



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جدا سازی و مطالعه ی باکتری های تثبیت کننده ی ازت

1

ازت مولکولی که حدود چهار پنجم حجم جو زمین را تشکیل می دهد، تقریباً برای کلیه ی موجودات اعم از حیوان و گیاه، علی رغم نیاز شدیدی که به این ماده دارند، غیر قابل استفاده است. محصولات کشاورزی جهان سالانه ۱۰۰ میلیون تن ازت از خاک خارج می کنند.

بعضی از باکتری ها به صورت همزیست و بعضی به صورت آزاد همچینین به صورت هوازی و بی هوازی قادر به تثبیت ازت می باشند .

اصولاً در حالت غیر همزیستی، باکتریها و جلبک های آبی مایل به سبز رنگ دو گروه اصلی تثبیت کننده ازت محسوب می شوند. مهم ترین باکتریهای تثبیت کننده ازت از خانواده ازتوباکتریاسه و باسیلاسه هستند علاوه بر آن ها گونه هایی از جنس های مختلف دیگر و بعضی باکتریهای فتوسنتتیک نیز تا حدودی قادر به انجام این عمل هستند.

خانواده ازتوباکتریاسه *Azotobacteraceae*

▶ باکتریهای این خانواده همگی هتروتروف، هوازی مطلق، فاقد اسپور، گرم منفی و تثبیت کننده ازت هستند. مهمترین گونه های تثبیت کننده ازت به ترتیب اهمیت در سه جنس ازتوباکتر (*Azotobacter*) بیژرنکیا (*Beijerinckia*)، درکسیا (*Drexia*) قرار می گیرند.

▶ این باکتری ها به اندازه و شکل های مختلفی دیده می شوند به جز گونه ی بیژرنکیا که فاقد تاژک است سایر گونه ها به وسیله ی تاژکهای متعدد اطراف سلولی حرکت می کنند. کلیه گونه های این باکتریها مولد کیست هستند.

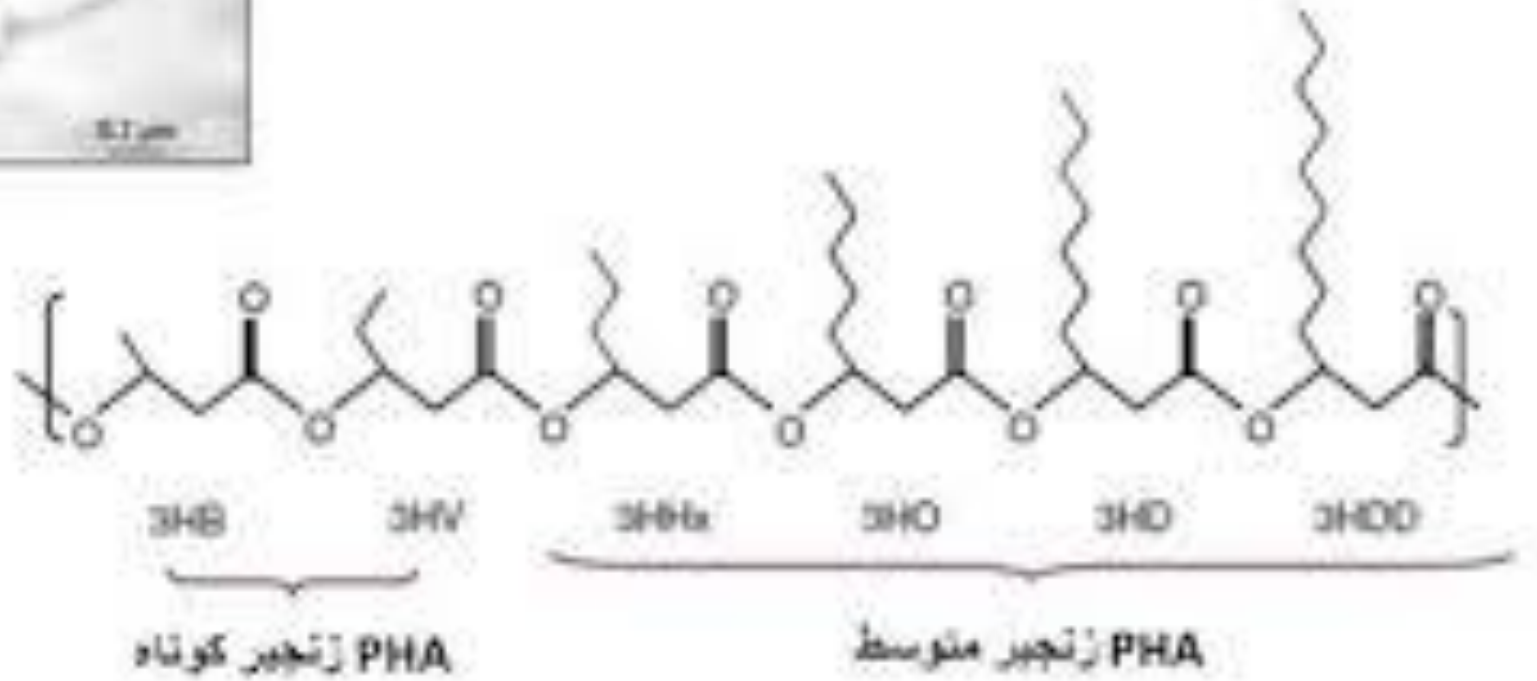
➤ هنگامی که میکروارگانیزم به کیست تبدیل می شود تحرک خود را از دست می دهد و شکل ظاهری آن تغییر می کند (به صورت سلول های کوچک مدور به قطر ۱-۲ میکرون در می آیند .)

➤ ذخیره چربی در این باکتریها پلی بتا هیدروکسی بوتیریک اسید است .

➤ کیست باکتری از دو لایه تشکیل شده است . کیست داخلی از جنس پلی ساکارید است و کیست خارجی از جنس لیپوپلی ساکارید همراه با یون کلسیم و گاهی همراه با سیلیس می باشد . به خاطر وجود این کیست ، میکروارگانیزم برای مدت ها قادر به تحمل درجه حرارت صفر درجه می باشد. معمولاً فلور میکربی ازتوباکتر خاک در زمستان کاهش می یابد .



کپسول های PHA





تهیه کننده : سهیلا عباسی

با وجود که مقدار ازت تولیدی توسط ازتوباکتر در مقایسه با باکتری های همزیست بسیار کم می باشد. (۲/۵-۰/۲ کیلوگرم ازت در سال به هر هکتار در مقایسه با ازت اضافه شده توسط ریزوبیوم که در حدود ۳۰۰ کیلوگرم ازت در سال به هر هکتار خاک است) ولی در مناطقی که گیاهان تیره لگومینوز کاشته نمی شوند، دانه های گیاهان را با ازتوباکتر آغشته می کنند که به این عمل باکتریزاسیون می گویند.

