF se před okyselením rozdělil na dvě části, první zůstala bez přidavku a do druhé byl přidán PolyP (NF + PE, FF + PE).

3.3.3. Růstový experiment a fumigačně extrakční metoda

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda mikroorganismy vykážou růst bez přídavku P do růstového média, tedy zda využívají vnitřní zásoby PolyP. Do 300 ml NTS lahvi jsem navážila 25 g sterilního písku a množství půdy (viz tabulka 1), které bylo vypočítané tak, aby obsahovalo 5 μmol mikrobiálního C. Poté jsem přidala 1 ml roztoku růstového média bez přídavku P (v 1 l redestilované vody jsem rozpustila sacharozu - 2,85 g, což je 70násobek MBC, dále kvasnicový extrakt - 0,036 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,072 g, FeSO_4 - 0,0072 g, NH_4Cl - 0,356 g, CaCl - 0,0072 g). Vše jsem poctivě promíchala a NTS lahvičky uzavřela oxitopovými hlavicemi a uložila jsem je do inkubátoru na 7 dní při teplotě 20 °C. Oxitopové hlavice fungují na principu měření změny podtlaku, který vzniká tím, že se spotřebovává kyslík a veškerý vyprodukovaný oxid uhličitý se váže na hydroxid sodný, který je součástí hlaviček. Takový podtlak je tak přímo úměrný koncentraci spotřebovaného kyslíku, dle kterého se následně počítá růstová rychlost. Růstová rychlost se počítá z křivek průběhu spotřeby kyslíku, kdy je růstová rychlost přímo úměrná exponenciálnímu nárůstu rychlosti spotřeby kyslíku. K tomuto nárůstu dochází zhruba po 24–48 hodinách od začátku inkubace a trvá dalších asi 24 hodin, poté se rychlost spotřeby kyslíku stabilizuje. Růstová rychlost se vypočítává automaticky pomocí balíčku growthrates (Petzoldt, 2022) ve statistickém programu R.

Po týdnu inkubace jsem odvážíla směs půdy a písku do 50 ml centrifugačních zkumavek, provedla znovu fumigačně extrakční metodu a zjišťovala jsem stechiometrii mikrobiální biomasy (C:P a N:P), která by měla značit přítomnost PolyP (viz kapitola 2.2.). Pokud by buňky obsahovaly PolyP, které by mikrobiální biomasa využila k růstu, poměry C:P a N:P by se měly zvýšit.

Tab. 1: Tabulka ukazuje množství půdního mikrobiálního uhlíku (MBC) a sušiny (DW) v půdních opadovém (O) a humusovém (A) horizontu z různých plocha povodí Čertova (CT) a Plešného (PL) jezera. Dále ukazuje, kolik půdy je nutné navážít, aby vzorek obsahoval 5 μmol MBC.

Povodí	Č. plochy	Horizont	MBC ($\mu\text{mol/g}$)	DW	Navážka půdy (g)
CT	25	O	22,8	0,22	1,00
CT	25	A	16,1	0,23	1,37
CT	74	O	13,1	0,22	1,71
CT	74	A	9,1	0,25	2,17
CT	265	O	32,9	0,28	0,55
CT	265	A	26,0	0,38	0,50
PL	114	O	51,1	0,37	0,27
PL	114	A	30,4	0,34	0,48
PL	147	O	20,5	0,20	1,19
PL	147	A	12,2	0,24	1,70
PL	150	O	12,0	0,19	2,21
PL	150	A	17,1	0,31	0,94

3.3.4. Barvení polyfosfátů

Na barvení PolyP jsem zvolila Neisserovu metodou s použitím methylenové modři. K jejich nabarvení jsem využila půdní vzorky před inkubací s médiem bez přídavku P, tedy vzorky teoreticky obsahující PolyP, a vzorky půdy po inkubaci smíchané s pískem, tedy ty, které byly týden inkubovány, což znamená, že by v nich teoreticky měly být PolyP vyčerpány. Tyto vzorky jsem barvila pouze v jednom opakování.

Na přípravu suspenze jsem navážila 2 g půdy či 2 g půdy smíchané s pískem a přidala k nim 50 ml 0,8 % NaCl. Suspenze jsem poté roztřela na podložní sklíčka a nechala zaschnout. Následně jsem aplikovala roztok obsahující methylenovou modř a krystalovou violeť. 15 vteřin jsem roztok nechala působit a poté ho opláchlá vodou z kohoutku. Dále jsem aplikovala roztok s bismarkovou hnědí, který jsem nechala působit 45 vteřin a poté ho opláchlá vodou. Po uschnutí jsem vzorky vzala pod mikroskop (Olympus BX61). Sledovala jsem vzorky se spodním světlem a imerzí, zvětšení jsem nastavila na 100x. Při sledování jednotlivých vzorků jsem nafotila několik reprezentativních snímků.

3.3.5. Statistické zpracování dat

Statistická hodnocení jsem prováděla ve statistickém programu R (R Team, 2022) pomocí zobecněných lineárních modelů s gamma distribucí. Postupným výběrem jsem zjišťovala efekt půdních horizontů, ploch a povodí jezer CT a PL na všechna základní data (SRP, MBC, MBN, MBP a V_{\max}).

Stejným způsobem jsem zjišťovala efekty půdních horizontů, ploch a povodí na jednotlivé návratnosti PolyP – návratnost z nefumigované půdy (nPP), z nefumigovaného extraktu (nPE), z fumigované půdy (fPP), a z fumigovaného extraktu (fPE). Zároveň jsem postupným výběrem testovala i jednotlivé návratnosti mezi sebou. Na závěr jsem pomocí posthoc testu zjišťovala, které varianty návratností se od sebe liší. Tento test jsem dělala pomocí balíčku emmeans (Lenth, 2024).

Pomocí stejného modelu jsem také testovala efekt půdních horizontů, ploch a povodí na růstovou rychlost a stechiometrii mikrobiální biomasy (mikrobiální poměr C:P a N:P) před a po růstovém experimentu. Následně jsem testovala velikost změny stechiometrie mikrobiální biomasy v reakci na ukončení růstu (vyčerpání PolyP). Na závěr jsem pomocí posthoc testu zjišťovala, které experimentální varianty se od sebe liší v mikrobiálních poměrech. Tento test jsem dělala pomocí balíčku emmeans (Lenth, 2024).

