دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

گزارش کار آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جداسازی و مطالعه ی باکتری های اکسید کننده نیتریت و آمونیاک

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- نیتریفیکاسیون از دو بخش اکسید شدن آمونیاک و اکسید شدن نیتریت تشکیل شده است . نیتریفیکاتورها به طور گسترده در خاک و آب وجود دارند . نیتروزوموناس آمونیاک را به نیتریت و نیتروباکتر نیتریت را به نیترات اکسید می کند . باکتری های هتروتروف و قارچ ها قادرند از آمونیاک نیتریت و یا نیترات تولید کنند ولی میزان آن بسیار ناچیز است .

- اکسیژن مولکولی و آنزیم مونو اکسیژناز برای اکسید شدن آمونیاک نیاز است . اولین محصول حاصل از اکسید شدن آمونیاک هیدروکسیل آمین (NH_2OH) است و انرژی در این مرحله حاصل نمی شود . هیدروکسیل آمین به نیتریت اکسید می شود و ATP از طریق NADH و فسفوریلاسیون تولید می گردد .

- انرژی حاصل از اکسیداسیون نیتریت و آمونیاک ناچیز می باشد و به همین علت این باکتریها کند رشد هستند و حداقل دو هفته رشد آن ها طول می کشد آنزیم های مهمی در اکسیداسیون نیتروژن نقش دارند . آمونیاک مونواکسیژناز و هیدروکسیل آمین اکسید و ردوکتاز در اکسید کردن آمونیاک به هیدروکسیل آمین و نیتریت موثر می باشند . آنزیم آمونیاک مونواکسیژناز جزو پروتئین درونی غشا است . در حالی که هیدروکسیل آمین اکسید و ردوکتاز در غشا می باشد . سیتوکروم C وا بی کوئینون در انتقال الکترون نقش دارند . باکتری های اکسید کننده نیتریت حاوی آنزیم نیتریت اکسیداز می باشند ستوکروم a و b انتقال دهنده الکترون هستند .

جداسازی باکتری های اکسید کننده آمونیاک و نیتریت

- باری جداسازی این باکتری ها باید مطمئن شد باکتری جدا شده در محیط غنی رشد نمی کند چون ممکن است باکتری همراه با اباکتری های هتروتروف باشد .

- گرچه نیتریفیکاتور ها اتوتروف می باشند ولی نیتروباکتر می تواند از استات و پرووات استفاده کند .

- باکتری های اکسید کننده آمونیاک اتوتروف اند و از آمونیاک به عنوان تنها منبع انرژی و ازت استفاده می کنند . این باکتری در همه جا و به صورت پراکنده وجود دارند ولی معمولاً باکتری های الیگوتروف (باکتری های گرسنه پسند) و یا باکتری های هتروتروف مانع رشد و جداسازی این باکتری ها می شوند . اگر در آب مقطر میزان ناچیزی ماده ی آلی موجود باشد الیگوتروف ها رشد می کنند و مانع جداسازی این باکتری ها می شوند . اگر ماده آلی حتی در الیگوتروف ها نسبت به اتوتروف ها غالب خواهند شد .

- (زمان تقسیم هتروتروف ها خیلی کوتاه است و زمان تقسیم الیگوتروف ها نسبت به اتوتروف ها پایین تر است)

- بنابراین به شرطی می توانیم آن ها را جداسازی کنیم که بتوانیم رشد باکتری های هترورتروف و الیگوتروف را محدود کنیم برای این کار از آب مقطر دیونیزه و مواد کاملاً خالص استاندارد مرک استفاده کرد که عاری از مواد آلی باشد .

- حتی آزمایشگاه های مطالعه باکتری های اتوتروف باید از آزمایشگاه های دیگر جدا باشد . چون وجود متان ، اتانول ، فرم آلدئید ، متانول در هوا مانع از رشد این ارگانیسم ها می شوند .

- بعضی از مواد مانند بی کربنات به عنوان ماده ی اشتها آور می باشد چون گاز کربن دی اکسید برای اکسیداسیون آمونیاک نیاز دارند .

- باکتری اکسید کننده ی آمونیاک ، آمونیاک را به انرژی و نیتریت تبدیل می کند . انرژی حاصل از میکرو ارگانیسم ها خیلی جزئی است به همین جهت کند رشد هستند و هم در محیط هایی که حاوی مواد آلی باشند رشد نمی کنند . با حفظ این شرایط باکتری ها را در محیط کشت مایع غنی می کنند و بعد از چند بار انتقال آن ها در محیط حاوی آمونیاک و آگارز جداسازی می کنند . کلنی های این باکتری بسیار ریز و چسبنده به سطح آگار می باشند و برای مشاهده ی آن از میکروسکوپ و یا لوپ استفاده می کنند .

