دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

گزارش کار آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جداسازی و مطالعه ی باکتری های اکسید کننده گوگرد

تهیه کننده : سهیلا عباسی

- گوگرد جزو ساختمان شیمیایی بسیاری از مواد حیاتی مانند برخی از اسید های آمینه (سیستئین ، متیونین) و ویتامینها مانند (تیامین ، بیوتین ، اسید لیپوئیک) است . منشأ اصلی گوگرد خاک از سنگ های مادری است که در بسیاری از کانیهای آن این عنصر به شکل سولفورهای مختلف بویژه آهن ، مس و نیکل وجود دارد و پس از تخریب آن ها اکسید شده ، با خاک مخلوط می گردند در بعضی از مواد مثلاً سنگ های رسوبی ، گوگرد بیشتر حالت سولفات وجود دارد . در خاک های معمولی گوگرد به صورت ترکیب های بسیار متعددی است که هیچ یک از آن ها وضع کاملاً پایداری ندارند . در معرض تغییرات پی در پی هستند .

- ماده گوگردی که در مرحله ی نهایی تجزیه بوجود می آید بر حسب نوع ماده آلی در حال تجزیه و شرایط محیطی ممکن است به صورت سولفات و یا سولفور و یا ترکیبات گوگردی فرار مانند متیل مرکاپتان باشد که در بین آن ها آزاد شدن سولفور بخصوص در ضمن تجزیه مواد پروتئینی بیشتر دیده می شود . اکثر موجودات ذره بینی و گیاهان ، پس از جذب سولفات آن را به ترکیب های آلی سولفیدریل (R-SH) تبدیل می کنند که در اغلب موارد در حین تجزیه ی بازمانده ی این موجودات گوگرد به صورت هیدروژن سولفوره آزاد می شود .

$$R - SH \rightarrow R + SH_2$$

- این عمل سولفوری شدن و یا به علت تولید ترکیبات بدبو گندیدگی نیز نامیده می شود که انجام آن در شرایط هوازی و بی هوازی مقدور می باشد .

باکتری های اکسید کننده گوگرد

- $H_2S + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow S + H_2O$

- باکتری های اکسید کننده گوگرد باکتریهایی هستند که می توانند SH_2 ، گوگرد ، تیوسولفات و تتراتیونات را اکسید کنند و از اکسیداسیون این مواد گوگرد و یا اسید تولید کنند . این باکتریها اکثراً گرم منفی هستند و در شرایطی که گوگرد به عنوان تنها منبع انرژی است می توانند رشد کنند.

- به طور کلی باکتریهای اکسید کننده گوگرد سه دسته اند :

- **۱. باکتری های اتوتروف**
- **۲.باکتری های فتوتروف**
- **۳.باکتری های میکسوتروف**
- **۴.میکروارگانیسم های هتروتروف**

۱. باکتری های اتوتروف

- باکتری هوازی ، گرم منفی و کوتاه هستند . در ایران برای استخراج معادن در صنعت معدن مس استفاده می شود ولی در محیط در لوهل های آب ، خوردگی ایجاد می کنند . مهمترین جنس این باکتریها اسید تیوباسیلوس می باشد .
- از این جنس ۵ گونه ی تیوپاروس ، دنیتریفیکانس ، تیواکسیدانس ، فرواکسیدانس و نولوس به طور دقیق تری مورد مطالعه قرار گرفته اند . گونه های تیوپاروس و دنیتریفیکانس و نولوس دامنه ی انتشار وسیعتری دارند و در اکثر خاک ها پیدا شده اند زیرا این گونه ها pH حدود خنثی را ترجیح می دهند . در حالی که دو گونه تیواکسیدانس و فرواکسیدانس معمولاً در خاک های شدیداً اسیدی و سرشار از گوگرد یا سولفورهای مختلف پیدا می شوند . به طور کلی تعداد تیوباسیل ها در خاک چندان زیاد نیست . زیرا ترکیب های گوگردی که باید به عنوان منبع انرژی اختصاصی مورد استفاده ی آن ها قرار گیرد در اکثر خاک ها به مقدار بسیار جزئی وجود دارند و برای ازدیاد سریع آن ها کافی نیستند .