4. Výsledky

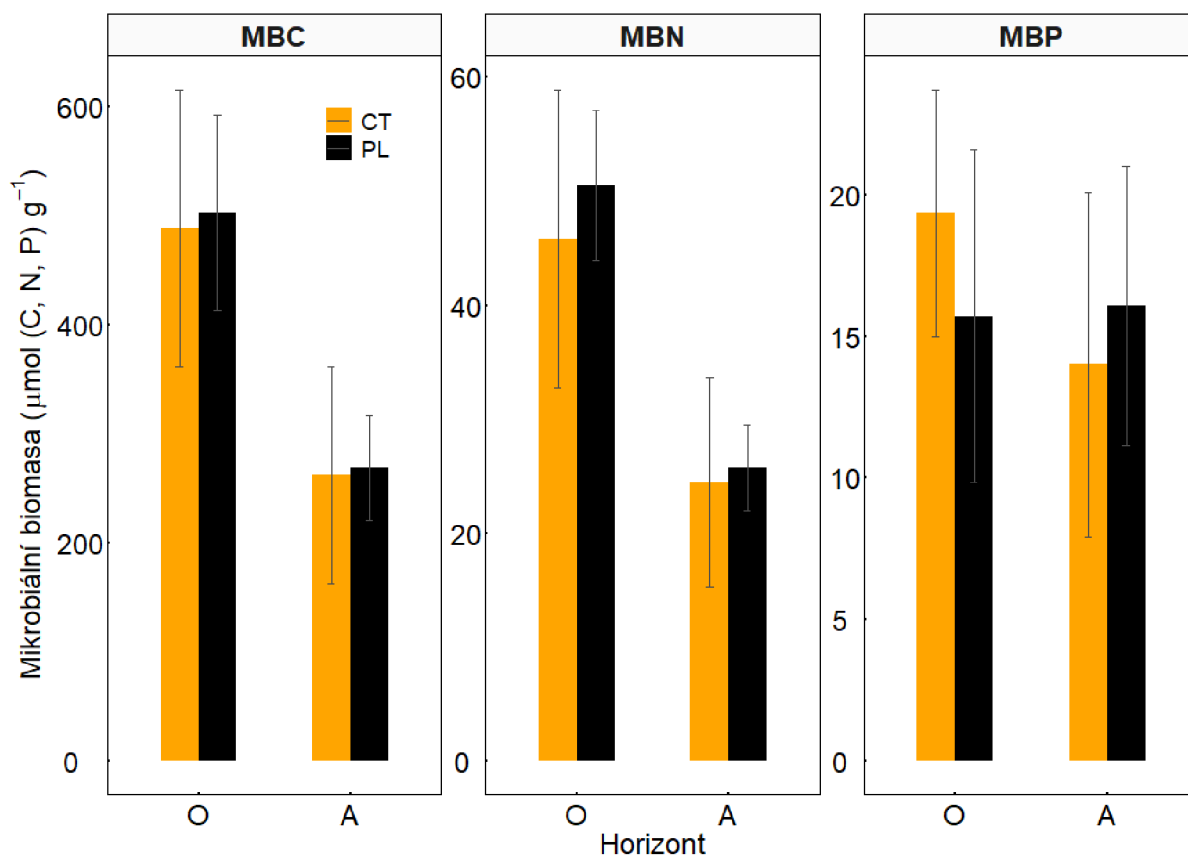
4.1. Základní analýzy

V tabulce (Tab. 2) jsou znázorněny základní charakteristiky opadového a humusového horizontu na třech různých lokalitách povodí Čertova a Plešného jezera.

Hodnoty MBC ($X^2_{(1, 36)} = 3,45$; $p < 0,001$), MBN ($X^2_{(1, 36)} = 3,76$; $p < 0,001$) a V_{\max} ($X^2_{(1, 36)} = 6,8$; $p < 0,001$) se statisticky významně lišily pouze mezi půdními horizonty. U hodnot SRP vyšel průkazný rozdíl mezi plochami ($X^2_{(5, 35)} = 22,87$; $p < 0,001$) a půdními horizonty ($X^2_{(1, 36)} = 2,79$; $p = 0,0079$). U MBP nevyšly žádné statisticky průkazné rozdíly. Průměrné hodnoty MBC, MBN a MBP lze vidět v obrázku 2.

Tab. 2: Základní charakteristiky opadového (O) a humusového (A) horizontu na třech různých lokalitách povodí Čertova (CT) i Plešného jezera (PL). pH (H₂O), extrahovatelný rozpuštěný organický uhlík (DOC), extrahovatelný celkový rozpuštěný dusík (DN), extrahovatelný reaktivní rozpuštěný fosfor (SRP), mikrobiální uhlík (MBC), mikrobiální dusík (MBN) a mikrobiální fosfor (MBP). Horní tučně zvýrazněné hodnoty v příslušných řádcích značí průměry a dolní zvýrazněné kurzívou značí směrodatnou odchylku.

Povodí	Plocha	Horizont	pH	V _{max}	DOC	DN	SRP	MBC	MBN	MBP
CT	25	O	4,8	11,31	49,18	30,83	1,64	596,76	58,11	23,58
				<i>1,95</i>	<i>1,12</i>	<i>0,71</i>	<i>0,19</i>	<i>40,28</i>	<i>3,90</i>	<i>2,92</i>
		A	4,67	2,18	49,18	28,12	0,46	391,15	35,94	21,13
				<i>0,20</i>	<i>1,12</i>	<i>0,81</i>	<i>0,07</i>	<i>17,97</i>	<i>2,80</i>	<i>0,34</i>
CT	74	O	3,75	5,11	46,38	16,25	0,19	326,83	29,52	14,50
				<i>0,97</i>	<i>1,37</i>	<i>0,45</i>	<i>0,05</i>	<i>29,42</i>	<i>3,22</i>	<i>0,63</i>
		A	3,41	6,31	45,60	5,90	0,04	175,10	15,49	8,40
				<i>1,22</i>	<i>1,22</i>	<i>0,03</i>	<i>0,03</i>	<i>9,71</i>	<i>1,29</i>	<i>0,93</i>
CT	265	O	4,22	5,07	63,44	26,91	0,43	543,39	49,91	19,96
				<i>0,40</i>	<i>1,41</i>	<i>0,65</i>	<i>0,04</i>	<i>27,57</i>	<i>2,14</i>	<i>0,30</i>
		A	3,78	2,48	26,45	6,32	0,06	220,54	22,01	11,75
				<i>0,72</i>	<i>0,51</i>	<i>0,10</i>	<i>0,02</i>	<i>11,38</i>	<i>1,62</i>	<i>0,78</i>
PL	114	O	3,72	2,38	60,06	13,84	0,55	472,24	46,09	13,41
				<i>0,18</i>	<i>1,03</i>	<i>0,18</i>	<i>0,05</i>	<i>8,47</i>	<i>1,12</i>	<i>1,18</i>
		A	3,75	3,83	41,09	8,82	0,38	325,22	29,67	22,22
				<i>1,26</i>	<i>0,64</i>	<i>0,23</i>	<i>0,03</i>	<i>20,17</i>	<i>1,18</i>	<i>2,26</i>
PL	147	O	4,4	2,48	90,86	23,75	0,33	615,13	58,51	10,59
				<i>0,44</i>	<i>2,12</i>	<i>0,30</i>	<i>0,09</i>	<i>33,91</i>	<i>4,74</i>	<i>1,72</i>
		A	3,69	9,41	29,54	5,07	1,25	263,89	26,00	14,5
				<i>1,20</i>	<i>1,19</i>	<i>0,41</i>	<i>0,02</i>	<i>15,56</i>	<i>2,54</i>	<i>0,41</i>
PL	150	O	4,16	6,92	66,91	35,00	2,37	421,70	46,94	23,13
				<i>1,05</i>	<i>1,50</i>	<i>1,52</i>	<i>0,25</i>	<i>32,13</i>	<i>2,16</i>	<i>1,79</i>
		A	3,99	1,53	35,57	6,61	0,60	218,77	21,54	11,51
				<i>0,29</i>	<i>1,70</i>	<i>0,37</i>	<i>0,04</i>	<i>7,22</i>	<i>0,45</i>	<i>0,70</i>