- انتقال کلنی های خالص به محیط کشت مایع و در محیط کشت مایع بعد از ۲۱ روز نمایان گر جداسازی باکتری های اکسید کننده آمونیاک می باشد . تمام باکتری های اکسید کننده آمونیاک هوازی کاتالاز (+) ، گرم منفی مانند نیتروزوکوکوس کوکسی گرم منفی و نیتروزوموناس میله ای گرم منفی .

- باکتری اکسید کننده نیتریت نیز تمام شرایط تمام شرایط باکتری های اکسید کننده ی آمونیاک را دارد . بدین معنا که نیتریت را به عنوان تنها منبع انرژی استفاده می کنند . از اکسیداسیون نیتریت نیترات تولید شده و انرژی حاصل از این اکسیداسیون بسیار ضعیف است به همین جهت مانند باکتری های اکسید کننده ی آمونیاک کند رشد هستند .

- به عنوان مثال می توان نیتروباکتر را نام برد که باکتری گرم منفی هوازی کاتالاز مثبت حساس به ترکیبات آلی اتمسفر می باشد .

- فرم آلدهید اتروکلروفرم رشد باکتری را متوقف می کند . بنابراین برای هر دو باکتری ابتدا در سطح محیط مایع حاوی آمونیاک و نیتریت باکتری غنی سازی شده بعد از سه بار پاساژ در این محیط ها روی محیط جامد حاوی آگارز جداسازی می شوند این گونه باکتری ها کاربرد مهمی دارند چون هیچ نوع باکتری الیگوتروف و هتوتروفی قادر نیست آمونیاک را با غلظت بالا تحمل کنند و یا قادر به حذف آن نمی باشند

- حتی باکتری های هتروتروفی هستند که آمونیاک را جذب می کنند ولی هنگام مرگ آن را رها می کنند .
- در حالی که باکتری های اتوتروف از آمونیاک نیترتی تولید می کنند و چون باکتری ها نیتریت را به نیترات تبدیل می کنند در اثر دنیترنیکاسیون آمونیاک کاملاً جذب می شود . این باکتری ها کاربرد هایی در زمینه ی حذف آلودگی آمونیاکی از پساب ها و حوضچه های پرورش ماهی دارند . همچنین از غشاهای این باکتری در نانوتکنولوژی برای تبدیل آمونیاک به نیتریت و همچنین برای اکسیداسیون موادی مانند ترا اتیلن کلراید استفاده می کنند .

روش کار

۱. نمونه مورد استفاده خاک می باشد .

۲. نمونه خاک رابه میزان نیم گرم به صورت خاک الک شده و آماده به محیط نیتروزوموناس و یک گرم و نیتروباکتر تلقین می کنیم .

- **طرز تهیه محیط نیتروزوموناس و نیتروباکتر**
- **محیط کشت نیتروزوموناس**

$CaCO_3$	gr	0/5
$MgSO_4$	gr	0/5
K_2HPO_4	gr	1
NaCl	gr	2
$FeSO_4$	gr	a little
D.W.	Lit	1

- سولفات آمونیوم به عنوان انرژی و ازت چون اتوتروفند منبع کربن ندارند و از گاز دی اکسید کربن استفاده می کنند .

- پس از استریل (۲۵ میلی لیتر در هر ارلن) ۴ قطره سولفات آمونیوم یک درصد و ۵/۰ گرم کربنات کلسیم خشک اضافه می کنیم . به خاطر وجود Ca محیط کشت سفید است .

- **محیط کشت نیتروباکتر**

Na_2CO_3	gr	1
K_2HPO_4	gr	1
$FeSO_4$	gr	a little
NaCl	gr	0/5
$MgSO_4$	gr	0/5
D.W.	Lit	1

- پس از استریل (۵۰ میلی گرم در هر ارلن) ۴ قطره نیتریت سدیم ۱۰٪ اضافه می کنیم . نیتریت سدیم منبع انرژی و ازت می باشد .

- علت اینکه بعد از استریل اضافه می کنیم برای این است که واکنش صورت نگیرد .

