دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی
و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

# جدا سازی و مطالعه ی باکتری های تثبیت کننده ی ازت

## (آزوسپریلیوم)



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# جدا سازی آزوسپریلیوم

- این باکتری جزء باکتری های خمیده می باشد که هم به صورت آزاد در شرایط میکروآئروفیلیک و هم به صورت همیار در گندم تثبیت ازت انجام می دهد.

# روش کار

- ۱) از نمونه ی خاک مزرعه گندم و برنج و یا عصاره ی تارهای کشنده گندم و برنج استفاده می کنیم.
- ۲) محیط کشت لازم جهت جداسازی آزواسپریلیوم را تهیه می کنیم.
- محیط جداسازی محیط NFB است که حاوی اسید مالیک به عنوان منبع کربن است و ماده ی نیتروژن ندارد و حاوی بیوتین به عنوان ویتامین می باشد.

| | | |
|---|---|---|
| Malic Acid | 5 | gr |
| $K_2HPO_4$ | 0/5 | gr |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0/2 | gr |
| NaCl | 0/1 | gr |
| $CaCl_2.H_2O$ | 0/02 | gr |
| محلول معدنی | 2 | ml |
| محمول برموتیمول بلو | 2 | ml |
| Fe EDTA | 1/64% | |
| Vitamin | 1 | ml |
| Agar | 1/7 | gr |
| D.W | 1000 | ml |

## طرز تهیه محلول معدنی در یک لیتر آب

| | | |
|---|---|---|
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0/4 | gr |
| $ZnSO_4$ | 0/12 | gr |
| $H_2BO_2$ | 1/4 | gr |
| $MoO_4Na_4$ | 1 | gr |
| $MnSO_4$ | 1/5 | gr |

## طرز تهیه محلول ویتامین

| | | |
|---|---|---|
| بیوتین | 10 | mg |
| پیریدوکسین HCl | 20 | mg |

## طرز تهیه محلول برموتیمول بلو

| | | |
|---|---|---|
| پتاس | مولار | ۲/۰ |
| برموتیمول بلو | | ٪۵/۰ |

۰/۰۴ سی سی سولفیت آهن یا کلرید آهن به EDTA اضافه می کنیم .

- برای تهیه محیط کشت نصف آب لازم را در داخل ارلن می ریزیم و سپس بقیه ی مواد لازم را اضافه کرده و نهایتاً آگار را اضافه می کنیم . قبل از اضافه کردن آگار pH را روی ۸/۶ تنظیم می کنیم برای تنظیم pH از KOH استفاده می کنیم در حالی که در محیط های دیگر از NaOH استفاده می شد . برای محیط اسیدی از HCl استفاده می کنیم . سپس محیط را می جوشانیم تا آگار ذوب شود . محیط به صورت نیمه جامد است چون آگار کمی دارد . (کمتر از۰/۴ ) بعد به میزان ۵ سی سی در لوله ها توزیع می کنیم و سپس پنبه روی دهانه لوله ها می گذاریم و محیط را استریل می کنیم.

۳) اگر نمونه ریشه بود با وایتکس یا ساولون ضدعفونی کرده سپس با آب مقطر می شوییم. سپس در هاون استریل می کنیم و عصاره ی آن را می گیریم . از نمونه مایع ۰/۱ سی سی روی سطح لوله می ریزیم و اگر خود ریشه باشد در عمق محیط کشت فرو می بریم و اگر نمونه خاک بود ۰/۱ سی سی از خاک رقیق شده (۱۰ گرم در صد لیتر) در سطح تلقیح می کنیم.

۴) یک هفته در دمای ۲۵ درجه قرار می دهیم.

۵) ظاهر شدن حلقه معمولاً دو میلی متر پایین تر از سطح تشکیل می شود و شروع به رشد می کند و لوله از سبز به زرد تغییر رنگ می دهد . آزواسپریلیوم مانند چتری در داخل محیط کشت رشد می کند.

۶) از کلنی ها برداشته رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم . مرفولوژی باکتری گرم منفی و نسبتاً خمیده است . (شبیه ویبریو) از روی محیط کشت چتر مانند می توان برداشته و به محیط PDA و اسید مالیک منتقل کرده در مقابل نور کلنی صورتی رنگ می دهد. ولی در تاریکی کلنی شیری رنگ می دهد.

۶) از کلنی ها برداشته رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم . مرفولوژی باکتری گرم منفی و نسبتاً خمیده است . (شبیه ویبریو) از روی محیط کشت چتر مانند می توان برداشته و به محیط PDA و اسید مالیک منتقل کرده در مقابل نور کلنی صورتی رنگ می دهد. ولی در تاریکی کلنی شیری رنگ می دهد.