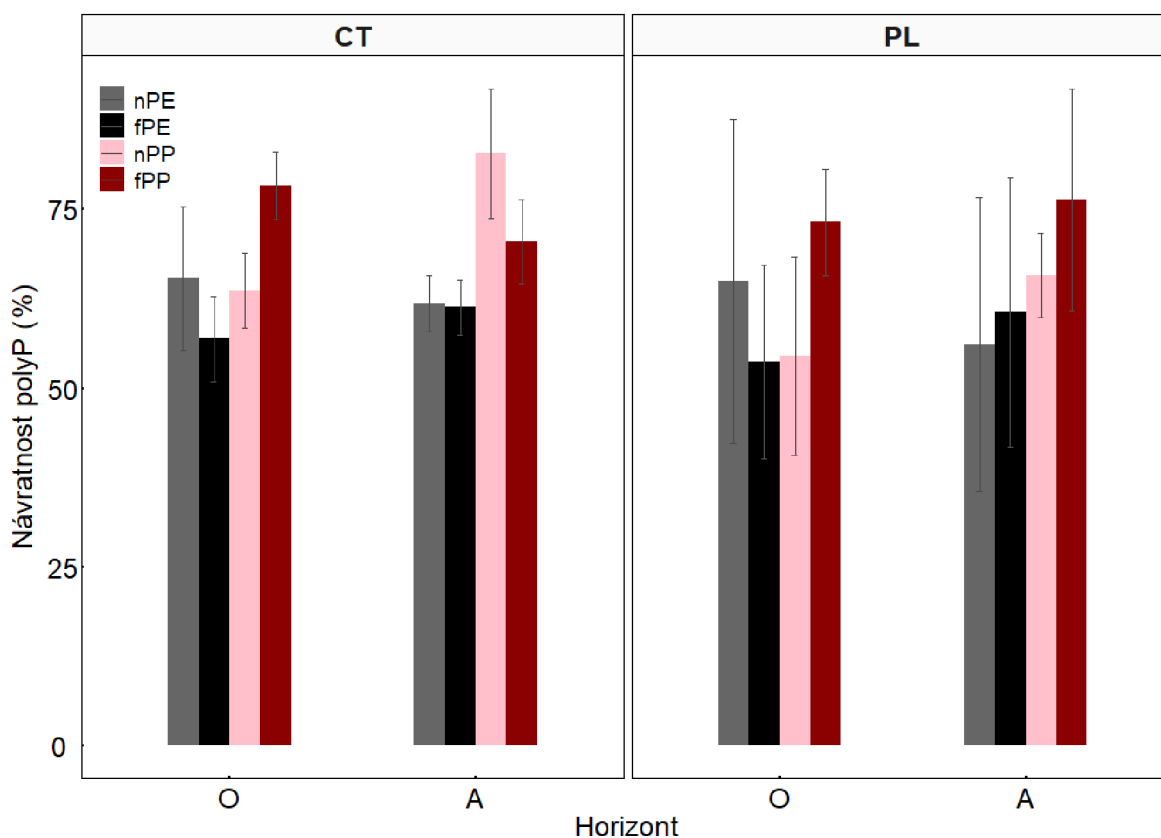


Obr. 2: Obsah uhlíku (MBC), dusíku (MBN) a fosforu (MBP) v mikrobiální biomase opadového (O) a humusového (A) horizontu z povodí Čertova (CT, oranžová barva sloupců) a Plešného (PL, černá barva sloupců) jezera. Velikost sloupečků odpovídá průměru a chybové úsečky směrodatné odchylce ($n = 9$). Osa y má u každého grafu jiný rozsah hodnot.

4.2. Návratnost polyfosfátů

Návratnosti PolyP z půdy a z extraktů ve formě SRP jsou zobrazeny v tabulce 3 a v obrázku 3. Návratnost PolyP byla ve všech vzorcích vysoká, průměrně dosahovala 50–80 %. Celkově nejvyšší návratnost PolyP byla z půdních fumigovaných vzorků (fPP).

U návratnosti PolyP z nefumigované půdy (nPP) byl statisticky průkazný efekt horizontu ($X^2_{(1, 35)} = 0,43$; $p < 0,001$) a povodí ($X^2_{(1, 35)} = 0,33$; $p < 0,001$). U nefumigovaného extraktu (nPE), fumigované půdy (fPP) a fumigovaného extraktu (fPE) nevyšel žádný signifikantní efekt půdních horizontů, ploch a ani jednotlivých povodí. Při testování návratností mezi sebou vyšel statisticky průkazný efekt jednotlivých návratností PolyP ($X^2_{(3, 139)} = 1,23$; $p < 0,001$).



Obr. 3: Graf návratností PolyP z nefumigovaného extraktu (nPE, šedá barva sloupce), z fumigovaného extraktu (fPE, černá barva sloupce), z nefumigované půdy (nPP, růžová barva sloupce) a z fumigované půdy (fPP, červená barva sloupce) z opadového (O) a humusového (A) horizontu z povodí Čertova (CT) a Plešného (PL) jezera. Velikost sloupečků odpovídá průměru a chybové úsečky směrodatné odchylce ($n = 9$).

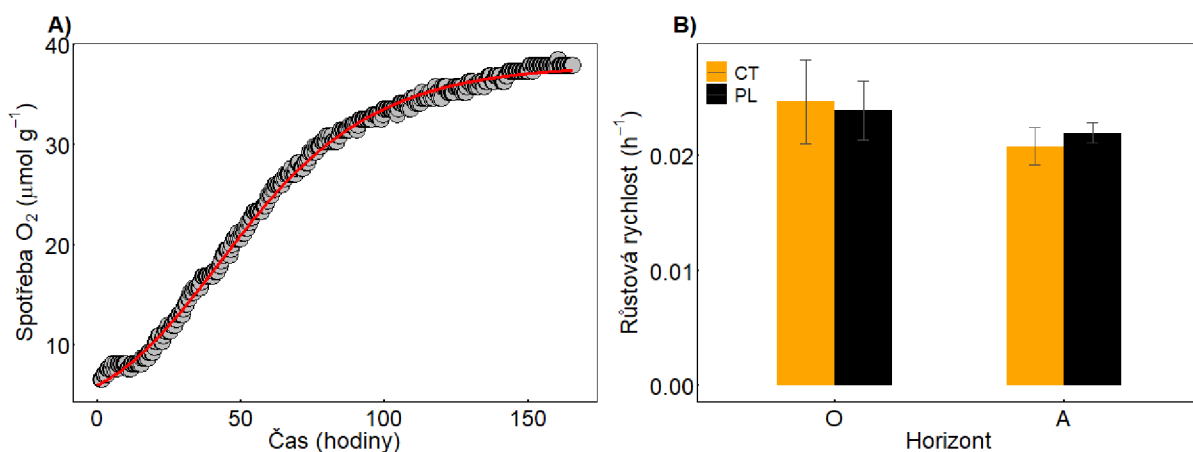
Tab. 3: Vypočítané jednotlivé návratnosti PolyP v procentech. Návratnost z nefumigované půdy (nPP), z nefumigovaného extraktu (nPE), z fumigované půdy (fPP), návratnost z fumigovaného extraktu (fPE). Horní tučně zvýrazněné hodnoty v příslušném řádku značí průměry a dolní zvýrazněné kurzívou značí směrodatnou odchylku.

