



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

میکروبیولوژی خاک

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مقدمه:

2

- ▶ فوقانی ترین لایه خاک از لحاظ حضور میکروبه‌ها حائز اهمیت است. عوامل متعددی بر نوع و تعداد میکروارگانیسم‌ها دخالت دارند:
- ▶ بافت فیزیکی- ترکیب شیمیایی- منشاء خاک- عمق خاک- مقدار و نوع مواد غذایی- رطوبت-حرارت- اثر میکروارگانیسم‌ها روی همدیگر- وجود ریشه گیاهان- اسیدیته خاک- میزان هوای موجود در خاک - حاصلخیزی خاک- مداخله انسان ، ...
- ▶ باکتری‌ها فراوانترین میکروارگانیسم‌های خاک هستند. و هر چه به عمق برویم از مقدار آنها کاسته می‌شود.

مقدمه:

3

► مواد زاید ناشی از انسان و جانوران و همچنین اندام های مختلف جانداران اعم از گیاه و جانور مستقیماً وارد خاک شده و سبب حاصلخیزی آن می شوند. خاکهای حاصلخیز یکی از مراکز تجمع میکروارگانیسم ها هستند. انواع گوناگونی از باکتری ها، قارچ ها، جلبک ها، ویروس ها، پروتوزوئرها در خاک زندگی می کنند. تعداد تقریبی میکروارگانیسم های خاک با میزان مواد آلی موجود در آن ارتباط دارد.

- شمارش تعداد باکتری های خاک توسط میکروسکوپ تعداد تقریبی آنها را بیش از چند میلیون در هر گرم خاک نشان می دهد ولی چنانچه این شمارش در روی محیط کشت انجام شود تعداد آنها در حدود چند میلیون در هر گرم خاک محاسبه می شود. علت چنین اختلافی این است که نمی توان محیط کاملا مساعدی از نظر فیزیکی و شیمیایی تهیه کرد که کلیه ی باکتری های خاک قادر به رشد در آن باشند.
- به عنوان مثال میکروبهای بی هوازی در سطح سطح محیط های عادی در شرایط هوازی رشد نمی کنند یا آنکه باکتری های بی هوازی تثبیت کننده ی ازت و اکثر باکتری های تجزیه کننده ی سلولز در محیط آگار غذایی رشد نمی کنند و همچنین باکتری های احیا کننده ی سولفاتها برای رشد به وجود سولفاتها و ماده ی آلی اکسید کننده نیاز دارند

مقدمه:

➤ به طور کلی عوامل موثر بر جمعیت و نوع میکروارگانیسم های موجود در خاک عبارتند از:

➤ ۱- مقدار و نوع مواد غذایی

➤ ۲- دما

➤ ۳- اثر میکروارگانیسم ها بر یکدیگر

➤ ۴- رطوبت

➤ ۵- pH

➤ ۶- عوامل بیرونی مثل سیل و انسان

➤ ۷- میزان هوای موجود در خاک

➤ ۸- وجود ریشه گیاهان در خاک

➤ نقش میکروارگانیسم ها در تجزیه ی مواد آلی و تبدیل آن ها به مواد کانی قابل استفاده برای گیاهان عامل مهمی است که زندگی بدون آن امکان پذیر نیست. تغییراتی که میکروارگانیسم ها در مواد ایجاد می کنند باعث گردش عناصر در جهان زنده می شود

روشهای بررسی میکروبیولوژیک خاک:

- 1- روش کشت: با استفاده از تهیه رقت های متوال (Serial Dilution) و شمارش کلنی ها با Colony counter . اگر هدف ما حضور جزئی به صورت کمی در یک مجموعه یا کل باشد باید از روش serial dilution استفاده کنیم. بنابراین این روش فقط محدود به میکروبیولوژی خاک نیست.
- نتیجه می گیریم: هر چه رقت بیشتر شود تعداد میکروارگانسیم ها کمتر می شود. در رقت های آخر آنقدر کم است که می توانیم بشماریم.
- 2- روش میکروسکوپی:
- روش کار: از رقت 0.1 خاک ، همان سوسپانسیون اولیه تهیه شده از نمونه، یک قطره برداشته و بر روی لام می ریزیم، گسترش تهیه کرده، فیکس کرده، رنگ آمیزی گرام انجام می دهیم و بعد از رنگ آمیزی دنبال باسیلها و کلستریدیوم ها می گردیم.