۳. محیط های آماده نیترو باکتر و نیتروزوموناس را روی شیکر برای هوادهی در دمای محیط می گذاریم . بعد از یک هفته محیط کشت را از نظر تولیدات ترکیبات معدنی با استفاده از معرف ها می سنجیم .

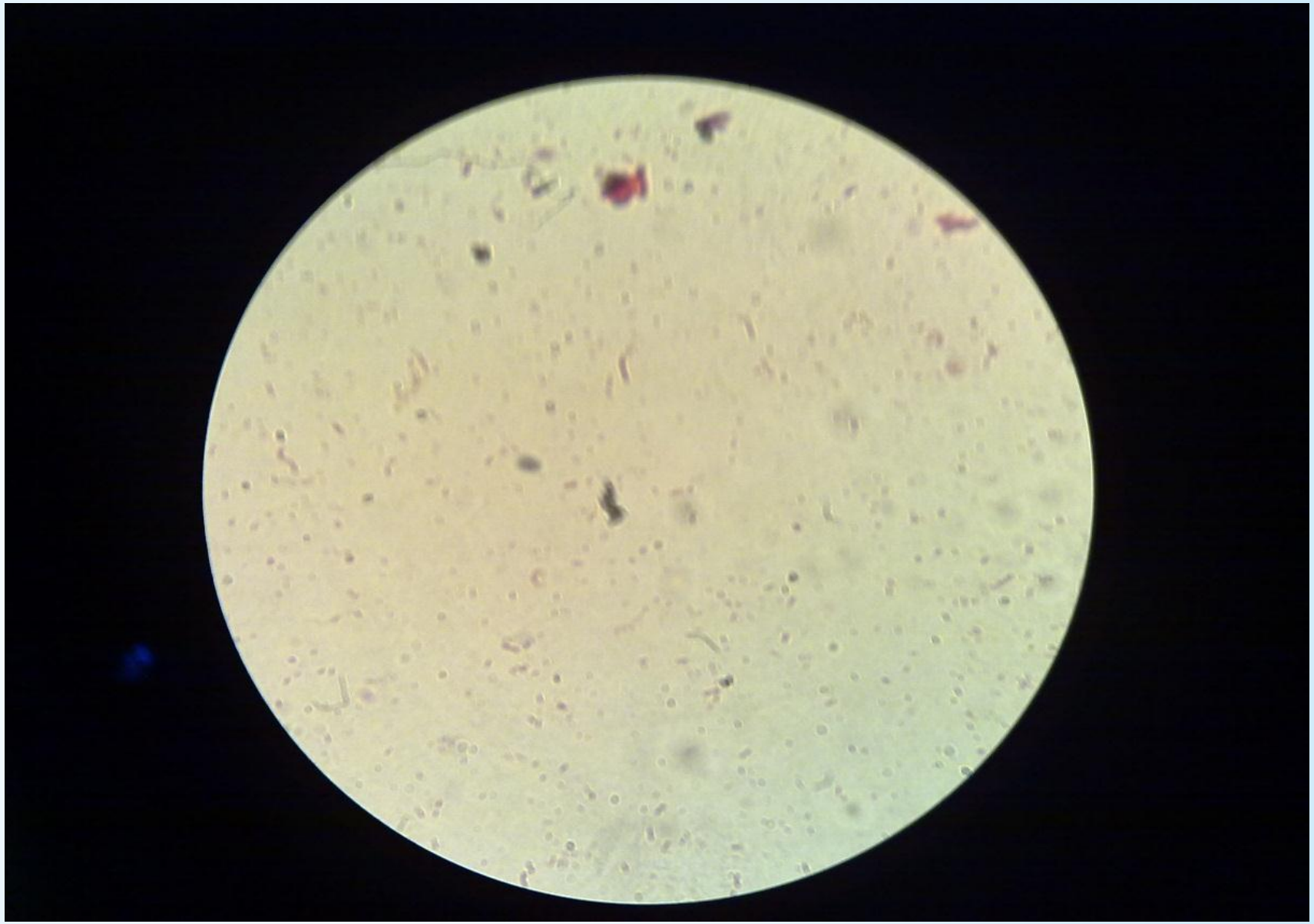
- برای تشخیص نیتریت از معرف α نفتیل آمین و اسید سولفانیلیک استفاده می کنیم . رنگ قرمز نشان دهنده ی نیتریت می باشد .
- برای تشخیص نیترات ازم عرف دی فنیل آمین استفاده می کنیم رنگ آبی نشان دهنده ی وجود نیترات است .

