



# Izolace vybraných skupin půdních mikroorganismů

# Půda a mikroorganismy

- ▶ V 1g půdy je přítomno **několik bilionů** buněk mikroorganismů
- ▶ **Běžná půdní mikroflora:** bakterie *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, plísně *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*
- ▶ **Patogeny a oportunní patogeny:** (*Actinomyces*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*...)
- ▶ **Patogenní bakterie** mohou být:
  - ▶ **Primární patogen** – patogenní pro rostliny/živočichy/člověka, v půdě přežívají déle. Např. klostridia (*Cl. tetani*, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*)
  - ▶ **Sekundární patogen** – do půdy se dostávají sekundárně z různých rezervoárů, přežívají v závislosti na jejich odolnosti



# Půda a mikroorganismy

- ▶ V přírodě se vytvářejí **mikrobiální společenstva**, normálně bývá v prostředí značný počet druhů v průměrném množství
- ▶ V půdách určitého druhu převažuje určitá skupina bakterií – termofilové v kompostu, plísňe 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...)

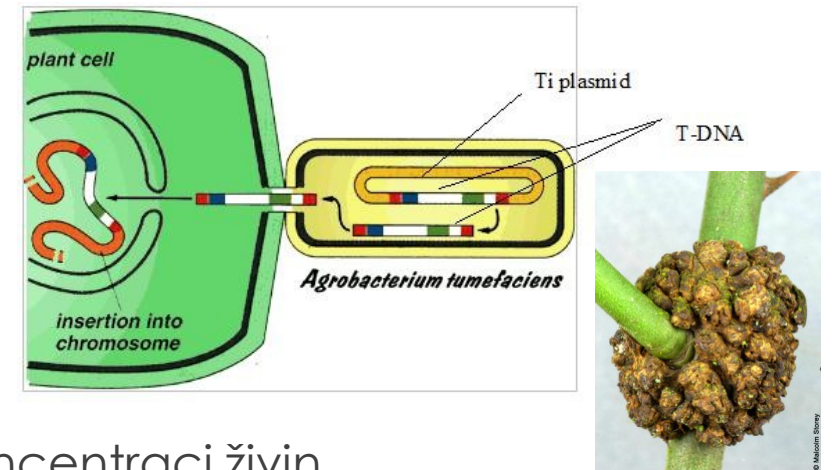
# Bakterie podle počtu zástupců a živin

## ▶ Autochtonní bakterie

- ▶ Jsou v půdě celoročně, ve vysokém, konstantním počtu a nezávisle na množství živin
- ▶ Mají nízkou metabolickou aktivitu
- ▶ *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*

## ▶ Zymogenní (alochtonní) bakterie

- ▶ V půdě jen sezonně, v nižším počtu, závisle na zvýšené koncentraci živin
- ▶ Mohutná metabolická aktivita
- ▶ Zajišťují koloběh prvků
- ▶ Nitrifikační, celulolytické a síru oxidující bakterie, myxobakterie, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*



# Funkce MO v půdě

- ▶ **Dekompozice** (humifikace, mineralizace) – organotrofy, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*
- ▶ Oxidace jedovatých **dusitanů na dusičnany** – nitrifikační bakterie
- ▶ Oxidace **sulfidů na sulfáty** – *Thiobacillus*
- ▶ Bioremediace, **rozklad těžko odbouratelných látek**
- ▶ **Fixace dusíku** symbiotickými (*Rhizobium*) a volně žijícími (*Agrobacterium*, *Azotobacter*) bakteriemi
- ▶ Producenti sekundárních metabolitů – **antibiotika**, *Streptomyces*
- ▶ Suprese plísňových onemocnění rostlin (*Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*)
  
- ▶ Zastoupení MO v půdě závisí od typu půdy, pH půdy, ročního období, dostupnosti živin, vody, kyslíku, minerálů, hloubky



