



دانشگاه اصفهان

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

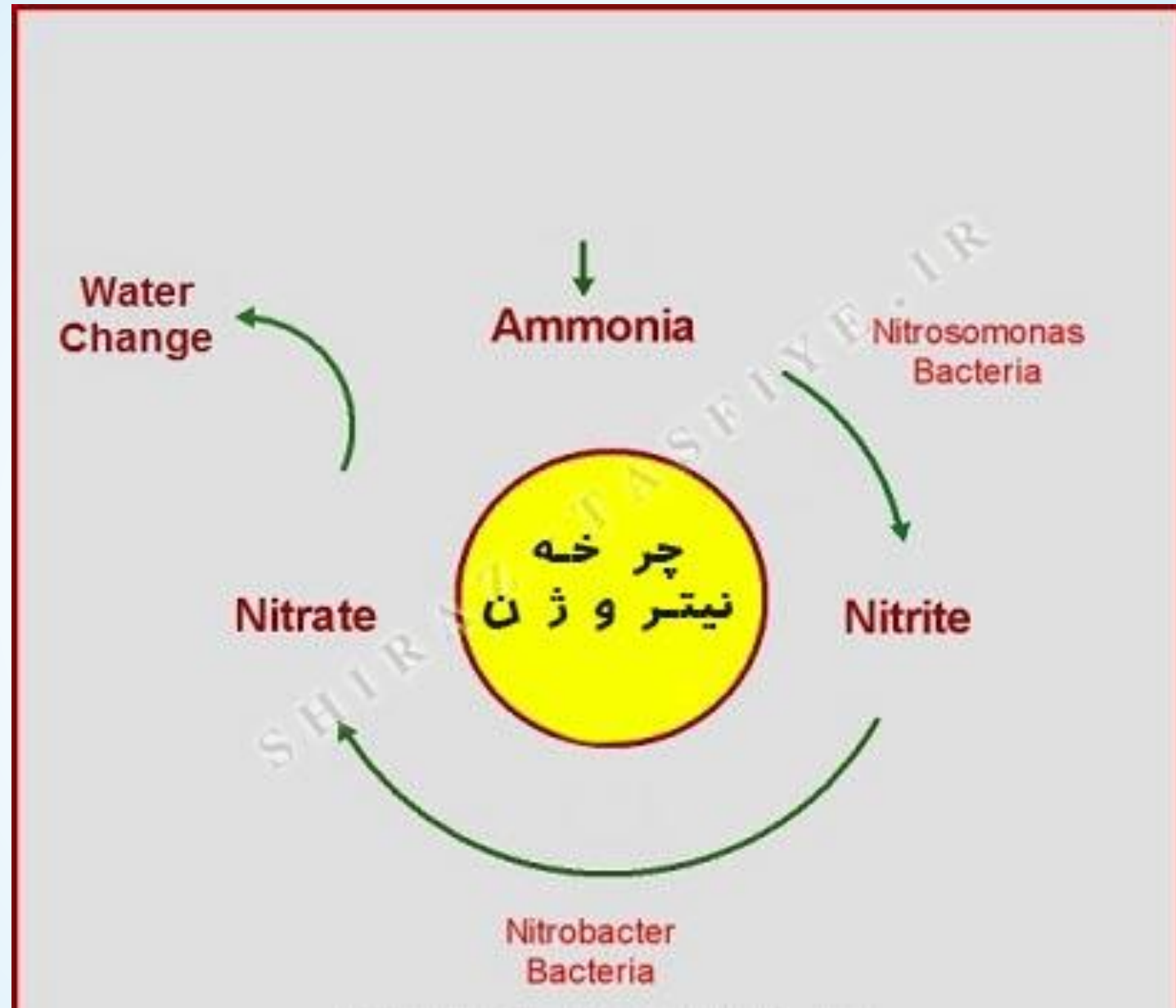


آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

جداسازی و مطالعه ی باکتری های اکسید کننده

نیتريت و آمونیاک

1

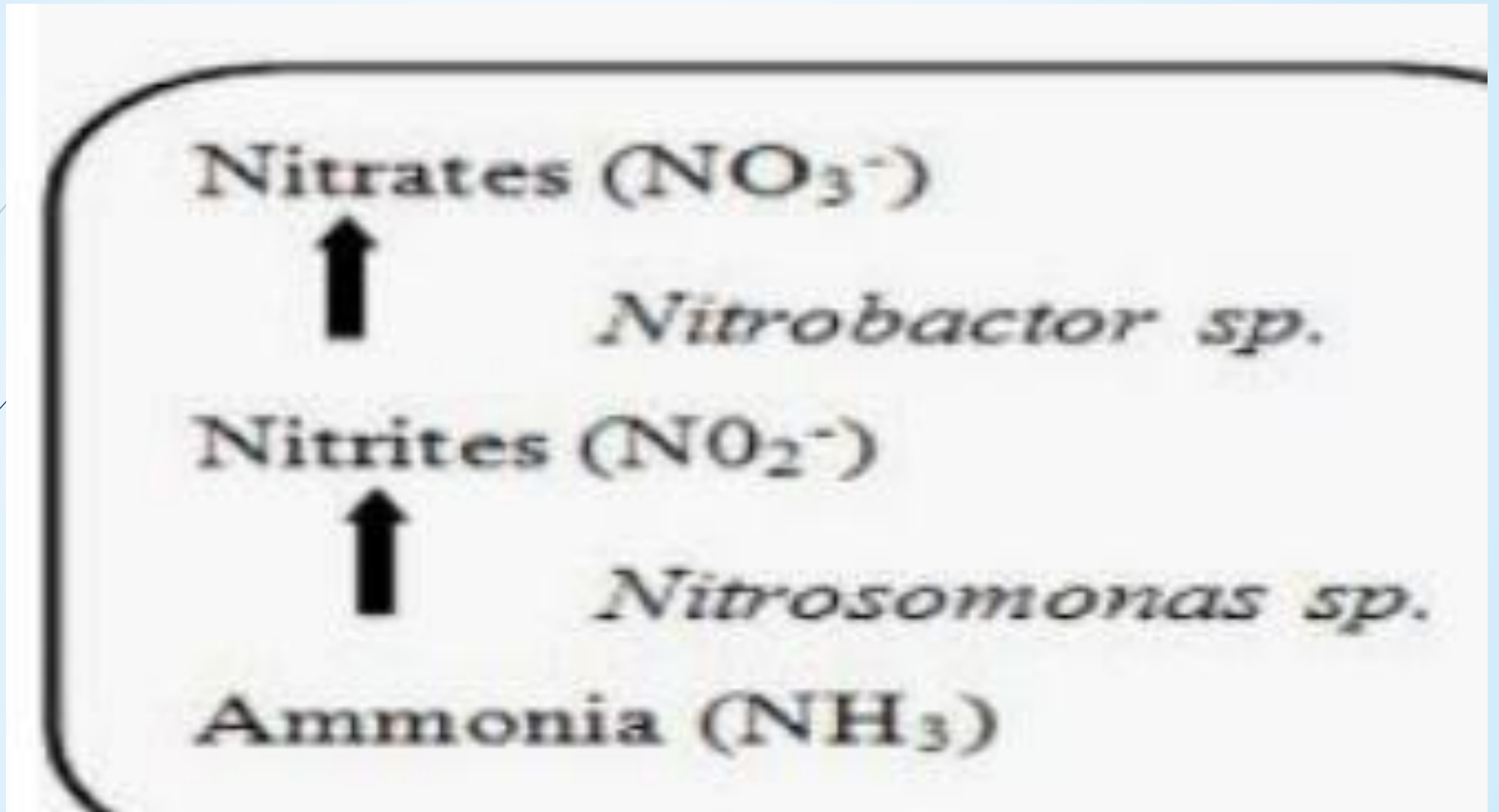


➤ نیتریفیکاسیون از دو بخش اکسید شدن آمونیاک و اکسید شدن نیتريت تشکیل شده است.

➤ نیتریفیکاتورها به طور گسترده در خاک و آب وجود دارند.

➤ نیتروزوموناس آمونیاک را به نیتريت و نیتروباکتر نیتريت را به نترات اکسید می کند.

➤ باکتری های هتروتروف و قارچ ها قادرند از آمونیاک نیتريت و یا نترات تولید کنند ولی میزان آن بسیار ناچیز است.



➔ اکسیژن مولکولی و آنزیم مونو اکسیژناز برای اکسید شدن آمونیاک نیاز است.

➔ اولین محصول حاصل از اکسید شدن آمونیاک هیدروکسیل آمین (NH_2OH) است و انرژی در این مرحله حاصل نمی شود. هیدروکسیل آمین به نیتريت اکسید می شود و ATP از طریق NADH و فسفوریلاسیون تولید می گردد.

➤ انرژی حاصل از اکسیداسیون نیتريت و آمونیاك ناچيز می باشد و به همین علت این باکتریها کند رشد هستند و حداقل دو هفته رشد آن ها طول می کشد آنزیم های مهمی در اکسیداسیون نیتروژن نقش دارند.

➤ آمونیاك مونواکسیژناز و هیدروکسیل آمین اکسید و ردوکتاز در اکسید کردن آمونیاك به هیدروکسیل آمین و نیتريت موثر می باشند.

➤ آنزیم آمونیاك مونواکسیژناز جزو پروتئین درونی غشا است. در حالی که هیدروکسیل آمین اکسید و ردوکتاز در غشا می باشد. سیتوکروم C و بی کوئینون در انتقال الکترون نقش دارند. باکتری های اکسید کننده نیتريت حاوی آنزیم نیتريت اکسیداز می باشند سیتوکروم a و b انتقال دهنده الکترون هستند.

