

Izolace vybraných skupin půdních mikroorganismů

Cíl: izolace a průkaz 3 skupin mikroorganismů

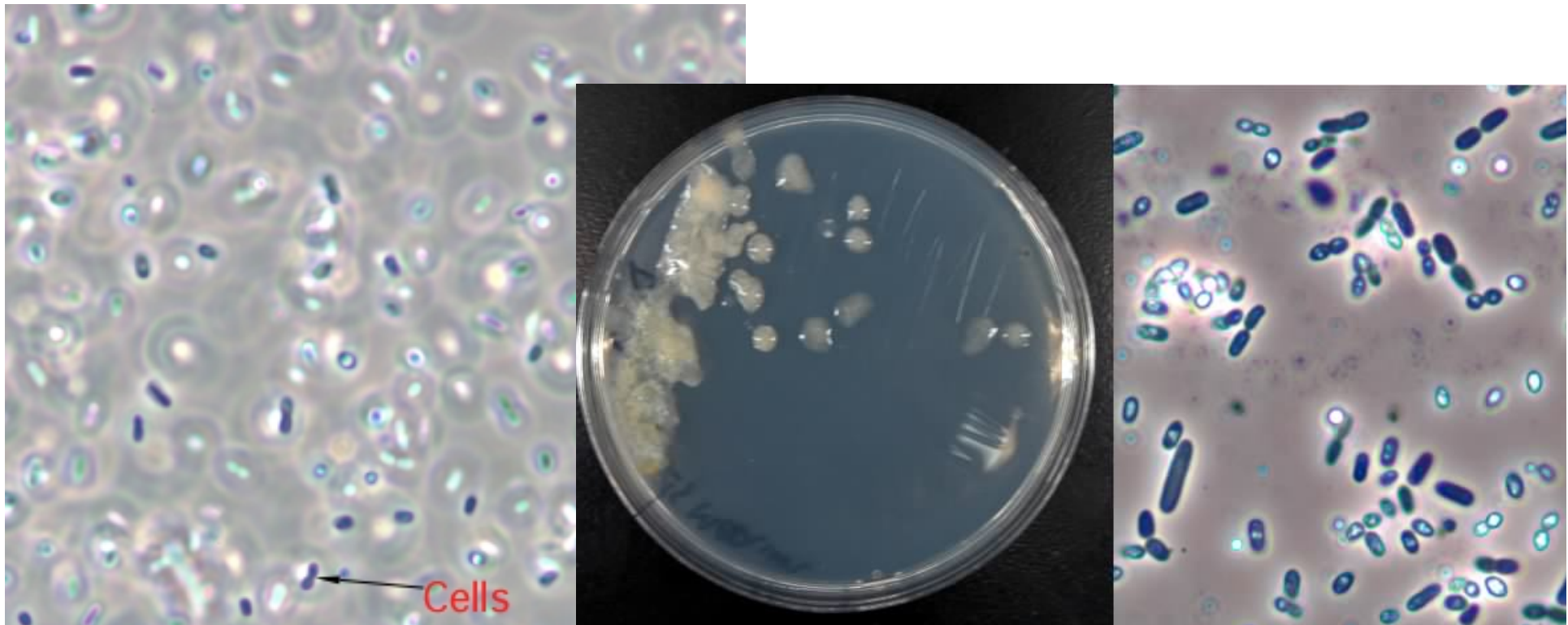
(ve vzorku komplex MO) z různých zdrojů půdy
(cílová skupina MO se nemusí nacházet v každém vzorku) za
selektivních podmínek kultivace

1. Izolace rodu *Azotobacter*
2. Izolace rodu *Clostridium*
3. Průkaz celulolytických bakterií

Azotobacter

G-, tvorba cyst, aerobní, tvorba pigmentu,
nesymbiotická fixace dusíku

- bezdusíkaté médium
(enzym nitrogenáza → dokáže dusík fixovat ze vzduchu)
- Ashbyho agar – hodně živin, bez dusíku
- <http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/azoto.htm>