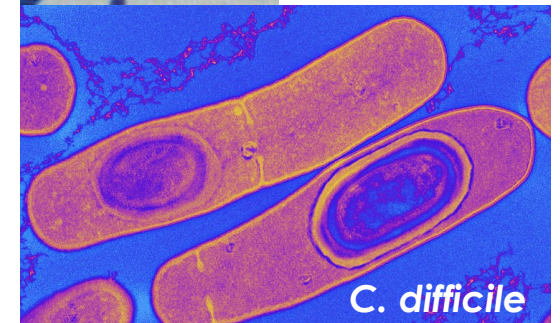
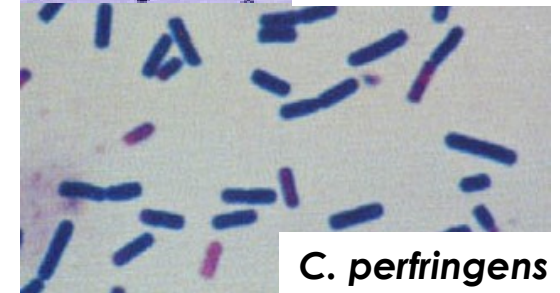
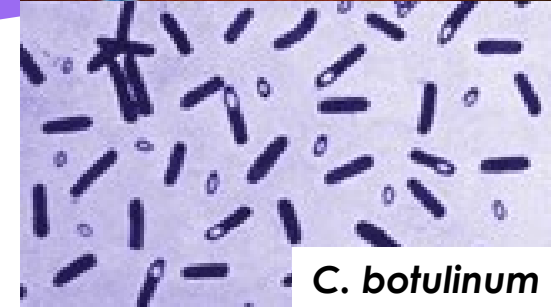
Biodegradable plastic products eaten by bacteria

# 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*, *C. difficile*
- ▶ G+ anaerobní tyčky
- ▶ Bičíky po celé buňce - **peritricha**
- ▶ Výskyt běžně v prostředí (půda, kal, mořské sedimenty, rostlinné zbytky), gastrointestinální trakt, klinický materiál
- ▶ **Spory, toxiny** (tetanospazmin, tetanolyzin, botulotoxin...)
- ▶ Primární i oportunní patogeny
- ▶ 10 – 65 °C, některé druhy fixují plynný dusík
- ▶ Sacharolytické, proteolytické, nebo aj aj
- ▶ V cvičení – ostatní vegetativní buňky usmrtíme pasterizací, spory pak vyklíčí v anaerobním prostředí v bujone pod parafinem

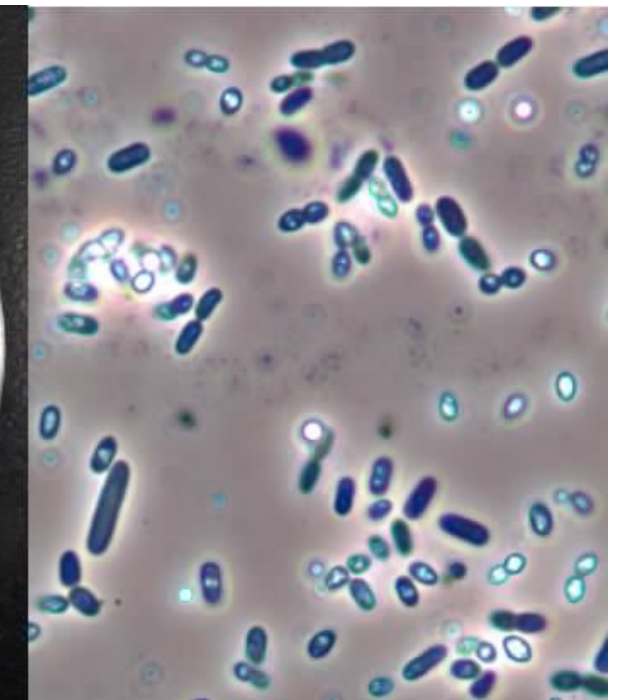
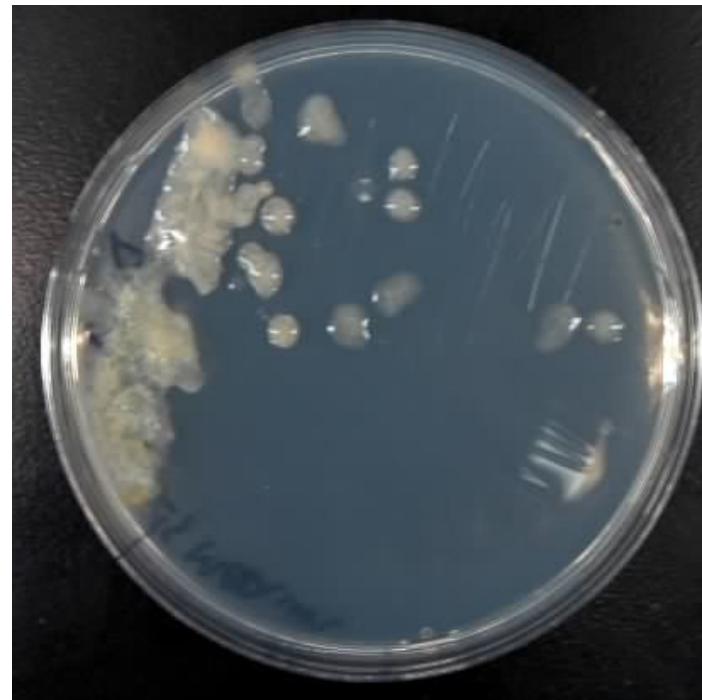