Povodí	Plocha	Horizont	nPP (%)	nPE (%)	fPP (%)	fPE (%)
CT	25	O	58,1	59,9	76,6	49,8
			<i>4,6</i>	<i>6,1</i>	<i>7,5</i>	<i>3,4</i>
		A	91,4	64,4	72,8	62,8
			<i>5,1</i>	<i>2,9</i>	<i>6,6</i>	<i>3,0</i>
CT	74	O	65,1	62,1	81,3	59,9
			<i>3,3</i>	<i>2,7</i>	<i>1,0</i>	<i>0,8</i>
		A	74,1	62,2	73,1	63,1
			<i>6,3</i>	<i>3,8</i>	<i>1,0</i>	<i>3,0</i>
CT	265	O	67,8	74,0	77,0	61,0
			<i>1,4</i>	<i>13,5</i>	<i>3,2</i>	<i>3,9</i>
		A	83,0	57,4	63,0	56,2
			<i>1,6</i>	<i>0,2</i>	<i>0,6</i>	<i>0,7</i>
PL	114	O	47,5	84,3	72,0	62,1
			<i>0,6</i>	<i>29,6</i>	<i>10,1</i>	<i>7,9</i>
		A	69,9	61,8	87,4	49,3
			<i>1,8</i>	<i>0,8</i>	<i>1,1</i>	<i>5,3</i>
PL	147	O	45,1	45,0	68,9	39,4
			<i>4,7</i>	<i>1,1</i>	<i>4,8</i>	<i>3,0</i>
		A	60,2	62,2	83,3	50,3
			<i>1,9</i>	<i>5,0</i>	<i>12,8</i>	<i>9,9</i>
PL	150	O	71,1	65,6	78,6	59,6
			<i>11,4</i>	<i>5,5</i>	<i>4,6</i>	<i>14,1</i>
		A	67,2	44,1	58,3	86,8
			<i>7,3</i>	<i>36,6</i>	<i>6,6</i>	<i>23,0</i>

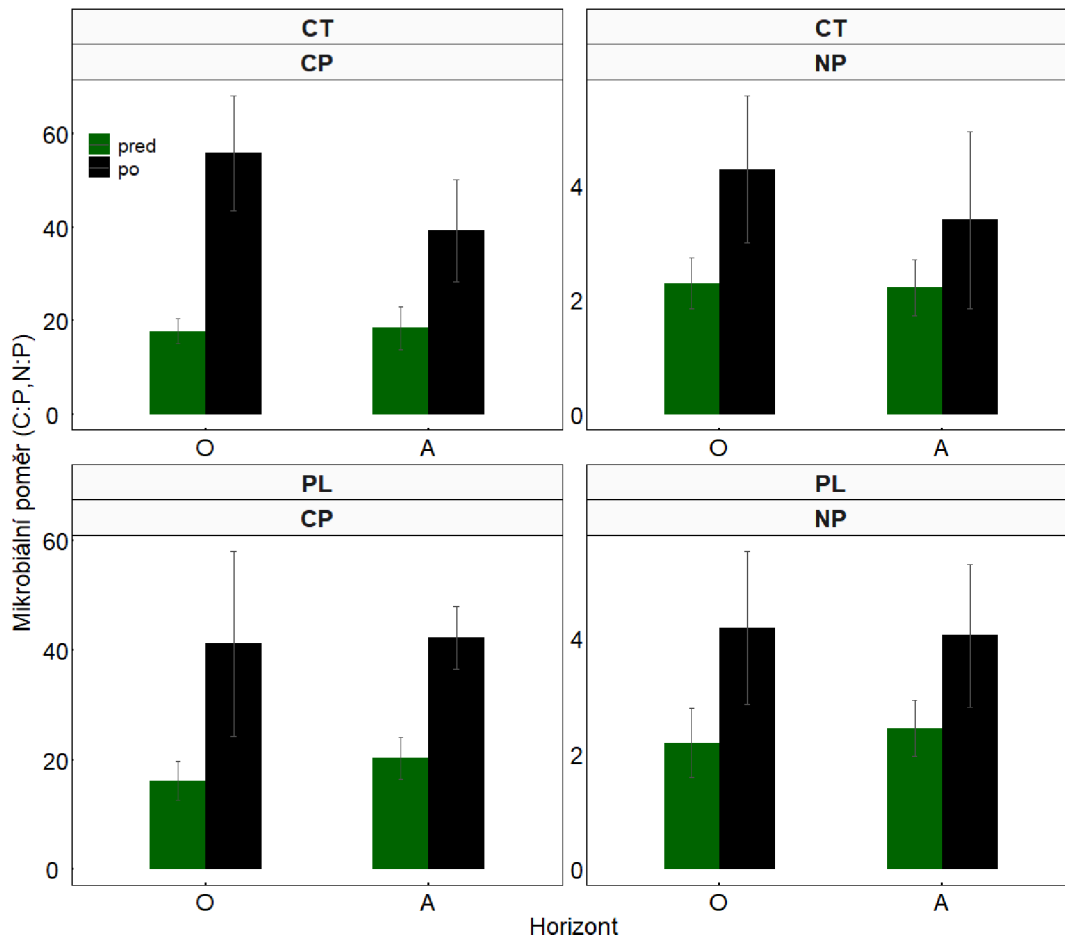
4.3. Růstový experiment

Během inkubace vzorků s růstovým médiem bez přídavku P se spotřeba O₂ měnila takovým způsobem, že z ní bylo možné odhadnout u všech vzorků růstovou rychlost (Obr. 4A). Růstová rychlost tedy byla pozitivní a při jejím testování vyšel statisticky průkazný vliv horizontu ($X^2_{(1,36)} = 0,15$; $p < 0,001$), viz obrázek 4B. U mikrobiálních poměrů C:P a N:P nevyšel žádný průkazný rozdíl mezi horizonty, plochami a povodími. Mikrobiální poměry C:P ($X^2_{(2,73)} = 14,15$; $p < 0,001$) a N:P ($X^2_{(2,73)} = 5,51$; $p < 0,001$) před a po inkubaci se průkazně změnily. Na začátku růstového experimentu byly poměry C:P a N:P poměrně nízké. Poměry

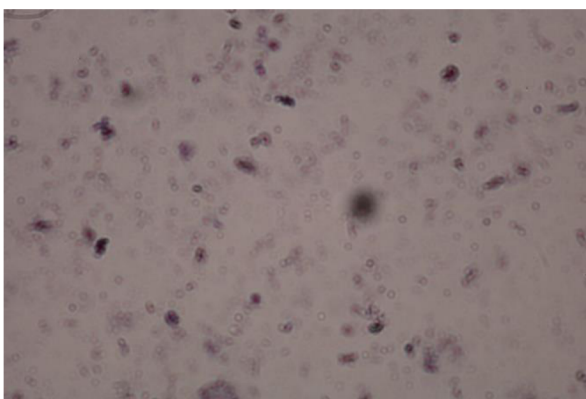
C:P byly průměrně 17-19 a po týdenním růstu se zvýšily až na průměrné hodnoty 41-47 (Obr. 5). Je vidět jistá souvislost mezi změnou mikrobiálních poměrů a změnou barvy buněk během inkubace. Barva buněk byla před týdenním růstem spíše fialová (způsobená obarvením PolyP v buňce) a po růstu se buňky odbarvily a získaly spíše hnědou barvu (buňky bez PolyP), viz obrázek 6.



