

Cvičení 6 Průkaz a izolace některých půdních mikroorganismů

Teorie:

Pro přesnou identifikaci je nutno mikroorganismy nejprve **izolovat** a dále kultivovat v **čistých kulturách**. Pro izolaci využijeme **selektivních medií**, které prokáží charakteristický znak – **fixaci dusíku** (medium je bezdusíkaté, izolují se tedy jen druhy schopné tuto molekulu fixovat). Další znak, štěpení celulózy, dokážeme charakteristickým růstem na buničité vatě a jiných materiálech obsahujících celulózu.

Dusíku jako biogenního prvku je v atmosféře omezené množství (NH_3 , NO_2^- , NO_3^-). Některé bakterie a sinice (*Azotobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Clostridium pasteurianum*, *Rhodospirillum*, *Anabena*, *Nostoc*) disponují enzymem nitrogenázou, pomocí kterého umí dusík fixovat z atmosféry. Je to energeticky náročný proces (15 ATP na 1 mlk N_2). Tento proces byl objeven Vinogradským již v roce 1895. Vyskytuje se u bakterií, které žijí v symbióze s rostlinami či volně v půdě (ve druhém případě schopné fixovat dusík i bez přítomnosti rostlin – platí pro oba rody, které budeme ve cvičení izolovat). Bakterie redukují plynný dusík na NH_3 a to za **striktně anaerobních** podmínek. Některé bakteriální druhy (pro naše cvičení *Azotobacter*) si anaerobní podmínky vytvoří spotřebováním kyslíku na povrchu buňky aerobní respirací. Pro *Clostridium* vytvoříme anaerobní podmínky zátkou ze sterilního parafínu.

Bakterie v půdě:

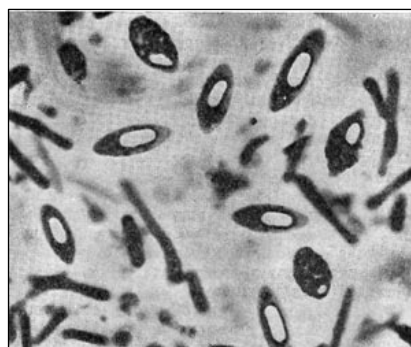
- **autochtonní bakterie** - přirozené půdní organismy, jsou po celé roční období zastoupeny v relativně konstantním počtu (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*...)
- **zymogenní bakterie** - vyskytují se ve větším počtu jen tehdy, je-li dostatečná zásoba živin. Vyznačují se mohutnou metabol. aktivitou a podílejí se na procesech mineralizaci půdy, zajišťují koloběh jednotlivých prvků v biosféře (*Bacillus*, *Mycobacterium*)
- **patogenní bakterie** - se mohou v půdě vyskytovat jako :
 - primární patogen - bakterie patogenní pro rostliny nebo živočichy včetně člověka
 - sekundární patogen - do půdy se dostávají sekundárně z různých rezervoárů a mohou v půdě přežívat značnou dobu

Bakterie v půdě se tedy účastní bohatých procesů humifikace a mineralizace, koloběhu prvků, produkují řadu látek ovlivňujících růst rostlin. Fixace dusíku je rovněž důležitým procesem symbiotických i volně žijících bakt. druhů. Mezi běžnou půdní mikroflórou náleží bakterie rodu *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* a také řada plísní (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*).

Některé znaky bakteriálních rodů, které budeme izolovat:

Clostridium:

- v půdě, stočném kalu, mořských sedimentech, rostlinných zbytcích, GITu živočichů a člověka (jícn, střeva), v klinickém materiálu
- pleomorfní tyčky, v rané fázi růstu G⁺, po 1, ve dvojicích či krátkých řetězcích
- peritricha (bičíky po celé buňce, nikoli jen na pólech b.)



- oválné či kulaté endospory – jejich přežití při pasteurizaci v našem cvičení zajistí izolaci klostridií!
- obligátně anaerobní (někt.druhy však ke kyslíku tolerantní)
- chemoorganotrofní, chemoautotr., chemolitotr
- růst 10 – 65 °C (široká tolerance)
- některé druhy fixují dusík
- velmi heterogenní skupina, ale identifikaci napomáhá diferenciací do tří skupin podle rozkladu bílkovin a sacharidů: a) sacharolytické, b) proteolytické, c) štěpí obojí

Clostridium pasteurianum patří do skupiny přísně anaerobních bakterií máselného kvašení. Je tolerantní ke kyselé i zásadité reakci půdy, dobře snáší vysoké nasycení půdy vodou a nižší teploty. Malé nároky na prostředí a schopnost tvořit spóry umožňují jeho rozšíření téměř ve všech typech půd. Zastoupení v půdní mikroflóře je udáváno v rozmezí 10^3 - 10^5 buněk/1g půdy.