# Azotobacter

- ▶ *A. chroococcum*, *A. vinelandii*
- ▶ Výskyt v prostředí (voda, půda)
- ▶ G – aerobní ovoidní tyčka až kok
- ▶ Bičíky **peritricha**
- ▶ Tvoří **pigment, sliz, cysty**
- ▶ Výskyt v půdě a vodě
- ▶ **Nesymbiotická fixace dusíku**  
– enzym nitrogenáza
- ▶ **Ashbyho agar** – bez dusíku, hodně živin
- ▶ 25 – 30 °C



cysty



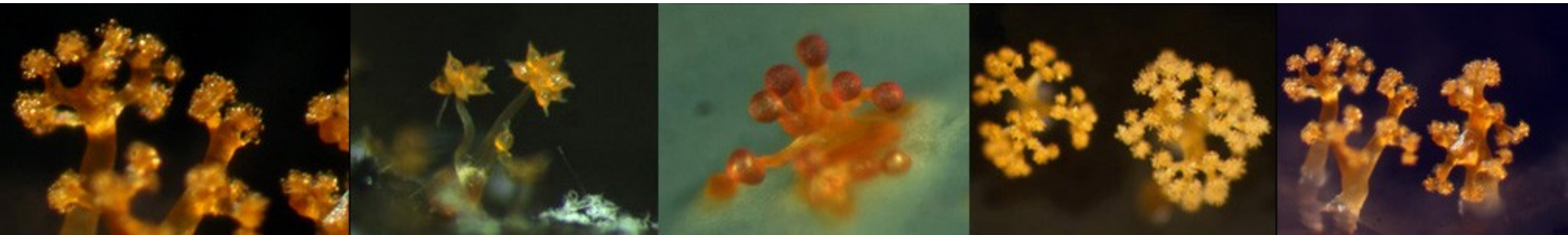
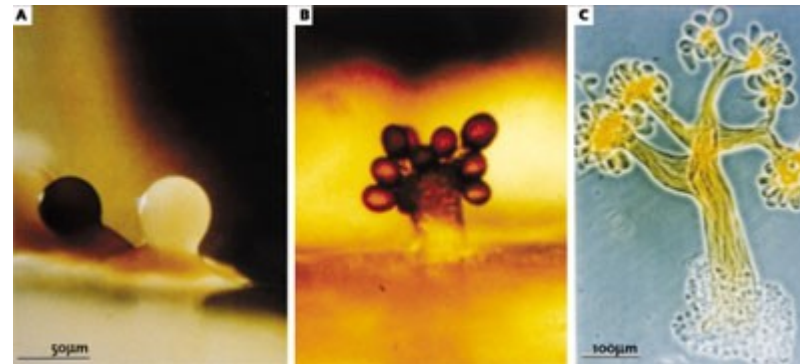
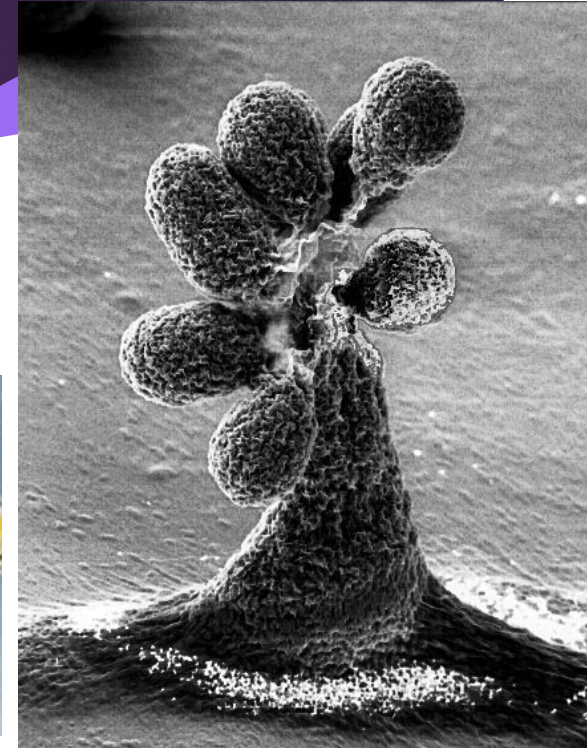


