

Izolace vybraných
skupin půdních
mikroorganismů

Půda a mikroorganismy



- mikroorganismy - dominující složkou živých organismů v půdě
- v **1 g půdy** - **$10^8 - 10^9$ bakterií**, $10^5 - 10^6$ hub, $10^4 - 10^5$ prvoků a $10^3 - 10^4$ eukaryotických řas
- **běžná půdní mikroflóra:** bakterie *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, vláknité houby *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*
- **patogeny a oportunní patogeny:** *Actinomyces*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*...
- **patogenní bakterie:**
 - **primární patogen** – patogenní pro rostliny/živočichy/člověka
 - v půdě přežívají déle, např. *Clostridium* (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. septicum*)
 - **sekundární patogen** – do půdy sekundárně z různých rezervoárů, přežívají v závislosti na jejich odolnosti (*Bacillus anthracis*)

Půda a mikroorganismy

- v přírodě se vytvářejí **mikrobiální společenstva**; standardně - v prostředí značný počet druhů v průměrném množství
- většina mikroorganismů v hloubce do 10 cm - dostupnost živin
 - navázána na **pevné částice** a velká část kumulována okolo **kořenové soustavy rostlin**
- v půdách určitého druhu převažuje určitá skupina bakterií – termofilové v kompostu, vláknité houby v kyselé půdě, anaeroby v zamokřené půdě
- můžeme je prokázat:
 - **kultivačně** podle jejich charakteristických metabolických aktivit: fixace dusíku, oxidace síry, redukce síranů, rozklad močoviny, rozklad celulózy...
 - **in situ detekcí** (fluorescence, sondy...)

Bakterie podle počtu zástupců a živin

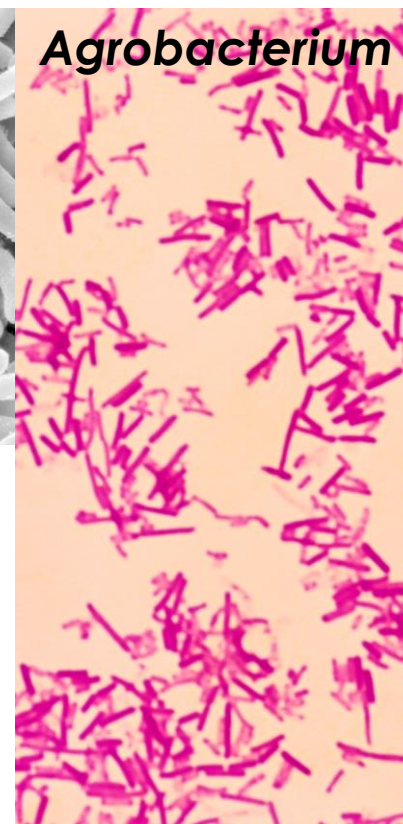
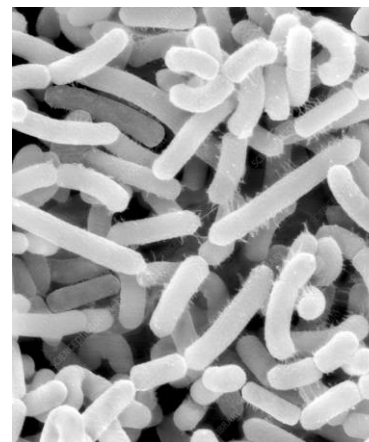
- podle dostupnosti živin se rozdělují bakterie na dvě skupiny (Winogradsky, 1856 -1953):

- Autochtonní bakterie**

- v půdě celoročně, ve vysokém, konstantním počtu a nezávisle na množství živin
- nízká metabolická aktivita
- Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*

- Zymogenní (alochtonní) bakterie**

- v půdě jen sezónně, v nižším počtu, závislé na zvýšené koncentraci živin
- mohutná metabolická aktivita
- zajišťují koloběh prvků
- nitrifikační, celulolytické a síru oxidující bakterie, myxobakterie, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*



MO v půdě

- zastoupení MO v půdě závisí zejména na:
 - na typu půdy
 - pH půdy
 - ročním období
 - dostupnosti živin, vody, kyslíku, minerálů
 - hloubce
 - struktuře
 - sorpčním komplexu, atd....