▶ باکتری‌زاسیون با ازتوباکتر باعث رشد سریع دانه می‌شود زیرا نه تنها تثبیت ازت را انجام می‌دهد، بلکه با تولید ویتامین و هورمون رشد جیبرلین و اسیدهای آمینه ضروری برای رشد سرعت رشد را افزایش می‌دهد. این باکتری همچنین با تولید آنتی بیوتیک از رشد بعضی از قارچها مانند فوزاریوم جلوگیری می‌کند.

▶ از تجزیه DNA ازتوباکترها نتیجه شده است که درصد مجموع گوانین و سیتوزین (C+G) بعضی از گونه‌ها تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارند. بر اساس مشابهت DNA، گونه‌ها را به گروه‌های کروکوکوم، بیژرنکی، و نیلانندی و آزیلیس تفکیک کرده‌اند.

▶ ازتوباکترها می‌توانند ازت مورد نیاز خود را از ترکیب‌های مختلفی مانند نمک‌های آمونیاکی، اوره، بعضی از اسیدهای آمینه بخصوص آسپارتیک و گلوتامیک اسید تأمین نمایند.

At present six species of *Azotobacter* are known –

1. *A. chroococcum*
2. *A. vinelandii*
3. *A. nigricans*
4. *A. paspali*
5. *A. armenicus*
6. *A. salinestris*

Azotobacter are much more abundant in the rhizosphere of plants than in the surrounding soil and that this abundance depends on the crop species.

A. chroococcum is the most commonly found species in soils.

➤ ۱- تهیه ی پلاستیکهای تجزیه شونده :

برای تهیه ی نخهای بخیه کاربرد دارد .

➤ ۲- استخراج آلژینات : ترکیبی

گرانقیمت است که در دندانپزشکی کاربرد دارد .

➤ ۳- در تهیه نانوتیوب و نانوفیلتر در

نانوتکنولوژی

➤ ۴- درمان سرطان و انتقال ژن های

نو ترکیب .

➤ از بین ازتوباکتر و نیلانندی گونه ای است

که چربی فراوان تولید می کند .

به علاوه اغلب سوشهای آن قادر به مصرف نیترب و

یا نیتراهای مختلف هستند ولی در صورتیکه محیط

رشد آن ها فاقد ترکیبات ازت دار بوده و یا مقدار این

مواد خیلی خیلی کم باشد به تثبیت ازت می پردازند .

از این باکتری ها استفاده های زیادی می شود:

خانواده ی باسیلاسه

12

از این خانواده که شامل باکتریهای میله ای شکل ، گرم مثبت و تولید کننده ی اسپور داخلی است گونه های جنس کلستریدیوم اهمیت زیادی در تثبیت ازت مولکولی دارند به علاوه قدرت تثبیت در بعضی گونه های باسیلوس نیز دیده شده است .

➤ گونه‌ی اصلی این جنس از لحاظ تثبیت ازت کلستریدیوم پاستورانیوم است. اسپور آن‌ها اکثراً بیضی شکل بوده و به علت قطر بیشتری که نسبت به باکتری دارد پس از تشکیل آن، سلول کمی متورم شده تقریباً حالت دوکی شکل پیدا می‌کند.

➤ در بین گونه‌های باسیلوس، گونه‌ی باسیلوس پلی میکسا که بی‌هوازی اختیاری است، باسیل تثبیت‌کننده ازت شناخته شده است. ولی عمل تثبیت ازت را فقط در شرایط بی‌هوازی انجام می‌دهد. گونه‌های ماسرانس و سرکولانس هم که بی‌هوازی اختیاری هستند تثبیت ازت را فقط در شرایط بی‌هوازی انجام می‌دهند.

باکتری های فتوتروف

➤ به دلیل بیهوازی بودن و در عین حال احتیاج به نور بیشتر در سطح آبهای شیرین و گاهی شور، چشمه های گوگردی حاوی هیدروژن سولفور و یا در گل و لای، لجنزارها و زمینهای خیلی مرطوب و غرقابی به سر می برند.

➤ مهم ترین اختلاف فتوسنتز این باکتریها با گیاهان در این است که برای احیای CO_2 گیاهان از آب و باکتریها معمولاً از ترکیب های گوگردی احیا شده مانند هیدروژن سولفور و سولفورها به عنوان دهنده هیدروژن و یا الکترون استفاده می کنند و به همین دلیل باکتریهای گوگردی هم خوانده می شوند. از این خانواده گونه هایی از جنس ردوسپریلیوم، ردوسودوموناس و ردومیکروبیوم در تثبیت ازت دخالت دارند.

▶ باکتریهای دیگری نظیر کلبسیلا پنومونیا (آئروباکتر آئروموناس)، انتروباکتر کلوواک، اشیشیا انتریدیا و یا باکتریهای بی هوازی، انواع احیا کننده های سولفات از جنس دسولفوویبریو و دسولفوتوماکولوم قادر به تثبیت ازت هستند .

▶ بعضی از انواع جلبک ها نیز قادر به تثبیت ازت می باشند. سرعت تثبیت ازت بوسیله ی جلبکها کندتر از باکتری ها است، اضافه کردن مقداری از ترکیبات مدنی ازت دار به محیط کشت، سبب کاهش و یا توقف تثبیت ازت می شود ولی شدت تأثیر آن روی جلبک ها خیلی کمتر از باکتریها است .

تثبیت ازت در قارچ ها، بیشتر در مخمر ها به خصوص انواعی از جنس ساکارومایسس مشاهده شده است. در راسته اکتینومیستال نیز قدرت تثبیت ازت مولکولی بندرت در بعضی انواع مثل نوکاردیا، رتیکولوباکتریوم (گونه ی فلاووم) به عنوان تثبیت کننده ازت مولکولی معرفی شده اند.

مهم ترین آنزیمی که در تثبیت ازت دخالت دارد نیتروژناز است، در سیستم نیتروژناز باکتری فلز آهن و مولیبدن در ساختار آن وجود دارد و برای فعالیت آن ضروری است. کمبود این ها در محیط کشت می تواند مانع از فعالیت سیستم نیتروژناز شود.

سنجش نیتروژن

17

۱- استفاده از ترکیباتی مانند استیلن ، نیتروژن سیانید یا نیتروز اکساید :
نیتروژن از این ترکیبات را احیا می کند .

نحوه سنجش :

باکتری را در لوله ای قرار می دهند و درب آن را با پلیمرهای پلاستیکی مناسب می پوشانند. مقداری گاز استیلن به داخل لوله تزریق می کنند سپس لوله را به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می کنند. نیتروژن از استیلن را به اتیلن احیا می کند. پس از این مدت، با سرنگ حجم معینی از گاز بالای لوله را استخراج می کنند.

