



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی  
و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

# مطالعه و جداسازی اکتینیومیست ها

1

این گروه از موجودات ذره بینی دارای خصوصیات مشترکی با باکتری ها و قارچ ها می باشد که به دلیل همین تشابه دو جانبه معمولاً به صورت گروهی مستقل و حد واسط آن ها به حساب می آیند.

شباهت آن ها با قارچ ها به خصوص در چند مورد زیر مشخص می گردد:

1. تشکیل میسلیوم با انشعاب حقیقی
2. ایجاد میسلیوم های هوایی
3. تولید کونیدی و اسپورهای غیر جنسی کاملاً مشابه با اسپور قارچ ها به منظور تولید مثل
4. چگونگی رشد در محیط کشت مایع

➤ در ضمن رشد در محیط مایع بر خلاف باکتریها هرگز باعث کدر شدن محیط نمی شود بلکه به صورت توده متراکم و یا به حالت پوسته و ورقه در کنار هم جمع می گردد.

➤ اکتینومیست ها در عین حال دارای خصوصیات مشترکی با باکتریها می باشند که مهمترین آن ها عبارتند از :

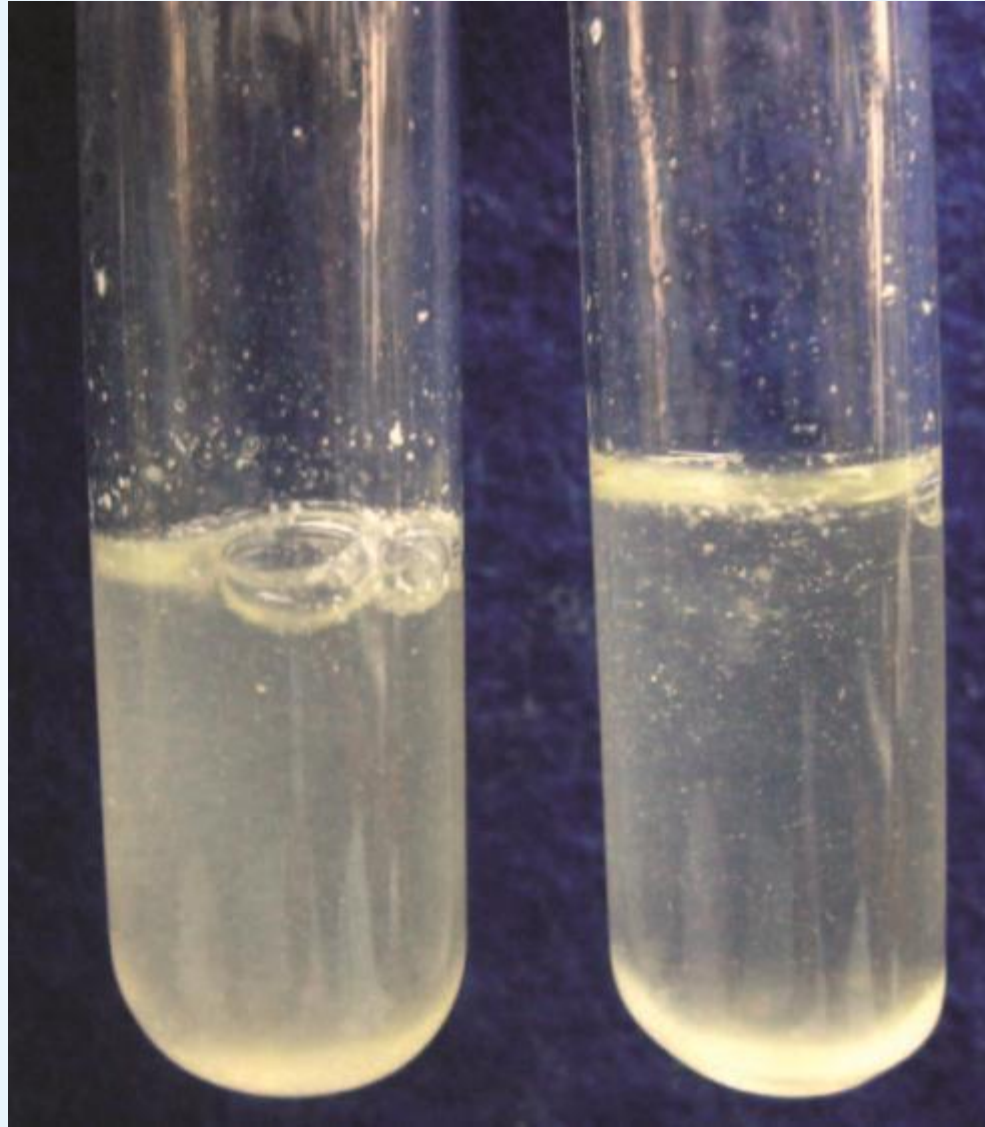
1. رشته های میسیلیوم دارای قطر کوچکی حدود یک میکرون

2. یاخته آن ها پروکاریوت است

3. در دیواره ی سلولی آن ها سلولز و کیتین وجود ندارد.

➤ این راسته دارای ۸ خانواده به نام های :

➤ آکتینوماسیتاسه، میکوباکتریاسه، فرانکیاسه، اکتینوپلاتاسه، درماتوفیلاسه، نوکاردیاسه، استرپتومیتاسه و میکرومونوسپراسه می باشند .



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# نوکار دیا روی محیط مایع



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

این میکروارگانسیم ها واجد میسلیوم های رویشی و هوایی می باشند. میسلیوم های هوایی زایا و یاسترون می باشند. فرم هیف های حامل اسپور و بخصوص در انواع مارپیچی، طرز انحنا و جهت چرخش هیف و تعداد حلقه های تشکیل شده ممکن است از ۱ تا ۲۰ تغییر کند و بالاخره مقدار باز و یا بسته بودن حلقه به تشخیص گونه های مختلف کمک می کند میسلیوم ها گاهی سفید و بی رنگ هستند. ولی تعداد زیادی از گونه ها قادر به تولید دانه های رنگی می باشند که بعضی از این مواد رنگی در آب قابل حل بوده و در نتیجه در محیط کشت پخش می شود.

این موجودات اکثراً بدون حرکت هستند و وجود تاژک در گونه های آن ها بسیار نادر است، بیشتر اکتینومیست ها بویی شبیه خاک دارند.

تولید مثل آن ها غیر جنسی است و با تولید اسپورهای مختلف و یا تقسیم مستقیم مسیلیومی انجام می شود.

پیدایش اسپورها اکثراً مشابه با تولید کونیدی ها است . برای تشکیل کونیدی ها معمولاً سیتوپلاسم مسیلیوم های هوایی از قسمت سرهیف به صورت قطعات کوچک مدور ، بیضی یا میله ای شکل به طول حدود ۱ تا ۲ میکرون تقسیم شده و کونیدی ها را تشکیل می دهند.