۲. باکتری های فتوتروف

- بیضی یا خمیده درشت می باشند مانند سه خانواده ی کروماتیاسه ، اکتوتیورودواسپیراسه ، کلروبیاسه که در شرایط بی هوازی قادر به اکسیداسیون SH_2 هستند . کلروفبیوم شرایط میکروآثروفیل را هم می توانند تحمل کنند ولی کروماتیوم بی هوازی مطلق است .

- چون این نوع اکثراً آبزی هستند اهمیت نسبی آن ها در خاک کمتر است .

- کلروبیوم و کروماتیوم برای از بین بردن ترشی گاز و حذف SH_2 استفاده می وشد ولی در لوله های آبرسانی بیوفیلم ایجاد می کند . این باکتریهای فتوسنتزی گوگردی زمانی که SH_2 را به S اکسید کنند قادر به احیای نوری CO_2 هستند که این عمل مشابه فتوسنتز یوکاریوت ها می باشد . کروماتیاسه گوگرد را به صورت درون سلولی ذخیره می کند در حالی که اکتورودواسپیراسه و کلروبیاسه آن را خارج می کنند . همه ی آن ها قابلیت محدودی در اکسید کردن گوگرد به سولفات دارند و ممکن است در استخراج بیولوژیکی گوگرد نقش داشته باشند .

۳.باکتری های میکسوتروف

- مانند بژیاتوآ که باکتریهای رشته ای گرم منفی هستند .

- باکتری های این جنس به شکل رشته های طویلی متشکله از سلول های کوتاه و مدور هستند . از لحاظ ساختمان ظاهری به سیانوفیسم ها شباهت دارند ولی بر خلاف آن ها فاقد دانه های رنگی می باشند . حرکت آن ها به طریق لغزشی است . محلی اصلی فعالیت این باکتریها چشمه های گوگردی ، آب های آلوده به فاضلات و لجنزاهاست . همینطور در بعضی از خاک های هیدرومورف نیز فعالیت قابل توجهی دارند .

- این باکتری ها انرژی مورد نیاز خود را به وسیله اکسیده کردن هیدروژن سولفوره تأمین می کنند و نتیجه ی این اکسیداسیون ابتدا تولید گوگرد است که به صورت دانه های شفاف در داخل یاخته های آن ها متراکم می گردد . این گوگرد نقش ماده ی غذایی ذخیره را به عهده دارد . زیرا در مواقعیکه باکتری سولفور کافی در اختیار نداشته باشد . از اکسیده کردن آن برای تأمین انرژی خود استفاده می کنند .

- در عین حال مشاهده شده که تمام کشت های خالص بژیاتوآ قادر به رویش هتروتروفی هستند و هیچیک از آن ها نمی توانند CO_2 را به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار دهند و بنابراین میکسوتروف به حساب آمده اند .

۴.میکروارگانیسم های هتروتروف

- علاوه بر باکتری های اتوتروف ، بسیاری از میکروارگانیسم های هتروتروف نیز قادر به اکسیده کردن ترکیب های گوگرد می باشند . مثلاً سودوموناس و آکروموباکتر و اسفروتیلوس و تیوتریکس می توانند تیوسولفات را به تتراتیونات تبدیل کنند . اکسیده شدن این مواد نتیجه واکنس های فرعی یا منحنی متابولیسم طبیعی این موجودات است و انرژی مورد نیاز آن ها اساساً از مواد آلی تأمین می گردد . بسیاری از قارچ های رشته ای بخصوص گونه های ی از آسپرژیلوس ، پنی سیلیوم و میکروسپوروم می توانند گوگرد موجود در بعضی ترکیب های آلی مانند سیستئین ، تیوره و تورین را به سولفات تبدیل کنند . بطور کلی هر چند در مقایسه با تیوباسیلوس ها اکسیداسیون گوگرد و سایر ترکیب های آن به وسیله ی هتروتروف ها بسیار کند و بطنی انجام می شود . ولی به علت فراوانی تعداد این موجودات و قدرت سازشی که با محیط و شرایط مختلف آن دارند . نقش آن ها در انجام سولفواکسیداسیون در خاک می تواند قابل توجه باشد .