توسط تکنیک gc (gas chromatography) میزان اتیلن تعیین می شود که معیاری برای سنجش آنزیم نیتروژناز است.

۲- استفاده از متد Kejeldal

این تکنیک در دسترس تر می باشد. در این روش باکتری را روی محیط کشت فاقد ازت کشت می دهند. پس از رشد باکتری محیط کشت (مایع) را ابتدا با اسید غلیظ H_2SO_4 همراه با حرارت هضم اسیدی - حرارتی می کنند به این صورت که ابتدا اسید اضافه می کنند و سپس روی هیتر حرارت می دهند. ازت کلی تولید شده با استفاده از متد Kejeldal تعیین می شود. به این ترتیب میزان نیتروژن از سنجیده می شود.

جدا سازی ازتوباکتر

ازتوباکتر جنس اول از خانواده *Azotobacteraceae* می باشد . گرم منفی، کروی و نسبتاً درشت و دارای کپسول بزرگی در اطراف آن می باشد که در خاک های حاصلخیزی که pH نزدیک خنثی دارند ظاهر می شود متحرک یا غیر متحرک هستند و به واسطه داشتن کیست قادر به تحمل شرایط نامساعد در محیط است.

ازتوباکتر را می توان به راحتی از خاک جدا کرد. زیرا در محیط های فاقد آمونیاک به خوبی رشد می کند. در حالیکه اکثر باکتریهای تثبیت کننده ازت در شرایط بی هوازی در محیط فاقد ازت رشد می کنند.

روش کار

19

➤ ۱. آماده کردن نمونه :

نمونه مناسب برای جداسازی ازتوباکتر خاک های تازه از باغچه یا مزرعه می باشد ولی خاک هایی که به تازگی به آن ها کود اضافه شده است مناسب نمی باشند.

➤ ۲. خاک را ساییده و الک می کنیم.

➤ ۳. مقداری از خاک را به حالت نمک پاش روی محیط ازتوباکتر می بریم.

طریقه ساخت محیط ازتوباکتر به شرح زیر می باشد :

ابتدا نمک ها را وزن کرده و درون ارلن ریخته و آب را به آن اضافه می کنیم بعد pH را روی ۷/۲ با استفاده از سود نرمال تنظیم می کنیم و بعد آگار را اضافه می کنیم و پس از تهیه آن را استریل کرده و در پتری دیش ها می ریزیم .

2 gr	Manitol
0/075 gr	KH ₂ PO ₄
0/025 gr	K ₂ HPO ₄
0/05 gr	MgSO ₄ + 7H ₂ O
0/04 gr	FeSO ₄
0/002 gr	Na ₂ MoO ₄
0/3 gr	CaCO ₃
2 gr	Agar
100 ml	D.W

این محیط کلی است اما با تغییر منبع کربن می توان آن را اختصاصی کرد . به طور مثال :

مانیتول برای جداسازی ازتوباکتر کروکوکوم
 ساکارز برای جداسازی درکسیا
 نشاسته برای جداسازی ازتوباکتر و نیلانیدی
 بنزوات سدیم برای جداسازی آزوموناس

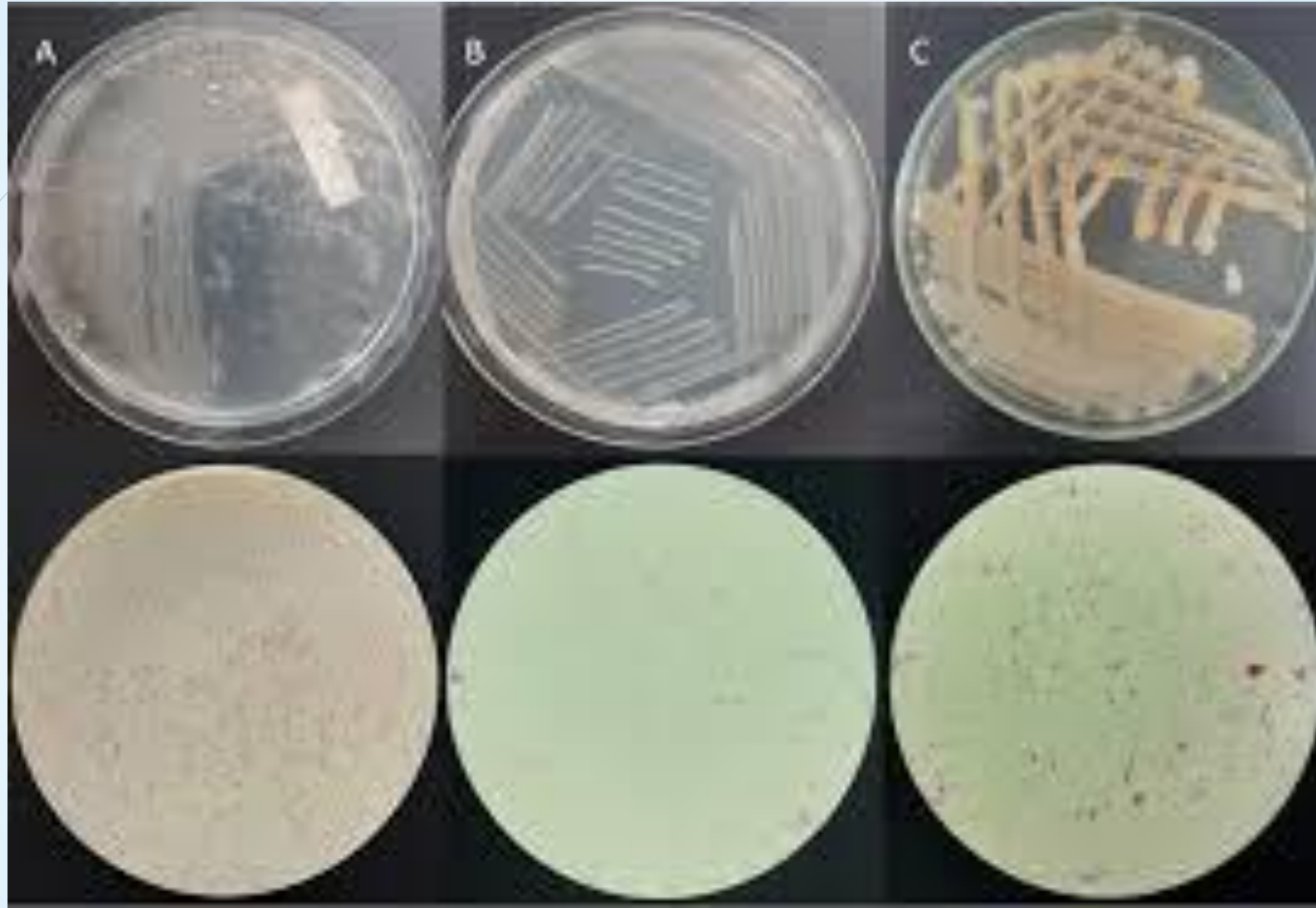
- ۴. پللیت را در دمای ۲۵ درجه به مدت یک هفته قرار می دهیم. (پللیت را بر نمی گردانیم)
- ۵. بعد از یک هفته ابتدا ظاهر کلنی را بررسی می کنیم.
- ▶ کلنی های بزرگ ، گرم رنگ ، موکوییدی
- ۶. از کلنی ها رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم.
- ▶ مرفولوژی باکتری به صورت دوتایی، گرم منفی، کپسول دار، کوکوباسیل
- ۷. رنگ آمیزی سودان سیاه جهت بررسی دانه های چربی انجام می دهیم.



