

Středoškolská odborná činnost 2010/2011
Obor 08 – Ochrana a tvorba životního prostředí

**Životní strategie heterotrofního bakteriálního společenstva
ve vysokohorských půdách Ladaku (Himálaje, Indie)**

Barbora Kuchtová
Tereza Pavelcová

České Budějovice 2011

Středoškolská odborná činnost
Obor 08 - Ochrana a tvorba životního prostředí

**Životní strategie heterotrofního bakteriálního společenstva
ve vysokohorských půdách Ladaku (Himálaje, Indie)**

**Life strategy of heterotrophic bacterial community
in soils in the high mountains of Ladakh (Himalaya, India)**

Autoři: Barbora Kuchtová
 Tereza Pavelcová

Škola: Gymnázium, Jírovцова 8, 371 61 České Budějovice

Konzultant: Ing. Václav Křišťůfek, CSc., Biologické centrum AV ČR,
 v. v. i. – Ústav půdní biologie, České Budějovice

Zadavatel práce: RNDr. Klára Řeháková, PhD., Biologické centrum AV ČR,
 v. v. i. – Hydrobiologický ústav, České Budějovic

České Budějovice 2011

Prohlášení

Prohlašujeme, že jsme svou práci vypracovaly samostatně, použily jsme jen literaturu uvedenou v seznamu použité literatury a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Českých Budějovicích, 15.4. 2011

.....

.....

Poděkování

Za veškerou pomoc, podporu a pochopení jak při práci v laboratoři, tak při psaní děkujeme Ing. V. Křišťůfkovi, CSc. (BC AV ČR, v. v. i. – ÚPB Č. Budějovice). Dále naše díky patří RNDr. Kláře Řehákové, PhD. (BC AV ČR, v. v. i. – HBÚ Č. Budějovice), která nám projekt zadala a Ing. Jaroslavu Hynštovi, PhD. (BC AV ČR, v. v. i. – ÚPB) za cenné rady při statistickém zpracovávání dat.

Naše poděkování náleží Biologickému centru AV ČR, v. v. i. - Ústavu půdní biologie za možnost pracovat v jeho laboratořích. Děkujeme technickému personálu ústavu za praktické rady při analýzách vzorků. Stejně tak děkujeme expedičnímu týmu, který se vydal do Ladaku a odebíral ve vysokohorských podmínkách půdní vzorky.

Aktivita výzkumného týmu v Ladaku probíhá díky projektu GAAV-IAA600050802 "Migrace rostlin do subniválních poloh: úloha rostlinných vlastností a interakcí v oteplovajícím se klimatu" (2008-2012), jehož hlavním řešitelem je Dr. Jiří Doležal (Botanický ústav AV ČR, v. v. i. v Třeboni) a zpracování odebraných vzorků probíhá za přispění projektů CNRS-PICs4876, GD206/08/H044, MŠMT ČR LC06066 a GAJU-138/2010/P.

Bakterie izolované z půdních vzorků byly použity pro řešení projektu "Antibiotická rezistence – antibiotika v životním prostředí" (1.43, Otevřená věda II – systematické zapojení talentovaných středoškolských studentů do vědecko- výzkumné práce, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/090034), do kterého jsme zapojeny. Výsledky tohoto výzkumu zveřejníme v rámci SOČ v roce 2012.

Anotace

Předmětem práce bylo zjistit, jak je bakteriální společenstvo ve vysokohorském prostředí ovlivněno nadmořskou výškou a přítomností rostliny *Thylacospermum caespitosum*. Studovaná oblast se nachází v pohoří Ladak, SZ Himálaje, Indie, kde je velmi suché klima a teploty mohou kolísat od +30°C v létě až k -30 °C v zimě. Půdní vzorky byly odebrány na dvou odlišných lokalitách, Nubra Valley a u jezera Tsomoriri, na 8 stanovištích pod polštářem rostliny *T. caespitosum* a z biologické půdní krusty vedle polštáře.

Celkové počty bakterií (T) v půdních vzorcích byly stanoveny epifluorescenční mikroskopií s barvením DAPI, počty kultivovatelných bakterií (C) byly stanoveny metodou CFU (Colony Forming Units) a zároveň bylo zjištěno procentické zastoupení bakterií r- a K-stratégů. Byl vypočten poměr kultivovatelných bakterií k celkovým počtům (C/T). Statistickými analýzami bylo zjištěno, že celkové počty bakterií v půdních vzorcích nebyly ovlivněny podmínkami rostliny *T. caespitosum* ani nadmořskou výškou odběrového místa. Naopak počty kultivovatelných bakterií a procentické zastoupení r-stratégů v půdě se mění v závislosti na přítomnosti *T. caespitosum* a na zvyšující se nadmořské výšce.

Naše výsledky tedy ukázaly, že celkové počty bakterií v půdách indického pohoří Ladak nejsou ovlivněny rostlinou *T. caespitosum* a nadmořskou výškou, ale tyto dva faktory ovlivňují složení mikrobiálního společenstva.

Klíčová slova: bakterie; polštářové rostliny; biologické půdní krusty; nadmořská výška; Himálaje; r-/K-strategie

Annotation

The aim of this study was to find out, how bacterial community is affected by altitude and presence of cushion plant *Thylacospermum caespitosum* in the alpine environment. The study area is situated in mountain range of Ladakh, NW Himalaya, India, where the climate is remarkably arid and temperatures can rise to +30 °C in summer and drop as low as -30 °C in winter. Soil samples were collected at two different localities, Nubra Valley and near the lake Tsomoriri, at 8 sites under the cushion of *Thylacospermum caespitosum* and from the biological soil crust near the cushion.

Total bacteria counts in soil samples were determined by the epifluorescent microscopy with DAPI staining, using Colony Forming Unit (CFU) counts were assessed the cultivable bacteria counts and the proportion of r- and K-strategists. Culturable-to-total cell ratio (C/T) was calculated.

Statistical analysis showed, that total bacteria counts weren't influenced by the cushion of *T. caespitosum* nor by altitude. On the contrary, CFU counts and proportion of r-strategists change with presence of *T. caespitosum* and different altitude.

Our results proved that total bacteria counts in soils of Ladakh, India are not influenced by *T. caespitosum* nor altitude, but these two factors affect the composition of microbial communities.

Keywords: bacteria; cushion plants; biological soil crusts; altitude; Himalaya; r-/K-strategy

Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	8
1.1. Úvod.....	8
1.2. Pracovní hypotéza projektu.....	9
1.3. Cíl práce.....	10
2. Materiál a metody.....	10
2.1. Charakterizace odběrových míst.....	10
2.1.1. Charakteristika <i>Thylacospermum caespitosum</i>	13
2.1.2. Biologické půdní krusty.....	13
2.2. Odběr půdních vzorků.....	14
2.3. Zpracování a skladování půdních vzorků.....	15
2.4. Mikrobiologický rozbor půdních vzorků.....	16
2.4.1. Příprava ředící řady.....	16
2.4.2. Epifluorescenční mikroskopie.....	16
2.4.3. Barvení půdních vzorků DAPI.....	16
2.4.4. Počítání bakterií v půdním vzorku.....	17
2.4.5. Kultivační médium pro stanovení počtu bakterií.....	17
2.4.6. Inokulace půdní suspenze na kultivačním médiu a inkubace bakterií.....	17
2.4.7. Stanovení počtu buněk bakterií na kultivačním médiu.....	17
2.4.8. Stanovení organické hmoty v půdních vzorcích.....	18
2.5. Statistické zpracování dat.....	18
3. Výsledky.....	18
3.1. Zhodnocení půdních vzorků z lokality Nubra Valley.....	18
3.2. Zhodnocení půdních vzorků z lokality u jezera Tsomoriri.....	23
4. Diskuse.....	27
5. Závěry.....	28
6. Seznam použité literatury.....	28

1. Úvod a cíle práce

1.1. Úvod

Aktivity českých vědců v Transhimálajích započaly expedicí Akademie věd v roce 1989. Jeden z účastníků, botanik Leoš Klimeš, se poté rozhodl pro systematický průzkum této dosud málo probádané oblasti a pravidelně navštěvoval Ladak od roku 1997. Jeho aktivity spočívaly zejména v důkladném mapování výskytu vyšších rostlin a v návaznosti na něj rovněž příprava moderní Květeny Ladakhu. Zajímal se i o ekologické otázky, jako je klonalita u místních druhů rostlin, a prováděl nejrůznější experimenty. Po jeho tragickém zmizení někde uprostřed divoké části Zanskaru v srpnu 2007 však jeho práce zůstala, bohužel, nedokončena. Od roku 2008 pokračují výzkumné aktivity pod vedením Dr. Jiřího Doležala z Botanického ústavu v Třeboni. Hlavní oblasti bádání zahrnují monitoring vegetačních změn, hospodaření rostlin s živinami, vztahy mezi cévnatými rostlinami a půdními mikrobiálními společenstvy a další ekologická témata týkající se extrémních nadmořských výšek (Dvorský, 2009).

