دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

گزارش کار آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جدا سازی و مطالعه ی باکتری های تثبیت کننده ی ازت

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- ازت مولکولی که حدود چهار پنجم حجم جو زمین را تشکیل می دهد ، تقریباً برای کلیه ی موجودات اعم از حیوان و گیاه ، علی رغم نیاز شدیدی که به این ماده دارند ، غیر قابل استفاده است . محصولات کشاورزی جهان سالانه ۱۰۰ میلیون تن ازت از خاک خارج می کنند .
- بعضی از باکتریها به صورت همزیست و بعضی به صورت آزاد همچنین به صورت هوازی و بی هوازی قادر به تثبیت ازت می باشند .

- اصولاً در حالت غیر همزیستی ، باکتریها و جلبک های آبی مایل به سبز رنگ دو گروه اصلی تثبیت کننده ازت محسوب می شوند . مهم ترین باکتریهای تثبیت کننده ازت از خانواده ازتوباکتریاسه و باسیلاسه هستند علاوه بر آن ها گونه هایی از جنس های مختلف دیگر و بعضی باکتریهای فتوسنتتیک نیز تا حدودی قادر به انجام این عمل هستند .

خانواده ازتوباکتریاسه Azetobacteracaea

- باکتریهای این خانواده همگی هتروتروف ، هوازی مطلق ، فاقد اسپور ، گرم منفی و تثبیت کننده ازت هستند . مهمترین گونه های تثبیت کننده ازت به ترتیب اهمیت در سه جنس ازتوباکتر (Azotobacter) بیزرنکیا (Beigerinckia) ، درکسیا (Derexia) قرار می گیرند .
- این باکتریها به اندازه و شکل های مختلفی دیده می شوند به جز گونه ی بیژرنکیا که فاقد تاژک است سایر گونه ها به وسیله ی تاژکهای متعدد اطراف سلولی حرکت می کنند . کلیه گونه های این باکتریها مولد کیست هستند .

- هنگامی که میکروارگانیسم به کیست تبدیل می شود تحرک خود را از دست می دهد و شکل ظاهری آن تغییر می کند (به صورت سلول های کوچک مدور به قطر ۲-۱ میکرون در می آیند .)
- ذخیره چربی در این باکتریها پلی بتا هیدروکسی بوتیریک اسید است .
- کیست باکتری از دو لایه تشکیل شده است . کیست داخلی ازج نس پلی ساکارید است و کیست خارجی از جنس لیپوپلی ساکارید همراه با یون کلسیم و گاهی همراه با سیلیس می باشد . به خاطر وجود این کیست ، میکروارگانیسم برایم دت ها قادر به تحمل درجه حرارت صفر درجه می باشد . معمولاً فلور میکربی ازتوباکتر خاک در زمستان کاهی می یابد .

- با وجود که مقدار ازت تولیدی توسط ازتوباکتر در مقایسه با باکتری های همزیست بسیار کم می باشد . (۵/۲-۲/۰ کیلوگرم ازت در سال به هر هکتار در مقایسه با ازت اضافه شده توسط ریزوبیوم که در حدود ۳۰۰ کیلوگرم ازت در سال به هر هکتارخ اک است) ولی در مناطقی که گیاهان تیره لگومینوز کاشته نمی شوند ، دانه های گیاهان را با ازتوباکتر آغشته می کنند که به این عمل باکتریزاسیون می گویند .

- باکتریزاسیون با ازتوباکتر باعث رشد سریع دانه می شود زیرا نه تنها تثبیت ازت را انجام می دهد ، بلکه با تولید ویتامین و هورمون رشد جیبرلین و اسیدهای آمینه ضروری برای رشد سرعت رشد را افزایش می دهد . این باکتری همچنین با تولید آنتی بیوتیک از رشد بعضی از قارچها مانند فوزاریوم جلوگیری می کند .
- از تجزیه DNA ازتوباکترها نتیجه شده است که درصد مجموع گوانین و سیتوزین (C+G) بعضی از گونه ها تفاوت قابل ملاحظه ای دارند . بر اساس مشابهت DNA، گونه ها را به گروه های کروکوکوم ، بیژرنکیا ، و نیلاندی و آژیلیس تفکیک کرده اند .
- ازتوباکترها می توانند ازت مورد نیاز خود را از ترکیب های مختلفی مانند نمک های آمونیاکی ، اوره ، بعضی از اسید های آمینه بخصوص آسپارتیک و گلوتامیک اسید تأمین نمایند .

به علاوه اغلب سوشهای آن قاد به مصرف نیتریب و یا نیتراتهای مختلف هستند ولی در صورتیکه محیط رشد آن ها فاقد ترکیبات ازت دار بوده و یا مقدار این مواد خیلی خیلی کم باشد به تثبیت ازت می پردازند .

از این باکتری ها استفاده های زیادی می شود .