Funkce MO v půdě

○ Rozklad a mineralizace organických látek

- účast mikroorganismů až z 90 %
- rozklad zbytků odumřelých rostlin v půdě – zejména saprofitické mikroskopické houby
- rozklad zbytků odumřelých živočichů a malých organismů - především bakterie
- houby – efektivnější rozklad organických látek než u bakterií

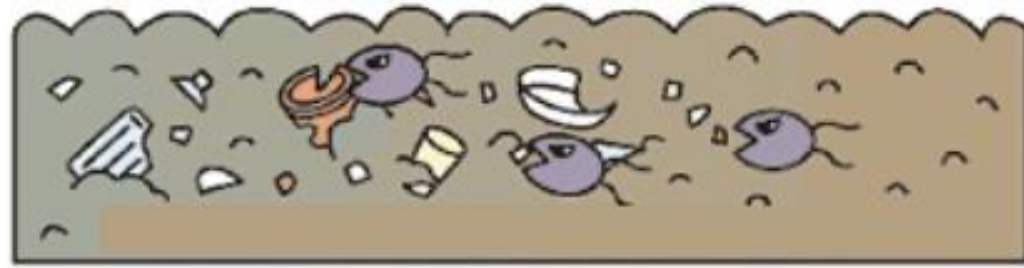
○ Produkce látek primárního a sekundárního metabolismu

- např. extracelulární enzymy, antibiotika, ale též toxiny a produkty vlastního metabolismu

○ Tvorba a odbourávání humusu

- mikroorganismy – podíl na vzniku a rozkladu humusových látek

Funkce MO v půdě



Biodegradable plastic products eaten by bacteria

- **Fixace vzdušného N₂** – schopnost některých bakterií poutat vzdušný dusík (schopnost zabudovávat ho do organických látek - obohacení půdy o tento biogenní prvek)
 - symbiotické (*Rhizobium*) i volně žijící (asociativně symbiotické *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Clostridium*) bakterie
- **Oxidace nedostupných sulfidů na sulfáty** (*Thiobacillus*)
- **Bioremediace**, rozklad těžko odbouratelných látek (např. pesticidy, celulóza, chitin)
- **Asimilace minerálních látek**
 - většina mikroorganismů dokáže pokrýt svoje nutriční potřeby z anorganických, tj. minerálních zdrojů; např. N, S, a P

Funkce MO v půdě

- **Vzájemné vztahy mezi mikroorganismy**
 - mnohé mikroorganismy (MO) - patogenní ve vztahu k rostlinám nebo živočichům
 - některé MO - symbióza nebo jiný vztah
- **Potrava pro jiné organismy**
 - MO – často důležitý článek v potravním řetězci pro jiné, často větší organismy
- **Úprava životního prostředí**
 - organismy - otevřené systémy (výměna látek a energie se svým okolím - ovlivňují tak navzájem nejen sebe, ale i prostředí)
 - např. okysličování půdy vlivem produkce kyselin nebo oteplování v důsledku silného metabolismu

Izolace půdních MO

- izolace a průkaz 3 skupin mikroorganismů:
 - **CLOSTRIDIUM**
 - **AZOTOBACTER**
 - **CELULOLYTICKÉ BAKTERIE**
- v půdě je komplex mikroorganismů – za **selektivních podmínek** kultivace získáme cílovou skupinu
- využití selektivních médií – pro bakterie fixující dusík bezdusíkaté médium
- využití charakteristických znaků – štěpení celulózy

Clostridium

- *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*
- *Clostridioides difficile*
- **G+** tyčinky, většina z nich je **obligátně anaerobní**
- bičíky po celé buňce - **peritricha**
- výskyt běžně v prostředí (půda, kal, mořské sedimenty, rostlinné zbytky), gastrointestinální trakt, klinický materiál
- **tvoří oválné nebo kulaté endospóry**, primární i oportunní patogeny
- 10 – 65 °C, některé druhy fixují plynný dusík a tvoří **toxiny** (tetanospazmin, tetanolysin, botulotoxin...)
- sacharolytické, proteolytické, a jiné...
- ve cvičení – ostatní vegetativní buňky usmrtíme pasterizací, spory pak vyklíčí v anaerobním prostředí v bujónu pod parafínem