V rámci Studentské odborné činnosti jsme se v letech 2010 – 2011 zapojily do výzkumu charakteristik půdních vzorků dovezených pracovníky ústavů Akademie věd z jejich experimentálních ploch v Himálajích. Naším úkolem bylo stanovení počtů bakterií v celkem 96-ti půdních vzorcích. Měly jsme tak možnost seznámit se s mikroskopickými a kulturačními technikami používanými v půdní mikrobiologii. Velmi cenné pro nás bylo zapojení do vědeckého výzkumného týmu, práce v laboratoři, účast na diskusních seminářích ke studované problematice, studium odborné literatury a konečně vyhodnocení výsledků, včetně statistických analýz. V práci zveřejněné výsledky jsou součástí mnohem širěji pojatého projektu, který se uskutečňuje v oblasti Himálají již několik let. Biodiverzita rostlin ve vysokohorském nebo alpinském ekosystému a jejich zeměpisnému rozšíření je věnována značná pozornost, obzvláště s probíhajícími změnami klimatu. Změny v rozšíření rostlinných druhů spojené s rostoucí teplotou byly záznamenány ve vysokohorských oblastech v Evropě, Severní Americe a na Novém Zélandu. Přesto jsou naše znalosti chladného alpického prostředí a jeho bioty stále útržkovité, obzvláště s důrazem na fototrofní mikrobiální společenstva v alpické půdě (Řeháková et al., v přípravě).

Ve vysokohorských podmínkách jsou rostliny vystaveny stresovým podmínkám (krátké vegetační období, nízká teplota, silný vítr, eroze a nízký přísun vody a živin), které ve-

dou u rostlin k vytváření polštářových forem jako projev životní strategie (Körner, 2003). Polštáře vytváří okolo 338 polštářových druhů rostlin, které patří do 78 rodů a 34 čeledí (Arredondo-Núñez et al., 2009). Polštářové druhy rostlin se řadí k tzv. „ekosystémovým inženýrům” vzhledem k tomu, že dokáží měnit kvalitu nejen mikroprostředí, ale i jejich blízkého okolí (snižují rychlost větru, zpřístupňují makroživiny, zmírňují výkyvy teploty, udržují vlhkost a jiné). Navíc mohou sloužit jako pěstební prostředí pro jiné rostliny, které v polštářích mohou začít růst a tak přispívají ke zvýšení diverzity rostlin v daném prostředí. Kompetice mezi rostlinami se ve stresových podmínkách snižuje (Dvorský et al., v přípravě). Pozitivní a negativní interakce probíhají současně a určují složení a strukturu rostlinného společenstva. Přitom vyrovnanost těchto interakcí je ovlivňována podmínkami prostředí. Tyto vztahy se nazývají „Stress Gradient Hypothesis” (Stresová gradientová hypotéza) (Dvorský et al., v přípravě). Ekologové dnes řeší otázku, zda se skutečně projevuje vzájemná podpora rostlin se zvyšujícím se stresovým zatížením prostředí.

Řešený projekt si klade za cíl získat prvotní poznatky o tom, zda se v extrémních výškách Transhimálají projevuje kladný vliv polštářovitých rostlin na ostatní organismy alpinské zóny. V této oblasti dochází díky globálním změnám k vytváření mnoha nových prostředí pro růst rostlin. Polštáře *Thylacospermum caespitosum* (CAMBESSEDES) SCHISCHKIN přitom mohou hrát významnou roli při kolonizaci odledněných oblastí a podpoře uchycení dalších druhů rostlin. Polštářové rostliny mohou také ovlivňovat chemismus půdy. Ovšem velmi málo je známo o jejich vlivu na půdní mikroorganismy, které hrají klíčovou úlohu při tvorbě půdy a při kolonizaci substrátu.

Projekt studuje následující otázky: i) ovlivňuje *T. caespitosum* půdní chemické vlastnosti?; ii) ovlivňuje *T. caespitosum* rozšíření cévnatých rostlin?; iii) ovlivňuje *T. caespitosum* kvantitativní a kvalitativní složení půdního mikrobiálního společenstva?; iv) jsou tyto charakteristiky ovlivněny nadmořskou výškou/vegetačním typem?

1.2. Pracovní hypotéza projektu

Byl formulován předpoklad, že polštářové rostliny *T. caespitosum* vytváří ve vysoko-horských podmínkách Himálaje vhodnější klima pro uchycení vyšších rostlin, a ovlivňují složení mikrobiálního společenstva.

1.3. Cíl práce

Cílem naší práce bylo zjistit, zda se společenstvo bakterií liší kvantitativně a kvalitativně v různých nadmořských výškách a zda je rozdílné v půdách pod polštářem a vedle polštáře rostliny *T. caespitosum*.

Předmětem výzkumu byly změny skladby rostlin podél výškových stupňů a zhodnocení důležitosti unikátních polštářů rostliny *T. caespitosum* na diverzitu vysokoalpínských a subniválních společenstev rostlin. Zároveň byl studován vliv *T. caespitosum* na chemismus půdy a mikrobiální společenstvo půdy. Testovala se hypotéza stresového gradientu a prospěšné účinky polštářů v suchých podmínkách hor východního Ladaku (Indie) na ostatní druhy rostlin (Dvorský, et al., v přípravě).

V rámci projektu byly stanoveny jednak počty bakterií, dále byly provedeny analýzy si-
nic a řas s využitím mikroskopických technik a také genetická analýza mikrobiálního společenstva, půdní vzorky byly charakterizovány po chemické a fyzikální stránce (Řeháková, ústní sdělení).