- ۱- تهیه ی پلاستیکهای تجزیه شونده : برای تهیه ی نخهای بخیه کاربرد دارد .
- ۲- استخراج آلژینات : ترکیبی گرانقیمت است که در دندانپزشکی کاربرد دارد .
- ۳- در تهیه نانوتیوب و نانوفیلتر در نانوتکنولوژی
- ۴- درمان سرطان و انتقال ژن های نوترکیب .
- از بین ازتو باکتر و نیلاندی گونه ای است که چربی فراوان تولید می کند .

خانواده ی باسیلاسه

- از این خانواده که شامل باکتریهای میله ای شکل ، گرم مثبت و تولید کننده ی اسپور داخلی است گونه های جنس کلستریدیوم اهمیت زیادی در تثبیت ازت مولکولی دارند به علاوه قدرت تثبیت در بعضی گونه های باسیلوس نیز دیده شده است .

- گونه ی اصلی این جنس از لحاظ تثبیت ازت کلستریدیوم پاستورانیوم است . اسپور آن ها اکثراً بیضی شکل بوده و به علت قطر بیشتری که نسبت به باکتری دارد پس از تشکیل آن ، سلول کمی متورم شده تقریباً حالت دوکی شکل پیدا می کند .
- در بین گونه های باسیلوس ، گونه ی باسیلوس پلی میکسا که بی هوازی اختیاری است ، باسیل تثبیت کننده ازت شناخته شده است . ولی عمل تثبیت ازت را فقط در شرایط بی هوازی انجام می دهد . گونه های ماسرانس و سرکولانس هم که بی هوازی اختیاری هستند تثبیت ازت را فقط در شریاط بیهوازی انجام می دهند .

باکتری های فتوتروف

- بدلیل بیهوازی بودن و در عین حال احتیاج به نور بیشتر در سطح آبهای شیرین و گاهی شور ، چشمه های گوگردی حاوی هیدروژن سولفوره و یا در گل و لای ، لجنزارها و زمینهای خیلی مرطوب و غرقابی به سر می برند .
- مهم ترین اختلاف فتوسنتز این باکتریها با گیاهان در این است که برای احیای CO_2 گیاهان از آب و باکتریها معمولاً از ترکیب های گوگردی احیا شده مانند هیدروژن سولفوره و سولفورها به عنوان دهنده هیدروژن و یا الکترون استفاده می کنند و به همین دلیل باکتریهای گوگردی هم خوانده می شوند . از این خانواده گونه هایی از جنس ردوسپریلیوم ، ردوسودوموناس و ردومیکروبیوم در تثبیت ازت دخالت دارند .

- باکتریهای دیگری نظیر کلبسیلا پنومونیا (آئوباکتر آئروموناس) ، انتروباکتر کلوواک ، اشریشیا انتریدیا و یا باکتریهای بی هوازی ، انواع احیا کننده های سولفات از جنس دسولفوویبریو و دسولفوتوماکولوم قادر به تثبیت ازت هستند .
- بعضی از انواع جلبک ها نیز قادر به تثبیت ازت می باشند . سرعت تثبیت ازت بوسیله ی جلبکها کندتر از
باکتری ها است ، اضافه کردن مقداری از ترکیبات مدنی ازت دار به محیط کشت ، سبب کاهش و یا توقف تثبیت ازت می شود ولی شدت تأثیر آن روی جلبک ها خیلی کمتر از باکتریهاست .

- تثبیت ازت در قارچ ها ، بیشتر در مخمر ها به خصوص انواعی از جنس ساکارومایسس مشاهده شده است . در راسته اکتینومیستال نیز قدرت تثبیت ازت مولکولی بندرت در بعضی انواع مثل نوکاردیا ، رتیکولوباکتریوم (گونه ی فلاووم) به عنوان تثبیت کننده ازت مولکولی معرفی شده اند .
- مهم ترین آنزیمی که در تثبیت ازت دخالت دارد نیتروژناز است ، در سیستم نیتروژناز باکتری فلز اهن و مولیبدن در ساختار آن وجود دارد و برای فعالیت آن ضروری است . کمبود اینها در محیط کشت می تواند مانع از فعالیت سیستم نیتروژناز شود .

سنجش نیتروژناز Assay Nitrogenous

- ۱- استفاده از ترکیباتی مانند استیلن ، نیتروژن سیانید یا نیتروز اکساید :
- نیتروژناز این ترکیبات را احیا می کند .

نحوه سنجش :

- باکتری را در لوله ای قرار می دهند و درب آن را با پلیمرهای پلاستیکی مناسب می پوشانند . مقداری گاز استیلن به داخل لوله تزریق می کنند سپس لوله را به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می کنند . نیتروژناز استیلن را به اتیلن احیا می کند . پس از این مدت ، با سرنگ حجم معینی از گاز بالای لوله را استخراج می کنند .
- توسط تکنیک (gc (gas chromatographyمیزان اتیلن تعیین می شود که معیاری برای سنجش آنزیم نیتروژناز است.
- ۲- استفاده از متد Kejeldal
- این تکنیک در دسترس تر می باشد . در این روش باکتری را روی محیط کشت فاقد ازت کشت می دهند . پس از رشد باکتری محیط کشت (مایع) را ابتدا با اسید غلیظ H2SO4همراه با حرارت هضم اسیدی – حرارتی می کنند به این صورت که ابتدا اسید اضافه می کنند و سپس روی هیتر حرارت می دهند . ازت کلی تولید شده با استفاده از متد Kejeldalتعیین می شود . به این ترتیب میزان نیتروژناز سنجیده می شود .

