



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



گزارش کار آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جداسازی و مطالعه ریزوبیوم *Rhizobium*

1

خصوصیات رزوبیوم

2

جنس اول از خانواده Rhizobiacea می باشد . گرم منفی میله ای متحرک و در شرایط مختلف پلی مرفیک می باشد .

گونه های مختلف ریزوبیوم به طور معمول در خاک هستند و می توانند در گیاهان زیر ایجاد ندولهای ریشه ای کنند . ارگانوسمهایی که زندگی آزاد دارند قادر به تثبیت ازت نیستند .

برای جداسازی ریزوبیوم چند غده داریم :

ریزوبیوم مایلوتی (شدر)

ریزوبیوم سی زر (عدس)

ریزوبیوم لوپنی (لویا)

ریزوبیوم لگومینوزاروم (نخود)

شکل باکترئیدهای هر کدام متفاوت است .

باکتری همزیست تثبیت کننده ی ازت نقش مهم تری در رشد گیاهان و تولید مثل محصول بازی می کنند . در رابطه ی همزیستی ، دو موجود متعلق به دو گونه مختلف با یکدیگر زندگی کرده و هر یک از دیگری بهره مند می گردد . این چنین رابطه ای در گونه های ریزوبیوم با ریشه گیاهان خانواده پروانه آسا نظیر لویا ، نخود ، بادام زمینی و یونجه شرح داده شده است .

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- ▶ باکتریهای ریزوبیوم به ریشه ی گیاهان میزبان معمولاً در ناحیه ی تارهای کشنده متصل می شوند .
تار کشنده در نتیجه آلودگی با باکتری متورم می شود که منجر به پیدایش رشته ی آلودگی گشته
و این رشته از تار کشنده گذشته و وارد ریشه می گردد . باکتریها این رشته آلودگی را دنبال کرده
و وارد سلول های ریشه می شوند در درون سلول ها شکل آن ها تغییر یافته به صورت اشکال
درشت تری بنام باکتروئید در می آیند . سلول های ریشه در اثر آلودگی تحریک شده و گره های
تومور مانند مرکب از سلول های پرا باکتروئید تشکیل می دهند . آنگاه ازت جوی با همزیستی
بین گیاه و باکتری تثبیت می گردد . گیاه شرایط بیه وازی فراهم ساخته و مواد غذایی لازم در
اختیار باکتری میگذارد و باکتری ازت جوی را ثابت می کند که بعد این ازت در ساختمان
پروتئین ها وارد می گردد .
- ▶ ریزوبیوم ها پلی ساکاریدی ترشح می کنند که شدیداً حالت لزج دارد و باعث ایجاد محیط لزج
می شود و دارای ذخیره چربی PHB است .
- ▶ ریشه ها بوسیله لکتین باکتری شناسایی و با ترشح آنزیم پلی گالاکتوزوناز سوراخ می شود .

روش کار

4

▶ برای یافتن غده های (گرانولهای) حاوی باکتری باید در خاک و در ریشه گیاهان تیره لگومیناسه و سایر موارد گفته شده را جستجو کنیم به این طریق که ریشه را با تارهای کشنده خارج کرده و غده ها را با پنس جدا

می کنیم . غده ممکن است کرم یا صورتی رنگ باشد .

▶ غده را با آب می شویم تا خاک اطرافش گرفته شود .

▶ یکی از غده ها را روی لام له کرده و از شیرابه ای که از آن خارج می شود فروتنی تهیه می کنیم و بعد از رنگ آمیزی گرم زیر میکروسکوپ مشاهده می کنیم باکتری در غده فرم حجیم و تغییر شکل یافته دارد که در این حالت به آن باکترئید گفته می شود که به اشکال حروف انگلیسی X,Y,Z,V

کشت

5

قبل از کشت دادن باکتریها باید آن ها را ضد عفونی کنیم تا باکتریهای موجود بر سطح غده از بین بروند و در کشت ما تداخل ایجاد نکنند. برای ضد عفونی مراحل زیر را انجام می دهیم.

- ۱- جدا کردن غده از ریشه
- ۲- شستشو با آب شیر
- ۳- قرار دادن غده در کلرور جیوه ۰/۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه و غده های بزرگتر را به مدت ۵ دقیقه در کلرور جیوه ۰/۵٪

۴. شستشو با آب مقطر استریل

6

این کار را درون پتری دیش استریل و سه بار هر بار به مدت یک دقیقه انجام می دهیم تا اثر کلرو جیوه از بین برود چون کلرو جیوه سمی است و نمی توان غده را با کلرور جیوه کشت داد .

بعد از مراحل ضد عفونی غده را کشت می دهند .

برای کشت از محیط کشت ریزوبیوم آگار استفاده می شود . این محیط باید واجد ازت باشد چون این باکتری همزیست تثبیت کننده ازت است و فقط به صورت همزیست با گیاه تثبیت ازت را انجام می دهد .