2. Materiál a Metody

2.1 Charakterizace odběrových míst

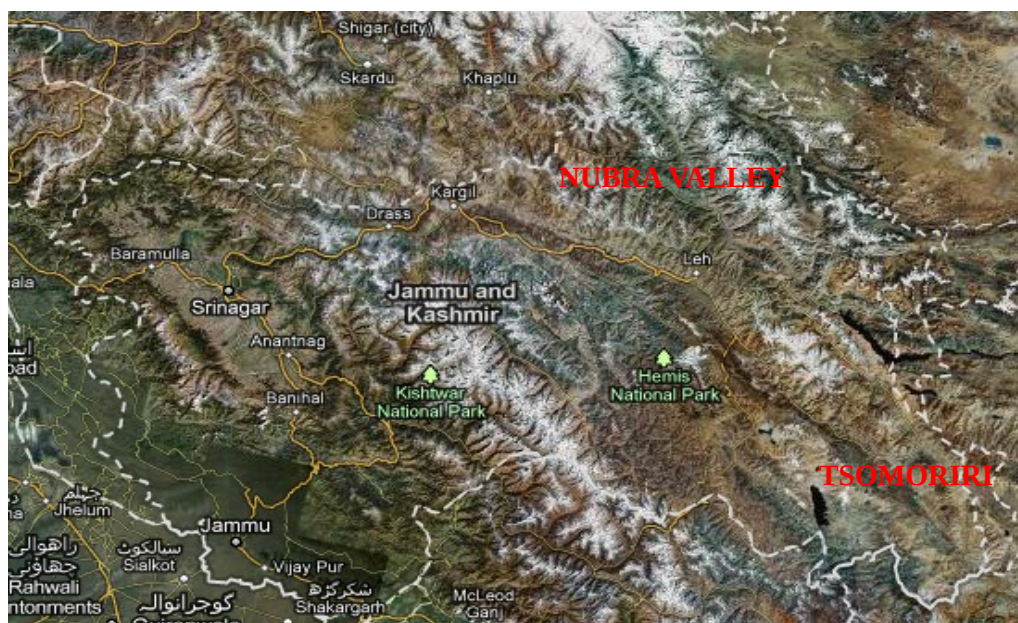
Místo odběru půdních vzorků se nachází v oblasti Ladak, ve státě Jammu a Kašmír, v severozápadní Indii mezi 32°41.5' – 33°59.7' (Obr. 1, 2). Přesněji v pohoří východního Karakumu - Nubra Valley - blízko hranici s Pákistánem (4700-5300 m n. m.) a na západní straně svahu vrcholu Chamser Kangri (6600 m n. m.) u jezera Tsomoriri (Obr. 3) v Malém Tibetu, poblíž hranice s Čínou (5300-5900 m n. m.). Ladak leží ve srážkovém stínu Himalají, které tvoří bariéru sezonním srážkám. Klima je tudíž převážně suché s průměrnými ročními srážkami 50 – 100 mm (Hartmann, 1983; Wang, 1988). Srážky klesají směrem východním podél údolí Indu od 83 mm u Lehu (3514 m, 34°09' S, 77°34' V, cca 50 km SZ od studovaného regionu) po 54 mm v Garu v JV Tibetu (4232, 32°07' S, 80°04' V, cca 160 km JV od studovaného regionu) (Miehe, 1990). V nižších a středních polohách výpar převládá nad srážkami. Podle Dvorského et al. (2011) dostupná klimatologická data pro tento region ukazují, že průměrná roční teplota se pohybuje okolo 0 °C. Geologické podloží v Nubra Valley tvoří batolit a v oblasti jezera Tsomoriri se vyskytuje Tsomoriri rula a prekambriická rula. Nadmořská výška studovaného území se pohybuje od 3350 m na dně Údolí Indusu k 7672 m na vrcholu Sa-

ser Kangri v pohoří Karakoram. V nižších nadmořských výškách je většina území pokryta chladnou pouští a polopouštní vegetací, step se nalézá ve středních výškách do 5000-5400 m n. m., alpské louky tvoří pás nad stepní zónou a subnivální vegetace je rozvinuta v nejvyšších nadmořských výškách (Dvorský et al., 2011).

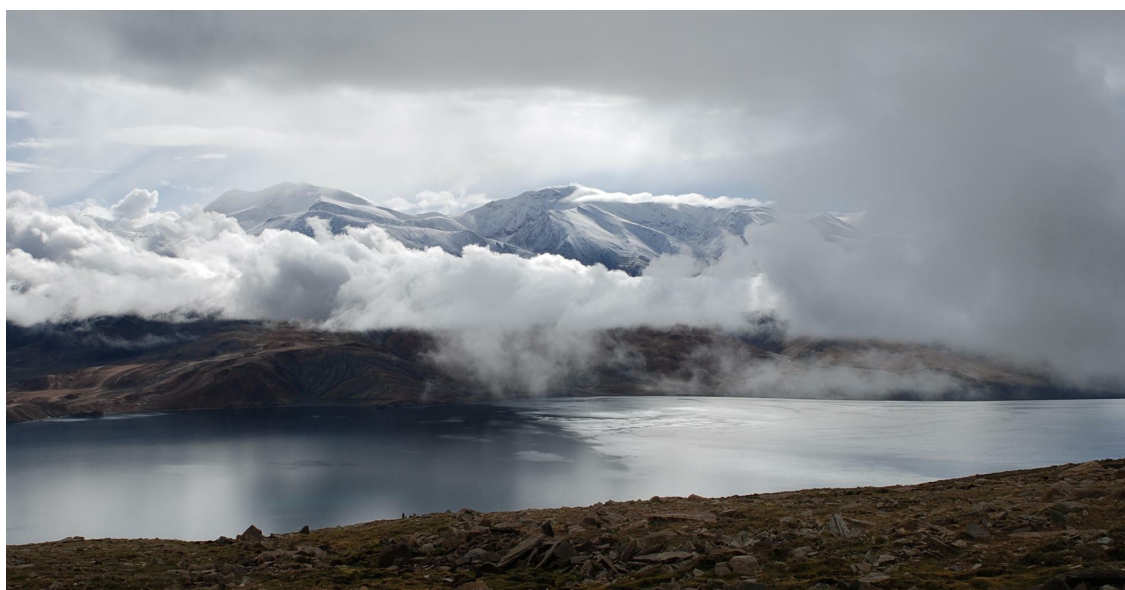
Studie byla provedena na dvou vzdálených lokalitách, aby byl vertikální gradient nadmořských výšek delší a umožnil lepší srovnání. Územní členění vegetace v Nubra Valley je podobné lokalitě u jezera Tsomoriri, ale díky odlišným geografickým podmínkám jsou vegetační pásy na lokalitě Nubra posunuty o 300-400 metrů níže (Dvorský et al., v přípravě). Byly provedeny chemicko-fyzikální rozborů půd ve studovaných oblastech, získaná data a jsou uvedena v práci Dvorského et al. (v přípravě).



Obr. 1. Celkový pohled na Indický poloostrov. V horní části obrázku je pohoří Himálaje, šipka ukazuje na oblast odběru půdních vzorků, pohoří Ladak (maps.google.com)



Obr. 2. Stát Jammu a Kašmír a pohoří východní Karakoram. Na obrázku jsou vyznačena místa odběru půdních vzorků, Nubra Valley a jezero Tsomoriri. (maps.google.com)



Obr. 3. Výzkumná plocha u jezera Tsomoriri v oblasti zvané Malý Tibet. V pozadí se zdvihá východní část pohoří Ladak. Podloží v této oblasti je tvořeno horninou rula. Foto Z. Chlumská (www.butbn.cas.cz/ladakh/).

2.1.1. Charakteristika *Thylacospermum caespitosum*

Thylacospermum caespitosum (čeleď hvozdíkovité, *Caryophyllaceae*) se vyskytuje ve velehorských oblastech Asie. Růst v okolí sněžné čáry jej zařazuje mezi nejvýše rostoucí cévnaté rostliny. Ve studovaném regionu se objevuje v rozmezí nadmořských výšek 4550 – 5960 m n. m. (Klimešová et al., 2010). V nižších polohách můžeme rostlinu najít na nízce spásaných pastvinách a sutích vystavených slunci. Vytváří pevné kompaktní pichlavé polštáře, které mají průměr 20-50 cm. Dorůstá do výšky cca 5 cm. Vykvétají v červnu a červenci (Sekyrka, 2008). Přestože o rychlosti jeho růstu nebo délce života je známo velmi málo, největší polštáře ve studovaných regionech mohou dosahovat více než 150 cm v průměru (osobní pozorování K. Řehákové) a mohou pravděpodobně přetrvávat přes desetiletí nebo dokonce století.



Obr. 4. Ostrůvkovitý výskyt polštářové rostliny *Thylacospermum caespitosum* (čeleď hvozdíkovité, *Caryophyllaceae*). Foto K. Řehákové.

2.1.2. Biologické půdní krusty

BPK se skládají z vodou nerozpustných půdních agregátů, které jsou spojeny řasami, houbami, lišejníky a mechy. Tloušťka krusty nad povrchem země může dosahovat až

10 cm. BPK se obvykle nachází v polosuchém a suchém prostředí po celém světě (www.soilcrust.org). Ve většině případů v kryptogamických krustách převládají vláknité cyanobakterie (Johansen, 1993). Protože krusty nejsou přizpůsobeny vysokému tlaku, pasoucí se dobytek, rekreační a vojenské aktivity způsobují velké ztráty na jejich integritě. Narušení krust přináší odnos půdních živin z prostředí, zvyšuje erozi, snižuje vlhkost půdy a tím způsobuje pokles diverzity organismů.