روش انجام آزمایش

- در ۹ لوله آزمایش ۹ سی سی آب ریخته شود سپس ۱ گرم از نمونه خاک را لوله اول وارد کرده آن را خوب مخلوط کنید سپس ۱ سی سی از مخلوط را از لوله اول با پیپت سترون برداشته در لوله دوم بریزید. دقت کنید پیپت نباید داخل آب شود و از قسمت بالای لوله پیپت را خالی کنید و سپس با یک پیپت دیگر از لوله دوم برداشته در لوله سوم بریزید و خوب به هم بزنید. پیپت را کنار گذاشته با پیپت های دیگر این عمل را تا لوله هفتم ادامه دهید.
 - ۲- از هر یک از ۴ رقت آخر ۱ سی سی در پلیت های سترون بریزید و رقت آن را پشت پلیت بنویسید.
 - ۳- از آگار ذوب شده که گرمای آن حدود ۴۵ درجه سانتی گراد است به هر پلیت ۱۰ سی سی اضافه کنید و با حرکات دورانی در جهت حرکت عقربه های ساعت و خلاف آن محیط را با این ۱ سی سی رقت مورد نظر خوب مخلوط کنید.
 - ۴- بعد از سفت شدن محیط پلیت ها آنه را ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار دهید و پس از این مدت پلیتی را که بین ۱۰ تا ۳۰۰ کلنی دارد از بین رقتها انتخاب کنید و کلنی های آن را بشمارید و در ضریب رقت ضرب کنید. مثلا اگر پلیت چهارم حاوی ۲۰ کلنی باشد تعداد تقریبی باکتری های موجود در یک گرم خاک برابر است با:
- $$200000 = 10000 \times 20$$