▶ اکتینومیست های مهم و فراوان در خاک دارند :

۱- خانواده ی نوکاردیاسه (جنس مهم آن نوکاردیا)

▶ به دلیل عدم وجود مسیلیوم های هوایی کلنی آن ها مشابه باکتری هاست در این انواع مسیلیوم رویشی به قطعات باسیلی شکل تقسیم می شود و گاهی هم از راه جوانه زدن صورت می گیرد.

۲- خانواده استرپتومیستاسه :

▶ در این انواع مسیلیوم ها به رشد کافی نرسیده، انشعابات فراوان پیدا می کند تولید مثل به وسیله ی کنیدی است و اسپورها به صورت زنجیری شکل در رأس آن ها قرار می گیرد.

۳- خانواده میکرومونوسپوراسه :

▶ در این ها مسیلیوم های هوایی معمولاً وجود ندارند و در موارد استثنایی ظاهر می گردند و به تمایز اصلی این جنس، تولید کنیدی های بیضی شکل و یا مدور است که بلور منفرد و در رأس شاخه های جانبی کوتاه تر از مسیلیوم رویشی قرار می گیرند. گونه های این جنس هوازی و مزوفیل هستند.

## ۴- خانواده اکتینوپلاماسه :

دارای میسیلیوم حقیقی است و تولید مثل بیشتر بوسیله ی اسپورانژ مشخص می شوند. بعضی از انواع اسپورانژئوسپورها تاژک دار و بعضی از انواع آن ها بدون تاژک هستند.

# فراوانی انتشار در خاک :

11

شمارش دقیق اکتینومیست های خاک هم مانند شمارش سایر موجودات ذره بینی خالی از اشکال نیست. به خصوص برای شمارش مستقیم میکروسکوپی، یکنواخت نبودن انتشار میسیلیوم در ضمن تهیه ی سوسپانسیون خاک، از مشکلات اساسی به شمار می رود. در شمارش اکتینومیست ها گونه های استرپتومیسس حداکثر تعداد را دارند. انواع گرمادوست بیشتر در داخل کودهای در حال تجزیه فراوانند. در خاک تعداد آن ها بسیار کم بوده و بدون فعالیت هستند.

تعداد کل اکتینومیست ها در علفزار ها و مراتع به علت تراکم ریشه ها خیلی بیشتر از زمین های زراعتی و خاک های بایر و بدون پوشش گیاهی حداقل است.

در خاک های قلیایی سرشار از مواد آلی و نسبتاً خشک تعداد آن ها به حداکثر می رسد.

## تغذیه اکتینومیست ها

▶ اکتینومیست های خاک عموماً هتروتروف هستند و به وجود انواع اتوتروف به ندرت اشاره شده است. این موجودات اکثراً به حالت ساپروفیت در خاک بسر می برند.

▶ تعداد گونه های بیماریزا در گیاهان بسیار کم است بعضی از گونه ها قادر به تجزیه ی اسید های چرب و هیدروکربورها لیگنین و تانن ها می باشند املاح آمونیاکی را می توانند از لحاظ تأمین ازت مورد استفاده قرار دهند قدرت تولید مواد رنگی ، ویتامین و آنتی بیوتیک را دارند. عناصری مانند  $Ca$  ,  $Su$  ,  $Zo$  ,  $Fe$  ,  $Mg$  ,  $K$  ,  $P$  برای اکثر آن ها ضروری می باشد .

## تأثیر فعالیت اکتینومیست ها در خاک :

▶ اکتینومیست ها نقش بسیار موثری در تجزیه ی بازمانده های گیاهی و حیوانی به خصوص در تجزیه بافت های مقاوم به عهده دارند. به این ترتیب که در مصرف مواد کربن دار ساده با باکتری ها و قارچ ها رقابت دارند.

▶ تعداد و شدت فعالیت آن ها خیلی کم است. ولی به تدریج کاهش مواد ساده و میکروارگانسیم های وابسته مقاوم باقیمانده شروع می کنند این موجودات در تجزیه پکتین، همی سلولز، کتین و کراتین به صورت موثری دخالت دارند. گونه های استرپتومایست در تجزیه ی همی سلولز بسیار موثرند.

انواعی از اکتینومیست ها، به خصوص گونه های نوکاردیا که قادر به استفاده از اسید اگزالیك به عنوان منبع کربن و انرژی هستند، می توانند در شرایط طبیعی نقش بسیار مهمی در برطرف کردن سمیت حاصل از اگزالات کلسیم موجود در بازمانده های گیاهی اضافه شده به خاک داشته باشند اکتینومیست ها قادر به تجزیه ی کراتین، کتین و چربی های موجود در تجزیه بافت های گیاهی و حیوانی دخالت دارند، اکتینومیست ها در تغییر و تبدیل ترکیبات از ته خاک، هم دخالت دارند.

اکتینومیست ها قادر به تولید ویتامین  $B_1$  ،  $B_2$  ،  $B_6$  ،  $B_{12}$ ، بیوتین و اسید فولیک می باشند. به خصوص در ویتامین  $B_{12}$  به وسیله گونه های متعددی از استرپتومیسس ها به مقدار بسیار زیاد تولید می شود.

تنها اثر مضر اکتینومیست ها مربوط به چند گروه محدود و بیماری زا است که از راه خاک به گیاهان به خصوص سیب زمینی حمله می کند. بعضی هم برای انسان بیماریزا هستند.

## جداسازی استرپتومیست ها :

استرپتومیست ها جمعیت اصلی خاک را تشکیل می دهند بیش از ۲۰ نوع آنتی بیوتیک ها توسط این باکتری ها تولید می شود که پاتوژن ها را از بین می برد و چون به صورت رشته ای هستند خاک را از باد و باران حفظ می کنند.

برای جداسازی آن ها از محیط کشتی به نام جنسون استفاده می شود که کازئین به عنوان تنها منبع کربن است. معمولاً میسیلیوم هوایی تشکیل می دهند و به راحتی قابل تشخیص می باشند. تشخیص استرپتومیست ها نیاز به میکروسکوپ الکترونی دارد.

|             |            |
|-------------|------------|
| 0/4 gr      | د کستروز   |
| 0/04 gr     | کازئین     |
| 0/1 gr      | $K_2HPO_4$ |
| 0/04 gr     | $MgSO_4$   |
| A little gr | $FeCl_3$   |
| 3/6 Lit     | Agar       |
| 200 ml      | D.W        |

## روش کار :

از انواع خاک به عنوان نمونه استفاده می کنند .

محیط کشت مورد استفاده محیط جنسون می باشد .

pH مساوی ۶/۶ می گیریم

محیط های جامد ۱/۵ گرم درصد آگار دارند .



۴. از خاک مورد نظر روی محیط جنسون به صورت مستقیم می‌پاشیم.