جداسازی بژیاتوآ

- برای شمارش بژیاتوآ ابتدا از محیط های کشتی استفاده می کنند که باکتری را غنی کند . برای غنی سازی باکتریها از محیط کشت حاوی عصاره ی یونجه استفاده می کنند . چون عصاره یونجه غنی از سیستئین است در هنگام استریل کردن محیط کشت SH_2 آزاد شده و SH_2آزاد شده باعث از بین رفتن باکتریهای دیگر شده و بژیاتوآ رشد می کند . املاح نیز از آب تأمین می شود .

روش کار

۱. از محیط کشت عصاره یونجه استفاده کرده که برای تهیه آن ۸/۰ گرم پودر یونجه آماده شده را به ۱۰۰ سی سی آب معمولی اضافه کرده و در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ – ۱۰ دقیقه اتوکلاو می کنیم .

۲. نمونه می تواند از پساب ، فاضلاب و لجن باشد از محیط های بی هوازی هم می توان نمونه برداری کرد . مانند دیواره ی چاه ها

۳. در حدود ۵/۰ سی سی از نمونه و اگر نمونه خاک بود یک گرم خاک را به محیط عصاره ی یونجه اضافه می کنیم محیط را به هم می زنیم در دمای ثابت ، بدون حرکت قرار می دهیم و در مدتی که انکوبه شده است نباید جابه جا شود .

۴. بعد از یک هفته محیط را بررسی می کنیم چون یک باکتری هوازی است در سطح یک لایه سفید تشکیل می دهد برای خواندن جواب از لایه ی تشکیل شده ا لوپ یک فروتی تهیه کرده و رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم .

- بژیاتوآ به صورت باکتری رشته ای گرم منفی مشاهده می شود که دارای دانه های گوگردی است .
- (تفاوت دانه های گوگردی با دانه های چربی در این است که دانه های چربی گرد و منظم می باشد ولی دانه های گوگردی چند وجهی و نامنظم هستند.)
- در لام بژیاتوآ ممکن است باکتری های کلروبیوم و کوماتیوم را هم مشاهده می کنیم چون شرایط بی هوازی ایجاد شده است و مخصوصاً اگر در معرض نور قرار گرفته باشد .
- این باکتریها به صورت میله ای گرم منفی و به رنگ سبز دیده می شوند . (رشته ای نیستند.)

۵. برای خالص سازی بژیاتوآ تکه ی غنی شده را به مرکز محیط کشت انتقال داده و بژیاتوآ با حرکت لغزنده ای که دارد از مرکز تلقیح دور شده و می توان با چند بار پاساژ دادن تست های رشد کرده ی بژیاتوآ آن را خالص کرد .

۶. نکته : کلر انتروباکتریاسه را از بین می برد ولی بژیاتوآیی را که در بیوفیلم است را از بین نمی برد .

جداسازی تیوباسیلوس

- **روش کار :**

۱. نمونه مورد استفاده برای جداسازی تیوباسیلوس معمولاً خاک می باشد .

۲. محیط مناسب برای جداسازی هر یک از تیوباسیلوس ها متفاوت می باشد .

- محیط کشت مورد استفاده برای جداسازی تیوباسیلوس تیواکسیدانس :

آگار	gr	۲۰
گوگرد	gr	۱۰
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	gr	۳
سولفات منیزیوم	gr	۵/۰
سولفات آمونیوم	gr	۲۵/۰
کلرور فریک	gr	۰۲/۰
آب مقطر	Lit	۱