جدا سازی ازتوباکتر

- ازتوباکتر جنسِ اول از خانواده Azetobacteracaea می باشد . گرم منفی ، کروی و نسبتاً درشت و دارای کپسول بزرگی در اطراف آن می باشد که در خاک های حاصلخیزی که pH نزدیک خنثی دارند ظاهر می شود متحرک یا غیر متحرک هستند و به واسطه داشتن کیست قادر به تحمل شرایط نامساعد در محیسط است .
ازتوباکتر را می توان به راحتی ازخ اک جدا کرد . زیرا در محیط های فاقد آمونیاک به خوبی رشد می کند . در حالیکه اکثر باکتریهای تثبیت کننده ازت را در شرایط بی هوازی در محیط فاقد ازت رشد می کنند .

روش کار

۱. آماده کردن نمونه :

- نمونه مناسب برای جداسازی ازتوباکتر خاک های تازه از باغچه یا مزرعه می باشد ولی خاک هایی که به تازگی به آن ها کود اضافه شده است مناسب نمی باشند .

۲. خا را ساییده و الک می کنیم .

۳. مقداری از خاک را به حالت نمک پاش روی محیط ازتوباکتر می بریم .

طریقه ساخت محیط ازتوباکتر به شرح زیر می باشد :

Manitol	2	gr
KH_2PO_4	0/075	gr
K_2HPO_4	0/025	gr
$MgSO_4 + 7H_2O$	0/05	gr
$FeSO_4$	0/04	gr
Na_2MoO_4	0/002	gr
$CaCO_3$	0/3	gr
Agar	2	gr
D.W	100	ml

ابتدا نمک ها را وزن کرده و درون ارلن ریخته و آب را به آن اضافه می کنیم بعد pH را روی ۲/۷ با استفاده از سود نرمال تنظیم می کنیم و بعد آگار را اضافه می کنیم و پس از تهیه آن را استریل کرده و در پتری دیش ها می ریزیم .

این محیط کلی است اما با تغییر منبع کربن می توان آن را اختصاصی کرد . به طور مثال :

مانیتول برای جداسازی ازتوباکتر کروکوکوم

ساکارز برای جداسازی درکسیا

نشاسته برای جداسازی ازتوباکتر ونیلاندی

بنزوات سدیم برای جداسازی آزوموناس

۴. پلیت را در دمای ۲۵ تدرجه به مدت یک هفته قرار می دهیم . (پلیت را بر نمی گردانیم)

۵. بعد از یک هفته ابتدا ظاهر کلنی را بررسی می کنیم .

کلنی های بزرگ ، کرم رنگ ، موکوییدی

۶. از کلنی ها رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم .

مرفولوژی باکتری به صورت دوتایی ، گرم منفی ، کپسول دار ، کوکوباسیل

۷. رنگ آمیزی سودان سیاه جهت بررسی دانه های چربی انجام می دهیم .

روش رنگ آمیزی سودان سیاه :

۱- تهیه فروتی ، ۲- تثبیت ، ۳- فروبردن در رنگ سودان سیاه به مدت ۲۰ دقیقه ،

۴- گزیلل به مدت ۱ دقیقه ، ۵- سافرانین به مدت ۱ دقیقه ،

۶- شستشو

- ۸. خشک کردن و دیدن زیر میکروسکوپ
- در این حالت باکتریها به رنگ قرمز و دانه های چربی به رنگ سیاه داخل باکتریها دیده می شوند .
- ۹. جهت مطالعه کیست باکتریها پلیت را بعد از رنگ آمیزی یک هفته دیگر درون انکوباتور ۲۵ درجه قرار می دهیم .
- بعد از یک هفته ظاهر کلنی ها از کرم رنگ به قهوه ای تغییر شکل می دهند .
- سپس یه رنگ آمیزی ساده با سافرانین از کلنی انجام می دهیم در زیر میکروسکوپ کیست به صورت لایه های چنی خورده دیده می شود هرچه کیست رسیده تر باشد لایه های چین خورده بیشتر دیده می شود بعضی دیگر از باکتریهای تثبیت کننده مانند آزوموناس ممکن است در این محیط رشد کنند . ولی این باکتریها میله ای شکل و درشت می باشند و فاقد کیست می باشند .

- 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 از ۴/۰) 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 .

azetobacter

Dereksia

رنگ آمیزی سودان سیاه ازتوباکتر

با سپاس فراوان از توجه شما