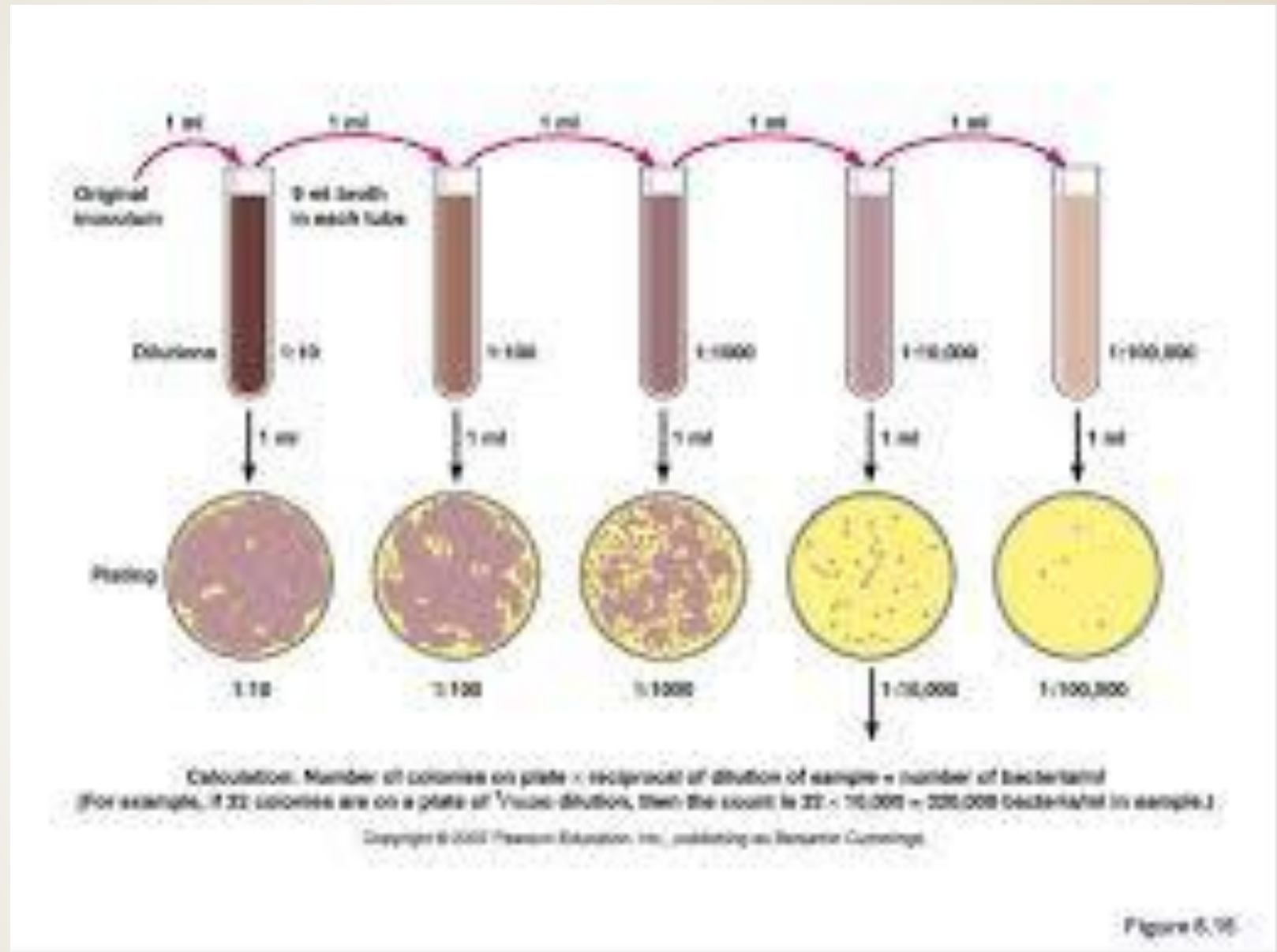
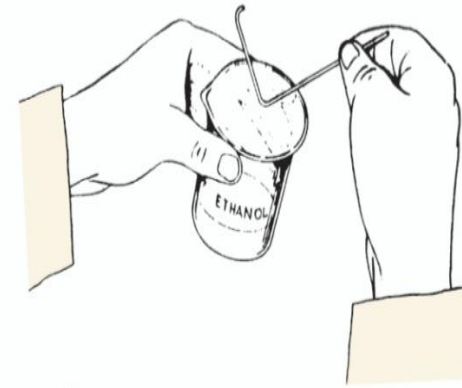
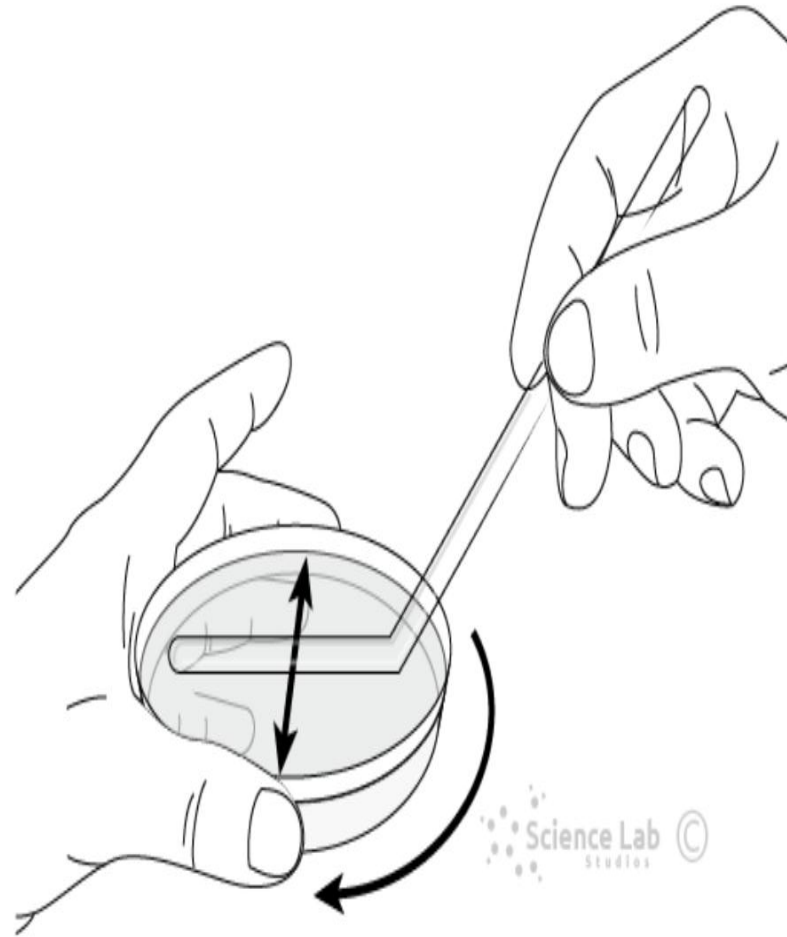
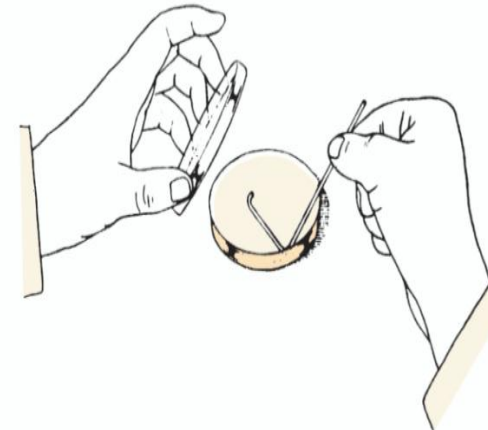