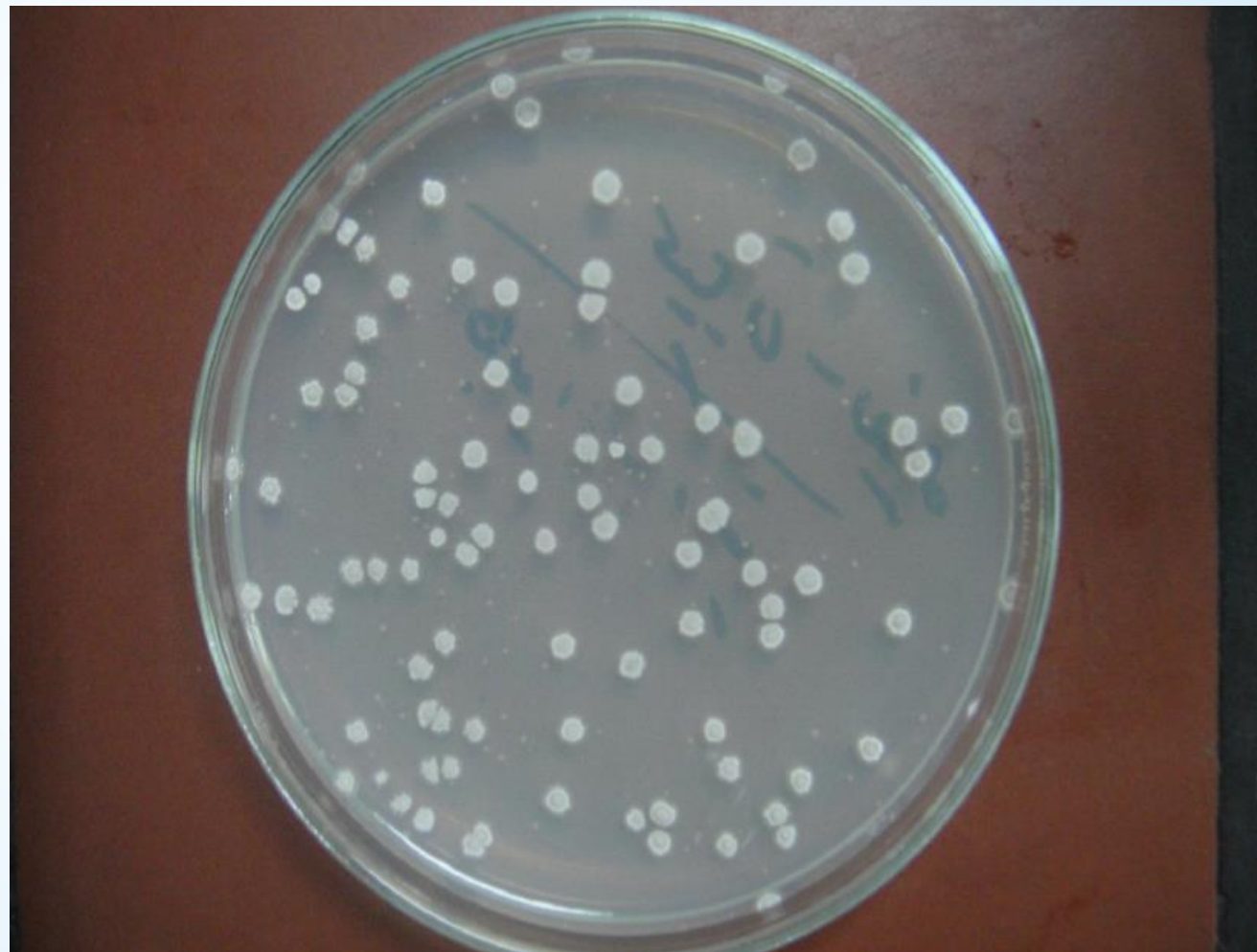
۵. کلنی‌هایی که حالت گچی یا پودری دارند و فرورفته در محیط کشت است مورد بررسی قرار می‌گیرد. این باکتری‌ها بوی خاک هم می‌دهند. رنگ کلنی‌ها سفید یا خاکستری و در مورد بعضی باکتری‌ها سبز رنگ می‌باشند. (در مورد ترموسفرها کلنی‌ها سبز رنگ است.) چون کلنی فرورفته در آگار است به راحتی بالا می‌آید.

۶. کلنی را روی لام خرد می‌کنیم و بعد از رنگ آمیزی گرم زیر میکروسکوپ می‌بینیم.

۷. باکتری به صورت گرم مثبت رشته‌ای با انشعابات زیاد و در سر اسپور مشاهده می‌شود.

۸. در کشت خالص بهترین کار تشخیص استفاده از اسلاید کالچر می‌باشد.

# کلنی استرپتومیست روی جنسون آگار



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# کلنی استرپتومیست روی جنسون آگار



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# کلنی استرپتومیست روی جنسون آگار



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# کلنی استرپتومیست روی جنسون آگار