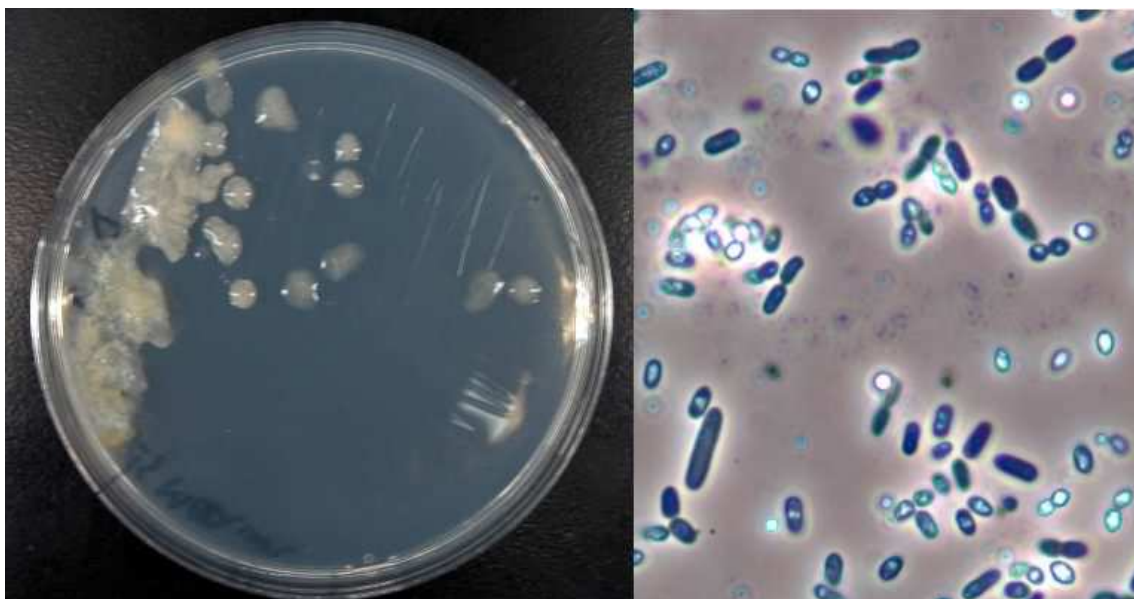
Azotobacter:

- vyskytují se v půdě či vodě
- G- ovoidní pleomorfní tyčky až koky
- po 1, 2 i nepravidelné shluky či řetízky
- peritricha
- tvoří cysty a pigmentují
- aerobní, chemoorganotrofní
- fixace dusíku nesymbiotická, vyžadují v mediu molybden či vanad (kofaktor)



Azotobacter chroococcum – aerobní, netvoří spory. Jde o druh náročný na podmínky prostředí, jeho podíl na celkovém množství půdní mikroflory je relativně malý - uvádí se 10^2 - 10^4 buněk /1g půdy.

Vyskytuje se jen v dobře provzdušňovaných a hnojených půdách s neutrální až alkalickou reakcí. Nejčastěji jej lze nalézt v těsné blízkosti kořenového systému rostlin, kde je půda obohacena o organické látky - kořenové výměšky. Vyžaduje přítomnost cukrů, jednoduchých alkoholů nebo solí organických kyselin, jejichž oxidací získává azotobakter energii potřebnou k fixaci molekulárního dusíku. Poměrně velké jsou i jeho nároky na přítomnost fosforu a vápníku, z mikroelementů molybdenu, bóru, vanadu, železa a manganu. V kyselých půdách nefixuje dusík. Jeho teplotní optimum se pohybuje mezi 25 -30° C .



Azotobacter - kolonie s exopolysacharidem a pigmentací. Preparát 1000x – vidíme oválné svítící cysty a vegetativní buňky koky až tyčky

Pomůcky:

- ❖ Petriho misky s Ashbyho agarem
- ❖ Očkovací kličky
- ❖ MPB č.2 s 5% Glu
- ❖ Zkumavky
- ❖ Pipety
- ❖ Sterilní parafinový olej
- ❖ Filtrační papír
- ❖ Ústřížky časopisu, novin, buničina
- ❖ Kahan
- ❖ Vodní lázeň
- ❖ Zemina ze zdrojů....

Postup:

Úlohy sestávají ze tří pokusů: cílená izolace Azotobacteria na selektivním bezdusíkatém Ashbyho agaru, anaerobní kultivace a izolace klostridií a izolace celulotických rodů na materiálech s celulórou přímo na zemině na Petriho misce.

1)

Izolace azotobacteria

Izolaci provádíme na selektivním bezdusíkatém mediu, které eliminuje druhy vyžadující přítomnost dusíku. Médium nezaručuje eliminaci mikroskopických hub.