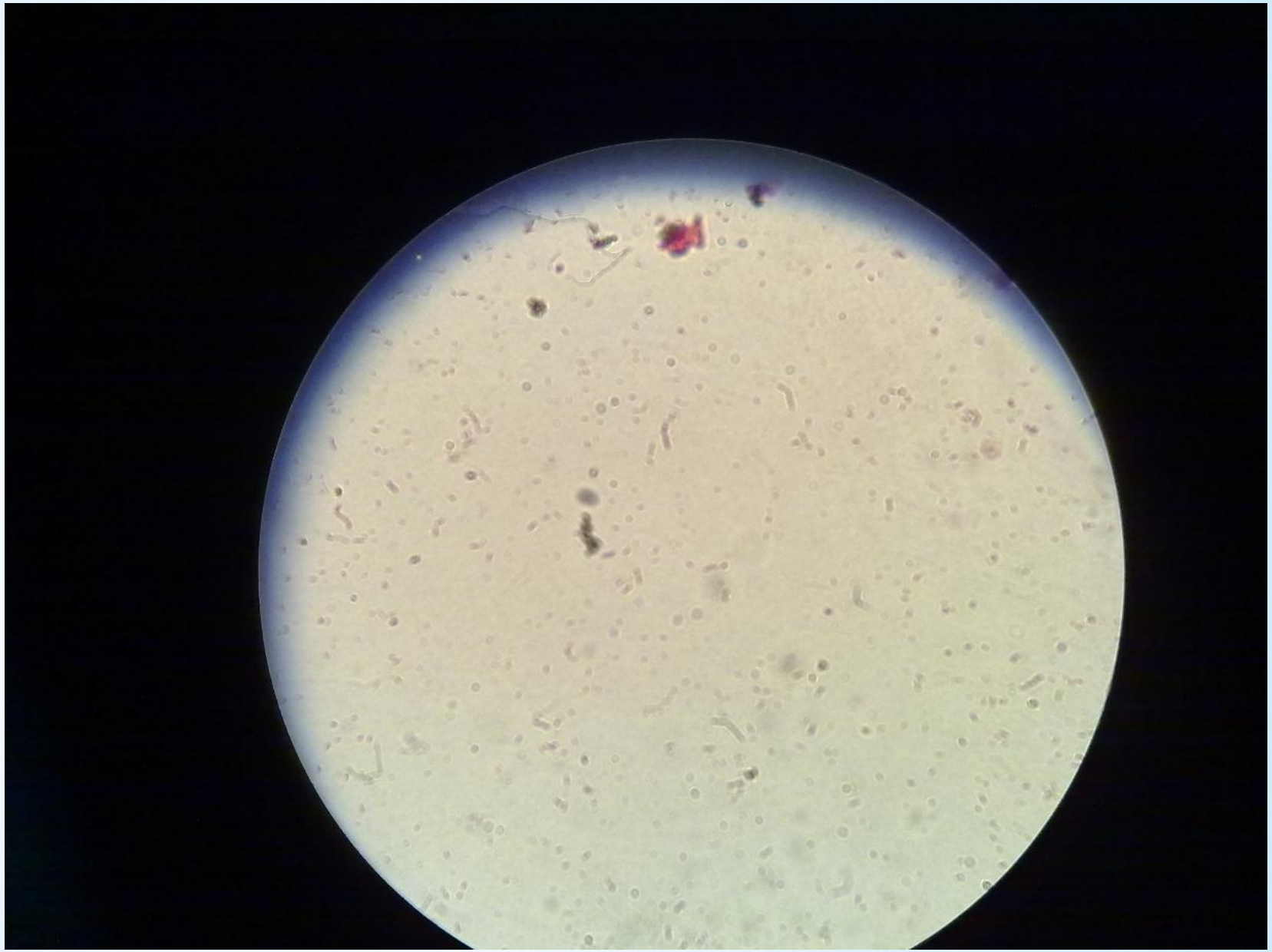
۴. بعد از بررسی محیط ها اگر در محیط نیتروزوموناس نیتریت تولید شده بود و واکنش دنیتریفیکاسیون صورت گرفته باشد در واقع آمونیاک به نیتریت تبدیل شده است . سپس می توان از این محیط باکتری را به محیط جامد انتقال داد.