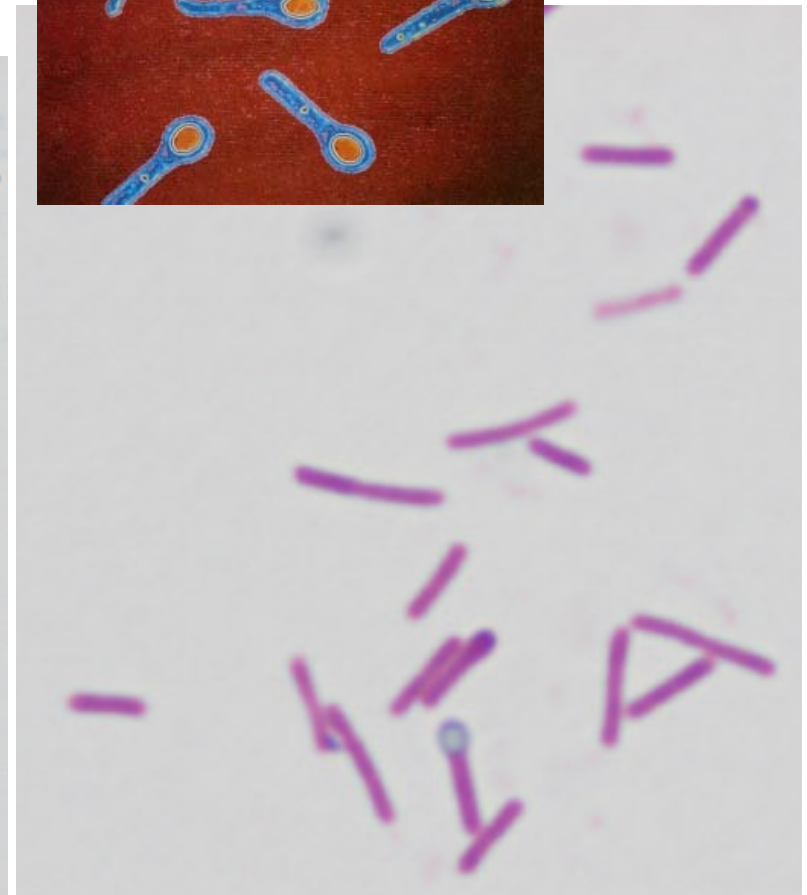
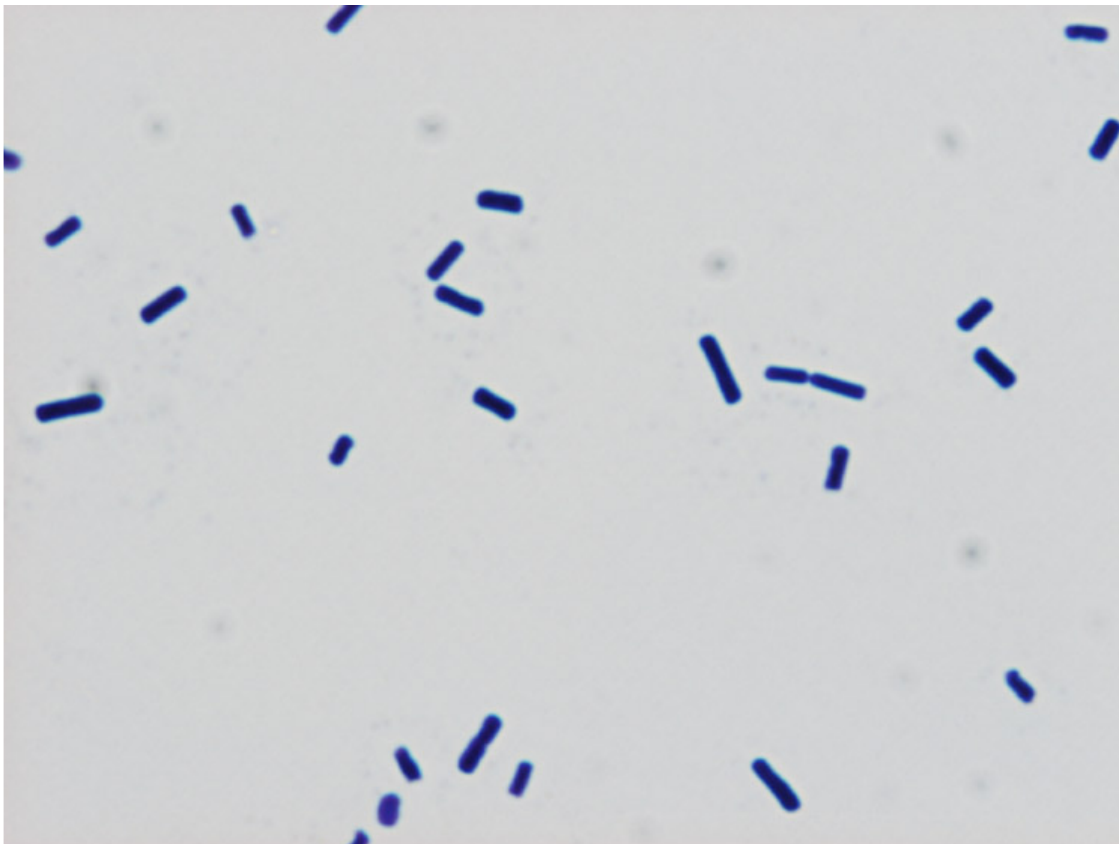
Clostridium – anaerobní bakterie, spory jsou schopny vyklíčit v anaerobním prostředí bujono pod parafinem, vegetativní buňky usmrceny pasterizací