Zvýšená členitost povrchu některých krust zlepšuje odolnost proti erozi větrem a vodou. Pokud mohou kryptogamické krusty zabráňovat erozi, tvoření dun a ztrátě úrodnosti půdy, mohou také zpomalovat proces dezertifikace.

Důkazy svědčí o tom, že krusty mají úlohu ve zpevňování povrchu půd a přispívají k úrodnosti půd díky fixaci dusíku, zadržování půdních živin a zvýšené organické hmotě v půdě (Johansen, 1993).



Obr. 5. Biologická půdní krusta (šipka). Foto K. Řeháková.

2.2. Odběr půdních vzorků

Odběry půdních vzorků probíhaly v srpnu roku 2009. Sběr dat koresponduje s vrcholem vegetačního období. V Nubře, v nadmořské výšce 5100 m n. m., začíná vegetační sezóna na počátku června a trvá do první poloviny září. Sněhová pokrývka se vyskytuje od

konce září do první poloviny května. V Tsomoriri v nadmořské výšce 5600 m n. m. začíná vegetační sezona v druhé polovině června a trvá do začátku září (Dvorský et al., v přípravě). Celkem bylo na obou lokalitách odebráno 96 vzorků půdy ve 4 různých nadmořských výškách. Jednotlivá místa odběru byla od sebe vzdálena 100-200 výškových metrů: v Nubra Valley 4620 m, 4870 m, 5020 m a 5100 m, u Tsomoriri 5346 m, 5575 m, 5735 m a 5833 m. Těchto 8 míst efektivně pokrývá vertikální rozšíření *T. caespitosum* v Ladaku (Dvorský et al., v přípravě). V každé nadmořské výšce byla odebrána půda z okolí 6-ti rostlin. Byl odebrán jeden vzorek (150 g) vedle rostliny *T. caespitosum* a jeden přímo pod polštářem (Obr. 4). Vzorek z okolí polštáře byl složen ze dvou vzorků odebraných na východní a západní strany polštáře (75 + 75 g). Na každém stanovišti byl půdní vzorek odebrán sterilní špachtlí z povrchové vrstvy (hloubka 1 – 3 cm) z plochy 10 cm².

2.3. Zpracování a skladování půdních vzorků

Odebraná půda byla sušena na hliníkovém plátu po dobu 10 hodin. Vzorky byly sterilně umístěny do 100 ml polypropylenových sáčků, byly udržovány při pokojové teplotě a přemístěny do laboratoře k analýzám nebo zamraženy po dobu maximálně 6 měsíců, při teplotě –20°C, před provedením analýz. Půda nebyla prosáta na sítu.

Vzorky byly skladovány ve sterilních zkumavkách při teplotě 4 °C ve tmě.



Obr. 6. Odebrané půdní vzorky na hliníkových plátech před analyzováním. Foto K. Řeháková.

2.4. Mikrobiologický rozbor půdních vzorků

2.4.1. Příprava ředící řady

Do sterilní 100 ml Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 5 g půdy a přidáno 45 ml sterilního 0,1 % roztoku kalgonu (hexametafosforečnan sodný (NaPO_3)₆). Poté byla připravena desetinasobným ředěním ve sterilní vodě ředící řada půdní suspenze (1 ml suspenze předchozího ředění do 9 ml sterilní vody). Jako nejvhodnější ředění pro izolaci mikroorganismů bylo zvoleno ředění 10^4 .

2.4.2. Epifluorescenční mikroskopie

Pro stanovení celkových počtů bakterií epifluorescenční mikroskopií bylo použito barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Základní roztok barviva byl připraven rozpuštěním 0,001g DAPI v 10 ml sterilní filtrované vody a homogenizace vzorku byla provedena ultrazvukem (UC 006 DM1, Tesla, Czechoslovakia). Roztok DAPI byl uchováván buď dlouhodobě v mrazničce při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo krátkodobě při $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DAPI je specifické barvivo a poutá se k dvoušroubovici DNA, obzvláště k částem bohatým na adenin a thymín. Proto vytváří méně nespecifikovatelných skvrn na pozadí než jiná barviva (např. acridine orange – $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3 \cdot 1/2 \text{ZnCl}_2$). DAPI patrně zabarvuje hlavně vnitřní části buněk. V pozorovaných polích v mikroskopu je řada životaschopných aktivních buněk až po neživé organické částice, což způsobuje veliký rozdíl v intenzitě vyzařování obarvených částic. Mikroskopické počítání je vždy subjektivní, neboť různé osoby používají různé “intuitivní hranice” k rozlišení mezi živými buňkami a částicemi na pozadí. Počítání mikroorganismů v půdě je mnohem složitější než ve vodě díky přítomnosti půdních částic a většímu počtu nespecifikovatelných skvrn na pozadí (Bloem, 1995).

2.4.3. Barvení půdních vzorků DAPI

1 ml vzorku byl obarven 0,05 ml pracovního roztoku DAPI. Vzorek byl přefiltrován přes $0,2\text{ }\mu\text{m}$ porovitý polykarbonátový filtr (GE Polycarbonate, Black, 0,22 Micron, 25 mm, GE Water & Process Technologies, USA). Poté jsme umístily filtr na podložní sklo a přidaly jsme na filtr nefluorescenčního imerzního oleje (Olympus, Immersion oil, Japan), překryly krycím sklíčkem a opět nanasly jednu kapku imerzního oleje.

2.4.4. Počítání bakterií v půdním vzorku

Bakterie jsme počítaly s použitím epifluorescenčního mikroskopu BX 60 (firma Olympus, Japan) při zvětšení 1000 x.

Počty bakterií na gram půdy (B) jsou kalkulovány podle následujícího vzorce:

$$B = (N/X) (A/B) (1/S)$$

kde N = počet bakterií odečtený na určité ploše, X = počet sledovaných polí mikroskopem, A = plocha filtru pokrytá půdním vzorkem, B = množství bakterií ve vzorku, S = množství vzorku na filtru (Bloem, 1995)

2.4.5. Kultivační médium pro stanovení počtu bakterií

R2A Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (g/l): kvasničný extrakt 0,5; proteosa pepton 0,5; hydrolizovaný kasein; glukóza 0,5; rozpustný škrob 0,5; pyruvát sodíku ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$) 0,3; hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4) 0,3; síran hořečnatý (MgSO_4) 0,05; agar-agar 12, pH 7,2.

2.4.6. Inokulace půdní suspenze na kultivačním médiu a inkubace bakterií

Na sterilní Petriho misky se ztuhlým živným kultivačním médiem bylo sterilní pipetou inokulováno 0,2 ml půdního roztoku ředění 10^4 , pro každý vzorek vždy ve čtyřech opakováních. Roztok byl sterilní skleněnou hokejkou rozetřen rovnoměrně po celém povrchu misky. Petriho misky byly inkubovány na tmavém místě při teplotě 20°C po dobu osmi dnů. r – stratégové (“fast growers”) byly definovány jako bakterie, které tvoří viditelné kolonie během 72 hodinové kultivace, K – stratégové (“slow growers”) během 96-192 hodin (De Leij et al., 1993).

2.4.7. Stanovení počtu buněk bakterií na kultivačním médiu

Po dobu osmi dnů inkubace jsme zaznamenávaly nově narostlé bakteriální kolonie na Petriho misce s kultivačním médiem R2A Agar. Počty bakterií byly přepočítány na gram organické hmoty. Byly stanoveny průměry z více opakování a vypočítány směrodatné odchylky. Dále byl vypočten index C/T, poměr počtu kultivovatelných bakterií (CFU) a celkového počtu bakterií (barvení DAPI).

