

Cvičení 6

Kultivační techniky izolace bakterií

Průkaz a izolace některých půdních mikroorganismů

Cíl práce:

Které tři skupiny mikroorganismů budeme cíleně kultivovat? Jaké selektivní medium v tomto cvičení využijeme a pro jaký bakteriální rod se používá? Proč při záchytu clostridií vyklíčí pouze jejich spory?

Teorie:

Při jakémkoli hodnocení kvalitativního zastoupení mikroorganismů v půdě či jejich množství si musíme uvědomit **zdroj zkoumaného vzorku půdy** (úrodnost – množství humusu, textura, množství kyslíku – provzdušňované orané půdy či zavodněné?, kyselost – kyselá půda je kupříkladu častá v jehličnatých lesích, profil – z jaké hloubky byl vzorek odebrán?). V jednom gramu půdy je přítomno několik bilionů mikroorganismů, které mohou být aerobní i anaerobní. Prokázat je můžeme podle některých jejich **charakteristických metabolických aktivit**: fixace dusíku, oxidace síry, redukce síranů, rozkladu močoviny, celulózy... Při barvení buněk ze vzorku půdy doplníme i jejich morfológickou charakteristiku a tím i předběžnou identifikaci.

Bakterie v půdě se 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 mikroflóru náleží bakterie rodu *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia* a také řada plísní (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*).

Winogradsky vymezil dvě základní skupiny bakterií podle kulminujícího počtu jejich zástupců v závislosti na zdrojích živin:

- **autochtonní bakterie** - přirozené půdní organismy, jsou po celé roční období zastoupeny v relativně vysokém a konstantním počtu nezávisle na množství živin. Je pro ně charakteristická nízká metabolická aktivita. Klasifikují se většinou jen podle morfologie buněk (barvený preparát). Patří zde aktinomycety, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*...
- **zymogenní bakterie** - vyskytují se ve větším počtu jen tehdy, je-li dostatečná zásoba živin a zdrojů organických látek, které rychle vyčerpávají. Ve zvýšeném počtu jsou tedy přítomny v závislosti na zvýšeném množství organických látek. Vyznačují se mohutnou metabolickou aktivitou a podílejí se na procesech mineralizace půdy, zajišťují koloběh jednotlivých prvků v biosféře. Patří zde nitrifikační bakterie, celulólytické, oxidující síru, myxobakterie, sporulující *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*...

Patogenní bakterie - se mohou v půdě vyskytovat jako:

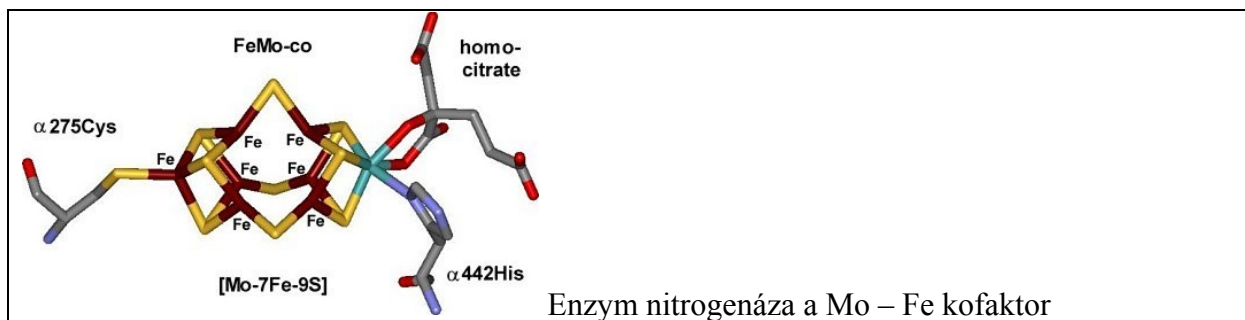
primární patogen - bakterie patogenní pro rostliny nebo živočichy včetně člověka,

v půdě většinou přežívají déle; klostridia (*Cl. tetani*, *botulinum*, *perfringens*, *septicum*..)

sekundární patogen - do půdy se dostávají sekundárně z různých rezervoárů, v půdě přežívají v závislosti na jejich odolnosti (gramnegativní bakterie méně)

Pro přesnou identifikaci je nutno mikroorganismy nejprve **izolovat** a dále kultivovat v **čistých kulturách**. S izolací jsme se již setkali v případě křížového roztěru. Můžeme však využít i **selektivních medií**, které prokáží určitý charakteristický znak. Například při průkazu fixace dusíku se využije bezdusíkaté medium, izolující druhy schopné tuto molekulu fixovat z ovzduší. Další znak, štěpení celulózy, dokážeme charakteristickým růstem na buničité vatě a jiných materiálech obsahujících celulózu, která bude zdrojem uhlíku pro bakterie.