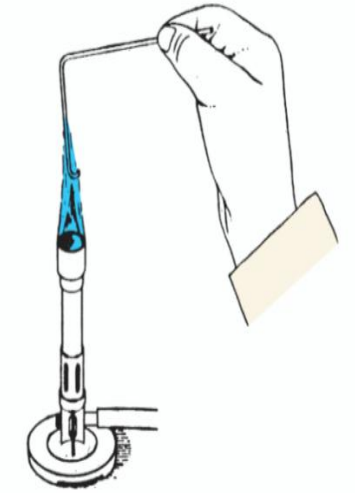
Figure 8.16



1 Spreading rod is dipped in ethanol for cleaning.



3 Organisms are spread evenly over surface of agar.



2 Rod is sterilized in Bunsen burner flame.

مهمترین میکروبهای خاک:

- ▶ باکتریها (بیشترین)
- ▶ اکتینومیست ها: باکتری هایی با منشاء خاک هستند. از نظر میزان Biomass در حد سایر باکتریها
- ▶ قارچها: کمتر از 2 گروه قبل (حجم توده میسلیال) ، کپک ها بیش تر از مخمرها هستند.
- ▶ جلبکها: حضور وابسته به نور ، آب ، دی اکسید کربن است.

اساساً خاک زیستگاه مناسبی برای باکتریهای بیماریزای انسان و حیوان نیست. خاک زیستگاه فقیری است. پس حضور میکروارگانیسم ها در خاک به باکتری های اسپوردار محصور می شود.

نقش های مختلف میکروارگانیسم های موجود در خاک:

- 1. تجزیه مواد آلی (مهمترین و حیاتی ترین نقش)
- 2. دخالت آنها در Biogeochemical cycle (چرخه های زیست ژئوشیمیایی : چرخه هایی هستند که در آنها به واسطه ایفای نقش میکروارگانیسم ها مواد شیمیایی و عناصر شیمیایی بین طبیعت بی جان و پیکره موجودات زنده هستند.)
- 3. تجزیه مواد شیمیایی ساختگی



تهیه کننده : سهیلا عباسی