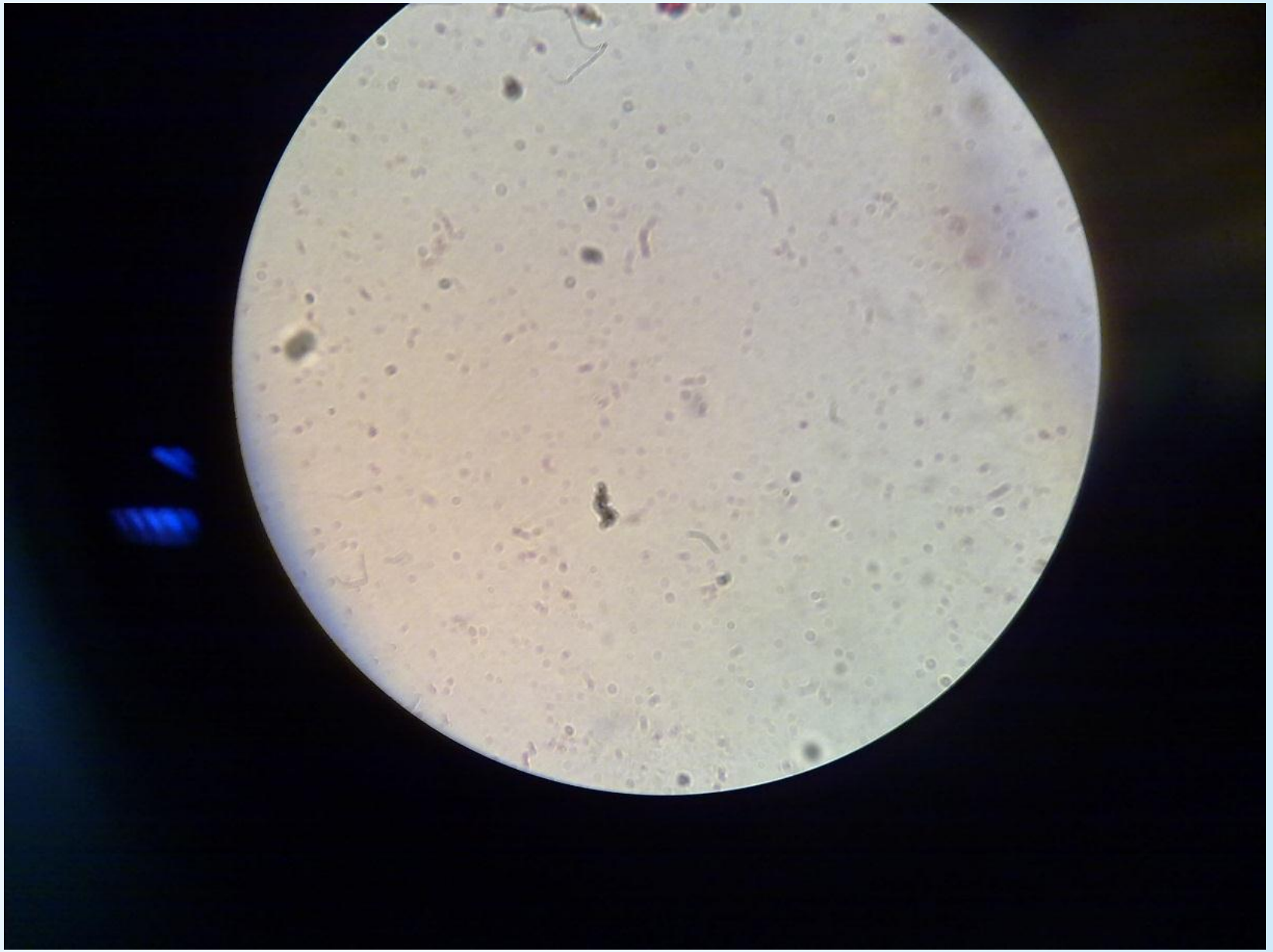
- برای تهیه ی محیط جامد نیتروزوموناس و نیترو آگار به هر لیتر آن می توان ۲۰ گرم آگار استفاده کرد . به صورت استریک (خطی) کشت می دهیم . در دمای محیط بعد از یک هفته کلنی ها رشد می کنند . در محیط نیتروباکتر اگر نیترات مثبت بود به محیط جامد برای جداسازی انتقال می دهیم .
- اگر نیترات منفی باشد ، معرف های نیتریت را هم به شاهد اضافه می کنیم چون ممکن است که واکنش به صورت کامل صورت نگرفته باشد .