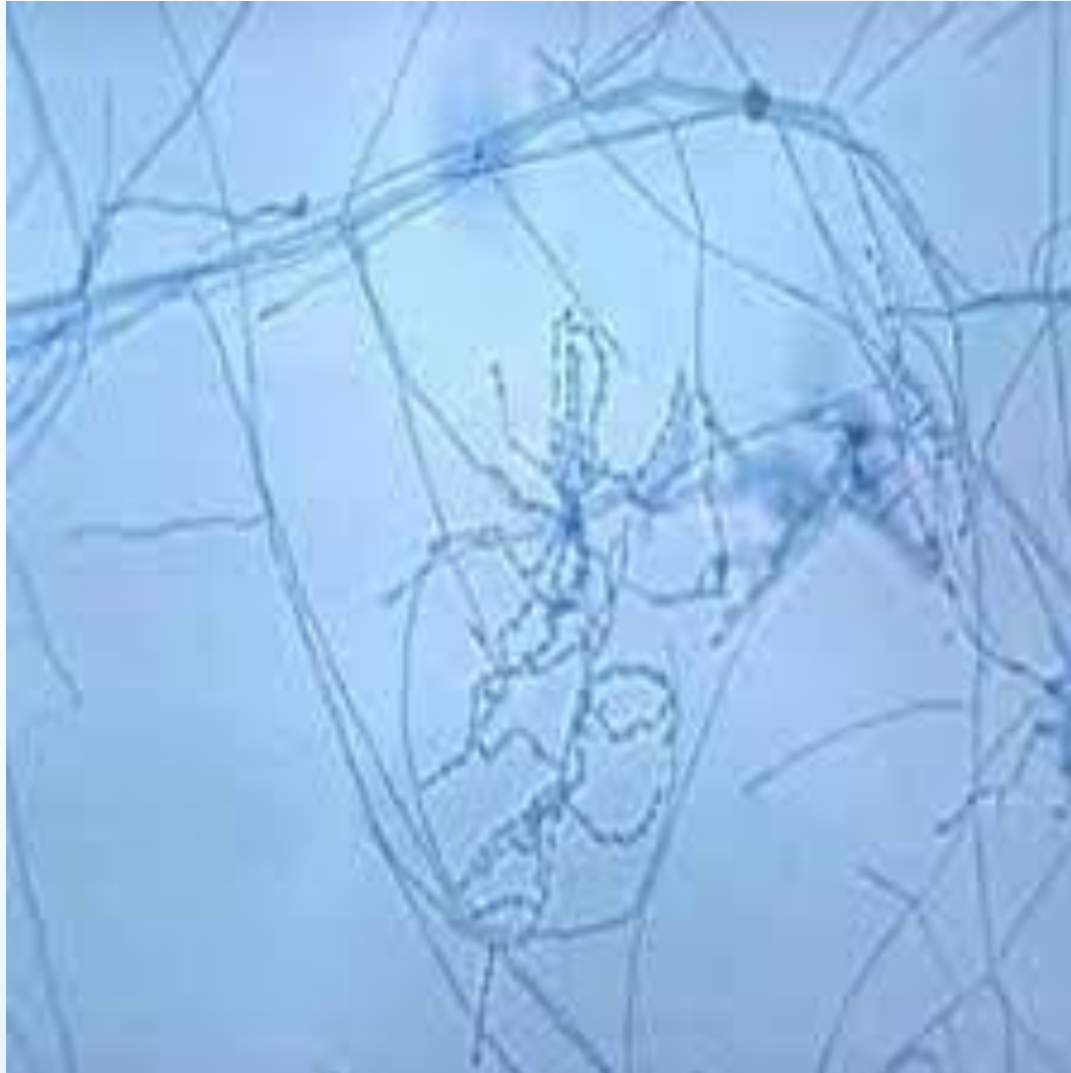
تهیه کننده : سهیلا عباسی

# کلنی استرپتومیست روی بلاد آگار



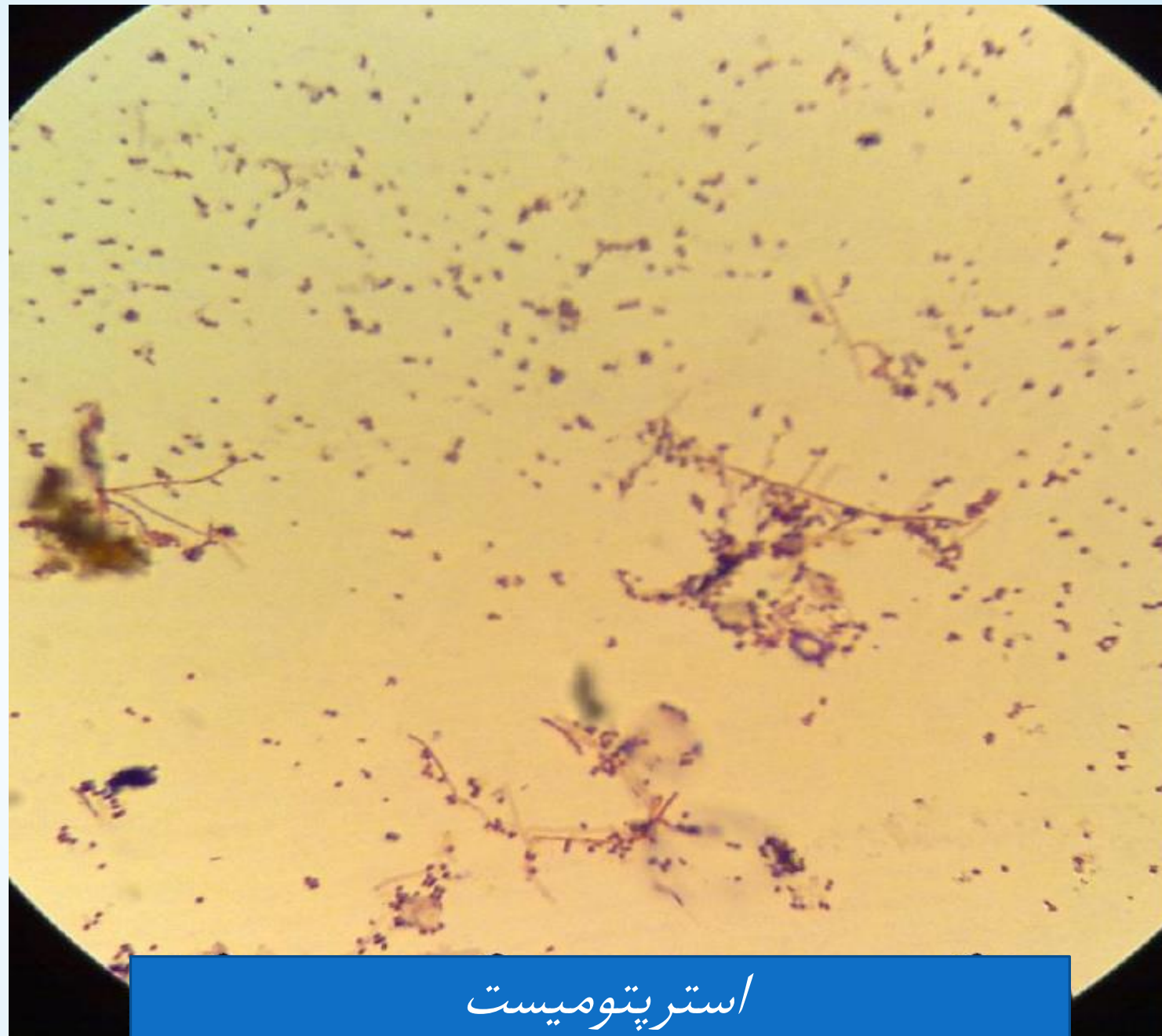
تهیه کننده : سهیلا عباسی