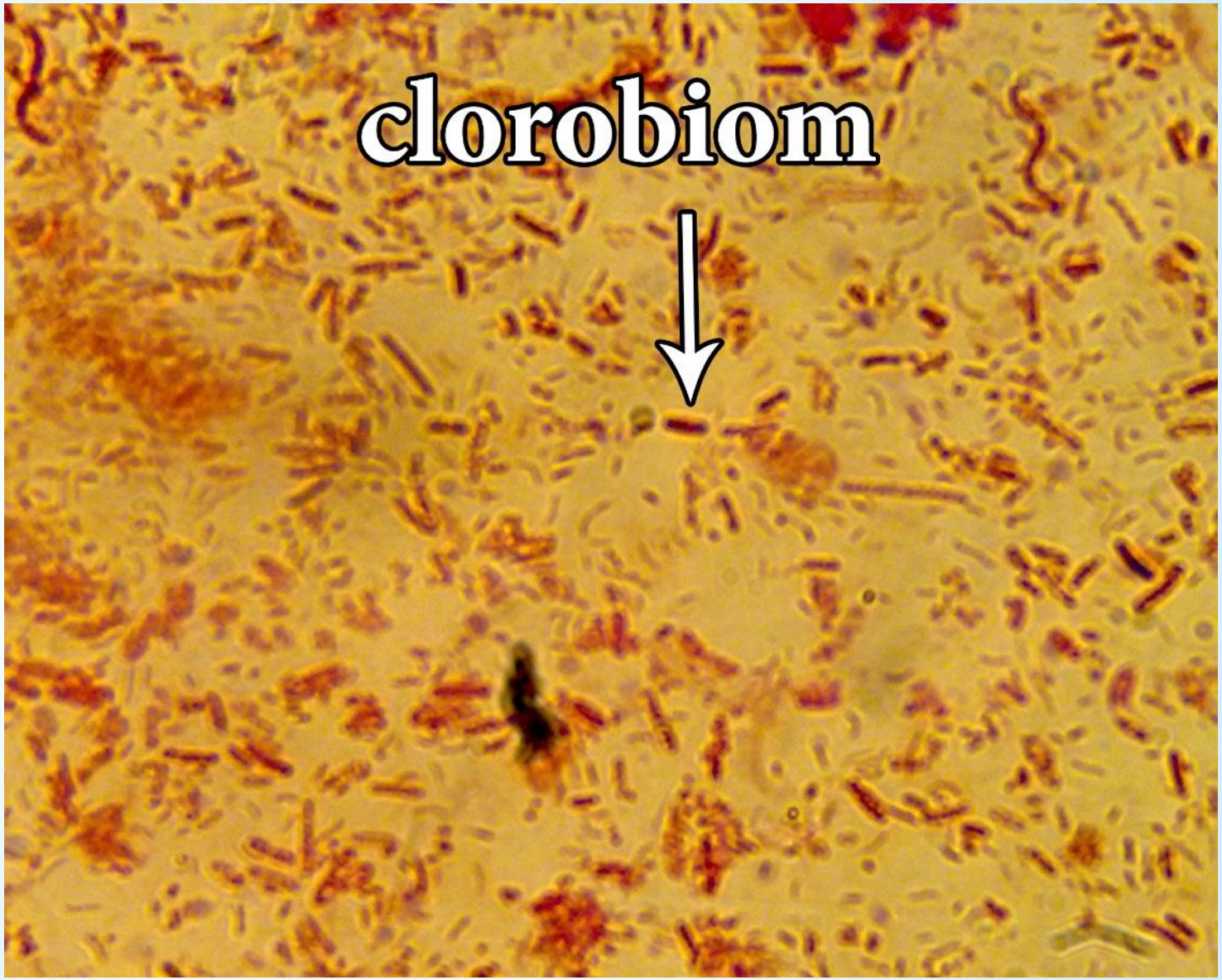
- پس از تهیه محیط را در لرلن ۲۵۰ سی سی به میزان هر ارلن ۱۰۰ سی سی می ریزیم و استریل می کنیم