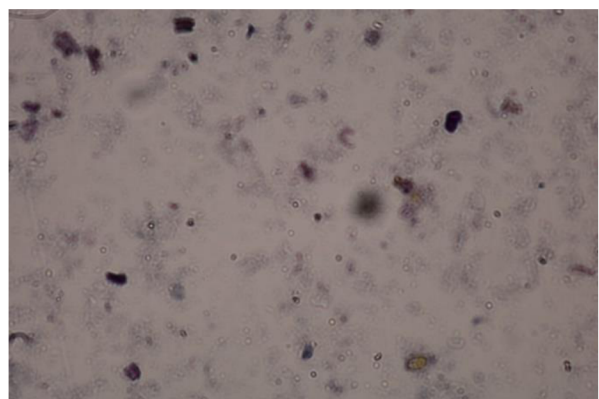
Obr. 4: Graf A) znázorňuje průběh spotřeby kyslíku (O_2) v čase vybraného vzorku. Červená křivka značí proložení dat růstovým modelem, jehož jedním parametrem je růstová rychlost. V grafu B) jsou data, která sumarizují růstové rychlosti odhadnuté z křivek znázorněných v grafu A) z opadového (O) a humusového (A) horizontu z povodí Čertova (CT, oranžová barva sloupce) a Plešného (PL, černá barva sloupce) jezera. Velikost sloupečků odpovídá průměru a chybová úsečka značí směrodatné odchylce ($n = 9$).



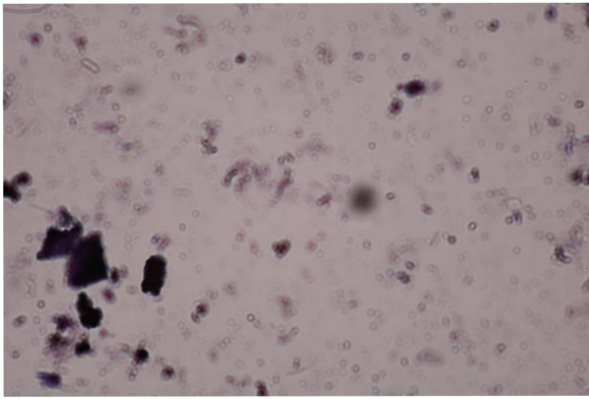
Obr. 5: Jednotlivé části grafu znázorňují mikrobiální poměry C:P (CP) a N:P (NP) ve dvou různých horizontech (opadovém – O a humusovém – A) z povodí Čertova (CT) a Plešného (PL) jezera. Barva sloupečků odpovídá hodnotám mikrobiálních poměrů před (zelená barva sloupce) a po (černá barva sloupce) inkubaci půdy s růstovým médiem bez přídavku fosforu. Velikost sloupečků odpovídá průměru a chybové úsečky směrodatné odchylce (n = 9). Osa y má u každého grafu jiný rozsah hodnot.



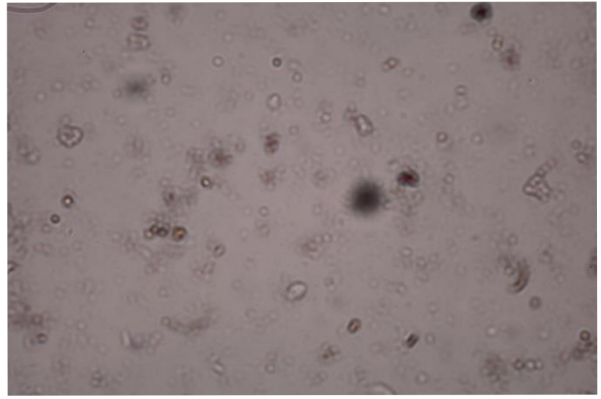
CT O – před inkubací



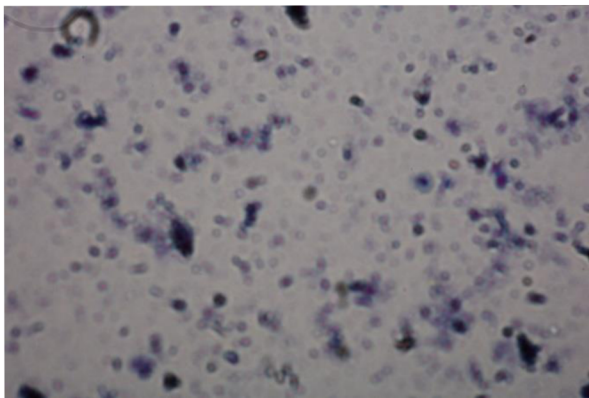
CT O – po inkubaci



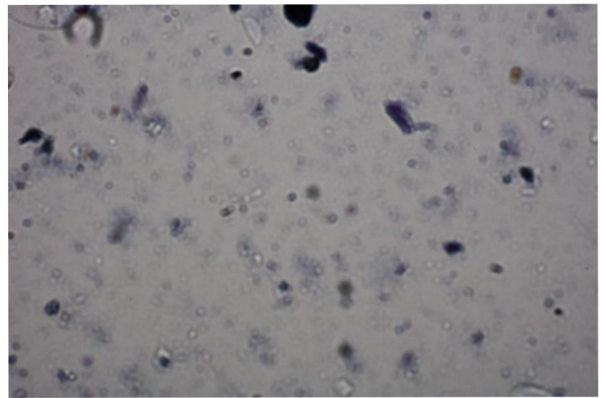
CT A – před inkubací



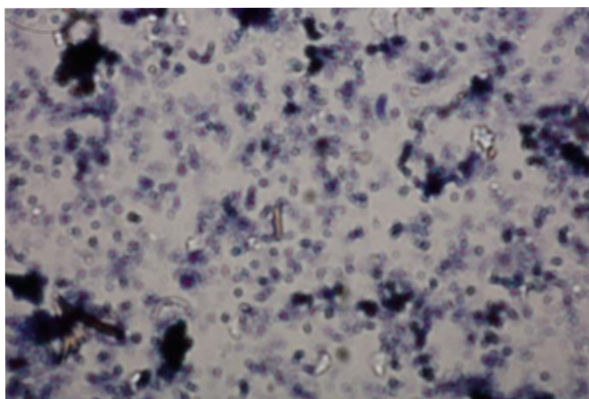
CT A – po inkubaci



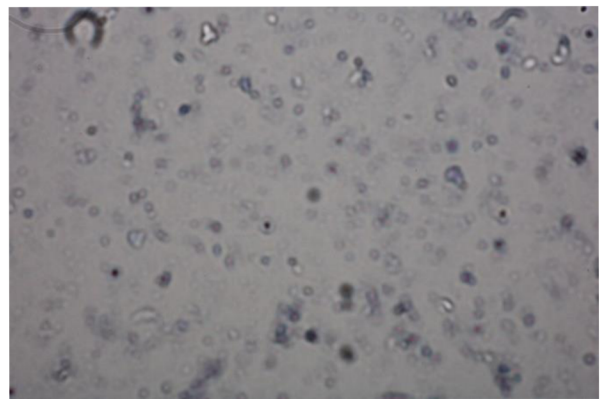
PL O – před inkubací



PL O – po inkubaci



PL A – před inkubací



PL A – po inkubaci

Obr. 6: Na obrázcích lze vidět výběr fotografií vzorků před a po inkubaci opadového (O) a humusového (A) horizontu z povodí Čertova (CT) a Plešného (PL) jezera s růstovým médiem bez přídavku fosforu.