جداسازی باکتری های اکسید کننده آمونیاک و نیتريت

7

برای جداسازی این باکتری ها باید مطمئن شد باکتری جدا شده در محیط غنی رشد نمی کند چون ممکن است باکتری همراه با اباکتری های هتروتروف باشد .

گرچه نیتريفیکاتور ها اتوتروف می باشند ولی نیتروباکتر می تواند از استات و پیرووات استفاده کند .

باکتری های اکسید کننده آمونیاک اتوتروف اند و از آمونیاک به عنوان تنها منبع انرژی و ازت استفاده می کنند. این باکتری در همه جا و به صورت پراکنده وجود دارند ولی معمولاً باکتری های الیگوتروف (باکتری های گرسنه پسند) و یا باکتری های هتروتروف مانع رشد و جداسازی این باکتری ها می شوند. اگر در آب مقطر میزان ناچیزی ماده ی آلی موجود باشد الیگوتروف ها رشد می کنند و مانع جداسازی این باکتری ها می شوند. اگر ماده آلی حتی در الیگوتروف ها نسبت به اتوتروف ها غالب خواهند شد .

زمان تقسیم هتروتروف ها خیلی کوتاه است و زمان تقسیم الیگوتروف ها نسبت به اتوتروف ها پایین تر است

بنابراین به شرطی می توانیم آن ها را جداسازی کنیم که بتوانیم رشد باکتری های هتروتروف و الیگوتروف را محدود کنیم برای این کار از آب مقطر دیونیزه و مواد کاملاً خالص استاندارد مرک استفاده کرد که عاری از مواد آلی باشد .

حتی آزمایشگاه های مطالعه باکتری های اتوتروف باید از آزمایشگاه های دیگر جدا باشد. چون وجود متان، اتانول، فرم آلدئید، متانول در هوا مانع از رشد این ارگانیسم ها می شوند .

بعضی از مواد مانند بی کربنات به عنوان ماده ی اشتها آور می باشد چون گاز کربن دی اکسید برای اکسیداسیون آمونیاک نیاز دارند .

▶ باکتری اکسید کننده ی آمونیاک ، آمونیاک را به انرژی و نیتريت تبدیل می کند. انرژی حاصل از میکروارگانيسم ها خیلی جزئی است به همین جهت کند رشد هستند و هم در محیط هایی که حاوی مواد آلی باشند رشد نمی کنند. با حفظ این شرایط باکتری ها را در محیط کشت مایع غنی می کنند و بعد از چند بار انتقال آن ها در محیط حاوی آمونیاک و آگارز جداسازی می کنند. کلنی های این باکتری بسیار ریز و چسبنده به سطح آگار می باشند و برای مشاهده ی آن از میکروسکوپ و یا لوپ استفاده می کنند.

▶ انتقال کلنی های خالص به محیط کشت مایع و در محیط کشت مایع بعد از ۲۱ روز نمایان گر جداسازی باکتری های اکسید کننده آمونیاک می باشد. تمام باکتری های اکسید کننده آمونیاک هوازی کاتالاز (+)، گرم منفی مانند نیتروزو کوکوس کوکسی گرم منفی و نیتروزوموناس میله ای گرم منفی .

▶ باکتری اکسید کننده نیتريت نیز تمام شرایط باکتری های اکسید کننده ی آمونیاک را دارد. بدین معنا که نیتريت را به عنوان تنها منبع انرژی استفاده می کنند. از اکسیداسیون نیتريت، نترات تولید شده و انرژی حاصل از این اکسیداسیون بسیار ضعیف است به همین جهت مانند باکتری های اکسید کننده ی آمونیاک کند رشد هستند.

▶ به عنوان مثال می توان نیتروباکتر را نام برد که باکتری گرم منفی هوازی کاتالاز مثبت حساس به ترکیبات آلی اتمسفر می باشد.

▶ فرم آلدئید اتروکلروفرم رشد باکتری را متوقف می کند. بنابراین برای هر دو باکتری ابتدا در سطح محیط مایع حاوی آمونیاک و نیتريت باکتری غنی سازی شده بعد از سه بار پاساژ در این محیط ها روی محیط جامد حاوی آگارز جداسازی می شوند این گونه باکتری ها کاربرد مهمی دارند چون هیچ نوع باکتری الیگوتروف و هتوتروفی قادر نیست آمونیاک را با غلظت بالا تحمل کنند و یا قادر به حذف آن نمی باشند

حتمی باکتری های هتروتروفی هستند که آمونیاک را جذب می کنند ولی هنگام مرگ آن را رها می کنند.

