



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه میکروب پایه

جداسازی میکروارگانیسم های خاک



مقدمه

میکروبیولوژی خاک شاخه‌ای از علم خاک است که به میکروارگانیسم‌های ساکن در خاک، نقش و فعالیت آن‌ها در اکوسیستم خاک می‌پردازد. میکروبیولوژی خاک یک موضوع بین رشته‌ای است که ارتباط نزدیکی با بیوشیمی خاک و اکولوژی میکروبی دارد که شامل درک اصول علم خاک، میکروبیولوژی و شیمی سیستم‌های بیولوژیکی است.



- دو رویکرد اصلی برای میکروبیولوژی خاک وجود دارد:
- مطالعه موجودات از طریق فیزیولوژی و طبقه‌بندی
 - تمرکز بر فرآیندهای میکروبی در خاک

خاک زیستگاهی متنوع با شرایط نوسانی برای رشد میکروبی است.

میکروارگانیزم‌های موجود در خاک فراوان هستند و فعالیت‌های متابولیکی مختلفی از خود نشان می‌دهند که برای چرخه مواد مغذی و حذف آلاینده‌ها ضروری است. خاک طیف وسیعی از بسترها را برای میکروارگانیزم‌ها ارائه می‌دهد، از قندهای ساده گرفته تا مواد پیچیده مانند هوموس.



خاک حاوی انواع مواد مغذی و عناصر ضروری است که آنرا به زیستگاه طیف متنوعی از میکروارگانیسم‌ها تبدیل می‌کند.

میکروارگانیسم‌های موجود در میکروبیولوژی خاک به هفت گروه تقسیم می‌شوند: باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، جلبک‌های سبز آبی، اکتینومیسیت‌ها، تک‌یاخته‌ها و نماتدها.

هر گروه دارای ویژگی‌های متمایزی است و نقش منحصر به فردی در اکوسیستم خاک ایفا می‌کند.



در میکروبیولوژی خاک، میکروارگانیسم‌ها را می‌توان هم در خاک سطحی و هم در خاک زیرسطحی یافت. اما به دلیل محتوای کمتر مواد آلی، تعداد آن‌ها به طور کلی با عمق کاهش می‌یابد.

ترکیب جامعه میکروبی ممکن است بسته به شرایط محیطی متفاوت باشد. توزیع میکروارگانیسم‌ها در مناطق مختلف خاک متفاوت است، به طوری که ریزوسفر (Rhizosphere) منطقه‌ای که مستقیماً تحت تأثیر ریشه‌های گیاه است - میزبان غلظت بیشتری از میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با سایر مناطق خاک است.

در ریزوسفر، ریشه‌های گیاه ترکیباتی را آزاد می‌کنند که از جمعیت میکروبی فراوان‌تر و فعال‌تری نسبت به خاک توده اطراف حمایت می‌کنند.



میکروارگانیزم‌های موجود در میکروبیولوژی خاک به هفت گروه تقسیم می‌شوند: باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، جلبک‌های سبز آبی، اکتینومیسیت‌ها، تک‌یاخته‌ها و نماتدها. هر گروه دارای ویژگی‌های متمایزی است و نقش منحصر به فردی در اکوسیستم خاک ایفا می‌کند.



آزمایش میکروبی خاک

- اکتینومیستها (Actinoplanetes , nocardioforms , and streptomycetes) ، باکتریهای دیگر،
- و قارچهای رشته ای (ریزوپوس ، ماکور، پنی سیلیوم، و آسپرژیلوس) اعضای مهم جمعیت میکروبی خاک هستند.
- پروتوزوئرها ، جلبکها ، سیانوباکتریها، نماتودها ، حشرات و دیگر بی مهره گان ، و ویروسها نیز اعضای مهمی هستند ولی در اینجا تنها بر روی باکتریها تمرکز داریم. هر گرم از یک خاک غنی باغ حاوی میلیونها میکرو ارگانیسم می باشد.
- در این آزمایش هدف شمارش تعداد باکتریها و قارچهای خاکی در یک گرم با روش کلنی کانت می باشد.

مواد و سایل لازم:

- نمونه خاک
- ارلن حاوی ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل
- لوله های حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل
- پلیت نوترینت آگار
- پی پت استریل
- پلیت حاوی PDA

روش کار:

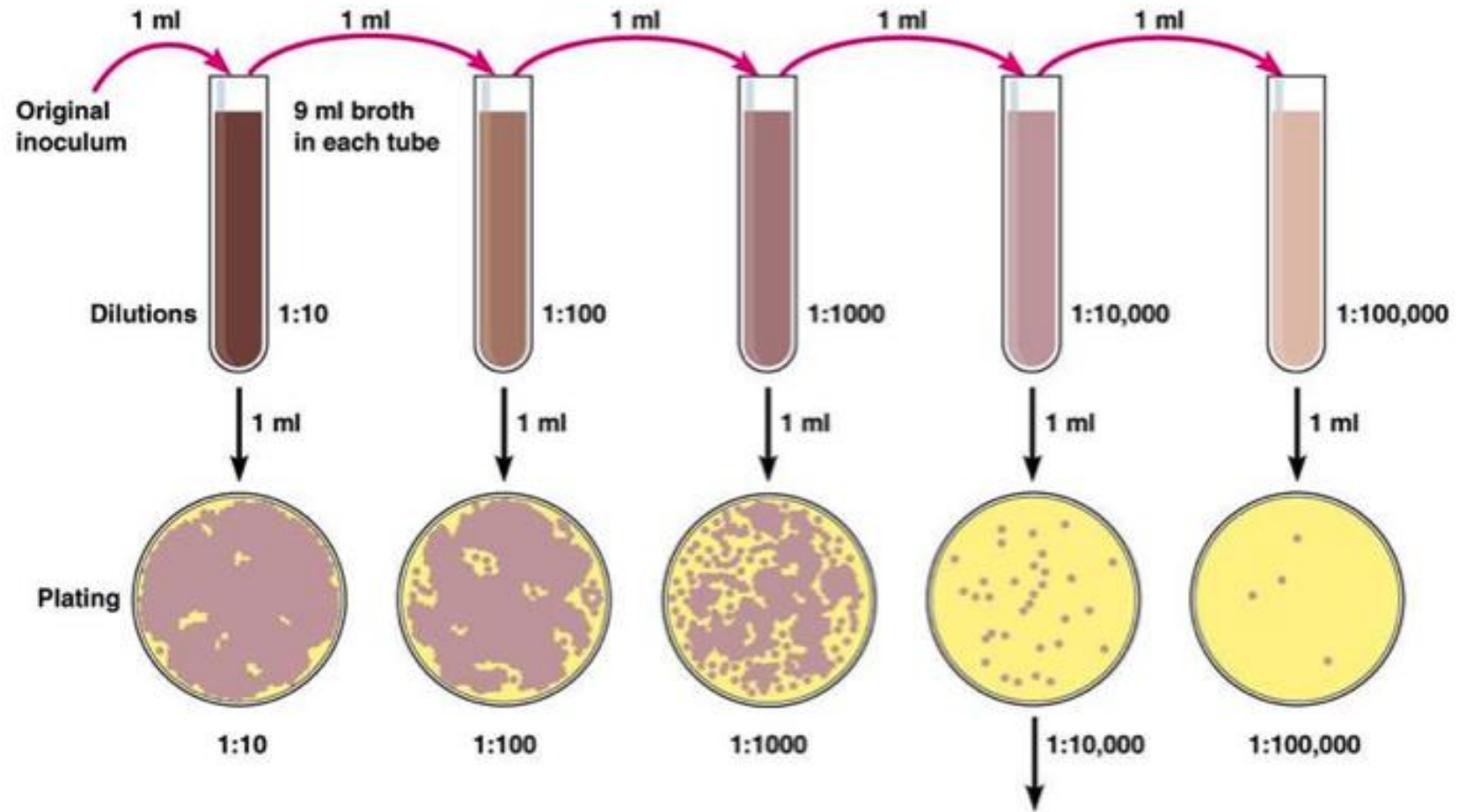
- ابتدا بوسیله تراز و یک گرم خاک پودر و سائیده و الک شده را وزن کرده و آنرا در ارلن حاور ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته و ارلن را بهم می زنیم تا ذرات خاک از هم باز شده و کلیه میکروبها در آب پخش شوند.

- سپس چند دقیقه ارلن را ساکن می گذاریم تا ذرات درشت ته نشین شوند و بعد از آن بوسیله پیت ۱ میلی لیتر از آنرا به لوله محتوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل منتقل می کنیم و مطابق شکل رفتهای دیگر را نیز تهیه می کنیم.

- پس از تهیه رقتها از سه رقت نهایی برای شمارش استفاده می کنیم. با پیت استریل ۱/۰ میلی لیتر به پلیت نوترینت آگار و اسی سی به پلیت PDA منتقل می کنیم و بوسیله میله شیشه ای سر کج استریل شده در الکل آنرا بطور یکنواخت در سطح پلیت پخش می کنیم.

- پلیت های نوترینت آگار را برای رشد باکتریها بمدت ۲۴ ساعت در اتوو ۳۷ درجه قرار داده و پلیت PDA را برای رشد قارچها به مدت ۴ تا ۷ روز در حرارت ۲۵ تا ۳۰ درجه با حرارت محیط قرار دهید.

- پس از زمانهای فوق برای شمارش باکتریها و قارچهای خاک به آزمایشگاه مراجعه کرده و پلیت هایی که از نظر تعداد کلنی قابل شمارش هستند را استفاده کرده و باکتریها و قارچها را شمارش کنید و اگر نیاز شد از نتایجتان میانگین تهیه نمایید.



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
 (For example, if 32 colonies are on a plate of $1/10,000$ dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000$ bacteria/ml in sample.)

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- تعداد باکتری در یک گرم = تعداد کلنی شمرده شده \times ضریب حجم \times ضریب رقت
- ضریب رفت عکس رقت استفاده شده و ضریب حجم عکس حجم استفاده شده می باشد که چون ۰/۱ سی سی برداشت کردیم ضریب حجم ۱۰ می شود.
- تعداد قارچهای موجود در یک گرم خاک = تعداد کلنی شمارش شده قارچ \times ضریب رقت
- بدلیل استفاده از ۱ سی سی حجم نمونه ، ضریب حجم برابر ۱ می شود.

با تشکر از حسن توجه شما

مستحق از حسن توجه شما