تهیه کننده : سهیلا عباسی

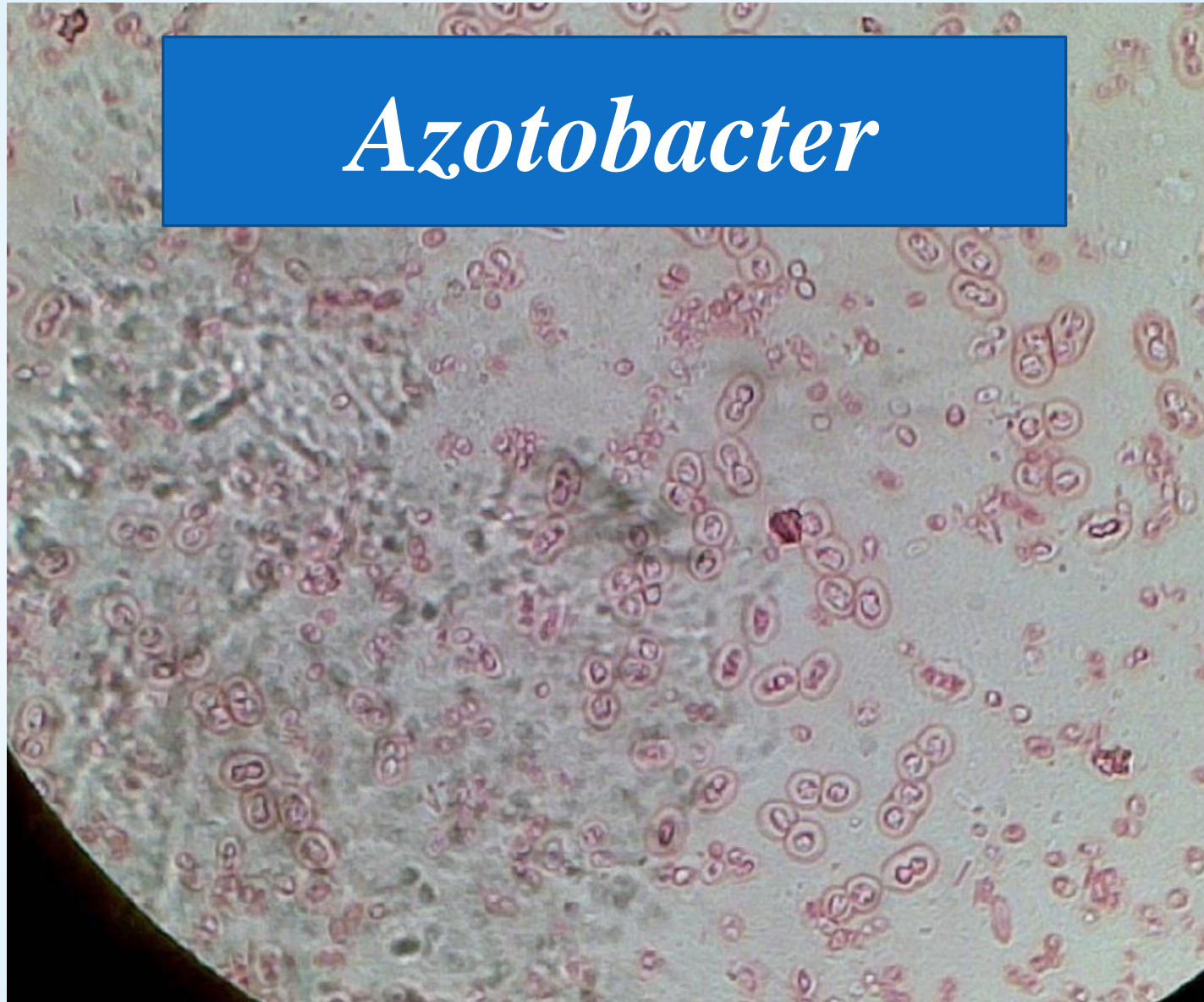
تهیه کننده : سهیلا عباسی





تهیه کننده : سهیلا عباسی

Azotobacter



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

Drexia



تهیه کننده : سهیلا عباسی

روش رنگ آمیزی سودان سیاه:

۱- تهیه فروتی

۲- تثبیت

۳- فروبردن در رنگ سودان سیاه به مدت ۲۰ دقیقه

۴- گزینل به مدت ۱ دقیقه

۵- سافرانین به مدت ۱ دقیقه

۶- شستشو

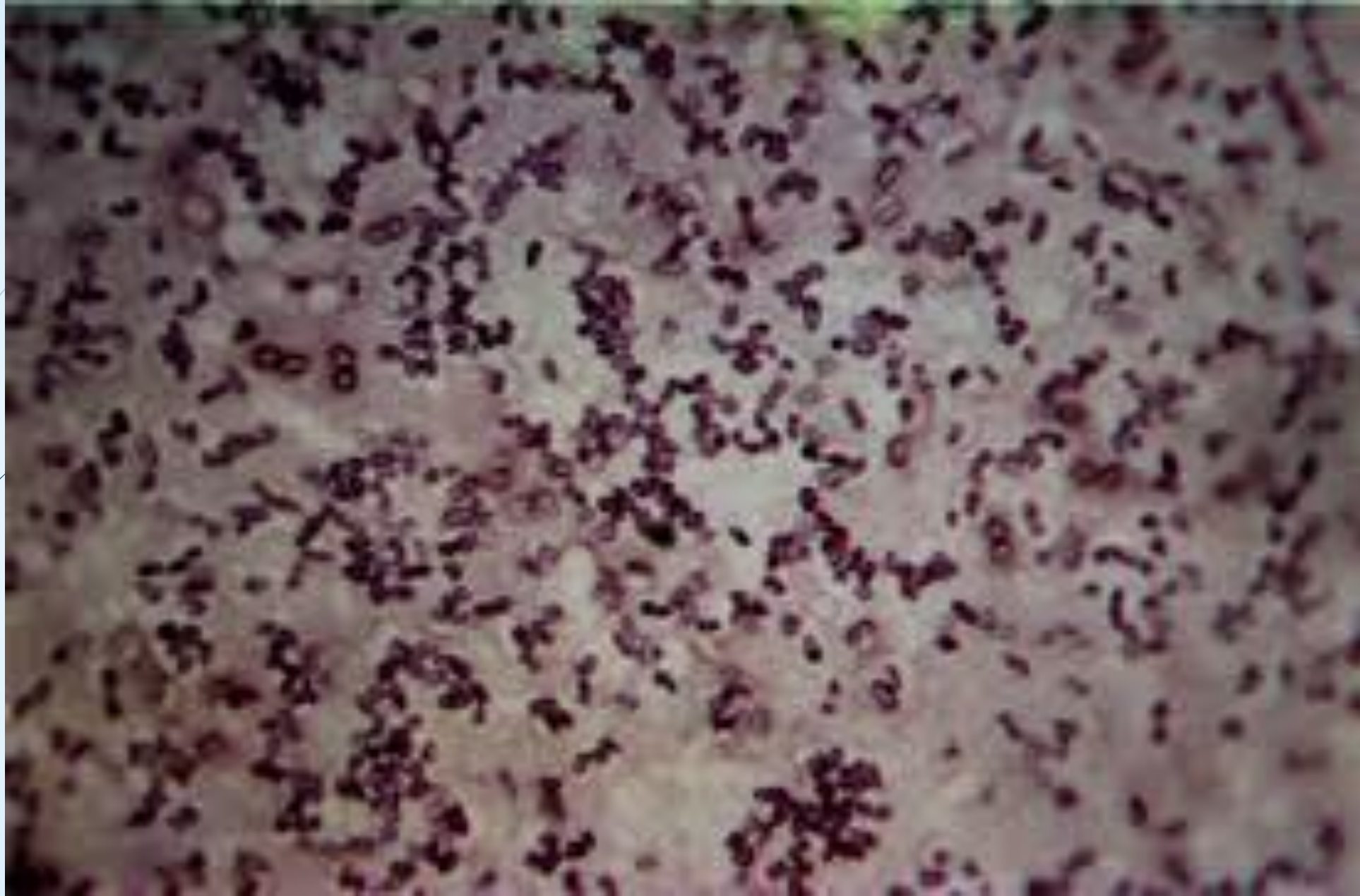
۸. خشک کردن و دیدن زیر میکروسکوپ

در این حالت باکتریها به رنگ قرمز و دانه های چربی به رنگ سیاه داخل باکتریها دیده می شوند.

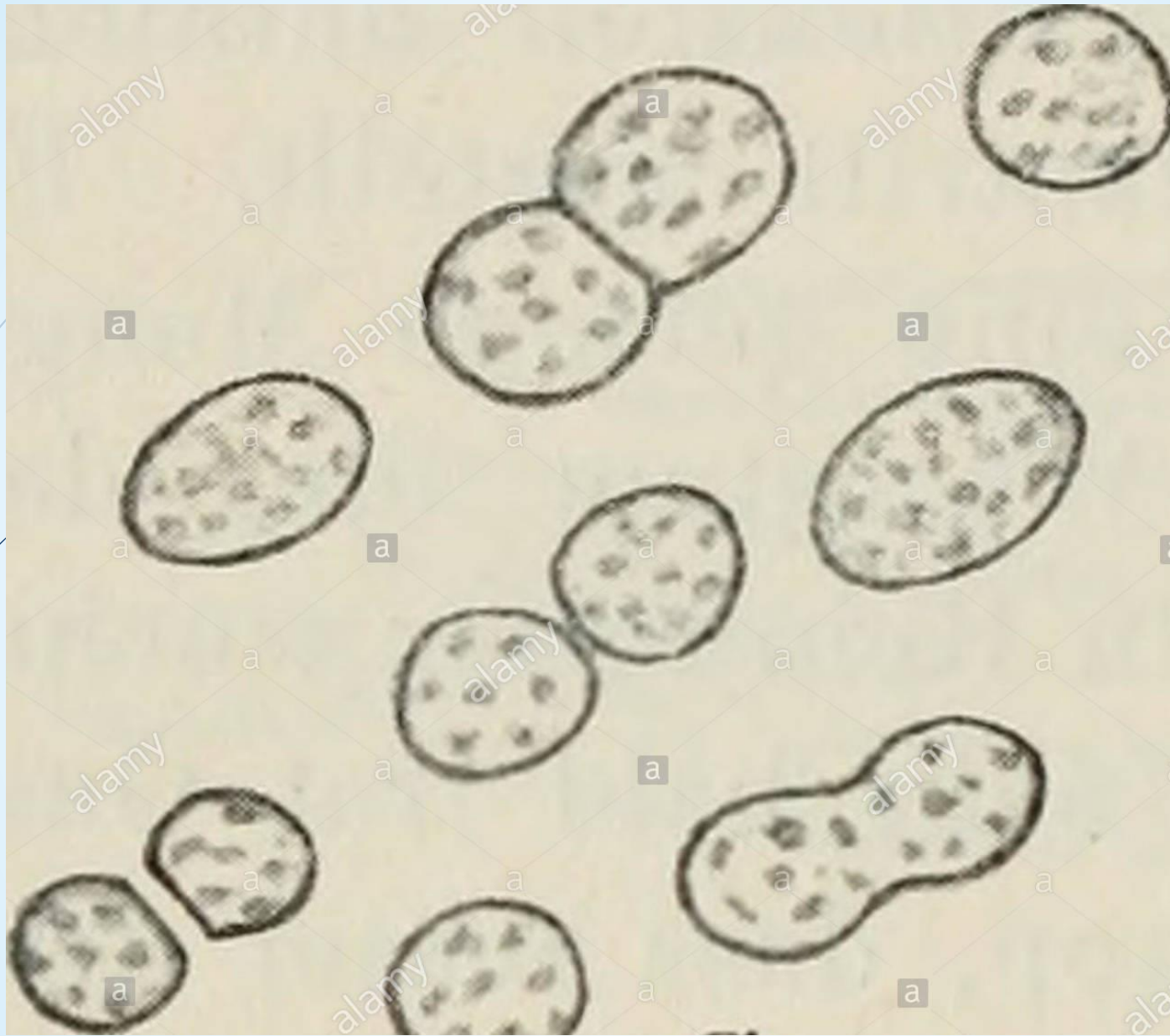
۹. جهت مطالعه کیست باکتریها پلیت را بعد از رنگ آمیزی یک هفته دیگر درون انکوباتور ۲۵ درجه قرار می دهیم.

بعد از یک هفته ظاهر کلنی ها از کرم رنگ به قهوه ای تغییر شکل می دهند.