# اكتينوميست



تهیه کننده : سهیلا عباسی

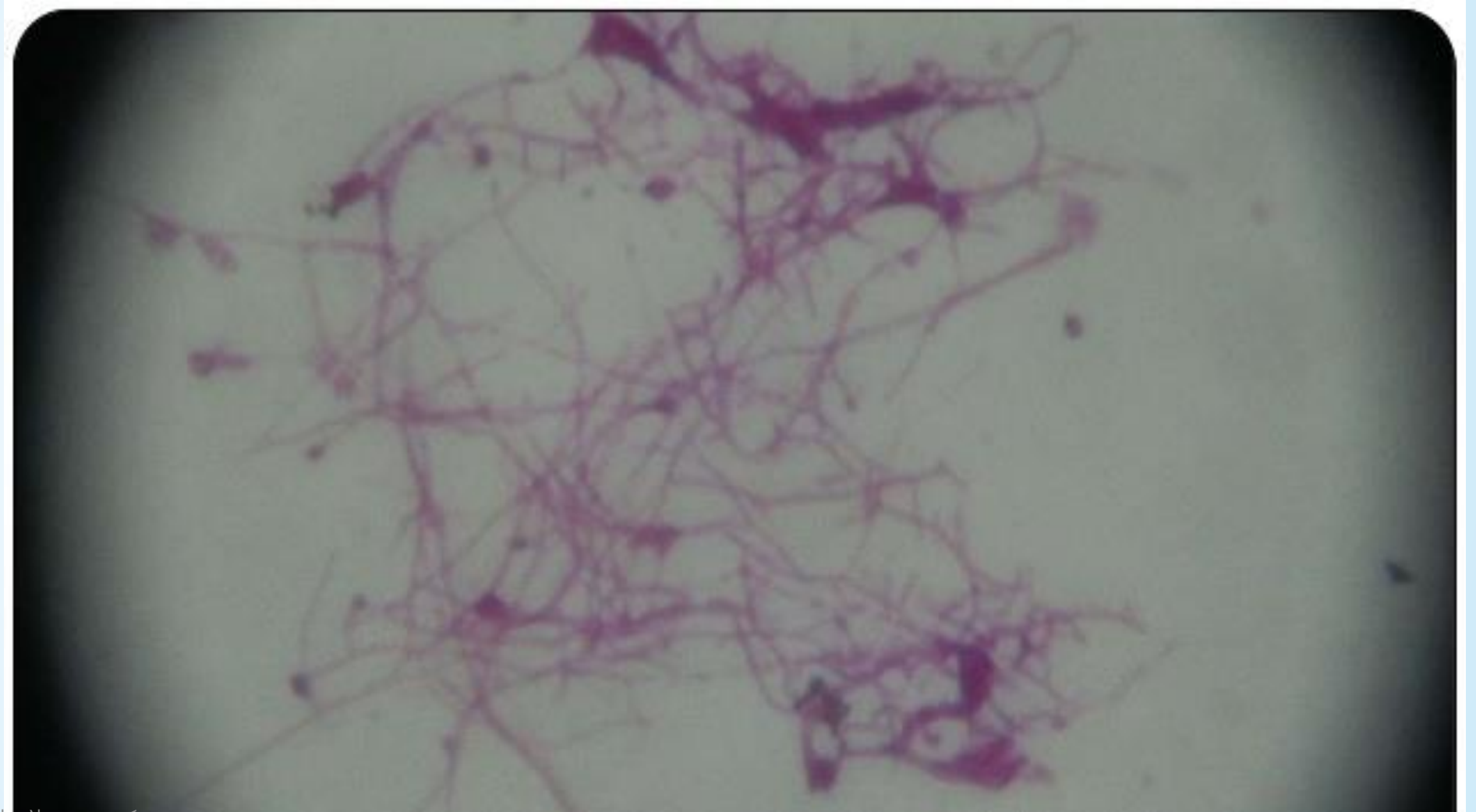




استرپتومیست

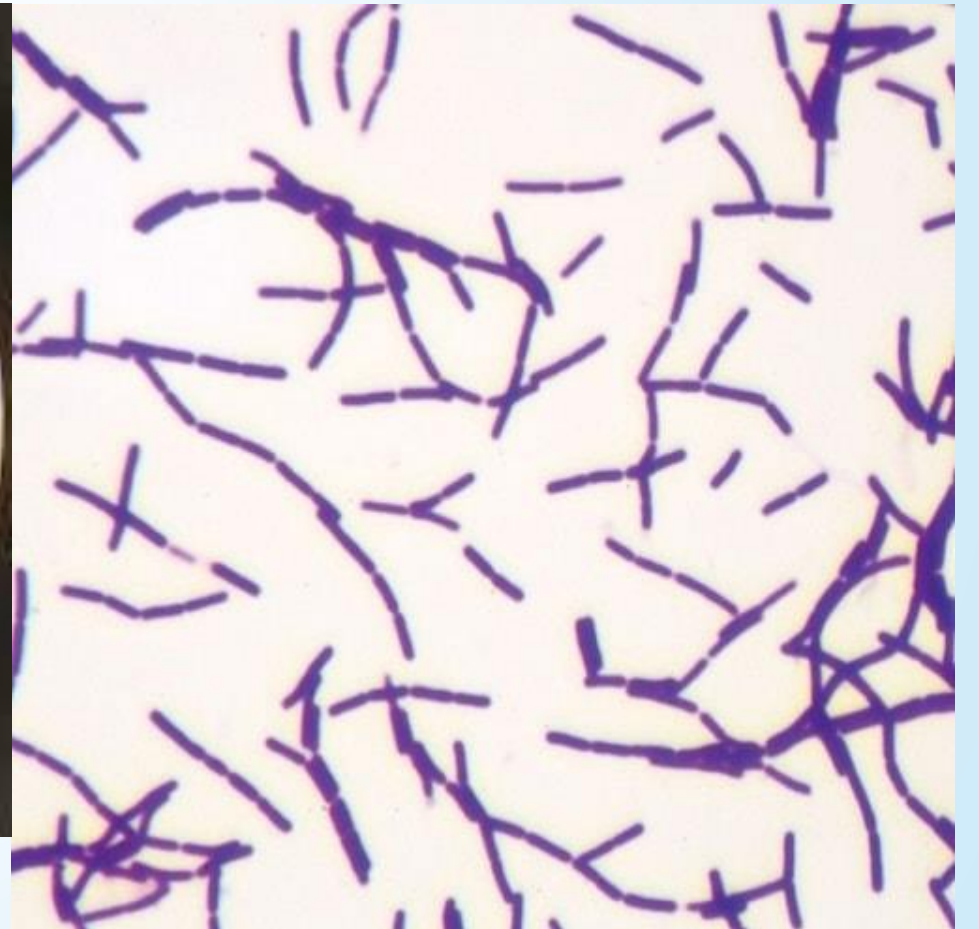
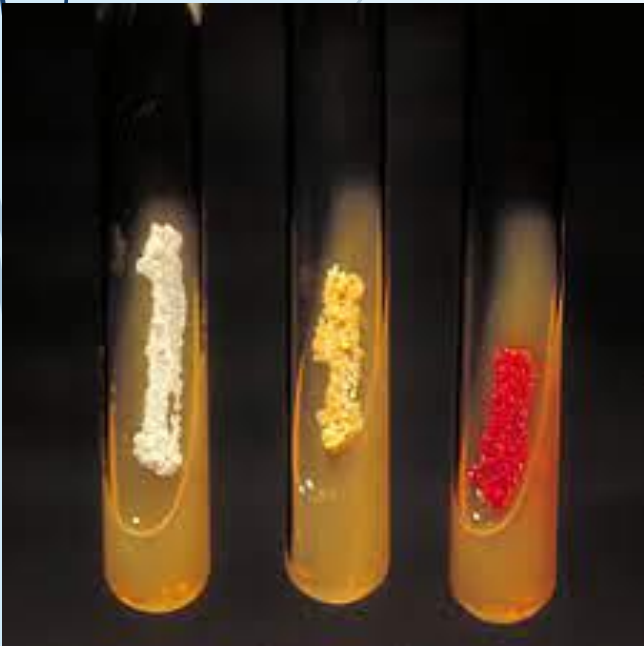
تهیه کننده : سهیلا عباسی