Organismy:

Vzorky zeminy z úrodné, dobře provzdušňované půdy

Média:

Petriho misky s Ashbyho agarem (M 5)

Pomůcky:

očkovací kličky

Postup:

- * Petriho misky s Ashbyho agarem zaočkujeme přímo zrníčky zeminy.
- * Kultivujeme 72 hodin při 30° C.
- * (Čistotu izolované kultury hodnotíme křížovým roztěrem)

Hodnocení:

Přítomnost azotobacteria se projeví průhlednými, později hnědnoucími slizovitými koloniemi kolem zrníček půdy.

Provedeme mikroskopickou kontrolu

Azotobacter chroococcum bychom měli zachytit z úrodných provzdušňovaných půd jako aerobní druh, po kultivaci je z misky poznatelný charakteristický zápach půdy.

2)

Izolace clostridií

Clostridium pasteurianum – také fixátor N ale anaerobní, tvoří spory (zduření buněk)

Anaerobní máselné kvašení – tvorba kys. máselné, plyny (amoniak) - zápach

Roste v sedimentu u dna zkumavky

Izolaci provádíme ze zeminy s kyselou půdní reakcí, v anaerobních podmínkách.

Přítomnost nesporulujících anaerobních bakterií vyloučíme pasteurizací.

Organismy:

vzorky lesní zeminy

Média:

MPB č.2 (M 1) s 5% glukózy (po 5 ml ve zkumavkách)

Pomůcky:

Vodní lázeň, zkumavky, zařízení pro filtraci, pipety, sterilní parafinový olej

Postup:

* Připravíme půdní extrakt:

zeminu smícháme s destilovanou vodou v poměru 1 : 10

třepeme alespoň 10 minut

zfiltrujeme dvakrát přes buničitou vatu (filtrát není zcela čistý)

* Pasteurizujeme 15 minut při 75° - 80° C na vodní lázni

* Do horkého, čerstvě přesterilizovaného média pipetujeme pasteurizovaný půdní extrakt (1 ml) a ihned převrstvíme 1 ml sterilního parafinového oleje

* Kultivujeme 72 hod. při 30° C

Hodnocení:

Během kultivace pozorujeme tvorbu plynu,

kultura má charakteristický zápach po kyselině máselné,

na dně zkumavky se tvoří světlá usazenina.

Provedeme mikroskopickou kontrolu.

Klostridia je možné izolovat z kyselé i zásadité půdy, méně náročné. Mícháme 10 g zeminy s 100 ml sterilní destilky. Dvojitá filtrace = časově oddělená či provedená přes dvojitý filtrační papír. Pasterizaci přežijí bakteriální spory, nikoli vegetativní buňky, následnou anaerobní kultivací cíleně zachytíme rod *Clostridium*, protože vyklíčí pouze jeho spory schopné růstu v prostředí bez přítomnosti kyslíku. Parafinová zátka zajistí anaerobní podmínky, vytvoří se pak sediment a produkovaný plyn nadzvedne zátku. Kontrola znamená např. tvorbu preparátu ze sedimentu, kterým prokážeme klostridia díky charakteristického tvaru buněk.

3)

Izolace celulolytických bakterií

Podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk je celulóza. V rostlinném materiálu je zpravidla doprovázena dalšími těžko odbouratelnými průvodními látkami - hemicelulózami, ligninem, pektinovými a tukovými látkami.

Na jejich rozkladu se podílí celá řada mikroorganismů schopných hydrolyticky štěpit celulózu na celobiózu a dále na glukózové jednotky. Největší podíl na těchto procesech mají

aerobní celulolytické bakterie. Jejich zastoupení v půdě je jedním z ukazatelů úrodnosti půdy. V intenzivně obdělávaných půdách se vyskytují zástupci rodů *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sporocytophaga*, atd. Ve slabě obdělávaných a zvláště kyselých půdách převládají mikroskopické houby.

Rozklad i anaerobní - hlavní celulózy

Mikroorganismy:

Vzorky zeminy z různých stanovišť

Pomůcky:

Plastová petriho miska

Postup:

- na petriho misku dáme zhruba 1 cm zeminy
 - na zeminu položíme 3 proužky substrátu: noviny, filtrační papír, buničina
- kultivujeme 3 týdny při laboratorní teplotě

Hodnocení:

Rozklad celulózy se projeví zbarvením filtračního papíru a jeho postupným rozkladem na napadených místech.