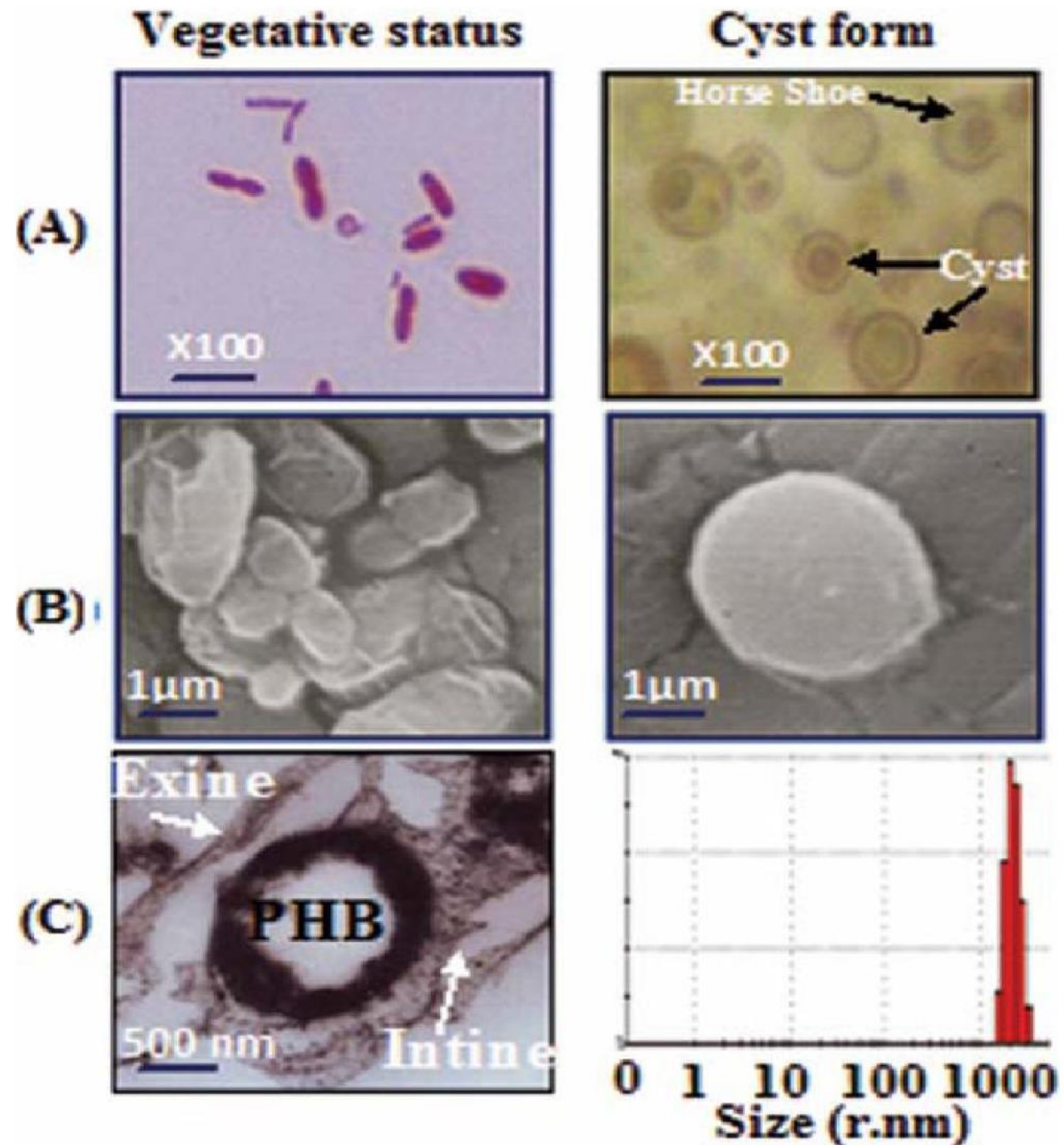
سپس رنگ آمیزی ساده با سافرانین از کلنی انجام می دهیم در زیر میکروسکوپ کیست به صورت لایه های چنی خورده دیده می شود هرچه کیست رسیده تر باشد لایه های چنی خورده بیشتر دیده می شود بعضی دیگر از باکتریهای تثبیت کننده مانند آزوموناس ممکن است در این محیط رشد کنند. ولی این باکتریها میله ای شکل و درشت می باشند و فاقد کیست می باشند.