G+, tyčky, tvorba spor, produkce toxinů, výskyt v prostředí

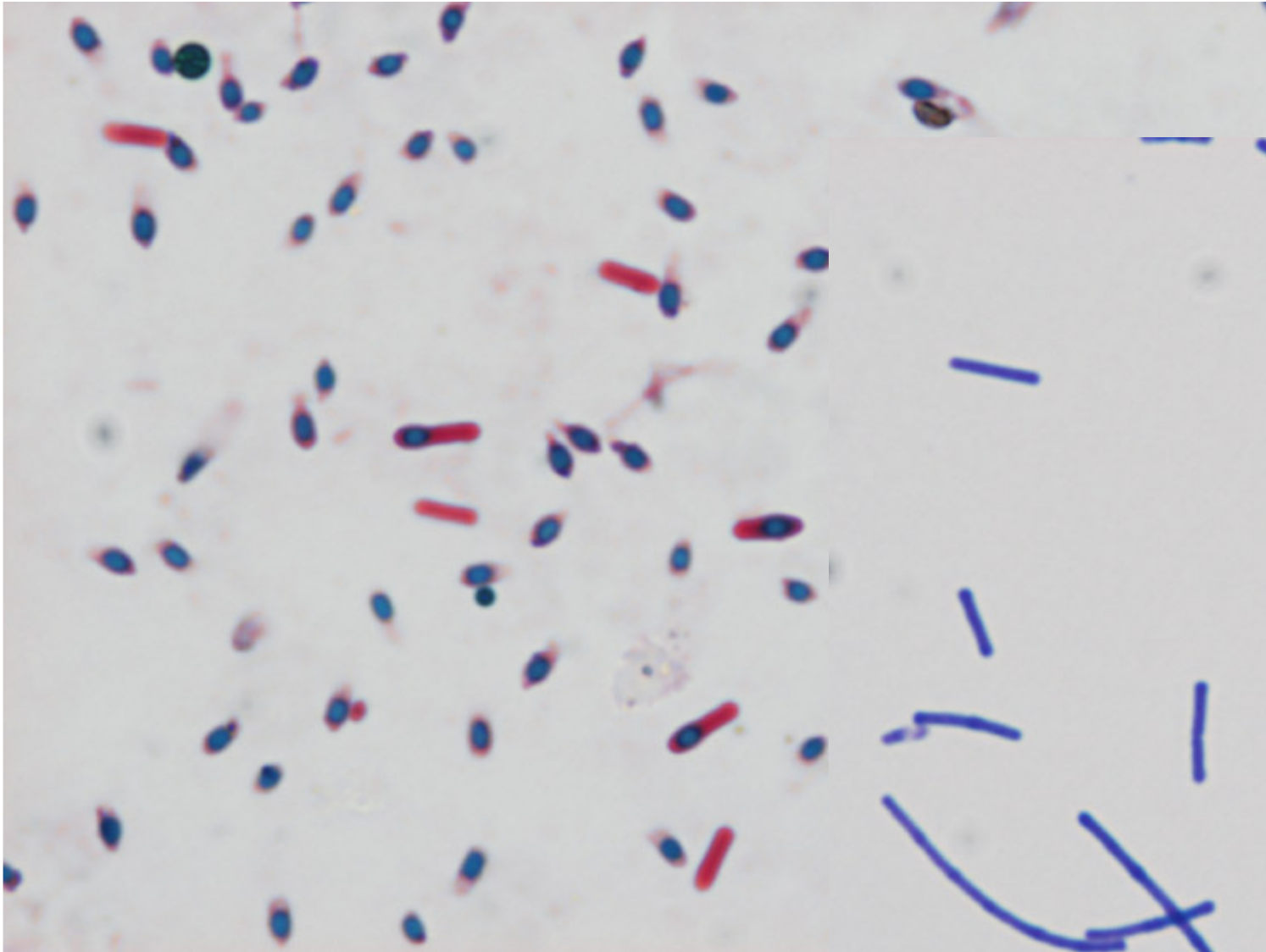
C. tetani



C. perfringens



C. septicum



- **Celulolytické bakterie** (*Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sporocytophaga*,..)– průkaz s jediným zdrojem uhlíku (lístečky s celulózou – noviny, buničina, filtrační papír)
- Ukazatel úrodnosti

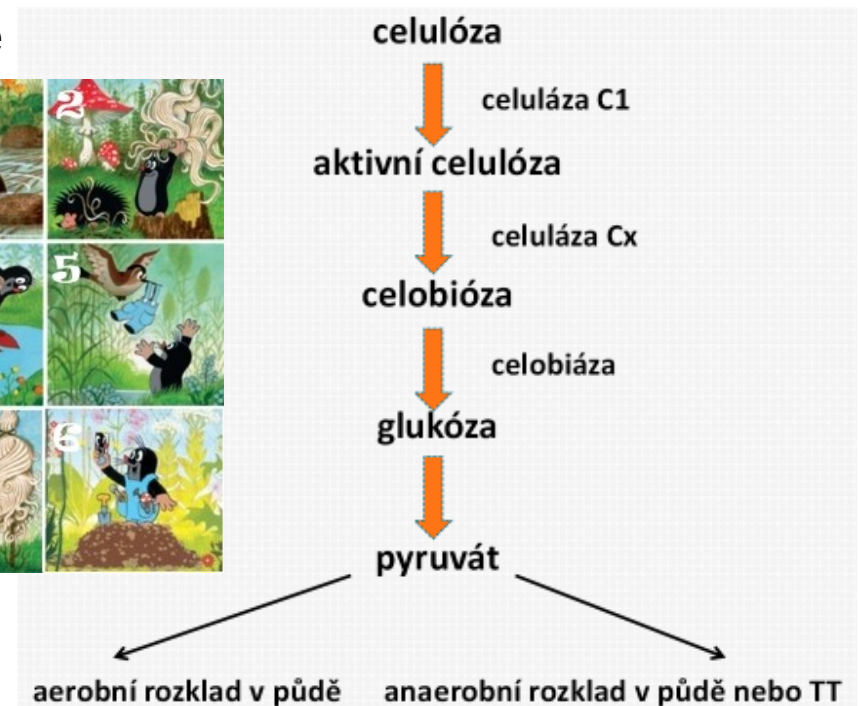
Relativní zastoupení aerobních, fakultativně anaerobních bakteriálních rodů, které se běžně vyskytují v půdě

Rod	%
<i>Arthrobacter</i>	5-60
<i>Bacillus</i>	7-67
<i>Pseudomonas</i>	3-15
<i>Agrobacterium</i>	1-20
<i>Alcaligenes</i>	1-20
<i>Flavobacterium</i>	1-20
<i>Corynebacterium</i>	2-12
<i>Micrococcus</i>	2-12
<i>Staphylococcus</i>	<5
<i>Xanthomonas</i>	<5
<i>Mycobacterium</i>	<5

Rozklad celulózy

- **Celulóza** - nejběžnější polysacharid v rostlinném opadu, rozklad významnou měrou určuje rychlost přeměny rostlinné hmoty v půdním prostředí
- **Aerobní rozklad v půdě** - úplná respirace, mineralizace organických látek, získá velké množství energie (*Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Cellulomonas*, aktinomycety, mikromycety)
- **Anaerobní rozklad v půdě** - máselné kvašení, k. máselná, k. octová, další organické kyseliny, etanol, CO_2 , H_2O (*Clostridium*), může navazovat produkce metanu (metanové bakterie), $\text{CO}_2 + \text{H}_2 = \text{CH}_4$
 - význam: mineralizace v zamokřené půdě
 - komposty, chlívská mrva
 - čištění odpadních vod (anaerobní vyhnívání kalů)
 - výroba bioplynu

Není to čistě nitrobuněčný proces!



Půda: vliv na zastoupení MO → roční období, půdní typ, dostupnost živin, vody O₂, pH, minerály, textura půdy, hloubka