2.4.8. Stanovení organické hmoty v půdních vzorcích

Organická hmota (OM) v půdních vzorcích se stanovovala jako hmotnostní procento, kdy se nejdříve zvážila půda, poté se vysušila při 80 °C a znovu se zvážila. Po odečtení hmotnosti půdy od hmotnosti vysušené jsme získali procento vody v půdě. Dále se vysušený vzorek žíhal při 450°C po dobu 5 hodin a zvážil se. Odečtením hmotnosti vzorku vyžíhaného od hmotnosti vysušeného vzorku při 80°C bylo získáno množství organické hmoty ve vzorku (K. Řeháková, ústní sdělení). Celkové počty bakterií a počty kultivovatelných bakterií byly přepočteny na gram OM.

2.5. Statistické zpracování dat

Ve statistických analýzách jsme lokality Nubra a Tsomoriri posuzovali odděleně z důvodu odlišného složení podloží (žula v Nubře versus rula v Tsomoriri). Obě lokality reprezentují odlišný gradient, který postupuje ze studeného stepního pásu do subniválního pásma. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1., rozlišujeme mezi lokalitami s polštáři *T. caespitosum* (zahrnující půdu pod nimi nebo jejich povrch s dalšími rostlinnými druhy) a neovlivněnými lokalitami mimo polštáře (BPK).

Dvoufaktorový test variance ANOVA a Tukey post hoc test v programu STATISTIKA 6.0 byl použit ke statistickému zhodnocení vlivu přítomnosti polštáře *Thylacospermum caespitosum* a měnící se nadmořské výšce odběrového místa vzorku na celkové počty bakterií (T), počet kultivovatelných bakterií (CFU), index C/T a počet r-strategů. Nezávislé proměnné byly vždy dosazeny nadmořská výška a přítomnost polštáře. Test variance byl prováděn u vzorků ze stejné lokality (Nubra Valley nebo Tsomoriri). Použito bylo všech 6 vzorků z každého odběrového místa.

3. Výsledky

3.1. Zhodnocení půdních vzorků z lokality Nubra Valley

Celkové počty bakterií v půdě pod polštářem se pohybují v rozmezí $6,9 - 41,67 \cdot 10^8$ v gramu OM (Tab. 1, Graf 1). V půdě BPK v rozmezí $27,13 - 35,31 \cdot 10^8$ v gramu OM. Celkové počty bakterií byly vyšší v BPK, ale statistická analýza neprokázala vliv nadmořské výšky a přítomnosti *T. caespitosum* na celkové počty bakterií, mimo jednoho vzorku odebraného pod polštářem, ve výšce 5020 m n. m., který byl výrazně odlišný od

ostatních vzorků ($p > 0,01$) (Tab.1).

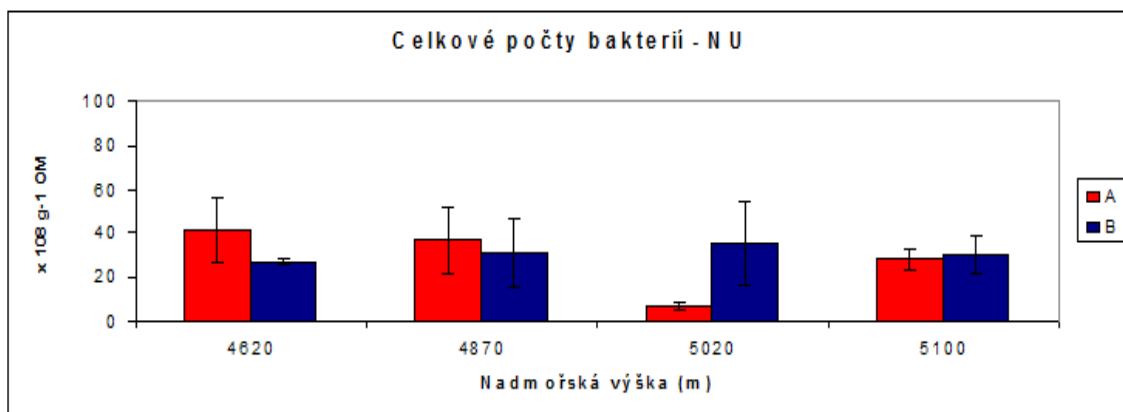
Počty kultivovatelných bakterií (CFU) se pohybovaly v rozmezí $2,25 - 4,79 \cdot 10^6$ v gramu OM v půdě pod polštářem (Tab. 1, Graf. 2). V půdě BPK v rozmezí $4,79 - 12,75 \cdot 10^6$ v gramu OM. Počty CFU byly ovlivněny jak nadmořskou výškou, tak i přítomností *T. caespitosum* (Tab. 1). V nadmořských výškách 4620 m n. m. a 4870 m n. m. byly hodnoty průkazně vyšší v BPK ve srovnání s hodnotami CFU pod polštářem. Ve větších nadmořských výškách byly hodnoty CFU v BPK také zvýšené, ale rozdíly byly statisticky neprůkazné (Tab. 1, Graf 2). Pod polštářem byl vliv nadmořské výšky na hodnoty CFU neprůkazný ($p < 0,01$).

Index C/T byl v BPK nejvyšší v nadmořské výšce 4620 m n. m., zatímco pod polštářem *T. caespitosum* byla nejvyšší hodnota zaznamenána v 5020 m n. m. ($p < 0,01$) (Tab. 1, Graf 3).

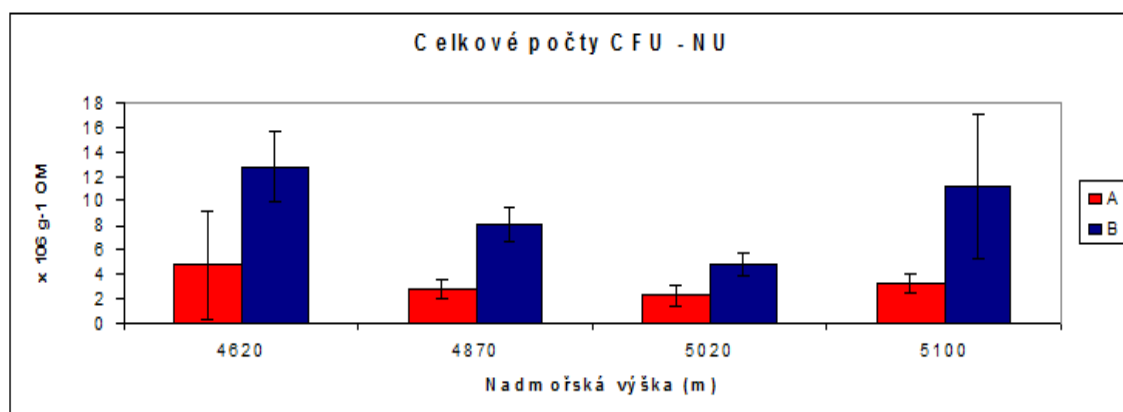
r-stratégové tvořili 50 – 72 % společenstva bakterií půdy pod polštářem, zatímco v BPK 32 – 57 %. Výskyt r-stratégů v půdních vzorcích byl statisticky ovlivněn polštářem *T. caespitosum* i nadmořskou výškou ($p < 0,01$) (Tab. 1). Nejvyšší procentické zastoupení r-stratégů v půdě bylo zaznamenáno u vzorku pod polštářem v nejvyšší nadmořské výšce 5100 m n. m (Tab. 1, Graf 4).

Tabulka 1. Údaje o počtech bakterií sledovaných různými technikami a z nich stanovené charakteristiky životní strategie heterotrofních bakterií v oblasti Nubra Valley. Půdní vzorky jsou rozlišeny dle přítomnosti polštáře rostliny *T. caespitosum* na vzorky “A” odebrané pod polštářem a vzorky “B” odebrané v biologické půdní krustě (BPK, mimo polštář). U půdních vzorků je uvedena nadmořská výška odběrového místa, celkové počty bakterií (počet $\pm$ S.D.) stanovené epifluorescenční mikroskopií a metodou CFU (údaje byly přepočteny na gram OM). Dále byl vypočten index C/T (poměr kultivovatelných bakterií CFU k celkovým počtům bakterií a procentické zastoupení r-strategů ve vzorcích půdy. Rozdílná písmena ukazují na statisticky významné rozdíly mezi vzorky (dvoufaktorová ANOVA a Tukey post hoc test).