در حالی که باکتری های اتوتروف از آمونیاک نیتراتی تولید می کنند و چون باکتری ها نیتريت را به نیترات تبدیل می کنند در اثر دنیتريفیکاسیون آمونیاک کاملاً جذب می شود. این باکتری ها کاربرد هایی در زمینه ی حذف آلودگی آمونیاکی از پساب ها و حوضچه های پرورش ماهی دارند.

همچنین از غشاهای این باکتری در نانوتکنولوژی برای تبدیل آمونیاک به نیتريت و همچنین برای اکسیداسیون موادی مانند تترا اتیلن کلراید استفاده می کنند.

روش کار

12

۱. نمونه مورد استفاده خاک می باشد .

۲. نمونه خاک رابه میزان نیم گرم به صورت خاک الک شده و آماده به محیط نیتروزوموناس و یک گرم و نیتروباکتر تلقیح می کنیم .

0/5 gr	CaCO ₃
0/5 gr	MgSO ₄
1 gr	K ₂ HPO ₄
2 gr	NaCl
a little gr	FeSO ₄
1 Lit	D.W.

➤ طرز تهیه محیط نیتروزوموناس و نیتروباکتر

➤ محیط کشت نیتروزوموناس

➤ سولفات آمونیوم به عنوان انرژی و ازت چون اتوتروفند منبع کربن ندارند و از گاز دی اکسید کربن استفاده می کنند .

پس از استریل (۲۵ میلی لیتر در هر ارلن) ۴ قطره سولفات آمونیوم یک درصد و ۵/۰ گرم کربنات کلسیم خشک اضافه می کنیم. به خاطر وجود Ca محیط کشت سفید است.

1 gr	Na ₂ CO ₃
1 gr	K ₂ HPO ₄
a little gr	FeSO ₄
0/5 gr	NaCl
0/5 gr	MgSO ₄
1 Lit	D.W.

محیط کشت نیتروباکتر

پس از استریل (۵۰ میلی گرم در هر ارلن) ۴ قطره نیتريت سدیم ۱۰٪ اضافه می کنیم. نیتريت سدیم منبع انرژی و ازت می باشد.

علت اینکه بعد از استریل اضافه می کنیم برای این است که واکنش صورت نگیرد.

۳. محیط های آماده نیترو باکتر و نیتروزوموناس را روی شیکر برای هوادهی در دمای محیط می گذاریم. بعد از یک هفته محیط کشت را از نظر تولیدات ترکیبات معدنی با استفاده از معرف ها می سنجیم.

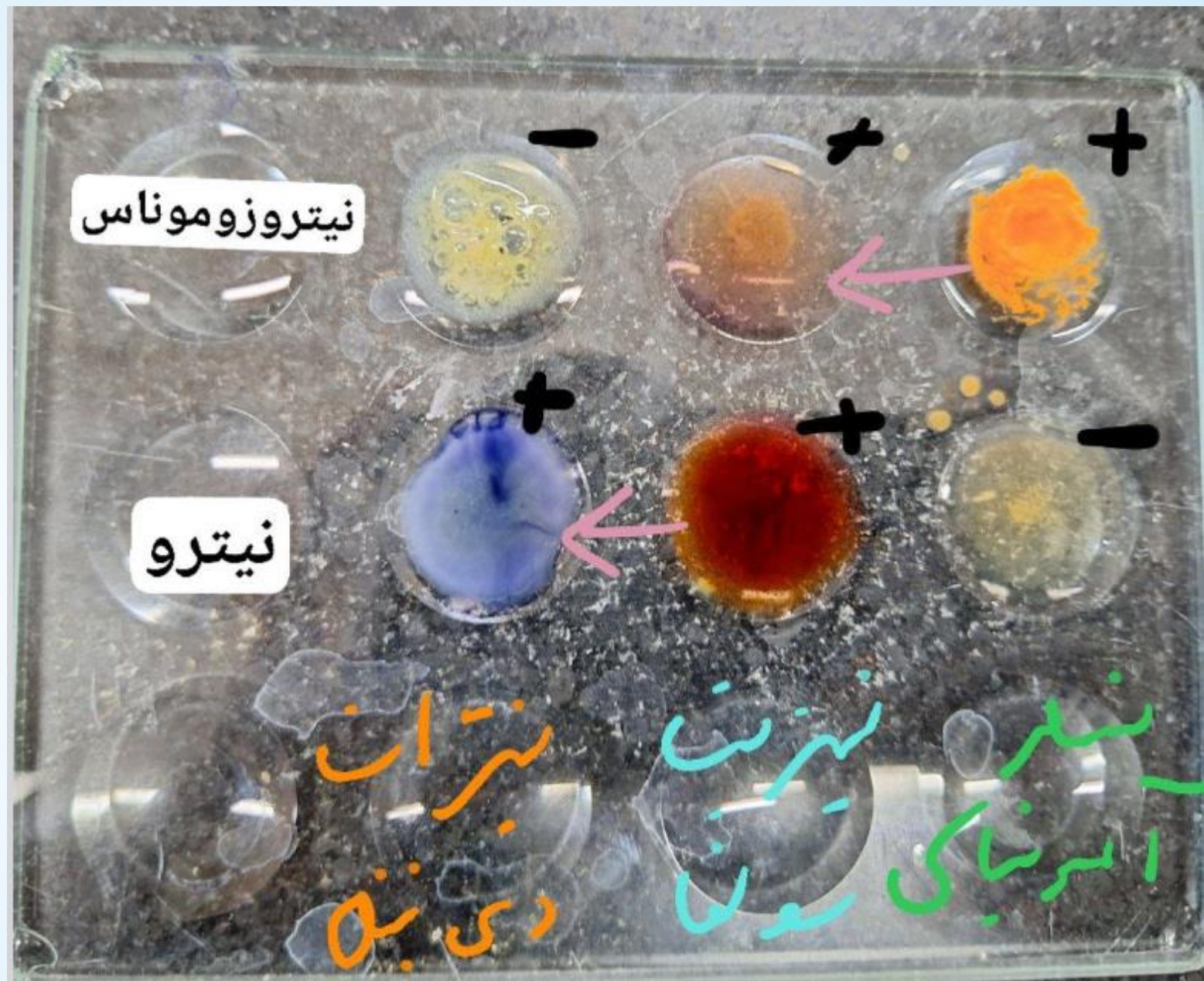
➤ برای تشخیص نیتريت از معرف α نفتیل آمین و اسید سولفانيليك استفاده می کنیم. رنگ قرمز نشان دهنده ی نیتريت می باشد.