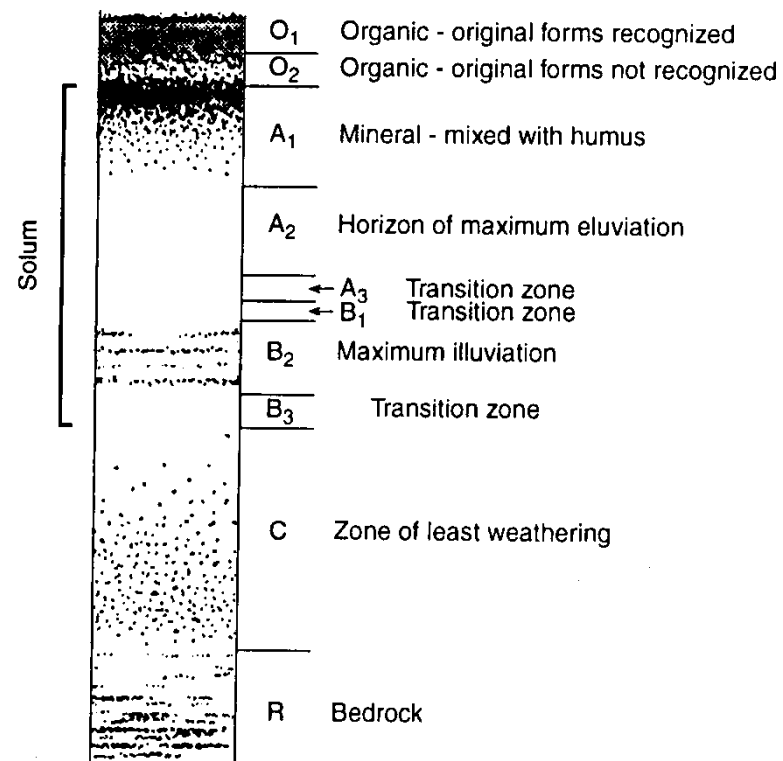
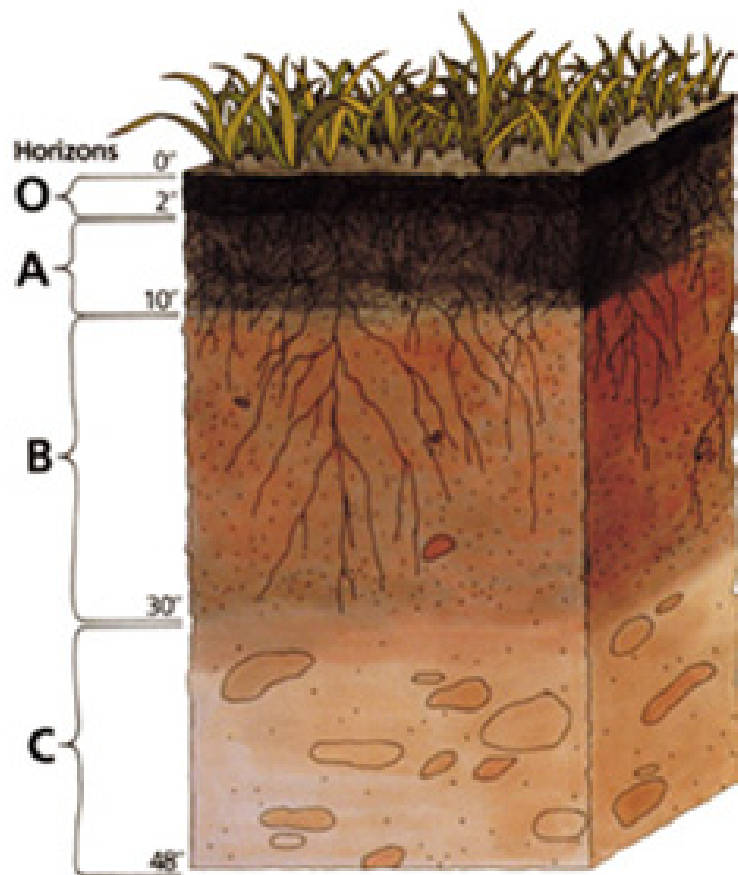
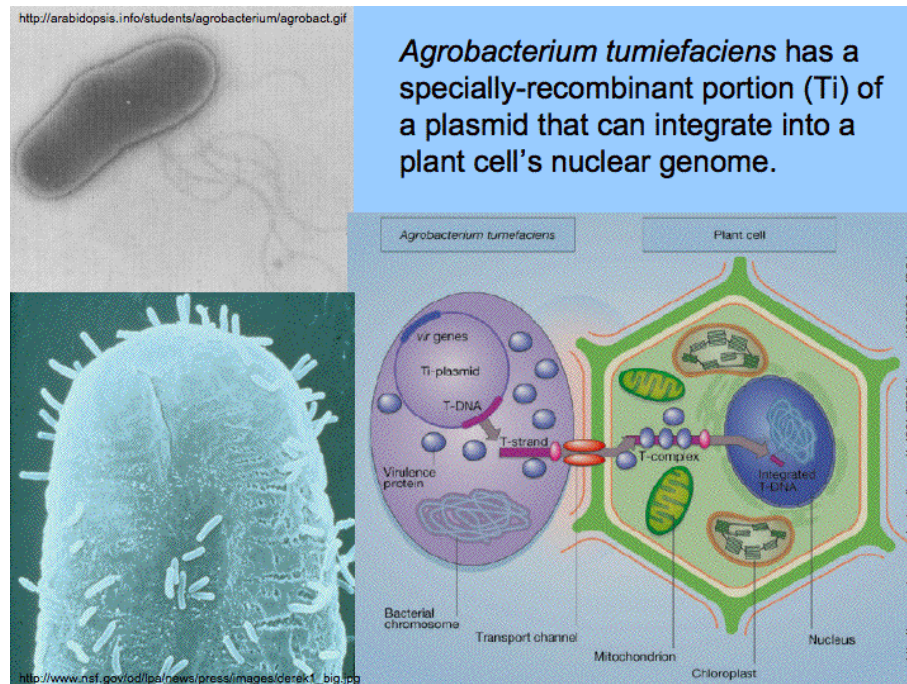


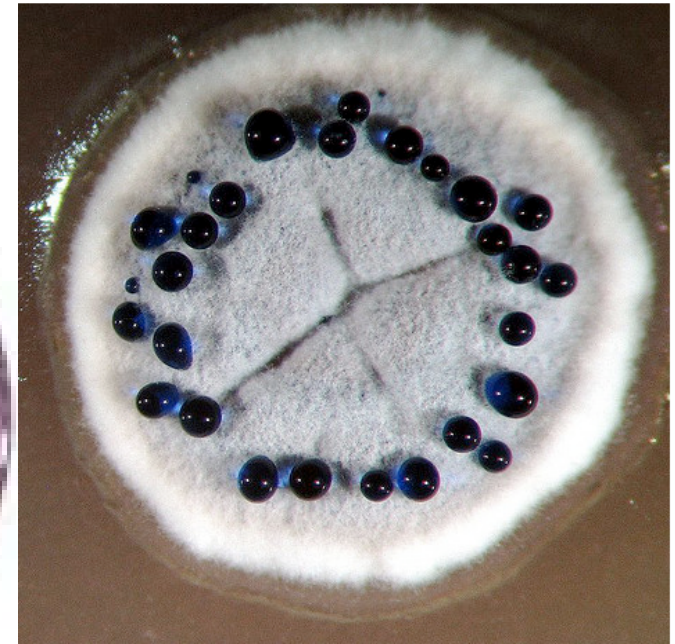
Figure 9.31
Vertical soil profile showing soil horizons. (Source: Buckman and Brady 1969. Reprinted by permission, copyright Macmillan Publishing Co.)