# Celulolytické bakterie

- ▶ Rozkládají **celulózu**, která se v podobě různých rostlinných zbytků, splachů a odpadových materiálů z průmyslu dostává do prostředí
- ▶ Přítomnost celulolytických bakterií je **ukazovatelem úrodnosti půdy**
- ▶ **Cytophaga, Sporocytophaga, Cellvibrio** (intenzivně obdělávané půdy), **myxobakterie** (středně obdělávané půdy) **mikroskopické houby** (slabě obdělávané a kyselé půdy)
- ▶ Celulóza je v přírodě nejrozšířenější, ve vodě nerozpustný polysacharid. Je spolu s hemicelulózami, pektiny, ligninem a tuky podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk
- ▶ Může být štěpena:
  - ▶ **aerobně** – získá mnoho energie, mineralizace organických látek
  - ▶ **anaerobně (kvašení)** – kyselina máselná, octová, etanol, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O...
- ▶ Celulózu štěpí exoenzym celulóza na celobiózu a tu endoenzym celobiáza na dvě podjednotky glukózy

# Myxobakterie

- ▶ Řád *Myxococcales*
- ▶ Plodnice: slizovitá stopka, sporangioly, myxospory
- ▶ Prostředí s rozkládajícím se organickým materiálem, kůra stromů, tlející dřevo, kompost...



# Postup

**Clostridium** - anaerobní kultivace v bujonu převrstveném parafinem – zajistí anaerobní prostředí

- ▶ 10 g půdy + 100 ml destilované vody, dá se třepat na 10 minut
- ▶ Dvojitá 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 napipetovat do MPB
- ▶ Na to napipetovat 1 ml parafinu
  
- ▶ **Azotobacter** – izolace na selektivním bezdusíkatém **Ashbyho agaru**, eliminuje druhy vyžadující dusík  
popsat misku na dno, na médium nadrobit půdu, mírně pokropit stříčkou, 72 h, 25 – 30 °C
  
- ▶ **Celulolytické MO** – izolace na čisté Petriho misce, popsat víčko misky, do misky nadrobit půdu, trochu poutláčet, navlhčit stříčkou, na to přiložit materiál z celulózy. 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 hlíny, 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.