5. Diskuze

5.1. Přítomnost polyfosfátů v biomase půdních mikroorganismů

Neexistuje žádná známá metoda, kterou by se mohly napřímo kvantifikovat PolyP v biomase půdních mikroorganismů. Abych potvrdila hypotézu, že některé půdní mikroorganismy PolyP obsahují, navrhla jsem experiment, který kombinuje několik přístupů, jež mohou, v případě, že mikroorganismy PolyP obsahují, nepřímo indikovat přítomnost PolyP. Zvolila jsem metodu růstu biomasy půdních mikroorganismů na růstovém médiu bez přídavku P, zároveň s tím jsem zjišťovala související změny ve stechiometrii půdních mikroorganismů, a také změny barvy u obarvené půdní suspenze před a po inkubaci.

Růstový experiment na růstovém médiu bez přídavku P jsem vybrala, jelikož například ve studii Čapek et al. (2016) zaznamenali nárůst biomasy půdních mikroorganismů na médiu bez přídavku P a poukázali tím na možné využití vnitřních zásob P. V mikrobiální literatuře je také dobře zdokumentované, že se PolyP rozkládají při nadbytku ostatních živin, tedy koncepčně je využívání zásob PolyP známo již kolem 50 let (viz kapitola 2.4.3.; Dawes & Senior, 1973). Při růstovém experimentu jsem využila růstového média, které neobsahovalo žádný P a zároveň jsem půdní vzorek zředila pískem. Zředěním vzorku jsem dosáhla toho, že množství půdního P bylo zanedbatelné a pokud by mikroorganismy vykázaly růst, vykázaly by ho téměř bez přítomnosti P. Stejně jako ve výše zmíněné studii, došlo i při mém růstovém experimentu k růstu mikrobiální biomasy (Obr. 4), což s největší pravděpodobností znamená, že mikrobiální biomasa využila k růstu vnitřní zásobu PolyP.

Dalším ukazatelem, který potvrzuje přítomnost PolyP v biomase půdních mikroorganismů, je změna mikrobiálních poměrů C:P a N:P. Počáteční mikrobiální poměry (tzn. před inkubací na růstovém médiu bez přídavku P) byly poměrně nízké, průměrně 17-19 pro C:P a 2 pro N:P. Po týdenní inkubaci s růstovým médiem bez přídavku P došlo k nárůstu hodnot v průměru na 41-47 pro C:P a 4 pro N:P. Iniciální hodnoty poměru C:P odpovídají obecnému C:P poměru ribozomů (viz kapitola 2.2.). Znamená to, že buď je buňka složená pouze z ribozomů, což není možné, nebo takto nízký poměr indikuje přítomnost PolyP v buňkách. Také nárůst mikrobiálních poměrů během inkubace poukazuje na přítomnost PolyP. Poměry C:P i N:P se zvýšily, což poukazuje na to, že buňky půdních mikroorganismů na začátku experimentu obsahovaly PolyP a v průběhu inkubace je vyčerpaly k růstu. Teoreticky by ke změně stechiometrie mohlo dojít také tím, že na růstovém médiu došlo k druhové změně mikrobiálního společenstva. V některých půdních vzorcích došlo k velkému

zvýšení C:P poměru z hodnot 14-20 na hodnoty 50–66. V jednom vzorku se C:P zvýšil dokonce z 15 na 80. Dle studie Mouginit et al. (2014) hodnota 15 neodpovídá C:P poměru žádné půdní bakterie a hodnota 80 odpovídá například C:P poměru bakterie *Rhodococcus* spp. Pokud by teoreticky došlo ke změně druhového složení, znamenalo by to, že jedna bakterie musela dominovat a přerůst všechny ostatní, což není příliš pravděpodobné. Z toho důvodu změny v mikrobiální stechiometrii přisuzuji spíše k vyčerpání zásob PolyP.

Posledním ukazatelem, že k růstu biomasy a ke změně stechiometrie došlo díky přítomnosti PolyP, je zobrazení (nabarvení) PolyP v buňkách. K barvení vzorků jsem nejprve zkoušela použít fluorescenční barvivo DAPI. Vybrala jsem ho, jelikož se běžně využívá při barvení PolyP v bakteriích ve vodních ekosystémech (Li & Dittrich, 2019), a také při barvení PolyP v arbuskulárně mykorhizních houbách (Nguyen & Saito, 2021). Barvení PolyP pomocí DAPI v půdní suspenzi bylo při mém experimentu neúspěšné. Jak jsem zmiňovala výše, vzorky byly zředěné pískem, a právě pískové částičky pod mikroskopem také fluoreskovaly. V mikroskopu jsem tak nebyla schopná rozlišit buňky půdních mikroorganismů. Proto jsem následně zvolila velice dostupnou Neisserovu metodu, při které se buňky barví pomocí methylenové modři. Toto barvení bylo úspěšnější, na fotografiích v obrázku 6 lze vidět fialové buňky (PolyP) před růstovým experimentem a odbarvené hnědé buňky (bez PolyP) po týdenní růstu. Změna barvy poukazuje na vyčerpání PolyP při růstovém experimentu a potvrzuje tak část mé hypotézy. Na fotografiích lze vidět určité rušení, větší fialové/černé skvrny, které jsou způsobeny špatným rozprostřením suspenze na sklíčko a k následné reakci barviva s půdním matrixem. V mikroskopu jsem však byla schopná takové skvrny odlišit od buněk půdních mikroorganismů a jasně tak rozpoznat změny barev buněk.

U naměřeného množství SRP v půdě vyšly statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými plochami a horizonty, což poukazuje na rozdílnou dostupnost P. Rozdíly u jiných půdních charakteristik a poměrů C:P a N:P mezi povodími a lokalitami nebyly průkazné. Z toho lze usoudit, že PolyP obsahují i společenstva v půdách s menší dostupností P, tedy pravděpodobně nezáleží na dostupnosti P v půdě, což jsem předpokládala v první hypotéze. Potvrdila jsem tak jen část první hypotézy a to, že nejen některá, ale všechna společenstva půdních mikroorganismů obsahují PolyP.

5.2. Návratnost polyfosfátů

Fosfor je v mikrobiální biomase součástí mnoha důležitých makromolekul jako RNA, ATP, koenzymů, fosfolipidů a také PolyP. Zabývala jsem se tím, jaké množství P ve formě PolyP je stanovitelné jako SRP. Využila jsem k tomu fumigačně extrakční metodu, při které se měří P ve formě SRP a následně se přepočítává na MBP. Fumigačně extrakční metodu jsem proto poupravila a přidala do ní ještě několik ošetření. Přidávala jsem PolyP do nefumigované půdy před extrakcí, do nefumigovaného extraktu před okyselením, do fumigované půdy před fumigací a extrakcí a do fumigovaného extraktu před okyselením. Zjišťovala jsem tak, zda dochází k depolymerizaci PolyP hlavně v půdě či půdním extraktu a zda se přídavek PolyP projeví jako zvýšená koncentrace SRP. Pro celý koncept experimentu bylo důležité, zda je navýšení koncentrace SRP dostatečné, aby bylo měřitelné. Výsledky inkubačního experimentu částečně naznačují, že se PolyP depolymerizovat musí, jelikož jinak bych nedokázala vidět změny v mikrobiálních poměrech C:P a N:P.