- **autochtonní MO** = typické pro dané prostředí (např. *Agrobacterium*, *Streptomyces*)
 - vždy přítomny v významném množství, nezávisle na množství živin
 - dlouhodobě na nízké metabolické aktivitě, rychle využívají sebemenší zvýšení koncentrace živin
- **alochtonní (zymogenní) MO** = v daném prostředí se vyskytuje sezónně
 - závisí na periodickém nárůstu množství živin, běžně přítomny pouze v nízkých počtech
 - počty závidí na kolísání živin v půdě

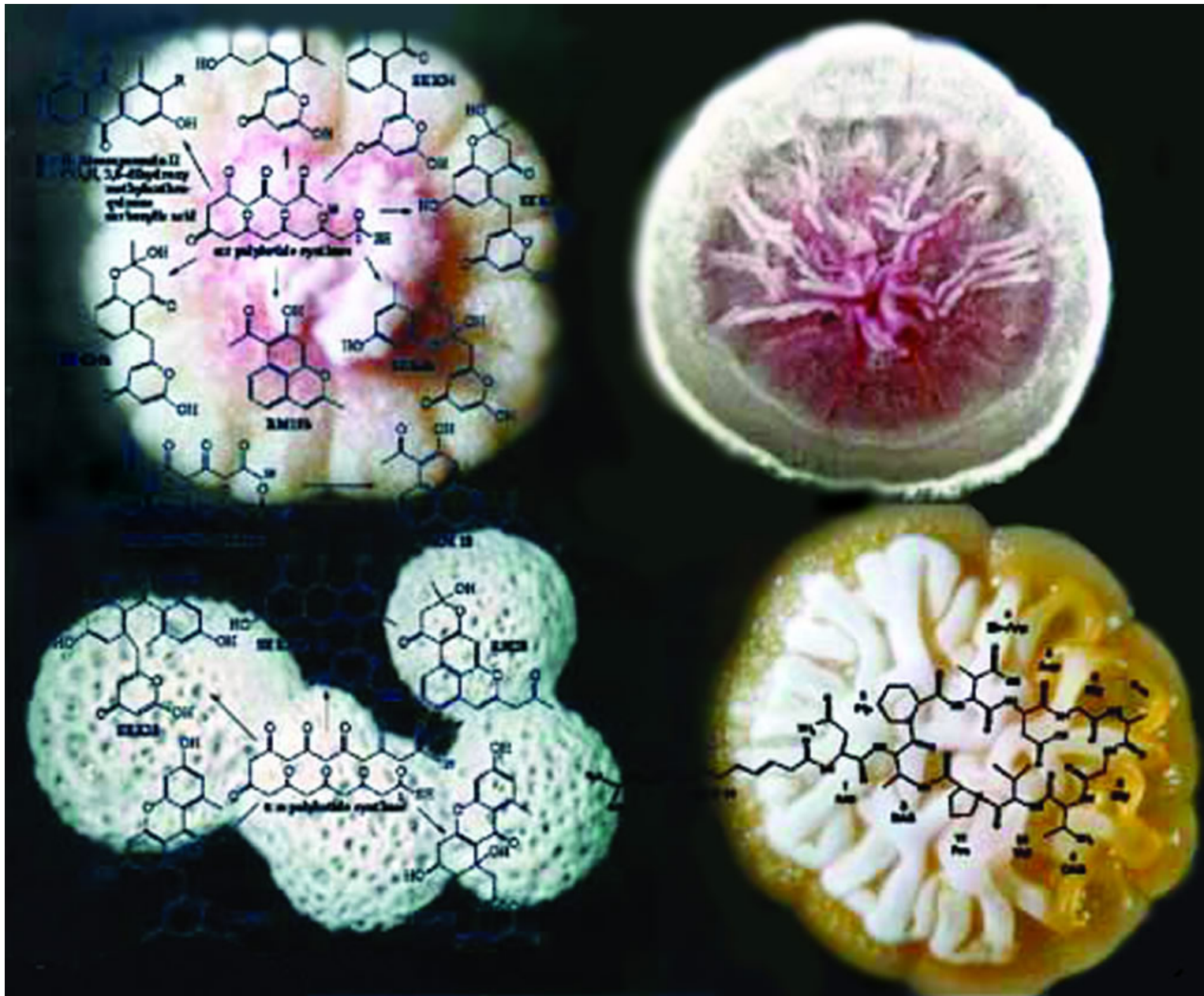


Agrobacterium

Streptomyces



Streptomyces



Myxobakterie

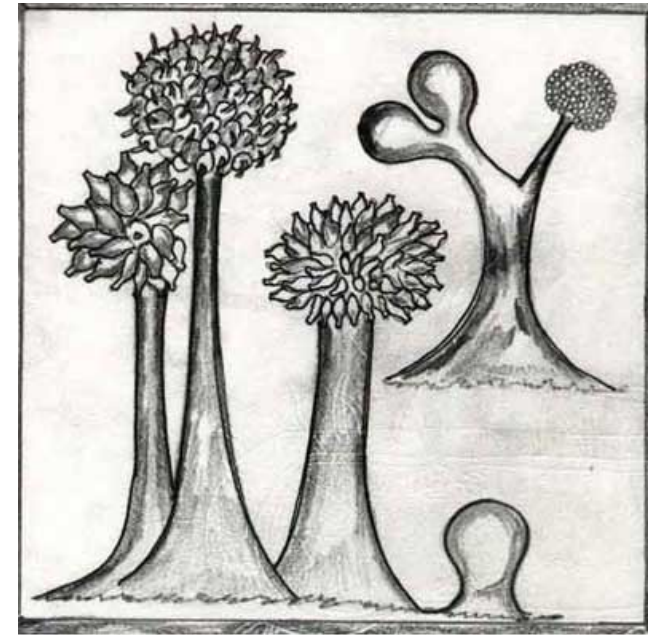
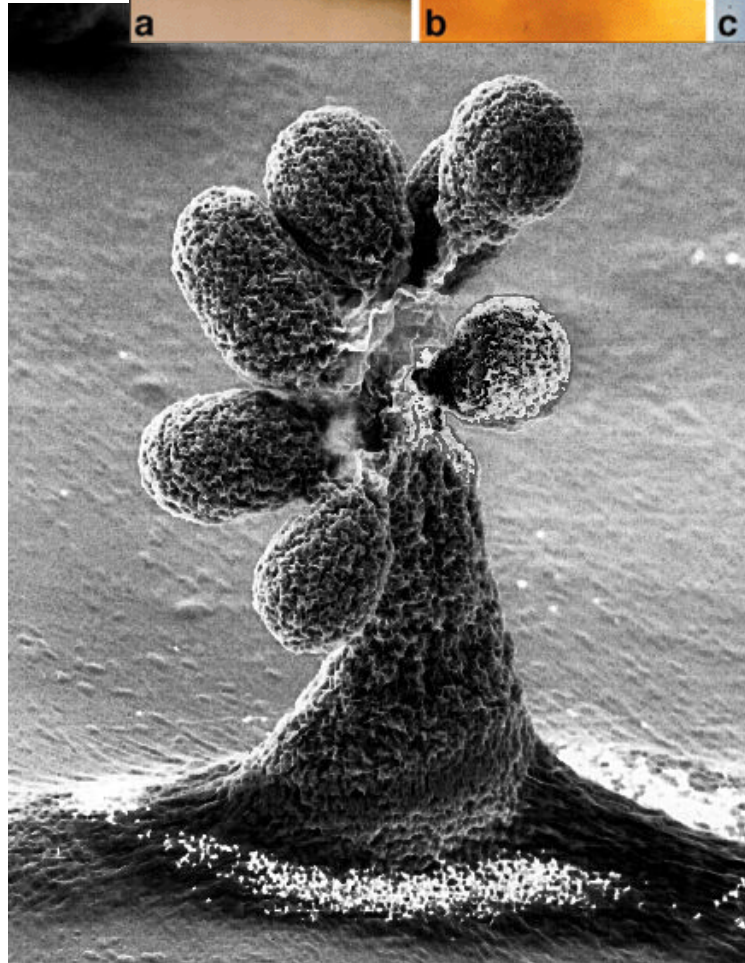
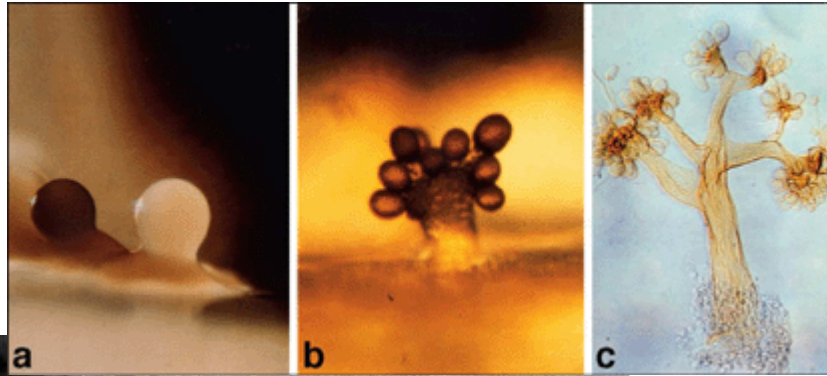


FIGURE: DRAWING OF A COMMON MYXOBACTERIUM
THAXTER, R. 1897. Bot. Gaz., 23: 395-411

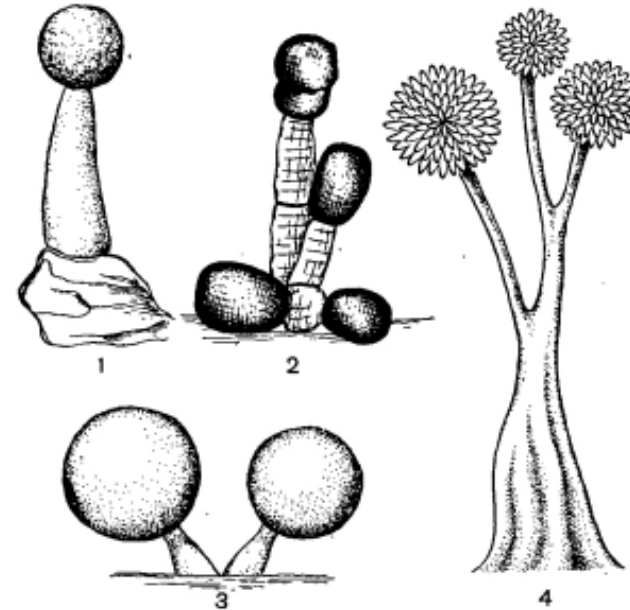
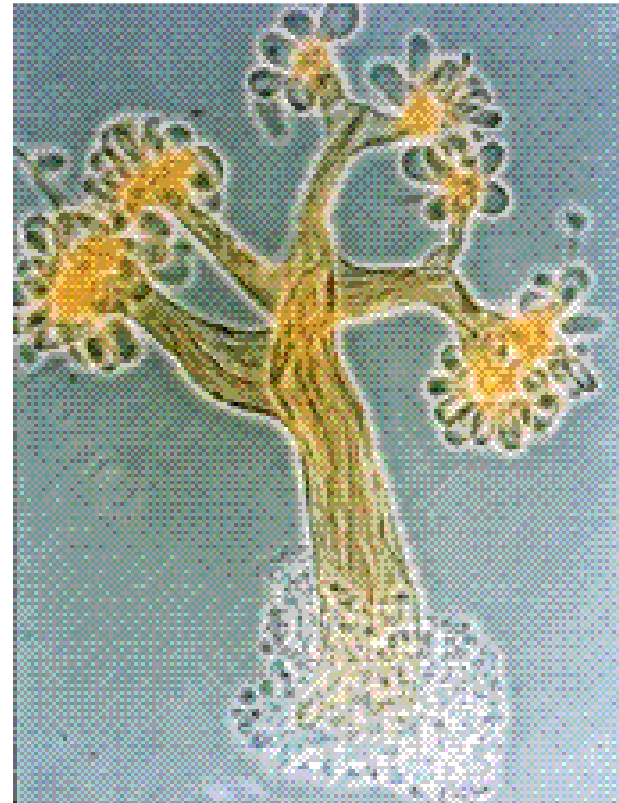
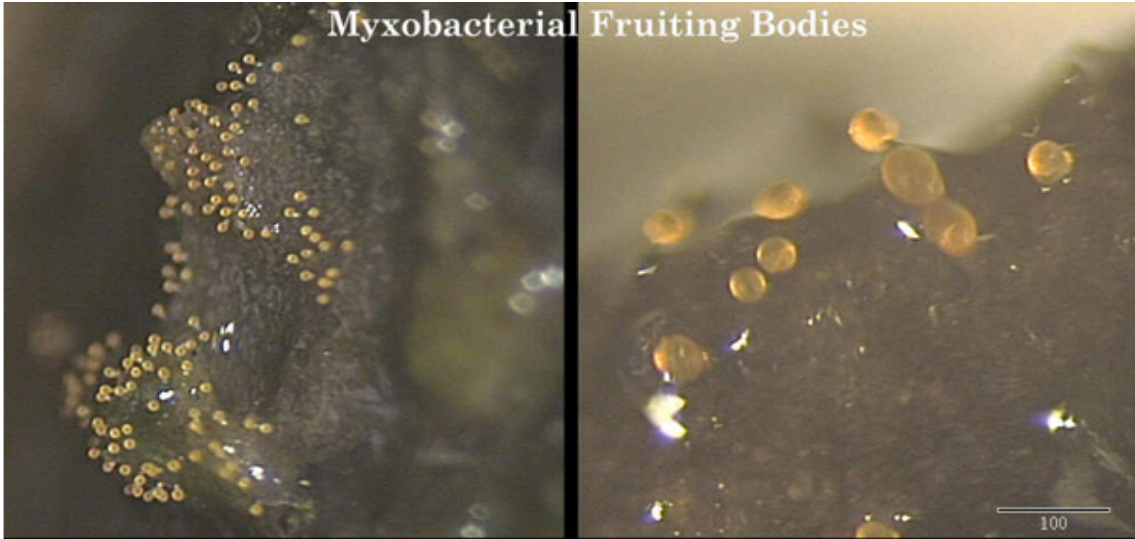