# نوکار دیا



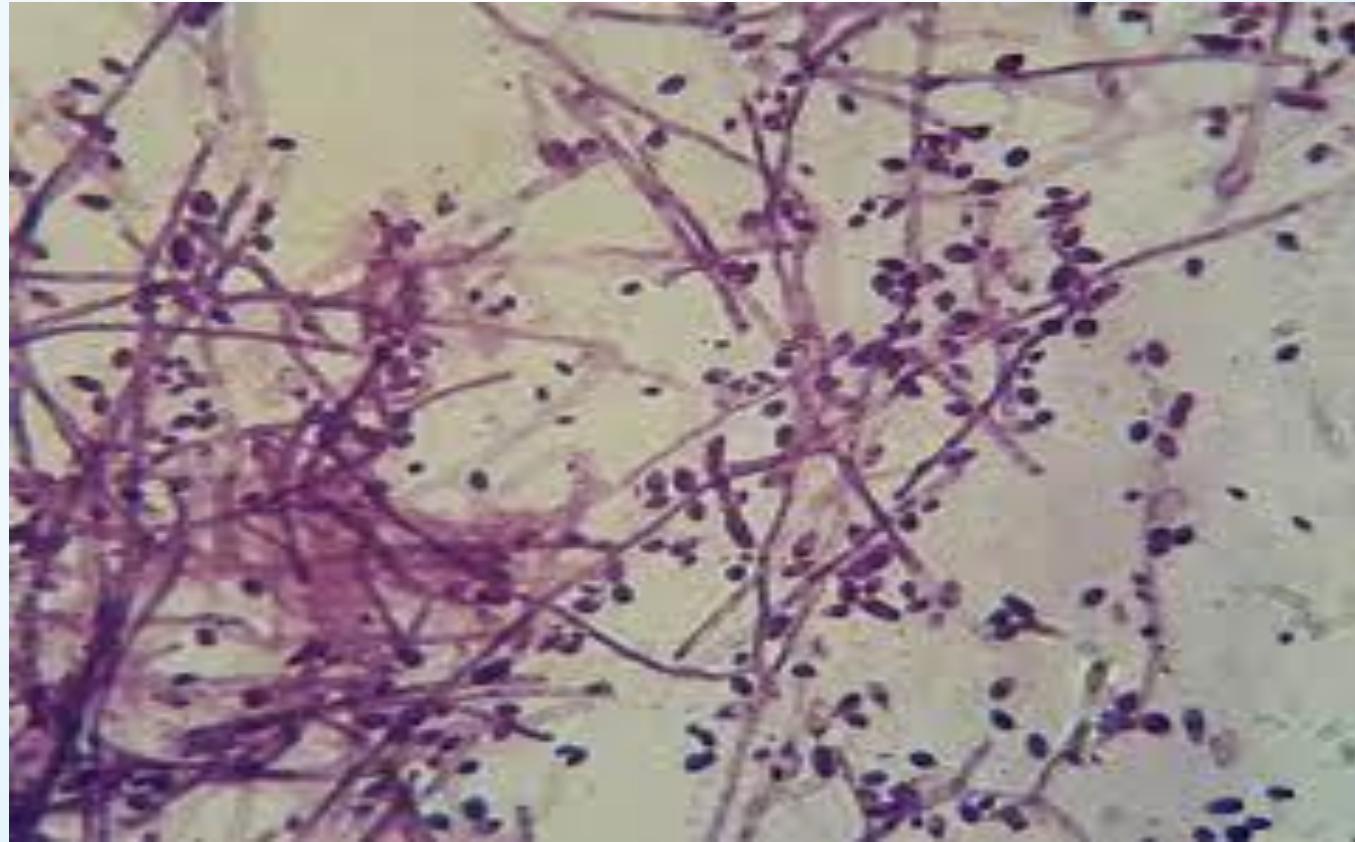
تھیہ کنندہ : سہیلا عباسی

# نوکار دیا

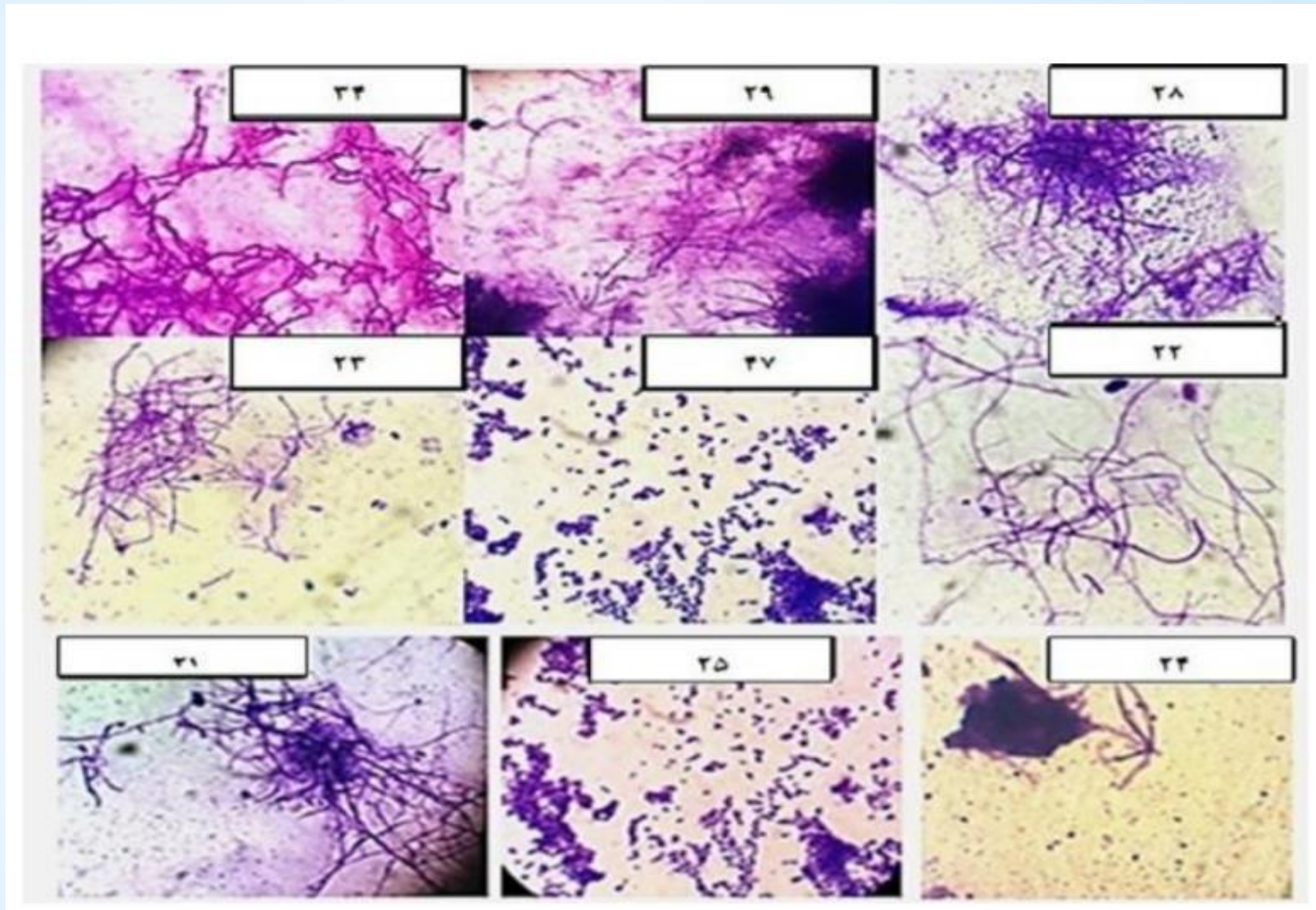


تهیه کننده : سهیلا عباسی

# استرپتومیسیت

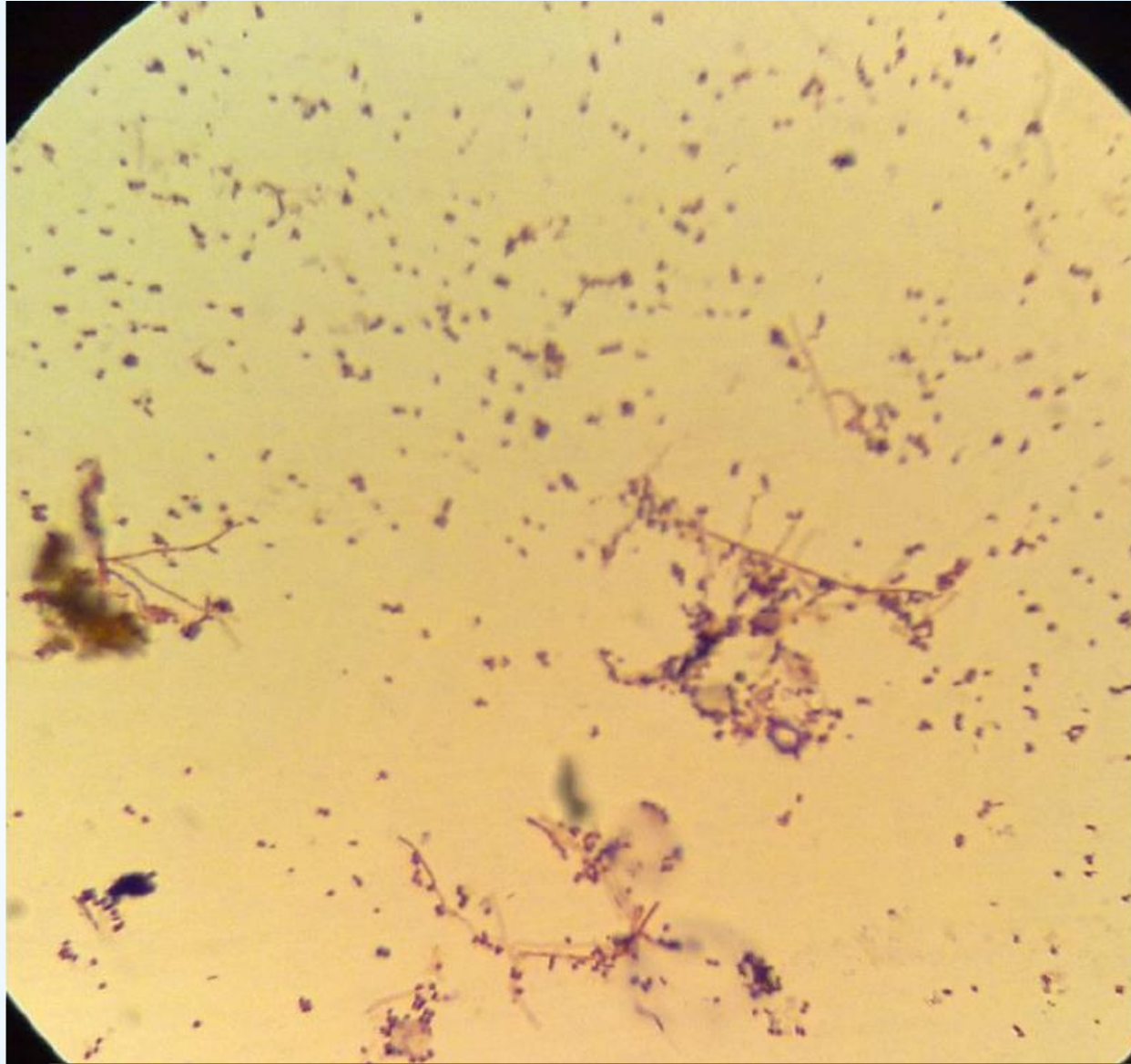


تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

تهیه کننده : سهیلا عباسی



استرپتومیسیت



تهیه کننده : سهیلا عباسی

# اكتينو ميست



تهیه کننده : سهیلا عباسی





# اسلايد كالچر

copyright © by aloazemayesh.com

تهیه کننده : سهیلا عباسی

# روش کار

34