Azotobacter

- *A. chroococcum*, *A. vinelandii*
- G- aerobní ovoidní tyčinky až koky
- bičíky **peritricha**
- tvoří **pigment, slizovitý obal a cysty**
- výskyt v půdě a vodě
- pro růst vyžadují růstové prvky (molybden a vanad)
- **nesymbiotická fixace dusíku**
 - enzym nitrogenáza
- pro izolaci **Ashbyho agar** – bez dusíku, hodně živin
- 25 – 30 °C

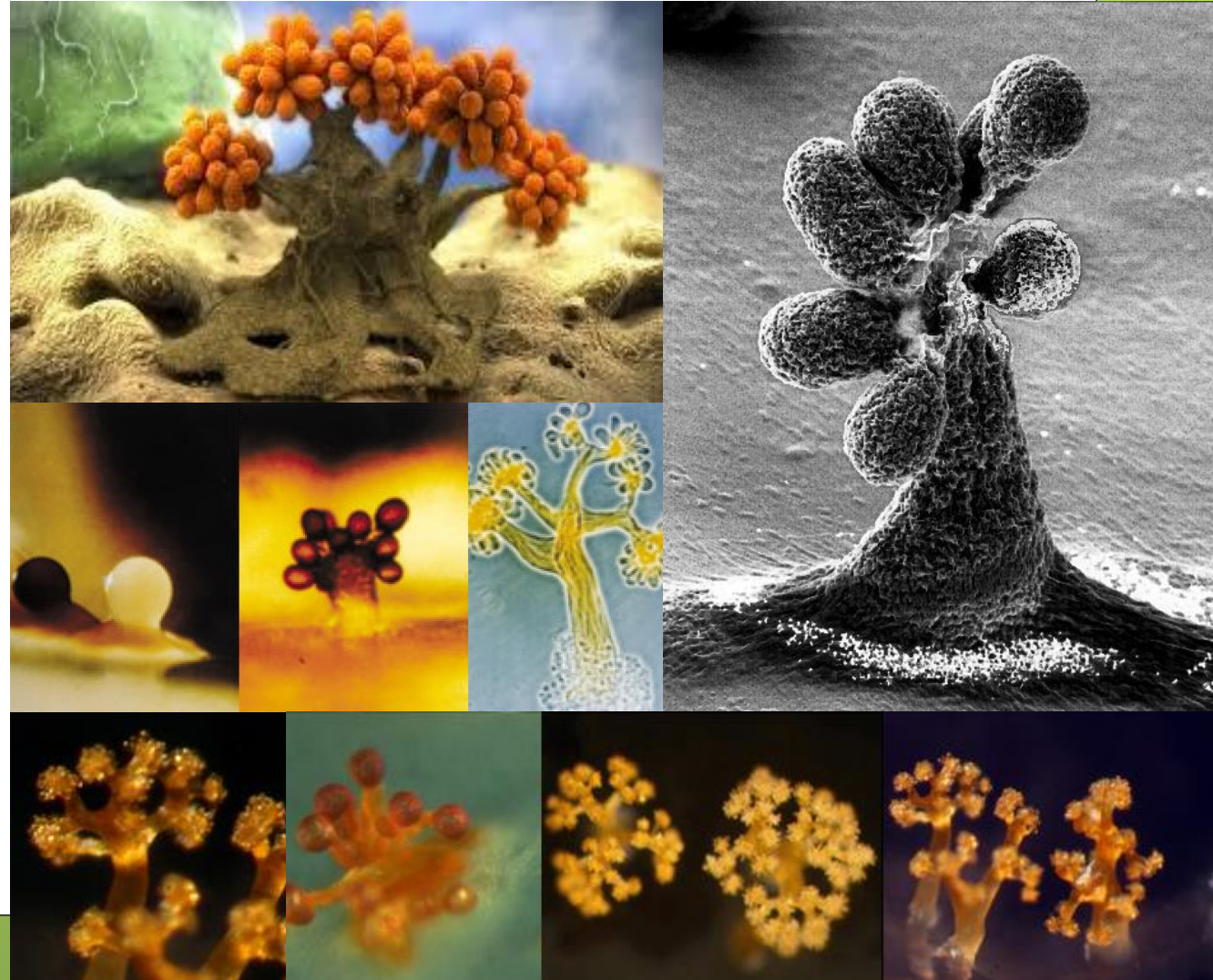


Celulolytické bakterie

- rozkládají **celulózu**
 - celulóza se v podobě různých rostlinných zbytků, splachů a odpadových materiálů z průmyslu dostává do prostředí
- přítomnost celulolytických bakterií - jedním z **ukazatelů úrodnosti půdy**
- **Cytophaga, Sporocytophaga, Cellvibrio** (intenzivně obdělávané půdy), **myxobakterie** (středně obdělávané půdy) **mikroskopické houby** (slabě obdělávané a kyselé půdy)
- celulóza - v přírodě nejrozšířenější, ve vodě nerozpustný, polysacharid; spolu s hemicelulózami, pektiny, ligninem a tuky podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk
- může být štěpena:
 - **aerobně** – získá energii, mineralizace organických látek
 - **anaerobně (kvašení)** – kyselina máselná, octová, etanol, CO₂, H₂O...
- celulózu štěpí exoenzym celulóza na celobiózu a tu endoenzym celobiáza na dvě podjednotky glukózy

Celulolytické bakterie - Myxobakterie

- řád *Myxococcales*
- tyto bakterie mezi sebou intenzivně komunikují (chemické signály) a shlukují se do velkých skupin – napomáhání při získávání živin
- při nedostatku potravy vytvářejí **plodnice** či klidová stádia (**myxospóry**)
- plodnice: slizovitá stopka, sporangioly, myxospory
- prostředí s rozkládajícím se organickým materiálem, kůra stromů, tlející dřevo, kompost,...