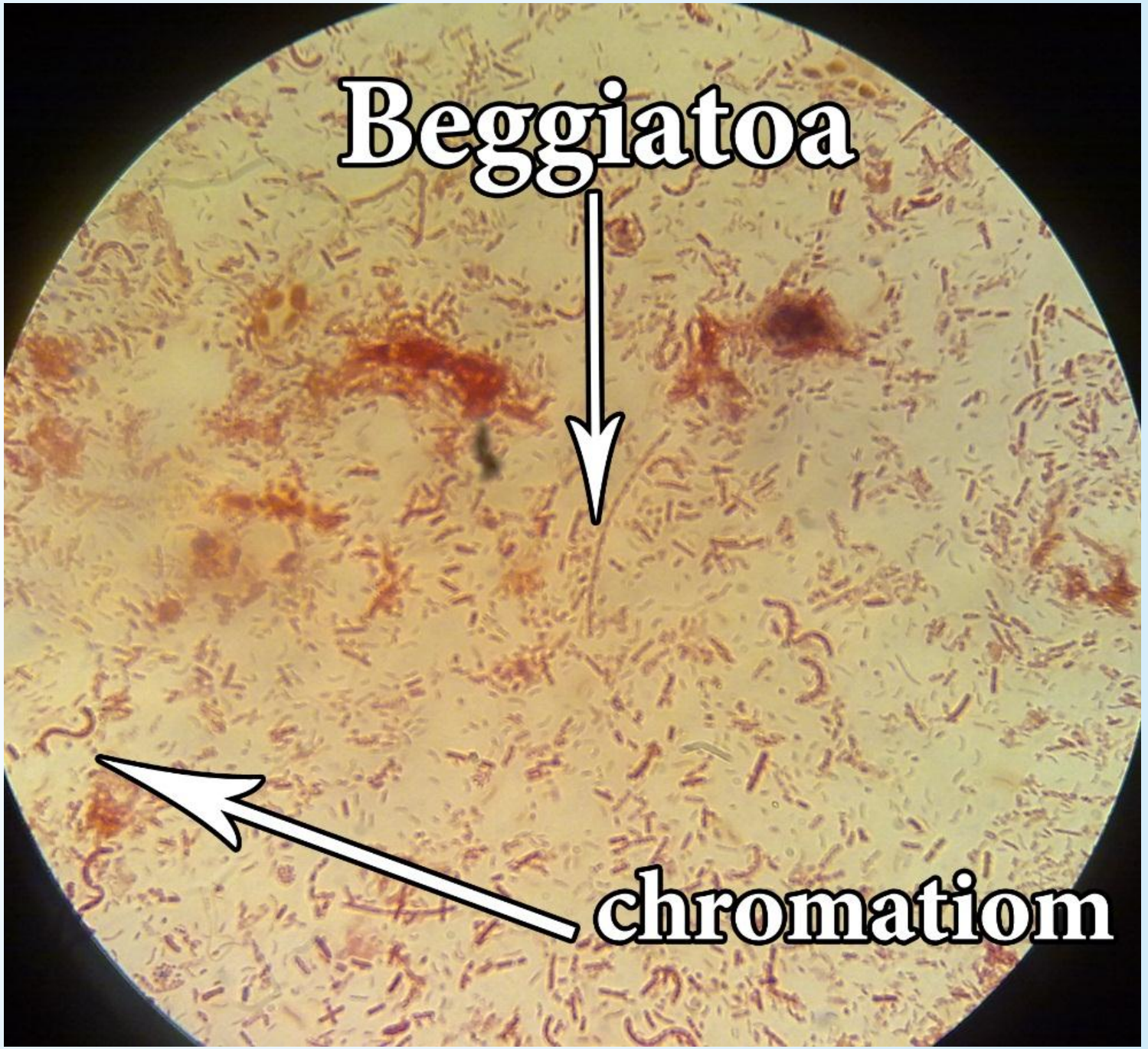
۳. یک گرم خاک را به محیط جداسازی تیوباسیلوس اضافه می کنیم و یک هفته روی شیکر قرار می دهیم .

۴. بعد از غنی سازی روی محیط جامد ایزوله می کنیم .

۵. باکتریها به شکل میله ای ریز گرم منفی دیده می شوند .

streptomycete


clorobiom


Beggiatoa
chromatiom

با سپاس فراوان از توجه شما