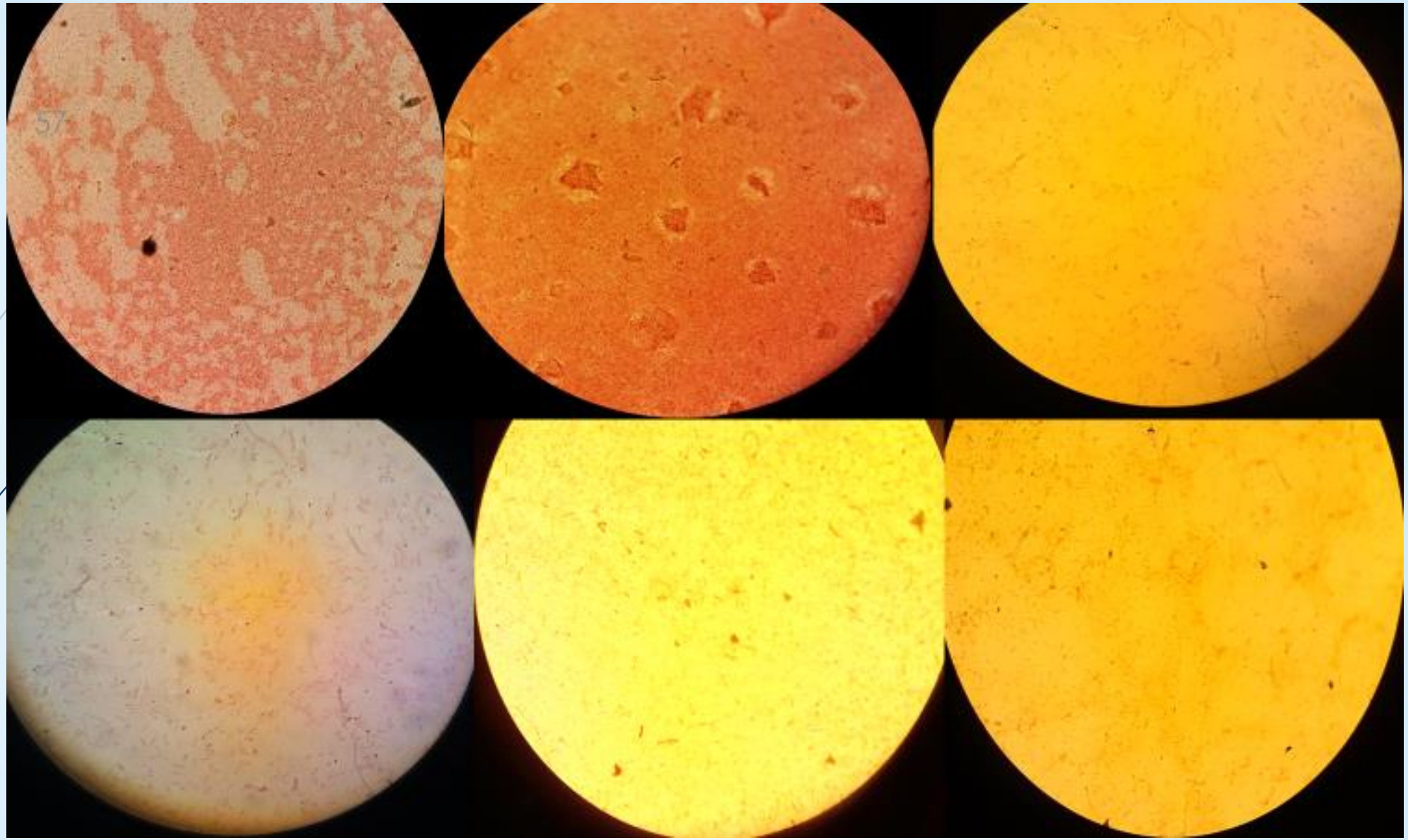
نکته :

اگر از خاک استفاده می شود چون خاک دارای منبع ازت است بهتر است پاساژهایی به محیط دیگر داده شود تا منبع ازت حذف شود .

- از محیط NFB نیمه جامد و نهایتاً به NFB جامد انتقال می دهیم . سپس از محیط جامد تک تک کلنی ها را به محیط جامد دیگر که حاوی نشاسته باشد انتقال می دهیم.
- PDA بدین منظور از همه مناسب تر است. یکی از پلیت ها را در نور و پلیت دیگر را در تاریکی اتوگذاری می کنیم.

# خصوصیات آزواسپریلیوم :

- اکسیداز، فسفاتاز و اوره آز مثبت است.
- از قند ها اسید تولید نمی کند. بطوریکه مصرف لاکتوز، ساکارز، رامنوز، دولسیتول در آن منفی است.
- تولید اندول و پیگمان محلول در آب نمی کند .
- روی نشاسته و ژلاتین هم قادر به رشد نیست.



با سپاس فراوان از توجه شما