مواد مورد نیاز جهت کشت ریزوبیوم

10 gr	مانیتول
0/5 Gr	K_2HPO_4
0/2 gr	VH_2O , $MgSO_4$
0/1 gr	NaCl
3 gr	$CaCO_3$
1 gr	عصاره مخمر
20 gr	Agar
1 Lit	آب مقطر

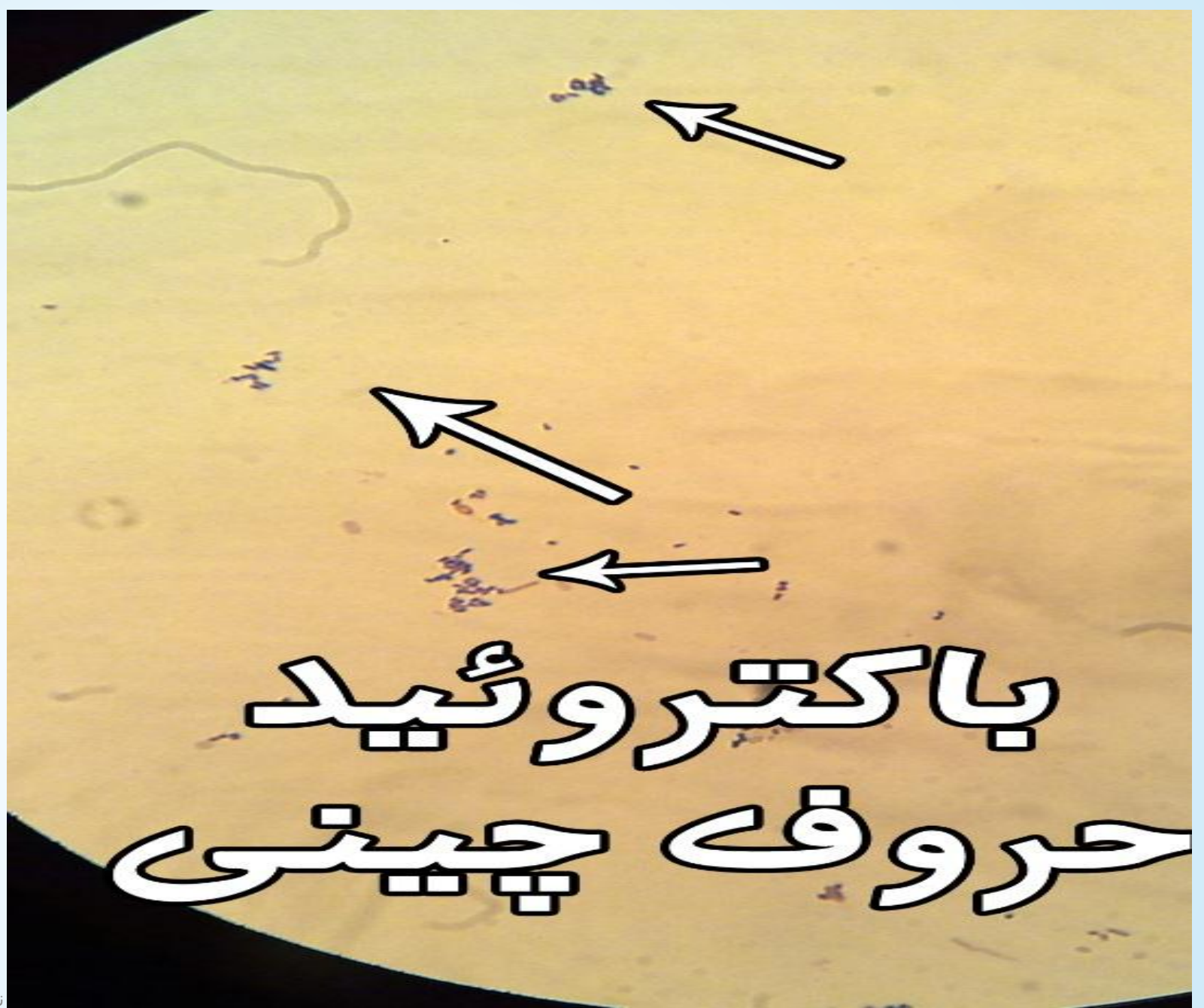
تهیه کننده : سهیلا عباسی

▶ ابتدا نمک ها را در آب حل کرده و بعد آگار را اضافه می کنیم بعد محیط را استریل کرده و درون پتری دیش پخش می نماییم .

▶ بعد غده استریل شده را بین دو پنس له کرده و در دو یا سه نقطه روی پلیت می کاریم . بهتر است از چند غده برای کشت استفاده شود یک غده ممکن است سه تکه شود .

▶ پلیت را بدون اینکه وارونه کنیم در دمای ۲۵ درجه به مدت یک هفته می گذاریم در طی هفته آرام آرام شروع به رشد می کند و از فرم باکترئید در غده به باکتری ریزوبیوم در محیط کشت تبدیل می شود کلنی شیری ، لزج و حالت چکنده دارد فقط کافیت که محیط را برگردانیم کلنی داخل درب پلیت می ریزد .

▶ برای مشاهده ی باکتریها رنگ آمیزی گرم و سودان بلاک انجام می دهیم .





Rhizobium

v, x, y, ...



با سپاس فراوان از توجه شما