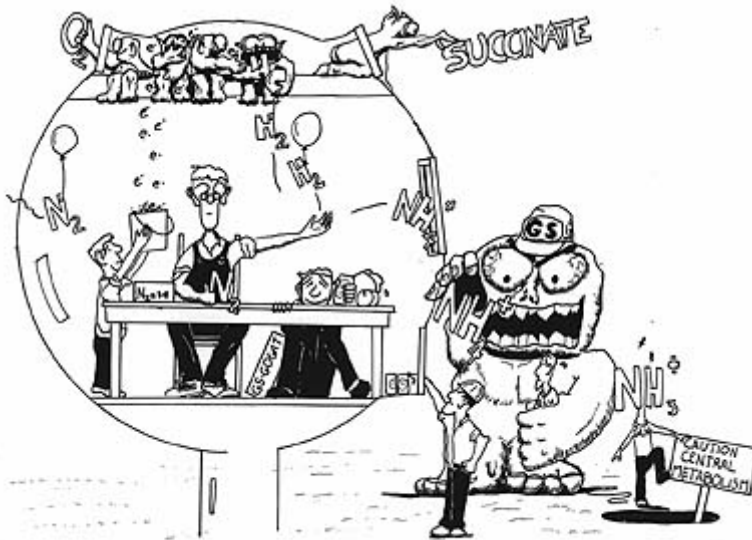
Popsanou izolační technikou většinou získáme zástupce rodů *Cellvibrio* a *Cellfalcicula*, v našich experimentech se projeví tvorbou žlutého a hnědého pigmentu, *Sporocytophaga* s okrovým pigmentem a *Cytophaga* s pigmentem oranžovým, červeným nebo zeleným.

Pozn: Čisté kultury izolujeme křížovým roztěrem na syntetickém mediu s celulózou.

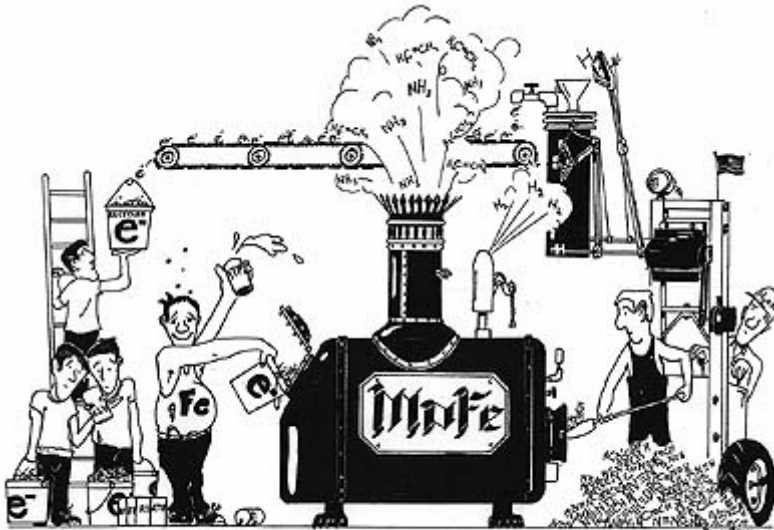
Celulolytické bakterie (rostoucí aerobně, ale rozklad celulózy je možný i anaerobně a to jejím kvašením!) ukazují svým zastoupením úrodnost půdy. Celulóza je ve vodě nerozpustný polysacharid. V rostlinném materiálu je celulóza obvykle doprovázena dalšími obtížně odbouratelnými látkami, např. hemicelulosami, pektiny, ligniny, tuky a pryskyřicemi. Celulóza je hydrolyticky štěpená celulázou na celobiózu, tento disacharid pak následně celobiázou na dvě glukózy. Největší rozklad pozorujeme u buničiny (cca 50%), méně pak (30%) u filtračního papíru a nejméně se rozkládá (vzhledem k inhibujícímu barvivu papíru) novinový či časopisový papír. Zeminu pod nimi je nutno navlhčit vodovodní vodou. Rozklad a zbarvení je možno pozorovat po týdnu.

V intenzivně obdělávaných půdách se vyskytují zástupci rodů *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sporocytophaga*, ve středně obdělávaných myxobakterie, ve slabě obdělávaných půdách a v kyselých půdách převládají mikroskopické houby.

Fixace u rodu Frankia:



Vesicles are the site of N_2 -fixation in *Frankia*. Nitrogenase reduces nitrogen using electrons and ATP from compounds donated by the plant (succinate is only one possibility). The product ammonia is most likely excreted from the vesicle where plant enzymes (GS) convert it to organic nitrogen (glutamine). (D. Benson) ([click for larger cartoon](#))



The Nitrogenase Machine

The operation of nitrogenase. The iron protein (Fe) takes electrons from central metabolism electron carriers and transfers them to the molybdenum iron protein (MoFe) expending a fair amount of ATP. N_2 is converted to ammonia and the electrons in H_2 are recycled by hydrogenase. (D. Benson) ([Click for larger cartoon](#))