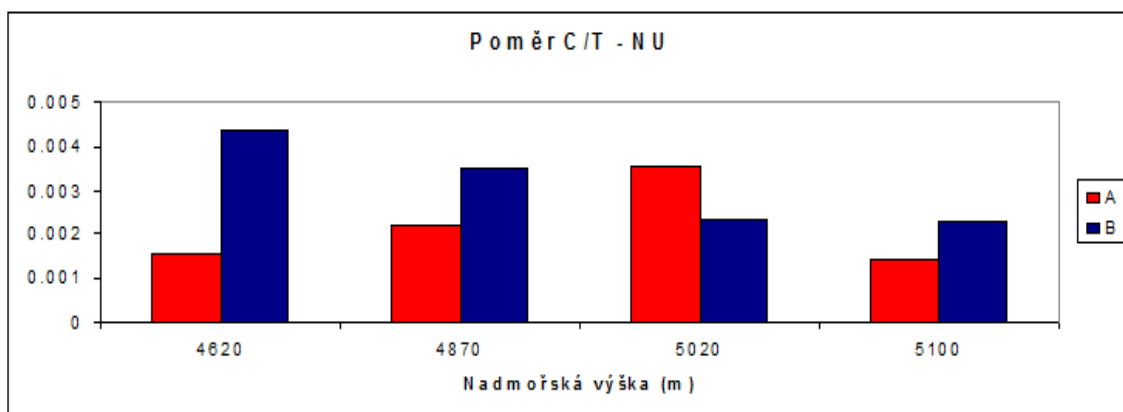
Vzorek	Nadmořská výška (m)	Celkové počty bakterií ($\times 10^8$ /g OM)	CFU ($\times 10^6$ /g OM)	Index C/T	r-strategové (%)
A	4620	41,67 $\pm$ 14,92	4,79 $\pm$ 4,44	0,0015 a	50,60 $\pm$ 4,56 a
A	4870	36,83 $\pm$ 15,02	2,75 $\pm$ 0,81	0,0022 b	67,00 $\pm$ 3,33 b
A	5020	6,90 $\pm$ 1,65 a	2,25 $\pm$ 0,91	0,0036 c	63,40 $\pm$ 3,92 c
A	5100	28,19 $\pm$ 4,69	3,27 $\pm$ 0,71	0,0014 d	72,83 $\pm$ 5,56 d
B	4620	27,13 $\pm$ 1,90	12,75 $\pm$ 2,89 a	0,0044 e	41,67 $\pm$ 2,78 e
B	4870	30,98 $\pm$ 15,38	8,11 $\pm$ 1,50 b	0,0035 f	45,20 $\pm$ 4,16 f
B	5020	35,31 $\pm$ 18,78	4,79 $\pm$ 0,96	0,0023 g	57,33 $\pm$ 5,00 g
B	5100	29,90 $\pm$ 8,69	5,76 $\pm$ 2,60	0,0023 h	32,17 $\pm$ 10,50 h



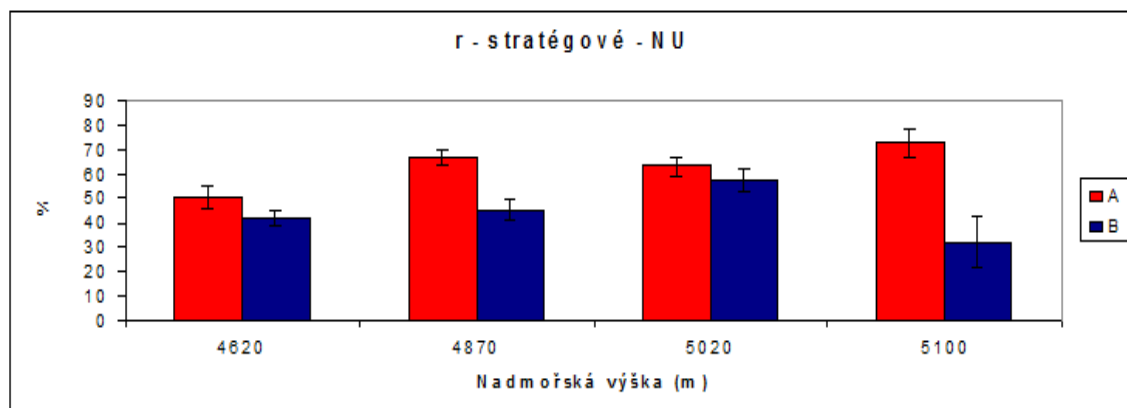
Graf 1. Celkové počty bakterií stanovené epifluorescenční mikroskopií (barvení DAPI) u půdních vzorků z Nubra Valley. A – pod polštářem *T. caespitosum*, B – biologická půdní krusta.



Graf 2. Celkové počty kultivovatelných bakterií stanovené inkubací na kultivačním médiu R2A Agar u půdních vzorků z Nubra Valley. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.



Graf 3. Poměr celkového počtu kultivovatelných bakterií (CFU) a počtu bakterií při barvení DAPI v půdních vzorcích z Nubra Valley. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.



Graf 4. Procentické zastoupení r-strategů v půdních vzorcích z Nubra Valley. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.

3.2. Zhodnocení půdních vzorků z lokality u jezera Tsomoriri

Celkové počty bakterií v půdě pod polštářem se pohybují v rozmezí $47,1 - 66 \cdot 10^8$ v gramu OM (Tab. 1, Graf 1). V půdě BPK v rozmezí $49,49 - 65,38 \cdot 10^8$ v gramu OM. Statistická analýza neprokázala vliv nadmořské výšky a přítomnosti *T. caespitosum* na celkové počty bakterií ($p > 0,01$) (Tab. 2, Graf 5).

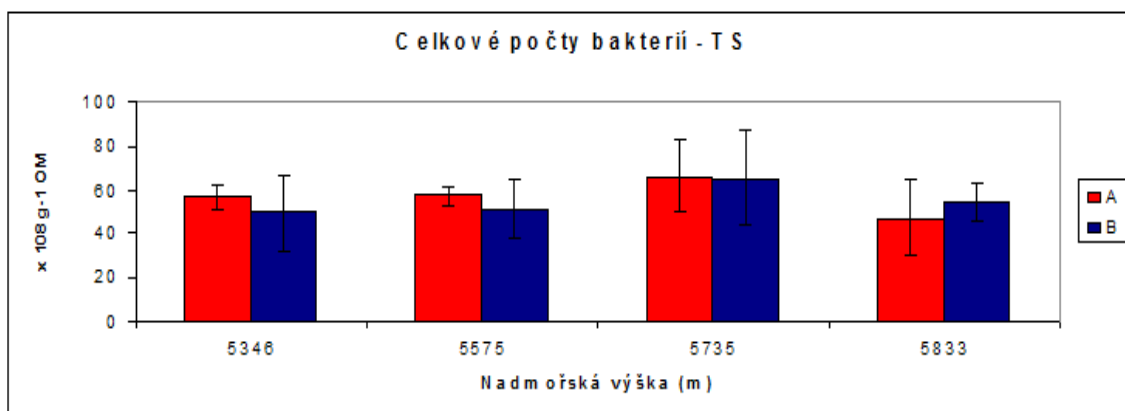
Počty kultivovatelných bakterií se pohybovaly v rozmezí $1,52 - 7,12 \cdot 10^6$ v gramu OM v půdě pod polštářem (Tab. 2, Graf. 6). V BPK v rozmezí $3,84 - 11,64 \cdot 10^6$ v gramu OM. Počty CFU byly prokazatelně ovlivněny nadmořskou výškou i přítomností rostliny *T. caespitosum*. Ve vzorcích odebraných z BPK byly hodnoty CFU vždy vyšší ve srovnání s půdními vzorky odebranými pod polštářem, v některých případech byly hodnoty vyšší průkazně. Od všech vzorků se nejvíce lišila hodnota vzorku odebraného vedle polštáře *T. caespitosum* v nadmořské výšce 5346 m. Tato hodnota byla největší a od hodnoty CFU pod polštářem se lišila téměř o 64 % ($p < 0,01$) (Graf 6).