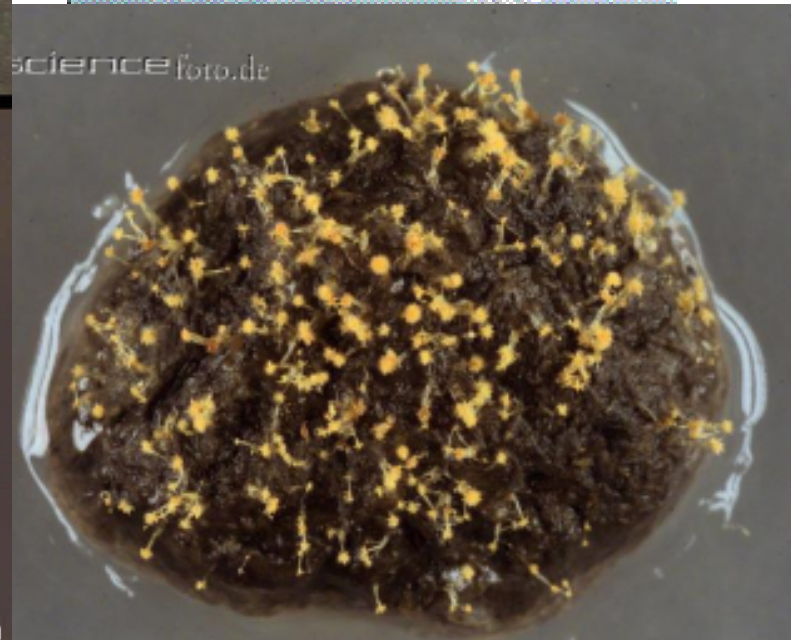
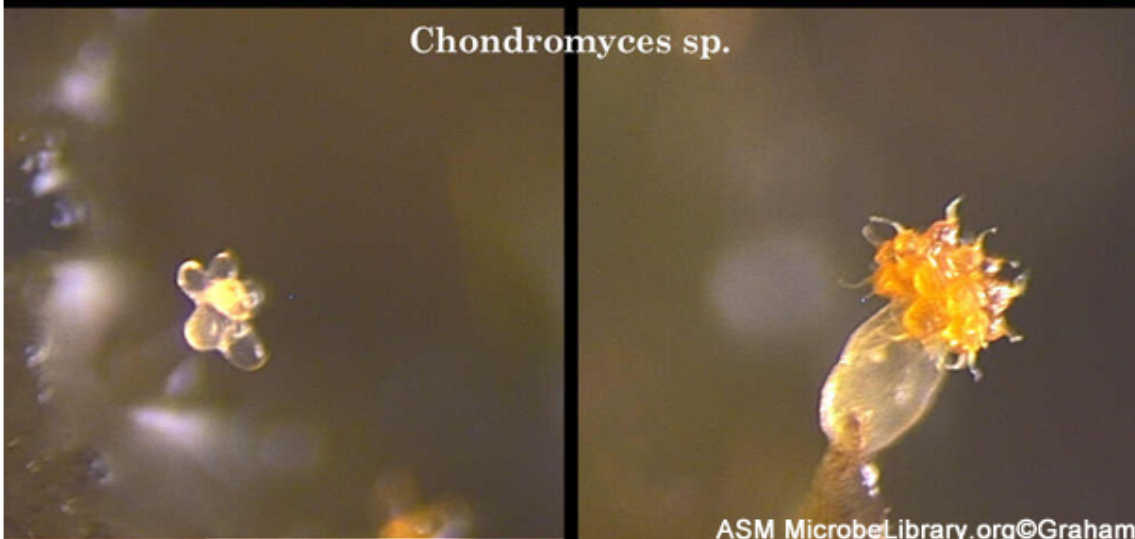
Рис. 113. Плодовые тела некоторых миксобактерий:
1 — *Myxococcus stipitatus* (высота колонии 0,1 мм); 2 — *Podan-
gium erectum* (высота 50 мкм); 3 — *Myxococcus fulvus* (высота
150 мкм); 4 — *Chondromyces* sp. (высота 0,5 мм).