➤ برای تشخیص نترات از معرف دی فنیل آمین استفاده می کنیم رنگ آبی نشان دهنده ی وجود نترات است.



تهیه کننده : سهیلا عباسی





تهیه کننده : سهیلا عباسی

۴. بعد از بررسی محیط ها اگر در محیط نیتروزوموناس نیتريت توليد شده بود و واكنش دنيتريفيكاسيون صورت گرفته باشد در واقع آمونياك به نيتريت تبديل شده است . سپس مي توان از اين محيط باكتري را به محيط جامد انتقال داد.

براي تهيه ي محيط جامد نيتروزوموناس و نيتروباكترا آگار به هر ليتر آن مي توان ۲۰ گرم آگار استفاده كرد . به صورت استريك (خطي) كشت مي دهيم . در دماي محيط بعد از يك هفته كلني ها رشد مي كنند . در محيط نيتروباكترا اگر نيترات مثبت بود به محيط جامد براي جداسازي انتقال مي دهيم.

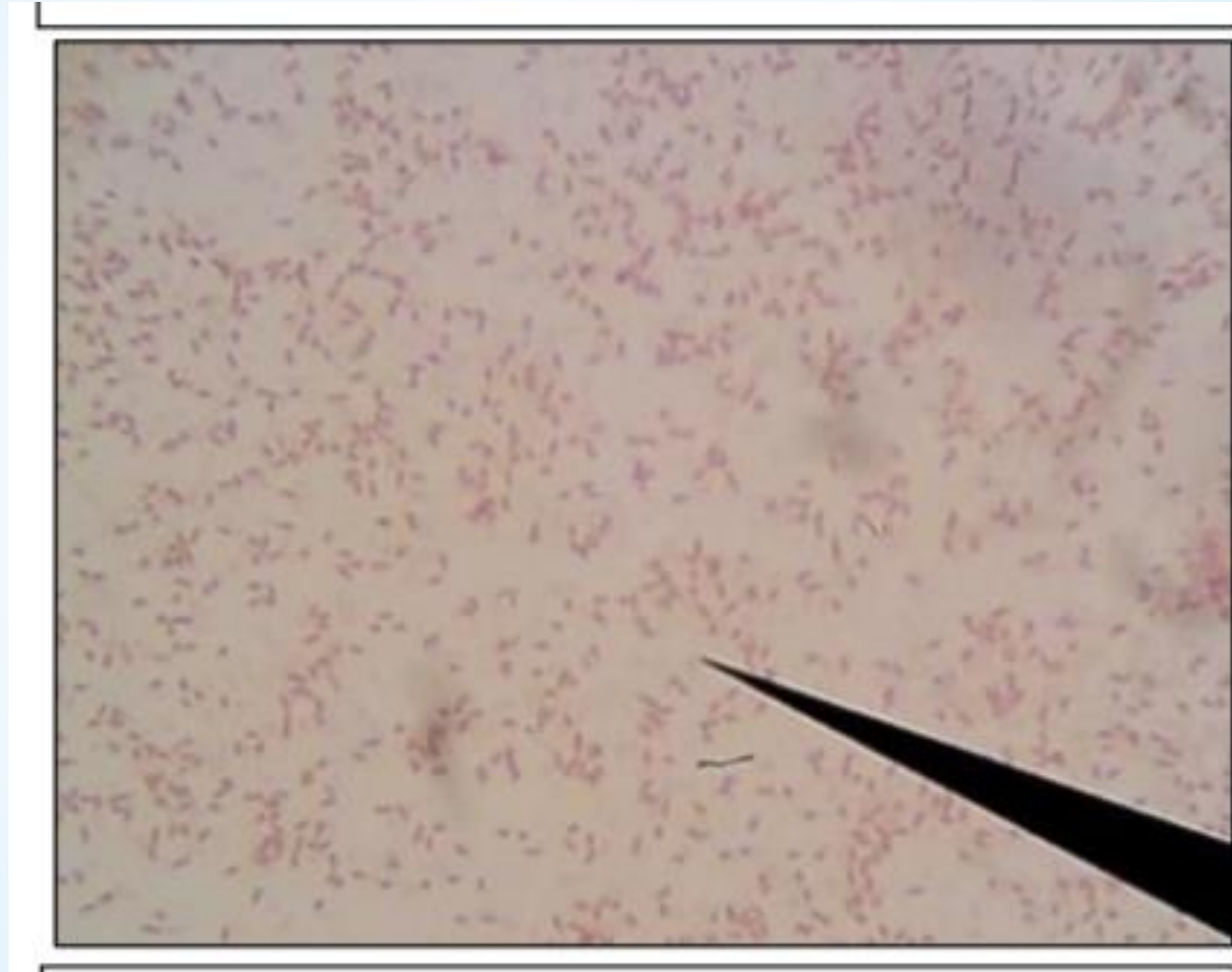
اگر نيترات منفي باشد ، معرف هاي نيتريت را هم به شاهد اضافه مي كنيم چون ممكن است كه واكنش به صورت كامل صورت نگرفته باشد .