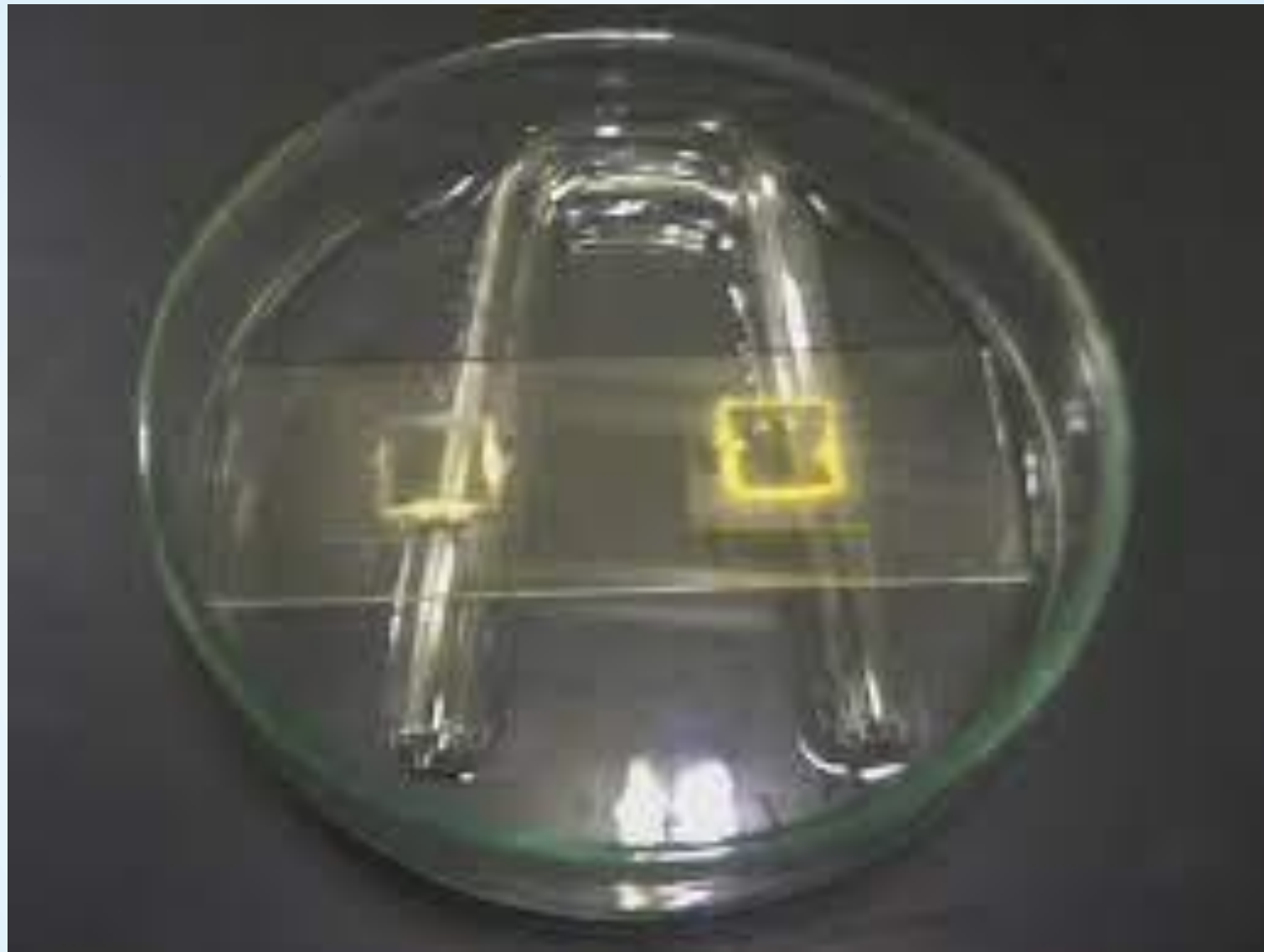
در یک پلیت خالی استریل شده مقداری از محیط ساپروز دکستروز آگار را بریزید و بگذارید تا منعقد شود. بعد با استفاده از اسکالپل استریل مقداری از محیط به ابعاد ۱ سانتیمتر مربع بریده و آن را روی لام قرار دهید (لام را چند بار از روی شعله عبور دهید تا استریل شود) بعد از اینکه آگار در مرکز لام قرار گرفت آن را روی لوله لاشکل که درون یک پلیت شیشه ای بزرگ است به صورت افقی قرار دهید. اکنون با استفاده از آنس استریل کپک را در چند نقطه از محیط روی لام تلقیح کنید.