Poměr C/T byl průkazně ovlivněn nadmořskou výškou a přítomností rostliny *T. caespitosum* (Tab. 2, Graf 7). Hodnoty indexu C/T se vzrůstající nadmořskou výškou klesaly od 5346 do 5735 m n. m. jak v BPK, tak pod polštářem *T. caespitosum* ($p < 0,01$).

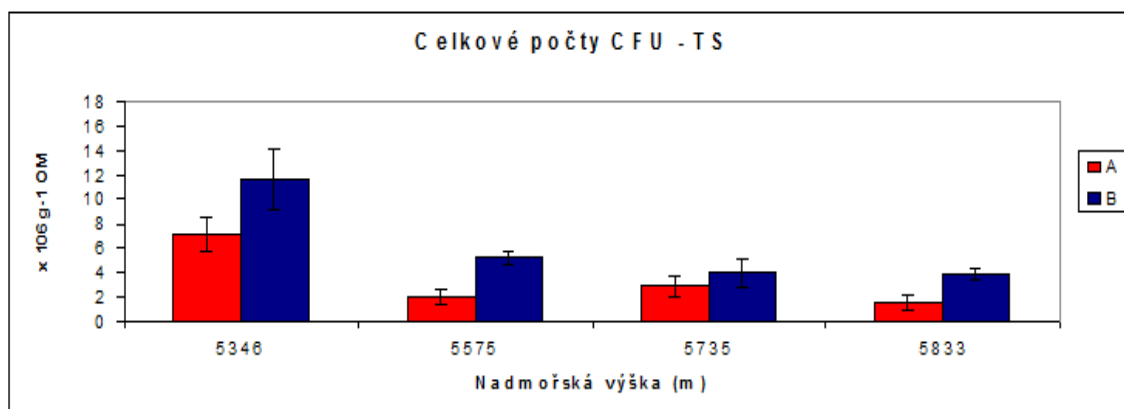
r-stratégové tvořili 57,7 – 72,7 % společenstva bakterií půdy pod polštářem, zatímco v BPK 46,8 – 64,2 %. Procentické zastoupení r-stratégů v půdních vzorcích nebylo statisticky ovlivněno nadmořskou výškou a přítomností polštáře *T. caespitosum*. Od všech hodnot se statisticky odlišoval jen vzorek odebraný v krustě v nejvyšší nadmořské výšce 5833 m n. m. ($p > 0,01$) (Tab. 2, Graf 8).

Tabulka 2. Údaje o počtech bakterií sledovaných různými technikami a z nich stanovené charakteristiky životní strategie heterotrofních bakterií v oblasti jezera Tsomoriri. Vysvětlení viz. Tabulka 1.

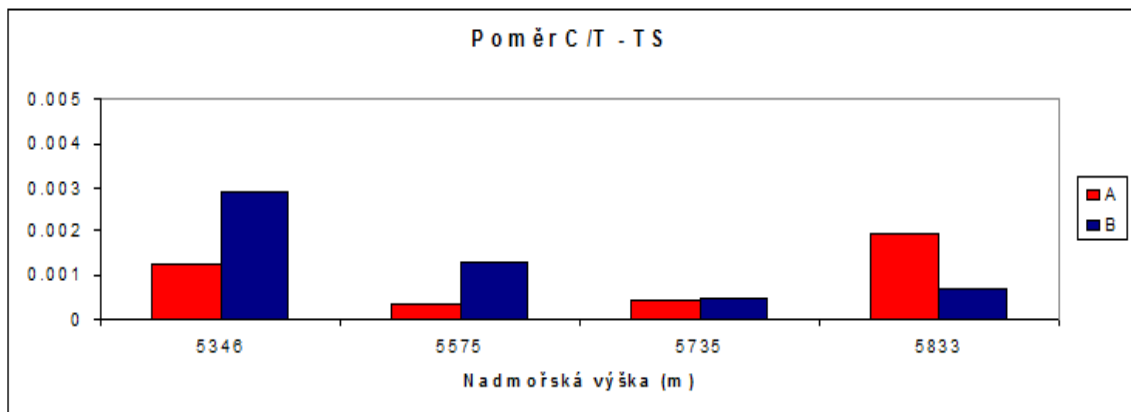
Vzorek	Nadmořská výška (m)	Celkové počty bakterií ($\times 10^8/\text{g OM}$)	CFU ($\times 10^6/\text{g OM}$)	Index C/T	r-strategové (%)
A	5346	$56,71 \pm 5,55$	$7,12 \pm 1,41$ a	0,0013 a	$72,67 \pm 7,33$
A	5575	$57,53 \pm 4,44$	$1,96 \pm 0,66$ b	0,00035 b	$68,40 \pm 2,24$
A	5735	$66,04 \pm 16,60$	$2,88 \pm 0,85$ c	0,00043 c	$58,00 \pm 6,33$
A	5833	$47,10 \pm 17,09$	$1,52 \pm 0,68$ d	0,0019 d	$57,67 \pm 9,33$
B	5346	$49,49 \pm 17,23$	$11,64 \pm 2,47$ e	0,0029 e	$64,20 \pm 5,76$
B	5575	$51,27 \pm 13,83$	$5,26 \pm 0,55$ f	0,0013 f	$54,50 \pm 9,75$
B	5735	$65,38 \pm 21,69$	$3,96 \pm 1,12$ g	0,00046 g	$62,33 \pm 6,33$
B	5833	$54,32 \pm 8,51$	$3,84 \pm 0,47$ h	0,00066 h	$46,83 \pm 9,44$ a



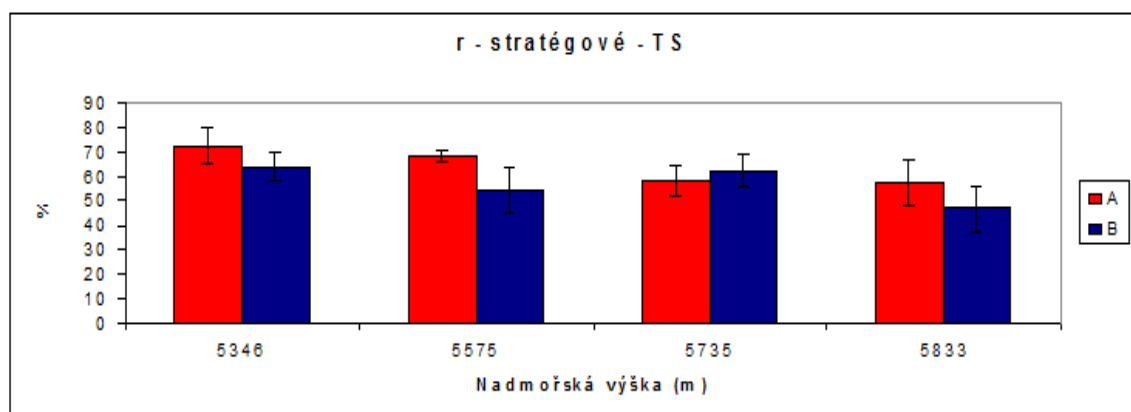
Graf 5. Celkové počty bakterií stanovené epifluorescenční mikroskopií (barvení DAPI) u půdních vzorků z oblasti jezera Tsomoriri. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.



Graf 6. Celkové počty kultivovatelných bakterií stanovené inkubací na kultivačním médiu R2A Agar u půdních vzorků z oblasti jezera Tsomoriri. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.



Graf 7. Poměr celkového počtu kultivovatelných bakterií (CFU) a počtu bakterií při barvení DAPI ve půdních vzorcích z oblasti jezera Tsomoriri. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.