۵. از کلنی های تشکیل شده با روش گرم رنگ آمیزی کرده و شکل نمونه و مورفولوژی آن را رسم می کنیم.

▶ نهایتاً اثبات می شود که در محیط کشت باکتری مورد نظر وجود داشته باشد. در درون خاک بیشتر نیتروزوموناس و نیتروباکتر وجود دارند در حالی که باکتری های دیگر اکسید کننده آمونیاک عبارتند از : نیترواسپیرا، نیتروزوکوکوس، نیتروزولوبوس و نیتروزوویریو.

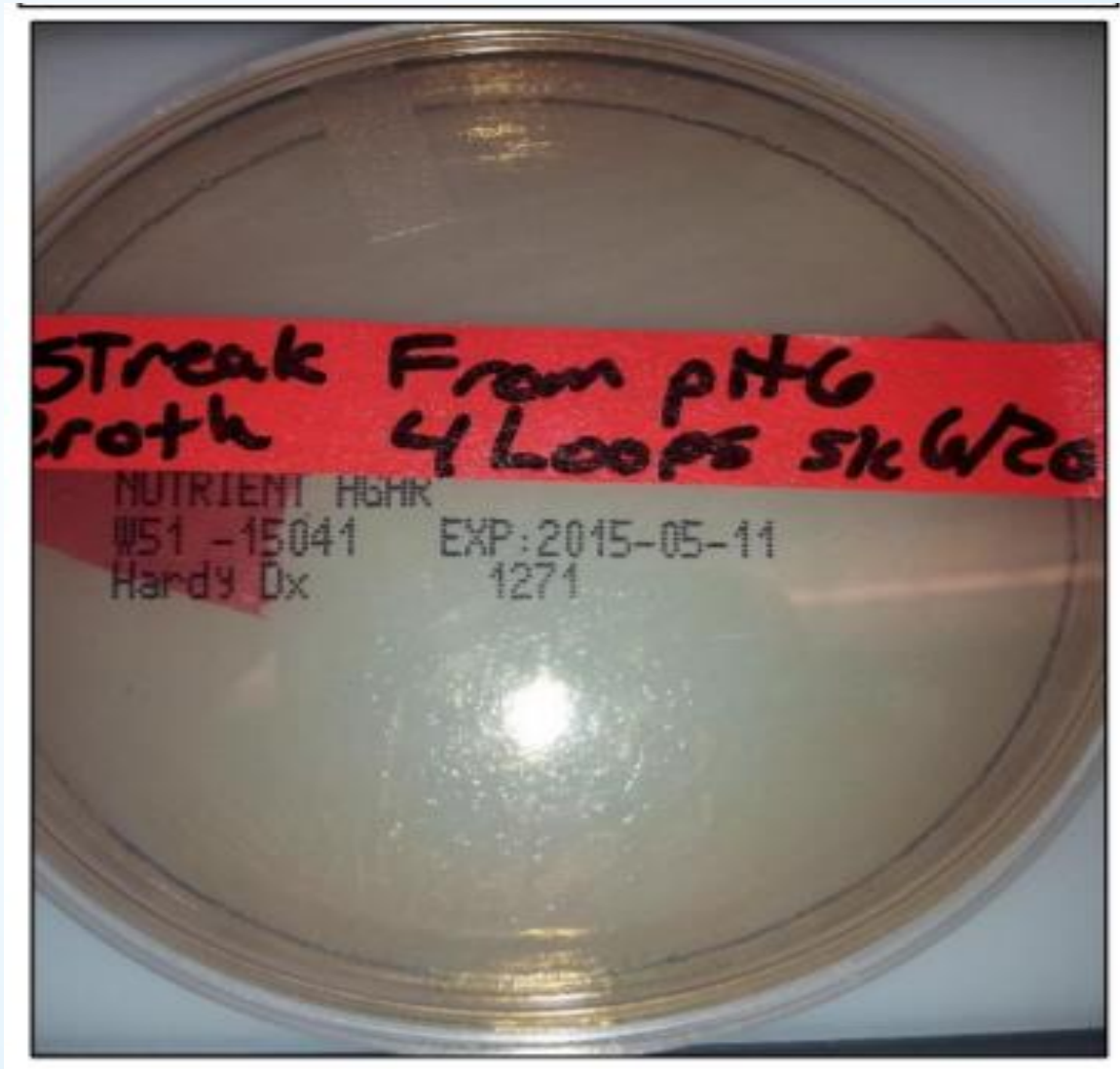
▶ باکتری های اکسید کننده نیتريت عبارتند از : نیترواسپیرا ، نیتروسپینا و نیتروزوکوکوس.