Chondromyces

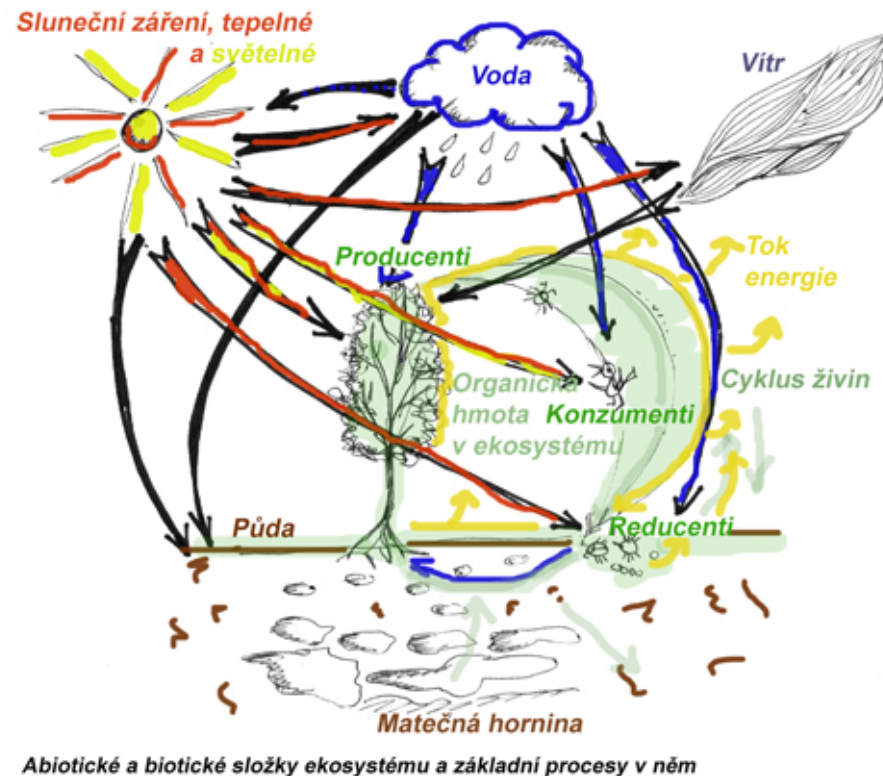
Myxobacterial Fruiting Bodies



Chondromyces sp.



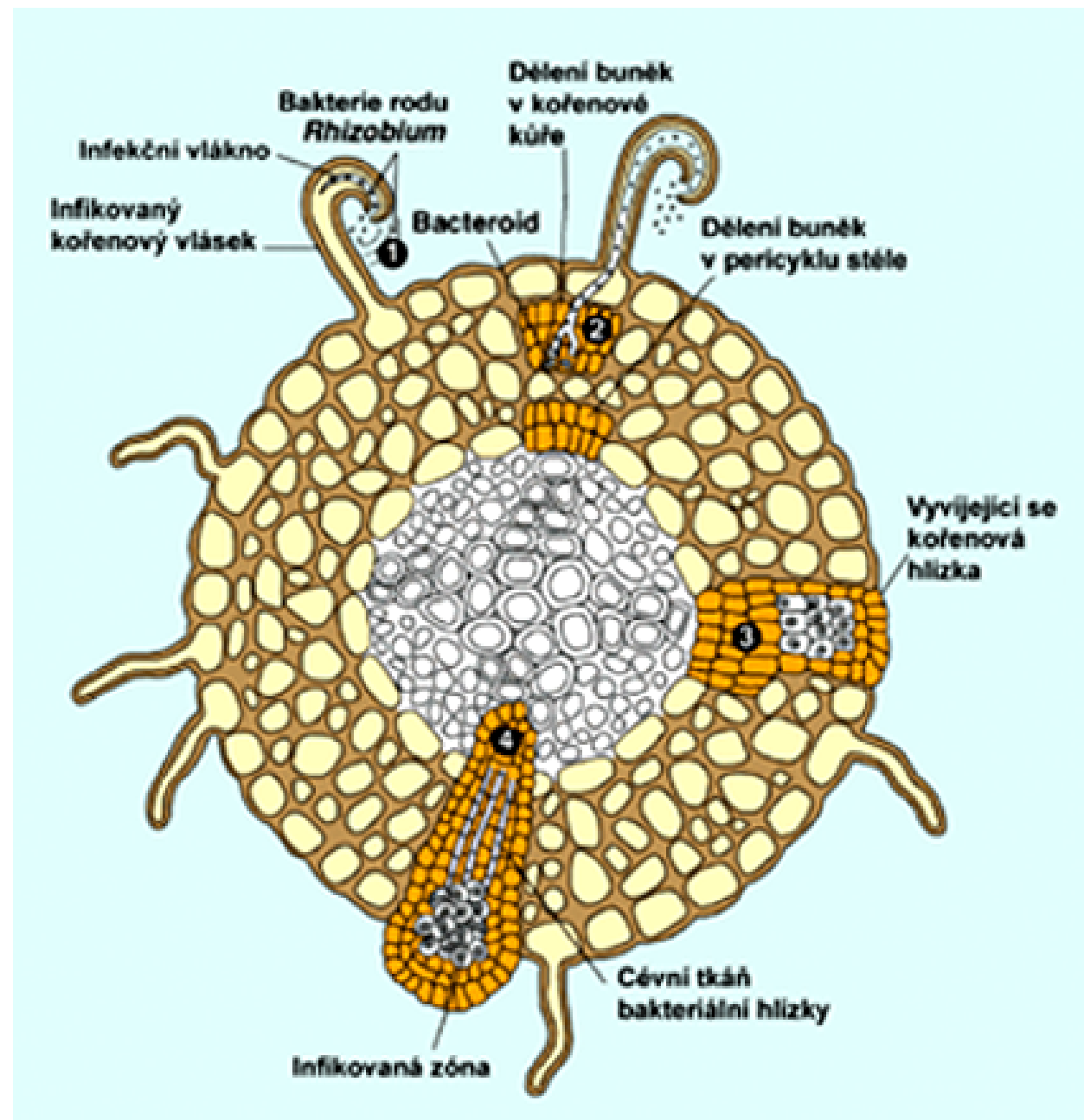
Funkce MO: humifikace, mineralizace, produkce i spotřeba látek, fixace N_2 (volná a pevná symbióza), koloběh prvků, bioremediace



Průkaz MO → charakteristické reakce (redukce SO_4 , rozklad močoviny, fixace N_2)

- Výskyt patogenů primárních (*Clostridium*) i oportunních

Symbiotická fixace dusíku





POSTUP

- ***Clostridium*** – 10 g půdy + 100 ml destilované vody → třepání 10 min
 - filtrace extraktu přes dvojitý filtrační papír (vrchní část extraktu) do baňky
 - přelít do zkumavky → 15 min vodní lázeň, 75-80°C
 - 1 ml extraktu pipetovat do sterilního MPB
 - převrstvit 1 ml sterilního parafínu
- ***Azotobacter*** – popsat misku na dno
 - nadrobit půdu na misku, neotáčet!!
- **Celulolytické MO** – plastové misky, popsat víčko
 - trochu udusat, přiložit lístečky (buničina, noviny, filtrační papír) a navlhčit půdu i lístečky v misce vodou
- **!! Hodnocení** – *Clostridium*, *Azotobacter* – po týdnu
 - celulolytické MO – po 1., 2. a 3. týdnu kultivace