Z výsledků experimentu jsem potvrdila část hypotézy, že se přítomnost PolyP projeví v měřeném SRP. Nejvyšší návratnost PolyP jsem změřila z půdy před fumigací (až 80 %). Všechny zbylé návratnosti PolyP ze vzorků byly také vysoké, dosahovaly až 60 %. Z těchto pozorování mohu usoudit, že k depolymerizaci PolyP dochází především abiotickým rozkladem, tedy tím v půdním extraktu (viz rozdíly ve sloupečcích v obrázku 3). Ke zbylým až 20 % návratnosti PolyP došlo v půdním prostředí během fumigace, kde mohly enzymy rozkládat PolyP, což částečně vyvrací hypotézu, že k depolymerizaci PolyP dochází v půdě. K depolymerizaci dle výsledků může docházet jak v půdě, tak v půdním extraktu.

Mé výsledky naznačují, že některé hodnoty MBP, v případě že půdní mikroorganismy obsahují PolyP, mohou být v předchozích studiích nadhodnocené. Při fumigačně extrakční metodě se počítá teoreticky pouze s mikroorganismy, které PolyP nemají. Pokud ve zkoumané půdě mikroorganismy mají PolyP, jejich přítomnost zvyšuje extrahovatelnost MBP. Výsledné vypočítané hodnoty MBP by tak mohly být chybné. Je to tím, že se hodnoty SRP přepočítávají korekčním faktorem, který nezapočítává přítomnost PolyP. Ve chvíli, kdy PolyP přítomné jsou, korekční faktor 0,4 (40 %; Brookes et al., 1982) je příliš nízký, jelikož návratnost PolyP po fumigaci dosáhla například až 80 %, což je dvojnásobek korekčního faktoru. Kvůli tomuto faktoru mohou být výsledné hodnoty MBP nadhodnocené a tím může dojít k chybnému výpočtu mikrobiální stechiometrie. Ze stechiometrie se následně mohou počítat mineralizace P (Čapek et al., 2021), čímž dojde k celkové špatné interpretaci výsledků. Princip je takový, že model předpovídá mineralizace na základě stechiometrických rozdílů mezi biomasou

půdních mikroorganismů a zdroji v půdě. Jakmile je tedy stechiometrie půdních mikroorganismů špatně odhadnutá, predikce půdních biogeochemických modelů mohou být nepřesné.

Všechny experimenty jsem prováděla na široké škále půd. Zvolila jsem povodí Čertova a Plešného jezera, jelikož jsou velice rozmanité. Tato povodí mají rozdílné složení horninového podloží a rozdílnou dostupnost P. Zároveň na obou povodích lze najít plochy s různými fázemi regenerace lesa, vzhledem k disturbancím z minulosti (viz kapitola 3.1.). To, že jsem zjistila přítomnost PolyP ve všech vzorcích z takto různých půd naznačuje, že mé výsledky nejsou platné jen pro tyto zvolené lokality, ale mohou poukazovat na to, že přítomnost PolyP v půdních mikroorganismech by mohla být spíše všeobecným trendem, což by mohlo mít teoreticky důsledky i pro jiné studie.

6. Závěr

Cílem této práce bylo zjistit přítomnost PolyP v biomase půdních mikroorganismů. Detekovala jsem přítomnost PolyP pomocí růstového experimentu a změn mikrobiální stechiometrie C:P a N:P kombinované s Neisserovou barvicí metodou. Při růstovém experimentu mikroorganismy vykázaly růst, mikrobiální stechiometrie C:P a N:P se po experimentu zvýšila a obarvené fialové buňky se po experimentu odbarvily dohněda. Všechny tyto výsledky poukazují na to, že se PolyP ve všech půdních mikrobiálních společenstvech reprezentujících půdní vzorek nacházejí.

Dalším cílem bylo zjistit, zda jdou PolyP změřit při běžně používané fumigačně extrakční metodě. Pomocí přídavek PolyP do různých kroků metody jsem zjistila, že PolyP ve formě SRP naměřit jdou a že je jejich návratnost vysoká (až 80 %). Z toho důvodu by se mělo při využívání fumigačně extrakční metody brát v potaz, zda půdní mikroorganismy obsahují PolyP. Ve chvíli, kdy mikroorganismy PolyP obsahují, může docházet k nadhodnocování množství MBP, jelikož v takovém případě může být přepočítávací korekční faktor příliš nízký. Může tak docházet k chybné interpretaci výsledků, a proto by se vnitřní zásoba PolyP měla brát v úvahu při tvorbě matematických modelů.

7. Seznam použité literatury

- Ahn, K., & Kornberg, A. (1990). Kinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 265(20), 11734–11739.
- Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., & Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1841–1847. <https://doi.org/10.1128/jb.180.7.1841-1847.1998>
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2002). The nature and properties of soils (13th ed.). *Pearson Education, Inc.* ISBN 0-13-016763-0
- Brookes, P. C., Powlson, D. S., & Jenkinson, D. S. (1982). Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(4), 319–329. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90001-3)
- Čapek, P., Choma, M., Tahovská, K., Kaňa, J., Kopáček, J., & Šantrůčková, H. (2021). Coupling the resource stoichiometry and microbial biomass turnover to predict nutrient mineralization and immobilization in soil. *Geoderma*, 385(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114884>
- Čapek, P., Kasanke, C. P., Starke, R., Zhao, Q., & Tahovská, K. (2021). Biochemical inhibition of acid phosphatase activity in two mountain spruce forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 57(7), 991–1005. <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01587-9>
- Čapek, P., Kotas, P., Manzoni, S., & Šantrůčková, H. (2016). Drivers of phosphorus limitation across soil microbial communities. *Functional Ecology*, 30(10), 1705–1713. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12650>
- Christ, J. J., & Blank, L. M. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* containing 28% polyphosphate and production of a polyphosphate-rich yeast extract thereof. *FEMS Yeast Research*, 19(3), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz011>
- Christ, J. J., Willbold, S., & Blank, L. M. (2020). Methods for the analysis of polyphosphate in the life sciences. *Analytical Chemistry*, 92(6), 4167–4176. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05144>
- Cohen, A., Perzov, N., Nelson, H., & Nelson, N. (1999). A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26885–26893. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26885>

- Dawes, E. A. (1986). Microbial energetics (Tertiary level biology). *Blackie Academic & Professional*. ISBN 0-216-91791-3
- Dawes, E. A., & Senior, P. J. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 10(C), 135–266. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60088-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60088-0)
- Egli, T., & Zehnder, A. J. (1994). Phosphate and nitrate removal. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(3), 275–284. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90029-9)
- Eikelboom, D. H., & van Buijsen, H. J. J. (1981). Microscopic Sludge Investigation Manual. *TNO*, 106.
- Elser, J. J., Sterner, R. W., Gorokhova, E., Fagan, W. F., Markow, T. A., Cotner, J. B., Harrison, J. F., Hobbie, S. E., Odell, G. M., & Weider, L. W. (2000). Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters*, 3(6), 540–550. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00185.x>
- Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R. J., Amann, R., & Blackall, L. L. (1997). Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of “*Microthrix parvicella*” in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(2), 310–318. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(97\)80078-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80078-1)
- Funamoto, R., Saito, K., Oyaizu, H., Saito, M., & Aono, T. (2007). Simultaneous in situ detection of alkaline phosphatase activity and polyphosphate in arbuscules within arbuscular mycorrhizal roots. *Functional Plant Biology*, 34(9), 803–810. <https://doi.org/10.1071/FP06326>
- Günther, S., Trutnau, M., Kleinstaub, S., Hause, G., Bley, T., Röske, I., Harms, H., & Müller, S. (2009). Dynamics of polyphosphate-accumulating bacteria in wastewater treatment plant microbial communities detected via DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) and tetracycline labeling. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2111–2121. <https://doi.org/10.1128/AEM.01540-08>
- Harold, F. M. (1966). Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriological Reviews*, 30(4), 772–794. <https://doi.org/10.1128/mmbr.30.4.772-794.1966>
- Haygarth, P. M., Hepworth, L., & Jarvis, S. C. (1998). Forms of phosphorus transfer in hydrological pathways from soil under grazed grassland. *European Journal of Soil*