نیتروزوموناس



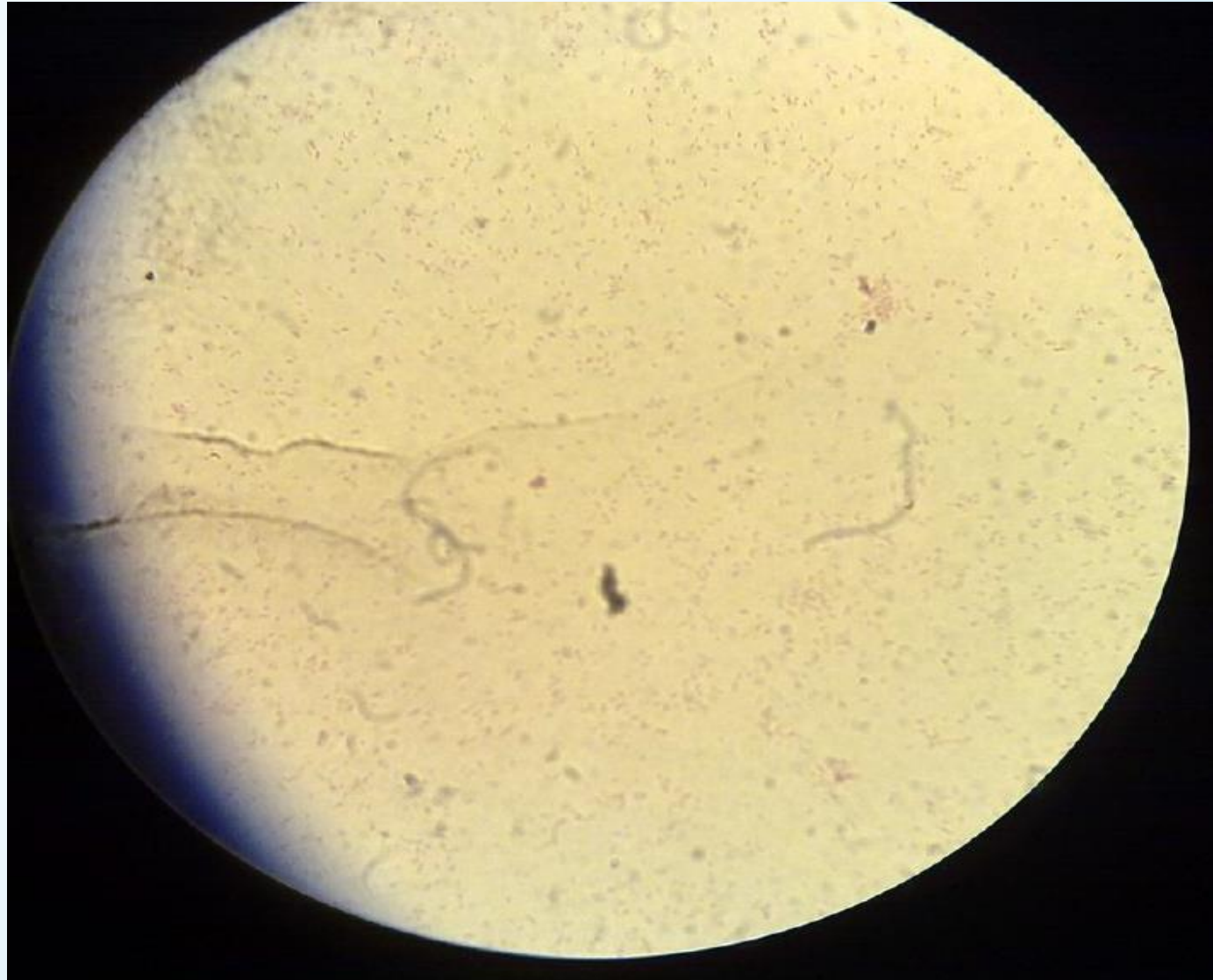
تهیه کننده : سهیلا عباسی