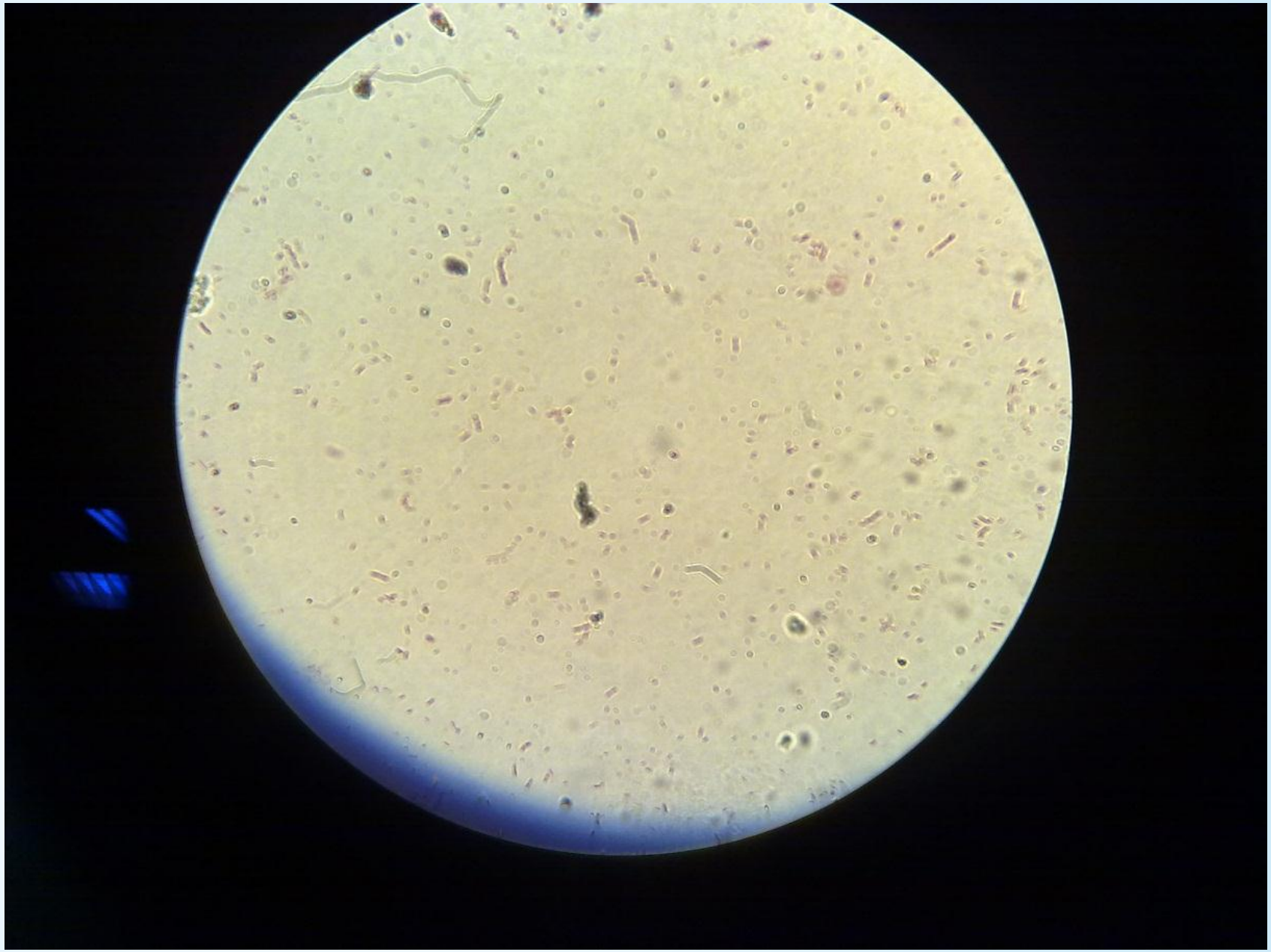
۵. از کلنی های تشکیل شده با روش گرم رنگ آمیزی کرده و شکل نمونه و مورفولوژی آن را رسم می کنیم .

- نهایتاً اثبات می شود که در محیط کشت باکتری مورد نظر وجود داشته باشد . در در خاک بیشتر نیتروزوموناس و نیتروباکتر وجود دارند در دحالی که باکتری های دیگر اکسید کننده آمونیاک عبارتند از : نیترواسپیرا ، نیتروزوکوکوس ، نیتروزولوبوس و نیتروزوویبریو.
- باکتری های اکسید کننده نیتریت عبارتند از : نیترواسپیرا ، نیتروسپینا و نیتروزوکوکوس .









با سپاس فراوان از توجه شما