تهیه کننده : سهیلا عباسی

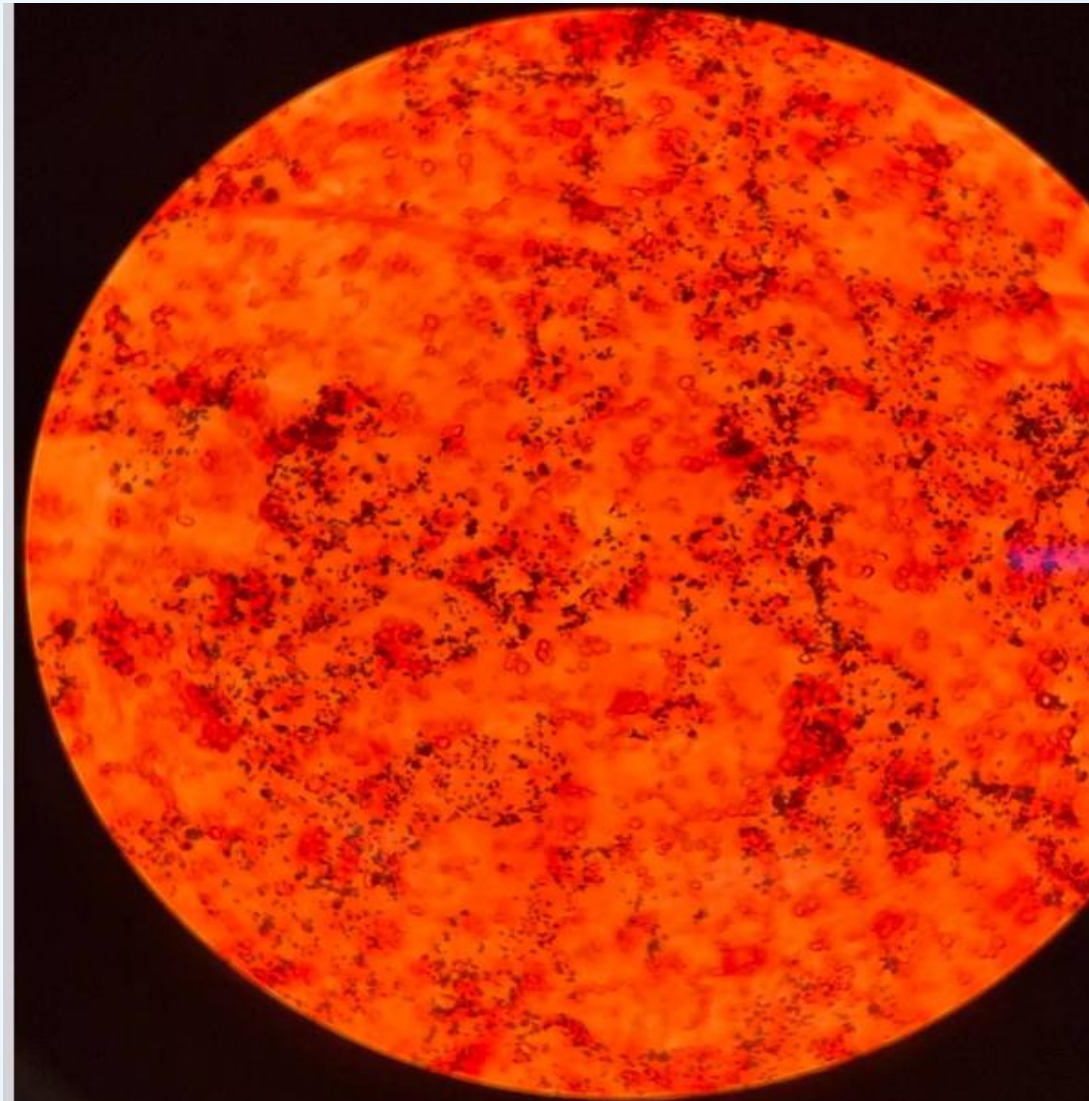


تهیه کننده : سهیلا عباسی



دانه های چربی

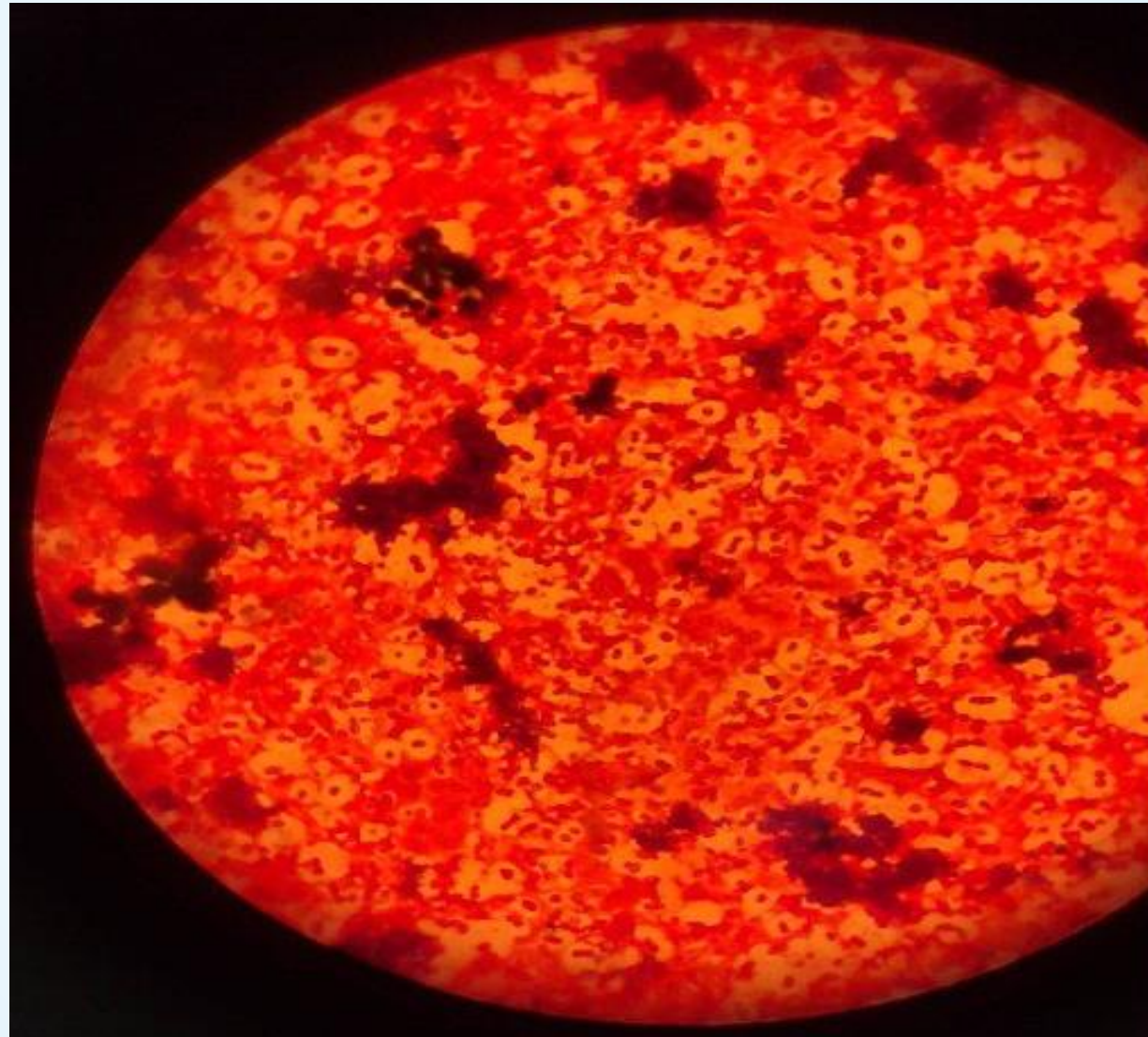
33



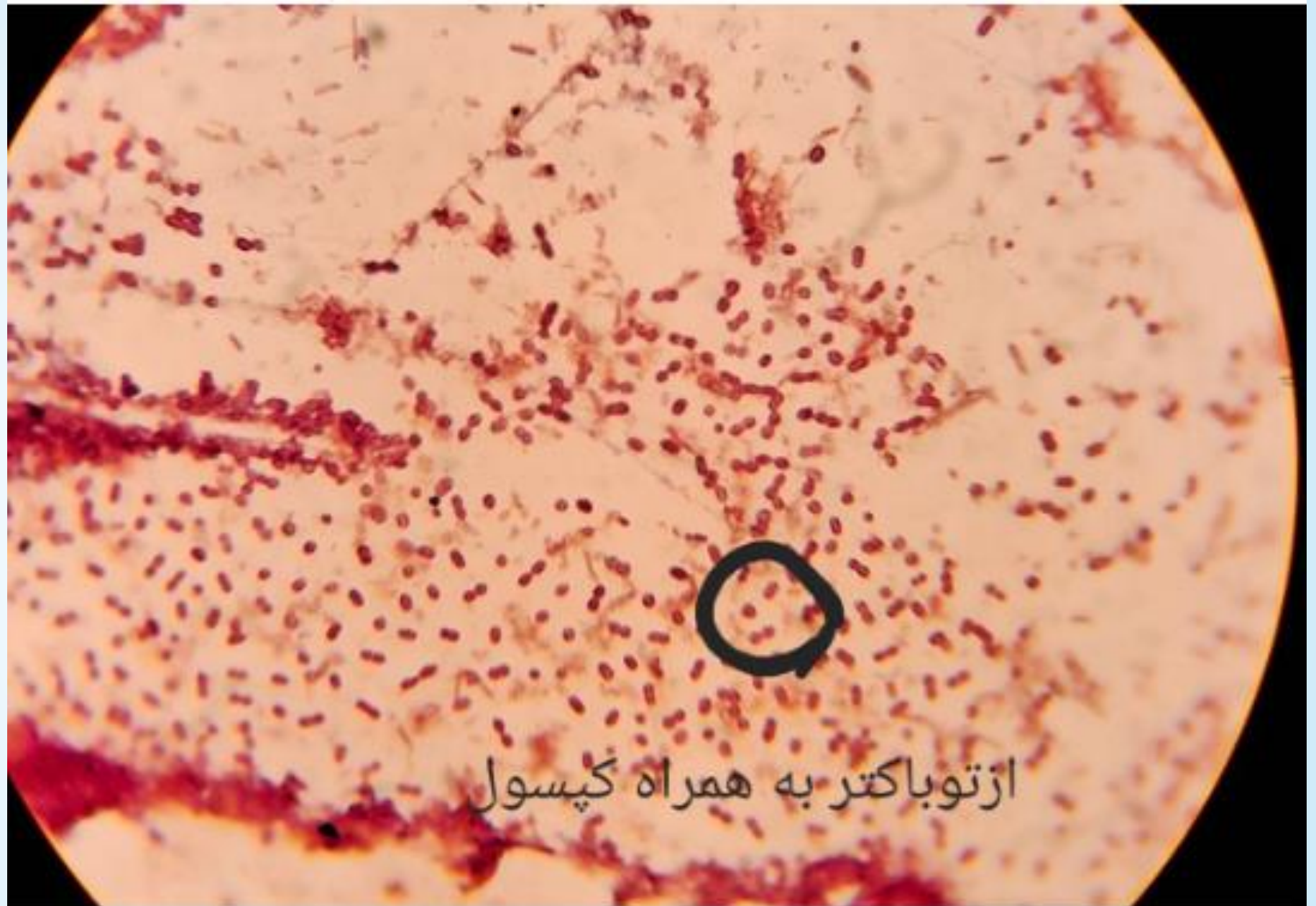