بعد یک لامل برداشته و با پنس آن را داخل الکل فرو کرده و بیرون آورید، یک بار آن را از روی شعله عبور دهید تا الکل باقیمانده آن بسوزد و استریل سازی لامل کامل انجام بشود.

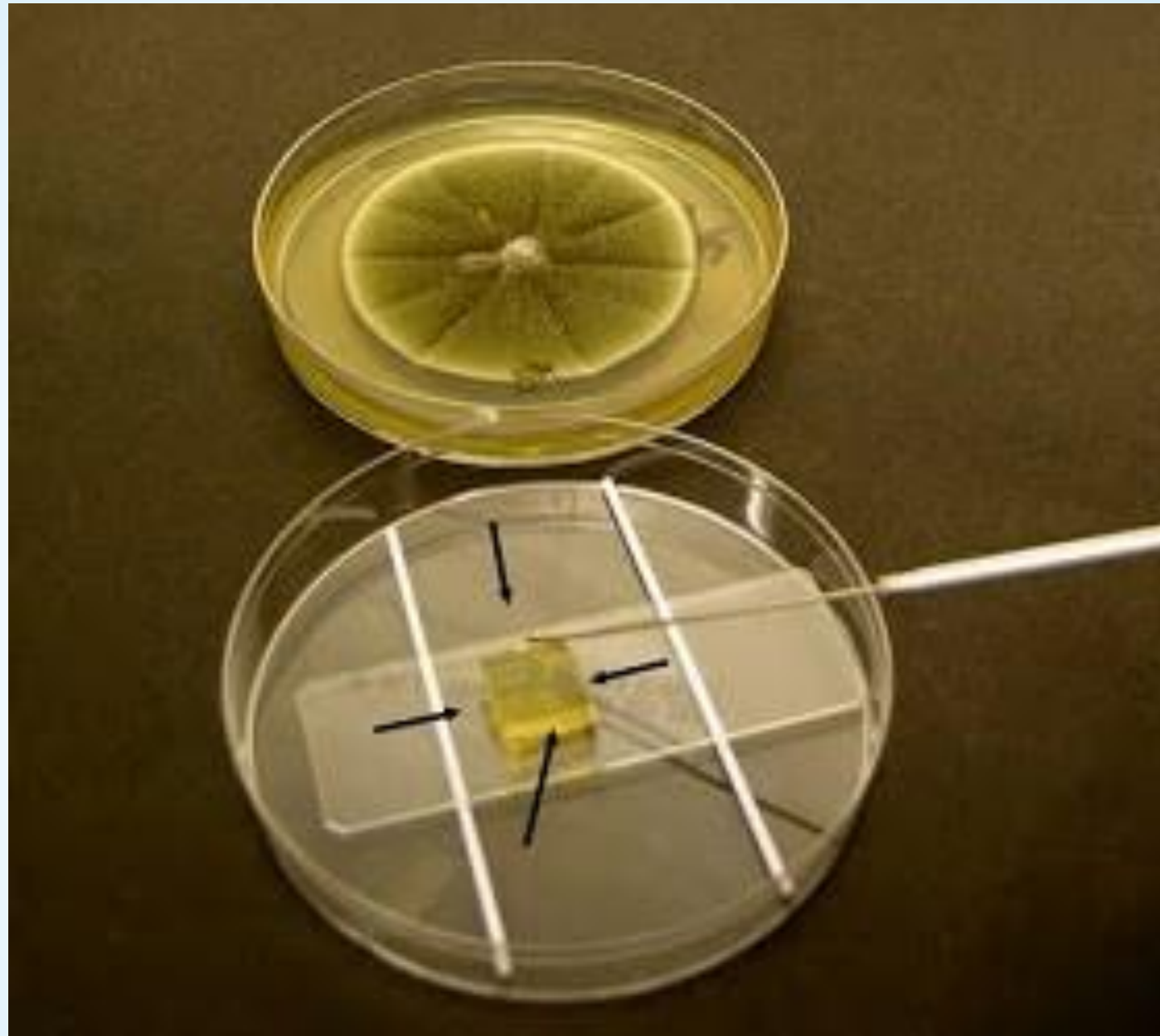
حال لامل سترون شده را روی قطعه آگار تلقیح شده قرار دهید. درب پلیت را ببندید و آن را داخل انکوباتور ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز بگذارید.

نکته: برای جلوگیری از خشک شدن قطعات آگار در طول مدت انکوباسیون حدود ۱۰ CC آب مقطر استریل را داخل پلیت بریزید اما مواظب باشید تا آب روی قطعه آگار یا لام و لامل نریزد

بعد از دوره انکوباسیون می‌توانید لامل را جدا کرده و بعد دو قطره لاکتو فنول - کاتن بلو را روی لام تمیز دیگری ریخته و لامل را با کپکی که به آن چسبیده روی لام قرار داده و ساختمان آن را با میکروسکوپ مشاهده کنید.



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



با سیاس فراوان از توجه شما