Graf 8. Procentické zastoupení r-strategů v půdních vzorcích z oblasti jezera Tsomoriri. A – pod polštářem *T. caespitosum* a B – biologická půdní krusta.

4. Diskuse

Společenstvo mikroorganismů je schopné přeměnou organické hmoty zpřístupnit jinak nedostupné minerální prvky pro rostliny (Dvorský et al, v přípravě). Jak je uvedeno v kapitole 2.1., hypotéza projektu byla o tom, že polštáře rostlin zlepšují podmínky prostředí pro mikroorganismy a podporují jejich přežívání v subnivální zóně. Předložené výsledky jsou, dle našich znalostí, první které řeší problematiku interakcí polštářové rostliny a mikrobiálního společenstva.

Polštáře *T. caespitosum* neměly vliv na celkové počty bakterií, ale ovlivnily složení mikrobiálního společenstva (community-level shift), což se projevilo ve zvýšeném zastoupení kultivovatelných typů bakterií pod polštářem rostliny. DeLeij et al. (1993) navrhl použít poměru tvorby kolonií bakterií na kultivačních médiích jako možnost rozlišení r- (rychle rostoucích) a K- (pomalu rostoucích) organismů. Zastoupení bakteriálních r-strategů bylo vyšší v půdách pod polštářem, kde je vyšší obsah organické hmoty, nižší pH, vyšší obsah přístupného fosforu, vyšší obsah rostlinných exudátů, vyšší vlhkost a stabilnější teplota. Tedy podmínky vhodné pro tzv. zymogenní mikroflóru (r-strategie) (Langer et al., 2004).

Vyšší zastoupení K-strategů bylo zaznamenáno na lokalitách s četnější frekvencí nepříznivých podmínek, jako je sucho (nadmořská výška 4620, 4870 m n.m.), nebo pravidelné zamrzání/roztávání během vegetačního období (5735, 5833 m n.m.). Nepříznivé podmínky navozují větší soutěž o zdroje živin; podporují růst organismů s nižším obratem biomasy a vyšší efektivitou metabolismu (Dworkin et al., 2006). Na těchto lokalitách se vytváří stabilní společenstvo, které je schopné využívat nepřístupný materiál.

Zaznamenaly jsme prostorovou variabilitu v zastoupení kultivovatelných vs nekultivovatelných typů bakterií podél výškového gradientu a mezi lokalitami (Tab. 1, 2). Zastoupení kultivovatelných bakterií je mnohem nižší ve vyšších nadmořských výškách, obzvláště na lokalitě Tsomoriri. Zvýšené zastoupení nekultivovatelných bakterií může být spojeno s pozdějším sukcesním stádiem, kde tyto typy bakterií věnují méně energie do růstu a/nebo mají velmi specifické růstové požadavky, které nemohou být splněny na umělých kultivačních médiích (Garland et al., 2001).

V rámci diskusí řešitelského kolektivu projektu se odvíjejí spekulace, zda Tibetská náhorní plošina je již po staletí v klimaxovém stádiu bez větších disturbancí. Naproti tomu

lokalita Nubra je relativně mladé předpolí ledovce. Z literárních údajů je známé, že ranná sukcesní stadia mají vyšší zastoupení kultivovatelných bakterií (Křišťůfek et al., 2005).

5. Závěry

V této práci jsme se zabývaly otázkou, zda se mikrobiální společenstvo v nepříznivých podmínkách pohoří Ladak (Indie) liší v různých nadmořských výškách a zda je ovlivněno přítomností polštářovité rostliny *T. caespitosum*. Z našich dosud získaných výsledků vyplývá, že “inženýr ekosystému” *T. caespitosum* neovlivňuje počet bakterií v půdě, ale má vliv na složení mikrobiálního společenstva. Nadmořská výška v některých případech počty bakterií ovlivnila.

6. Seznam použité literatury

ARREDONDO-NÚÑEZ, A.; BADANO, E.I.; BUSTAMANTE, E.O. How beneficial are nurse plants? A meta-analysis of the effects of cushion plants on high-Andean plant communities. *Community Ecology*. 2009, 10, p.1-6.

BLOEM, J. *Molecular microbial ecology manual*. Vol. 1.: Kluwer Academic Publishers, 1995. Fluorescent staining of microbes for total direct counts, p. 861-873.

DE LEIJ, F.A.A.M.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J.M. The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on the roots. *Microbial Ecology*. 1993, 27, p. 81-97.

DVORSKÝ, M. *Ladakh* [online]. 2009 [cit. 2011-04-10]. Výzkum v indickém Ladakhu. Dostupné z WWW: <<http://www.butbn.cas.cz/ladakh/index.html>>

DVORSKÝ, M.; DOLEŽAL, J.; DE BELLO, F.; KLIMEŠOVÁ, J.; KLIMEŠ, L. Vegetation types of East Ladakh: species and growth form composition along main environmental gradients. *Applied Vegetation Science*. 2011, 14, p. 32-147.

DVORSKÝ, M.; ŘEHÁKOVÁ, K.; CHLUMSKÁ, Z.; JANATKOVÁ, K.; KRIŠTŮFEK, V.; KOPECKÝ, M.; DOLEŽAL, J. No facilitative effect of cushion plants: a surprise from the roof of the world?. *Journal of Ecology*. In preparation.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd edition.: Springer, 2006. 1074 p.

GARLAND, J.L.; COOK, K.L.; ADAMS, J.L.; KERKHOF, L. Culturability as an indicator of succession in microbial communities. *Microbial Ecology*. 2001, 42, p. 150-158.

HARTMANN, H. *Jahrbuch des Vereins zum Schutz der Bergwelt* 48: 1983. Pflanzengesellschaften entlang der Kashmir Route in Ladakh, p. 131-173.

JOHANSEN, J.R. Cryptogamic crusts of semiarid and arid lands of North America. *Journal of Phycology*. 1993, 29, p. 140-147.

KLIMEŠOVÁ, J.; DOLEŽAL, J.; DVORSKÝ, M.; DE BELLO, F.; KLIMEŠ, L. Clonal growth forms in Eastern Ladakh, Western Himalayas: classification and habitat preferences. *Folia Geobotanica*. 2010, 45, p. 1-27.

KÖRNER, CH. *Alpine plant life*. 2nd edition.: Springer, 2003. 344 p.

KRIŠTŮFEK, V.; ELHOTTOVÁ, D.; CHROŇÁKOVÁ, A.; DOSTÁLKOVÁ, I.; PICEK, T.; KALČÍK, J. Growth strategy of heterotrophic bacterial population along successional sequence on spoil of brown coal colliery substrate. *Folia Microbiologica*. 2005, 50, p. 427-435.

LANGER, U.; BÖHME, L.; BÖHME, F. Classification of soil microorganisms based on growth properties: a critical view of some commonly used terms. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 2004, 167, p. 267-269.

MIEHE, G. *Langtang Himal. Flora und Vegetation als Klimazeiger und -zeugen im Himalaya. A prodromus of the Vegetation Ecology of the Himalayas.*: J. Cramer, 1990. 494 p.

ŘEHÁKOVÁ, K.; CHLUMSKÁ, Z.; DOLEŽAL, J. Distribution of phototrophs in relations to altitude and soil chemical composition in the high mountains of Ladakh, NW Himalaya. *Microbial ecology*. In preparation.

SEKERKA, P. *BOTANY.cz* [online]. 2008-03-17 [cit. 2011-02-03]. THYLACOSPERMUM CAESPITOSUM. Dostupné z WWW: <<http://botany.cz/cs/thylacospermum-caespitosum/>>

Soilcrust.org [online]. 2006 [cit. 2011-02-03]. Biological soil crust. Dostupné z WWW: <<http://www.soilcrust.org/crust101.htm>>

WANG, J. The steppes and deserts of the Xizang Plateau (Tibet). *Plant Ecology*. 1988, 75, p. 135-142.