تهیه کننده : سهیلا عباسی

کپسول از توباکتر

34



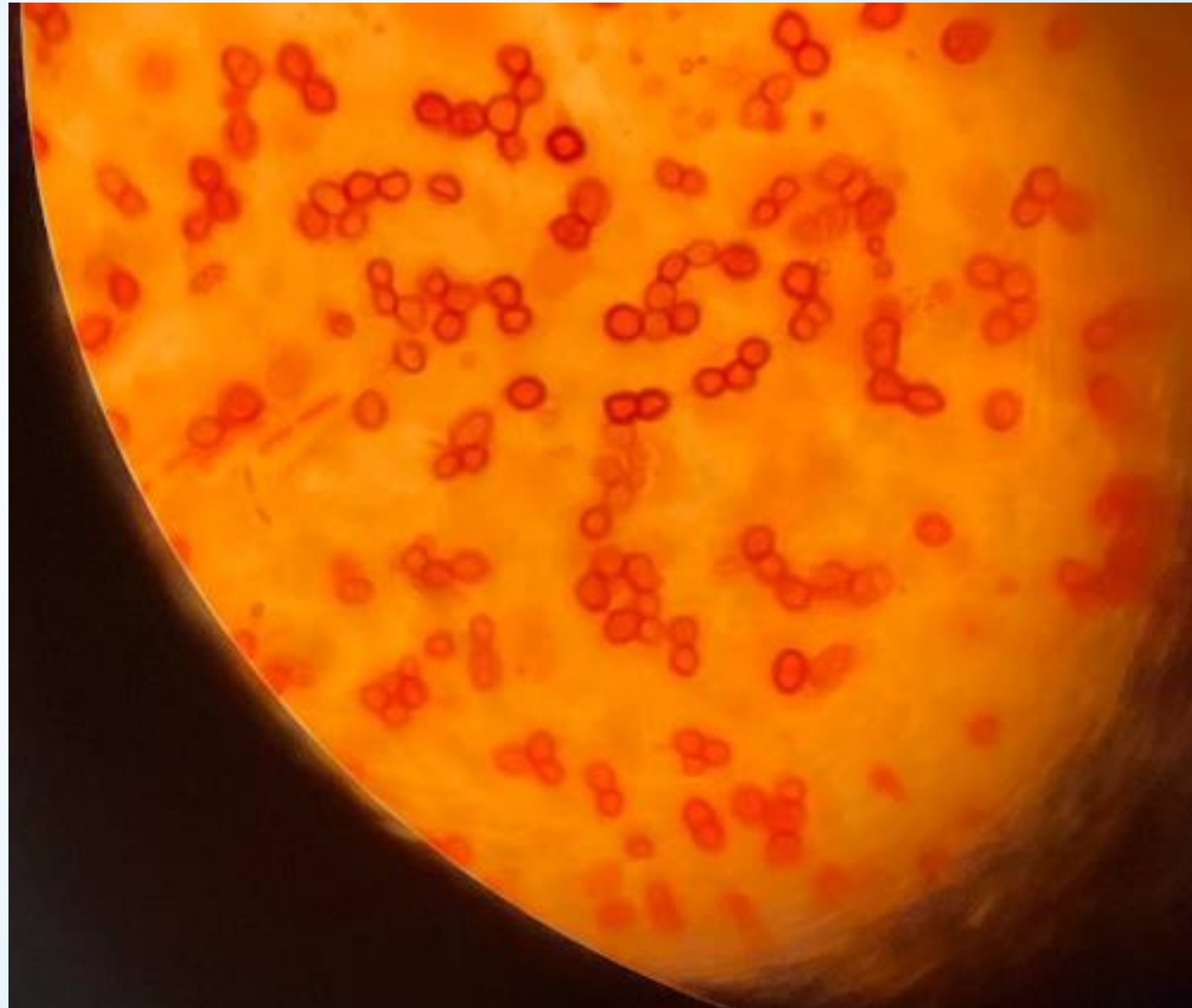
تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

کیست از توباکتر

36



تهیه کننده : سهیلا عباسی



با سیاس فراوان از توجه شما