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 (potřeba 15 ATP na 1 mlk N_2). Tento proces byl objeven Winogradským 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 redukuje plynný dusík na NH_3 a to za **striktně anaerobních** podmínek. Některé bakterie (pro naše cvičení *Azotobacter*) si anaerobní podmínky vytvoří spotřebováním kyslíku na povrchu buňky aerobní respirací.

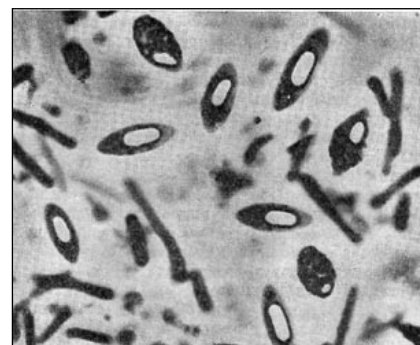


Ukazatelem úrodnosti půdy je přítomnost celulytických bakterií. V intenzivně obdělávaných půdách se vyskytují rychle rostoucí zástupci rodů *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sporocytophaga*, ve středně obdělávaných myxobakterie a ve slabě obdělávaných a v kyselých půdách převládají mikroskopické houby. Ve vodě nerozpustný polysacharid celulóza je podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk; je doprovázena hemicelulózami, pektiny, ligninem a tuky. Je štěpena povětšinou aerobně, může však být i anaerobně zkvašována. Celulóza je mimo buňku hydrolyticky štěpená EXOENZYMEM celulázou na celobiózu a tento disacharid je pak uvnitř buňky (po transportu) následně štěpen ENDOENZYMEM celobiázou na dvě glukózy. Rychlost rozkladu celulózy je ovlivněna množstvím celulytických bakterií a rovněž přítomností doprovodných látek – v přítomnosti ligninu je štěpena hůře.

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 ranné 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 clostridií!



- obligátně anaerobní (někt.druhy však ke kyslíku tolerantní)
- chemoorganotrofní, chemoautotr., chemolitotrofní
- 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, toleruje kyselost a promáčenost půdy a nižší teploty; tyto vlastnosti spolu s tvorbou spor umožňují jeho rozšíření téměř ve všech typech půd (10^3 - 10^5 CFU/1g)

Pro průkaz rodu *Clostridium* vytvoříme anaerobní podmínky zátkou ze sterilního parafínu.

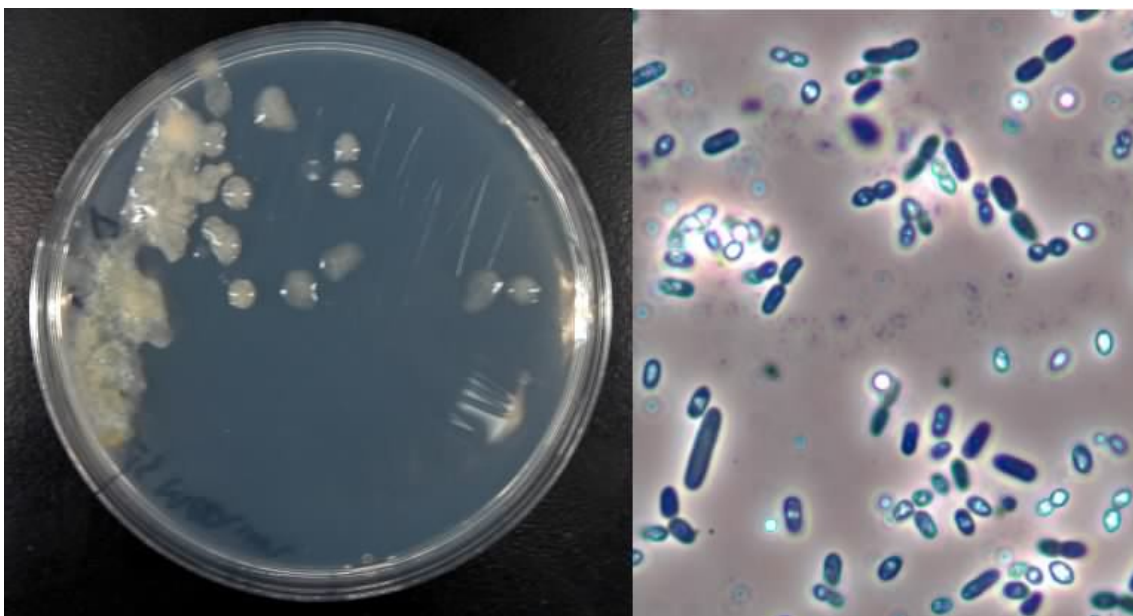
Azotobacter:

- vyskytují se v půdě či vodě
- G- ovoidní pleomorfní tyčky až koky
- po 1, 2 i nepravidelné shluky či řetězky
- 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 molybden, bór, vanadu, železa a manganu. V kyselých půdách nefixuje dusík. Jeho teplotní optimum se pohybuje mezi 25 -30° C .



Azotobacter - kolonie s exopolysacharidem a pigmentací. Zvětšení 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 parafínový olej
- ❖ Filtrační papír
- ❖ Ústřížky časopisu, novin, buničina
- ❖ Kahan
- ❖ Vodní lázeň
- ❖ **Zemina ze zdrojů – každý uvede svůj zdroj (skleník, lesní půda, zahrada..)**

Postup:

Úlohy sestávají ze tří pokusů: cílená izolace azotobaktera (rod *Azotobacter*) na selektivním bezdusíkatém Ashbyho agaru, anaerobní kultivace a izolace clostridií a izolace celulotických zástupců na materiálech s celulózou přímo na zemině na Petriho misce.

1) Izolace azotobaktera:

- Petriho misky s Ashbyho agarem zaočkovujeme přímo drobnými zrníčky zeminy
- kultivujeme 72 hodin při 25 – 30°C
- selektivní bezdusíkaté medium eliminuje druhy vyžadující přítomnost dusíku
- medium nezaručí eliminaci mikroskopických hub

Hodnocení: po prvních dnech jsou slizovité kolonie azotobaktera kolem zrníček hlíny bělavé, stářím hnědnou

- je možno provést mikroskopickou kontrolu (G- kokotyčky ve dvojicích; pouzdro)

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



2) Izolace clostridií

- půdní extrakt připravíme smícháním zeminy s destilovanou vodou v poměru 1:10, desetiminutovým protřepáváním a dvojitým zfiltrváním přes buničitou vatu
- pasteurizujeme 15 minut při 75 – 80°C na vodní lázni (vyloučíme tak přežití všech vegetativních buněk; přežijí jen spory (v anaerobním prostředí poté vyklíčí spory právě pouze clostridiální)
- do horkého sterilního media (MPB č.2 s 5% glukózy) pipetujeme 1ml pasteurizovaného extraktu a ihned převrstvíme 1ml parafínu pro zajištění anaerobního prostředí

Hodnocení: v přítomnosti clostridií vzniká sedlina, plyn a charakteristický zápach žluklého másla

- je možno provést mikroskopickou kontrolu (Gramovo barvení + barvení spor)

3) Průkaz celulolytických bakterií

- na Petriho misku nasypeme do 2/3 rozdrobenou zeminu, navlhčíme
- pinzetou položíme proužky filtračního papíru, buničité vaty a novin (1cm mezery)
- kultivujeme při pokojové teplotě
- po několika dnech stříčkou doplníme vodu

Hodnocení: (ne)pozorujeme rozklad a změnu zabarvení (přítomnost skvrn různých barev) všech proužků; výsledky zaznamenáme po 1, 2 a 3 týdnech

- největší rozklad by měl být pozorovaný u buničiny (cca 50%), méně pak (30%) u filtračního papíru a nejméně se rozkládá (vzhledem k inhibujícímu barvivu papíru) novinový či časopisový papír
- nejvíce celulolytických bakterií se vyskytuje na půdách s vyšším množstvím humusu, méně pak v půdách písčítých

Hodnocení:

Závěr:

Zdroje:

Němec M., Mazal P. (1989): Cvičení z mikrobiologie, Brno

<http://www.sci.muni.cz/mikrob/skripta/mikrobiologiecv.pdf>

http://www.eoearth.org/article/Winogradsky,_Sergei_Nikolaevitch

Cykly v půdě: <http://bioh.wikispaces.com/More+Elemental+Cycles?f=print>