- Science*, 49(1), 65–72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1998.00131.x>
- Heuck, C., Weig, A., & Spohn, M. (2015). Soil microbial biomass C: N: P stoichiometry and microbial use of organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry*, 85, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.029>
- Hothorn, M., Neumann, H., Lenherr, E. D., Wehner, M., Rybin, V., Hassa, P. O., Uttenweiler, A., Reinhardt, M., Schmidt, A., Seiler, J., Ladurner, A. G., Herrmann, C., Scheffzek, K., & Mayer, A. (2009). Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase. *Science*, 324, 513–516.
- Ishige, K., Zhang, H., & Kornberg, A. (2002). Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16684–16688. <https://doi.org/10.1073/pnas.262655299>
- Joergensen, R. G., & Mueller, T. (1996). The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the k_{en} value. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 33–37.
- Keasling, J. D. (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 829(510), 242–249. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48579.x>
- Keasling, J. D., & Hupf, G. A. (1996). Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 743–746. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.743-746.1996>
- Keyhani S, Lopez JL, Clark DS, K. J. (1996). Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. *Microbios* 88, 105–114.
- Kopáček, J., Fluksová, H., Hejzlar, J., Kaňa, J., Porcal, P., & Turek, J. (2017). Changes in surface water chemistry caused by natural forest dieback in an unmanaged mountain catchment. *Science of the Total Environment*, 584–585, 971–981. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.148>
- Kopáček, Jiří, Bače, R., Hejzlar, J., Kaňa, J., Kučera, T., Matějka, K., Porcal, P., & Turek, J. (2020). Changes in microclimate and hydrology in an unmanaged mountain forest catchment after insect-induced tree dieback. *Science of the Total Environment*, 720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137518>
- Kornberg, A., Kornberg, S. R., & Simms, E. S. (1956). Metaphosphate synthesis by an enzyme

- from *Escherichia coli*. *BBA - General Subjects*, 20(C), 215–227.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(56\)90280-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90280-3)
- Kulaev, I., Vagabov, V., & Kulakovskaya, T. (1999). New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 111–129.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80189-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80189-3)
- Kulakova, A. N., Hobbs, D., Smithen, M., Pavlov, E., Gilbert, J. A., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2011). Direct quantification of inorganic polyphosphate in microbial cells using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Environmental Science and Technology*, 45(18), 7799–7803. <https://doi.org/10.1021/es201123r>
- Lenth, R. V. (2024). emmeans: Estimated marginal means, aka Least-Squares means (R package version 1.10.0). <https://cran.r-project.org/package=emmeans>
- Li, J., & Dittrich, M. (2019). Dynamic polyphosphate metabolism in cyanobacteria responding to phosphorus availability. *Environmental Microbiology*, 21(2), 572–583.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14488>
- Mason-Jones, K., Robinson, S. L., Veen, G. F. (Ciska), Manzoni, S., & van der Putten, W. H. (2021). Microbial storage and its implications for soil ecology. *ISME Journal*, August, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01110-w>
- Mouginot, C., Kawamura, R., Matulich, K. L., Berlemont, R., Allison, S. D., Amend, A. S., & Martiny, A. C. (2014). Elemental stoichiometry of fungi and bacteria strains from grassland leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 76, 278–285.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.011>
- Murata, K., Uchida, T., Kato, J., & Chibata, I. (1988). Polyphosphate kinase: distribution, some properties and its application as an ATP regeneration system. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(6), 1471–1477.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1988.10868895>
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., & Kamagata, Y. (1995). *Microlunatus phosphovoms* gen. nov., sp. nov., a new Gram-Positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. 14, 17–22.
- Nguyen, C. T., & Saito, K. (2021). Role of cell wall polyphosphates in phosphorus transfer at the arbuscular interface in mycorrhizas. *Frontiers in Plant Science*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.725939>

- Nguyen, T. Q., Dziuba, N., & Lindahl, P. A. (2019). Isolated: *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles contain low-molecular-mass transition-metal polyphosphate complexes. *Metallomics*, *11*(7), 1298–1309. <https://doi.org/10.1039/c9mt00104b>
- Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Kojima, T., & Saito, M. (2008). Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods. *Analytical Biochemistry*, *383*(2), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.08.002>
- Petzoldt T. (2022). growthrates: Estimate growth rates from experimental data (R package version 0.8.4). <https://cran.r-project.org/package=growthrates>
- Reusch, R. N. (2000). Transmembrane ion transport by polyphosphate/Poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochemistry (Moscow)*, *65*(3), 280–295.
- Rose, A. H., Morris, J. G., & Tempest, D. W. (1983). Advances in microbial physiology. *Volume 24* (Vol. 24). ISBN 0120277247
- Saito, K., Ohtomo, R., Kuga-Uetake, Y., Aono, T., & Saito, M. (2005). Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in *Saccharomyces cerevisiae* by using the affinity of the polyphosphate binding domain of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(10), 5692–5701. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5692-5701.2005>
- Šimek, M. (2019). Živá půda. *Praha: Academia, 2019*. Strategie AV21. Špičkový výzkum ve veřejném zájmu. ISBN 978-80-200-2976-8.
- Sturner, R. W., & Elser, J. J. (2002). Ecological stoichiometry. *Princeton University Press*.
- Svoboda, M., Matějka, K., & Kopáček, J. (2006). Biomass and element pools of understory vegetation in the catchments of Čertovo Lake and Plešné Lake in the Bohemian Forest. *Biologia (Poland)*, *61*(20). <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0074-8>
- Team, R. C. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>
- Tijssen, J. P. F., Beekes, H. W., & Van Steveninck, J. (1982). Localization of polyphosphates in *Saccharomyces fragilis*, as revealed by 4',6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *BBA - Molecular Cell Research*, *721*(4), 394–398. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(82\)90094-5](https://doi.org/10.1016/0167-4889(82)90094-5)
- van Groenestijn, J. W., Vlekke, G. J. F. M., Anink, D. M. E., Deinema, M. H., & Zehnder, A. J. B. (1988). Role of cations in accumulation and release of phosphate by *Acinetobacter*

- Strain 210A. Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 2894–2901.
<https://doi.org/10.1128/aem.54.12.2894-2901.1988>
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19(6), 1–5.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Xu, X., Thornton, P. E., & Post, W. M. (2013). A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography*, 22(6), 737–749. <https://doi.org/10.1111/geb.12029>
- Zechmeister-Boltenstern, S., Keiblinger, K. M., Mooshammer, M., Penuelas, J., Richter, A., Sardans, J., & Wanek, W. (2015). The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecological Monographs*, 133–155.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1890/14-0777.1>
- Zhang, H., Ishige, K., & Kornberg, A. (2002). A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16678–16683. <https://doi.org/10.1073/pnas.262655199>