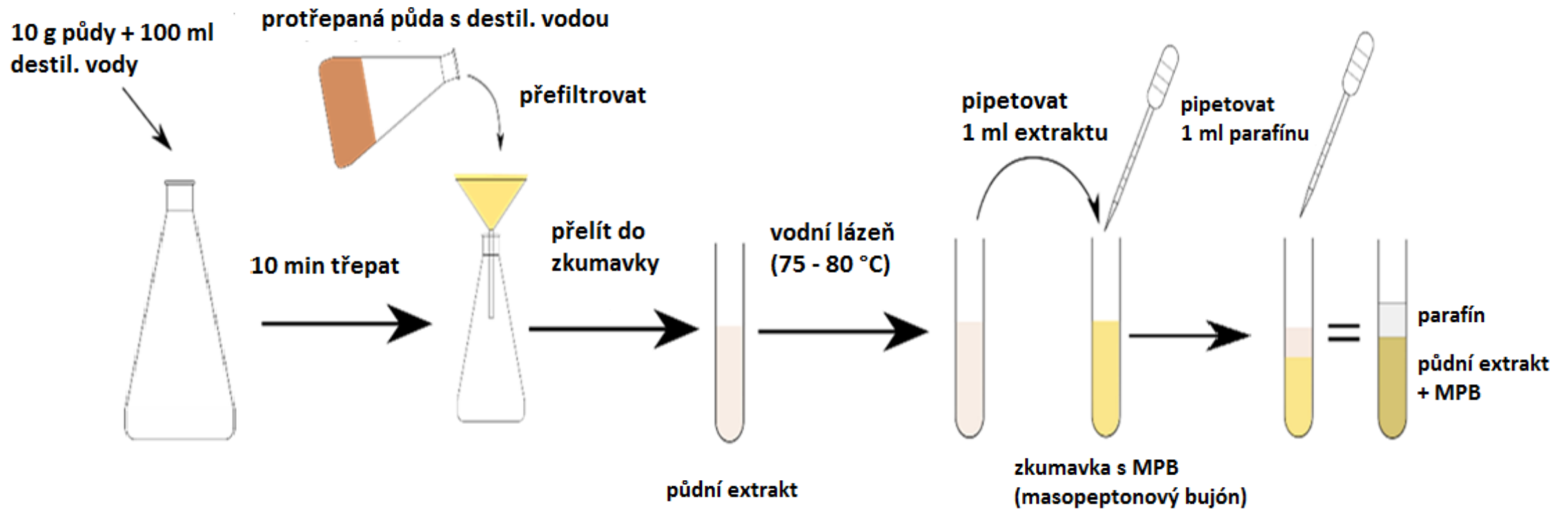


Postup - *Clostridium*

- anaerobní kultivace v bujónu převrstveném parafinem (parafin zajistí anaerobní prostředí)
 - 10 g půdy + 100 ml destilované vody, dá se třepat na 10 minut
 - filtrace přes filtrační papír do baňky
 - přelít do zkumavky a tu vložit na 15 minut do vodní lázně (75 – 80 °C, přežijí jen spory)
 - 1 ml odpipetovat do masopeptonového bujónu ve zkumavce (MPB)
 - na to napipetovat 1 ml parafinu



Postup - *Clostridium*



Postup - *Azotobacter*

- izolace na selektivním bezdusíkatém **Ashbyho agaru** – ten eliminuje druhy vyžadující dusík
 - popsat misku na dno, na médium nadrobit půdu
 - mírně pokropit stříčkou
 - kultivace probíhá při 25 – 30 °C 72 hodin



Postup - Celulolytické MO

- hodnocení případného rozkladu a změn zabarvení zdrojů celulózy
 - izolace na čisté Petriho misce
 - popsat víčko misky
 - do misky nadrobit půdu, trochu poutláčet
 - navlhčit stříčkou, na to přiložit materiál z celulózy
 - filtrační papír, buničina, novinový papír
 - kultivujeme při pokojové teplotě



Hodnocení

- ***Clostridium***: v přítomnosti klostridií vzniká sedlina, plyn a charakteristický zápach máselného kvašení, je možné zkontrolovat pod mikroskopem
- ***Azotobacter***: slizovité kolonie kolem zrníček zeminy, v prvních dnech bělavé, stářím hnědnou
 - je poznatelný charakteristický zápach
 - v preparátu lze pozorovat G- kokotyčky, často ve dvojicích, buňky jsou ohraničeny pouzdem
 - fázovým kontrastem jdou vidět cysty
- **Celulolytické bakterie**: ne/pozorujeme rozklad a změnu zbarvení
 - nejintenzivnější rozklad by měl být u buničiny, méně u filtračního papíru a nejméně se rozkládá novinový papír

Podklady pro vyhotovení protokolu

Příslušný protokol je vložen v IS. Do něj si vyplníte úvodní část pomocí prezentace a také pomocí skript, která již v IS máte.

Pro vyhodnocení půdního rozboru si, prosím, nastudujte na následujících snímcích:

- **Clostridium** – pro vyhodnocení popište změny mezi fotkou založení pokusu a po kultivaci, pokud by se vám změny nezdály patrné, dohledejte si další podklady pomocí literárních zdrojů
- **Azotobacter** – do vyhodnocení popište vzhled vyrostlých kolonií (kolonie se nachází kolem zrníček půdního vzorku na PM)
- **Celulolytické bakterie:** do vyhodnocení popište změny (rozklad, změna zabarvení) jednotlivých materiálu z celulózy
 - filtrační papír, buničina, novinový papír
 - procentuálně odhadněte v jaké míře ke změnám došlo a zda vůbec jsou nějaké změny patrné
- **Zdroj půdy:** navezená zemina - stavba Brno-Bohunice
- **V závěru tento úkol souhrnně zhodnoťte podle pokynů v protokolu.**

Clostridium



založení
pokusu



po kultivaci



po kultivaci

Azotobacter

založení pokusu



po kultivaci



po kultivaci

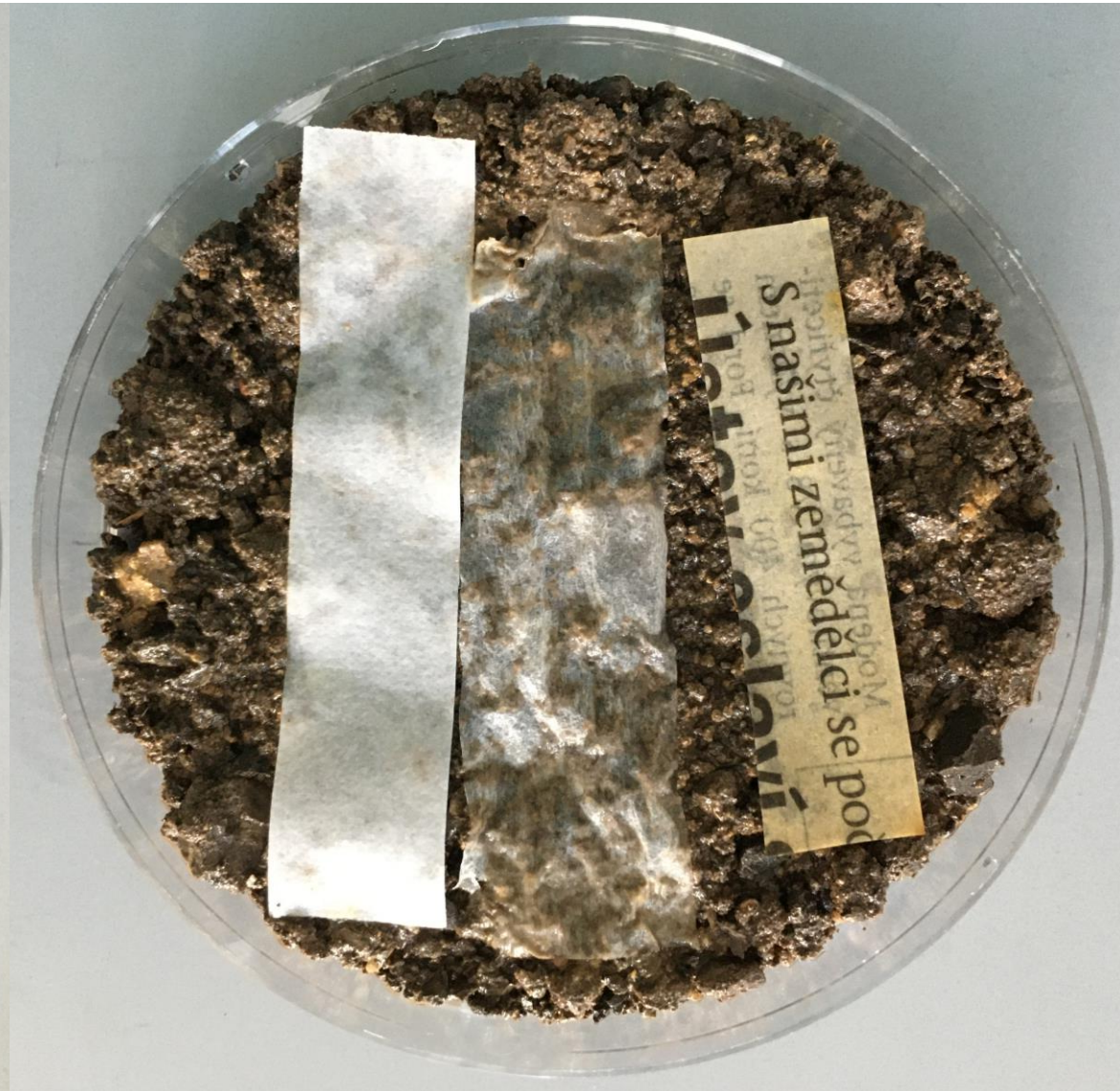


Celulolytické bakterie

založení pokusu



1 týden od založení pokusu



Celulolytické bakterie

2 týdny od založení pokusu



3 týdny od založení pokusu