نیتروزوموناس



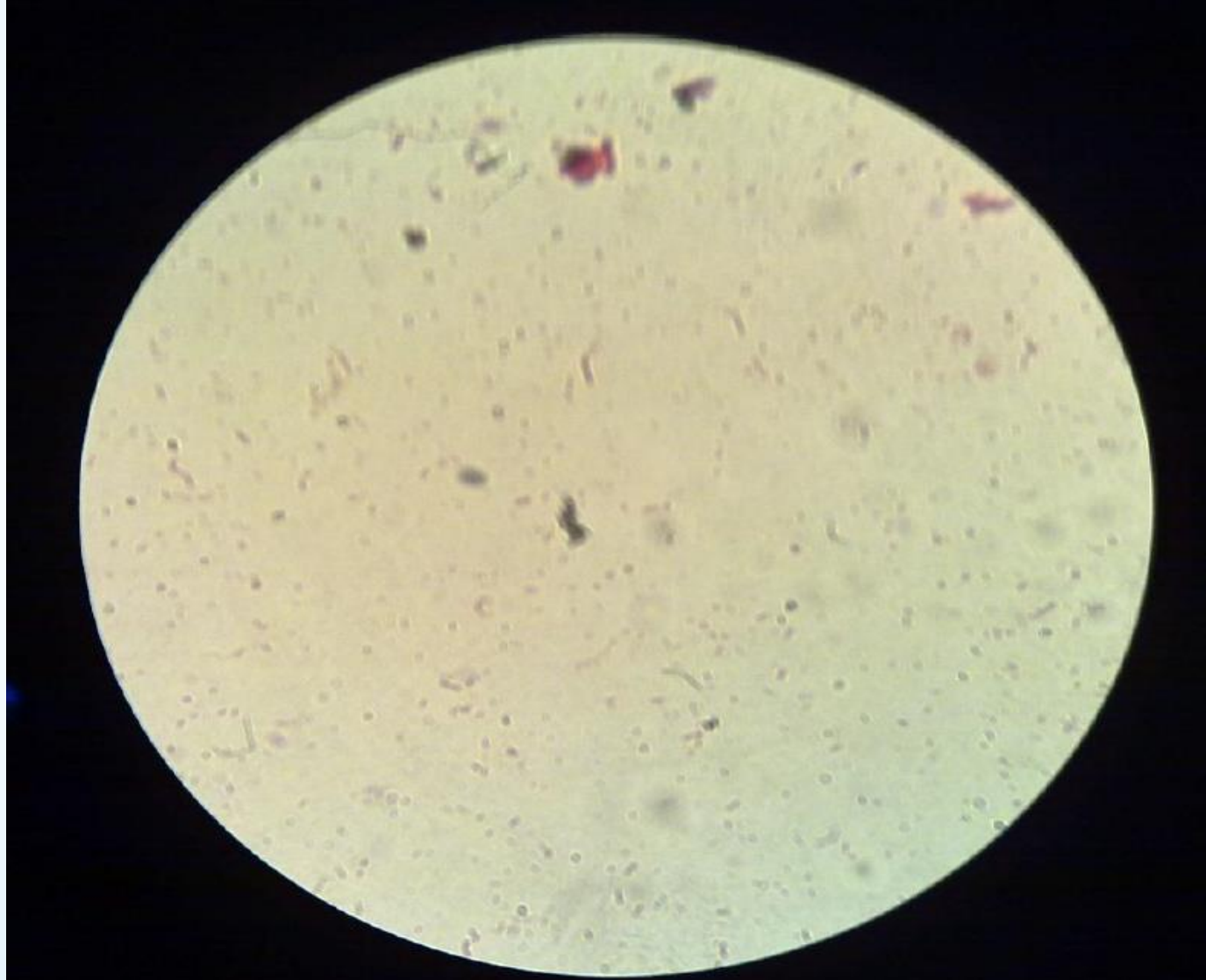
تهیه کننده : سهیلا عباسی

نیتروزوموناس



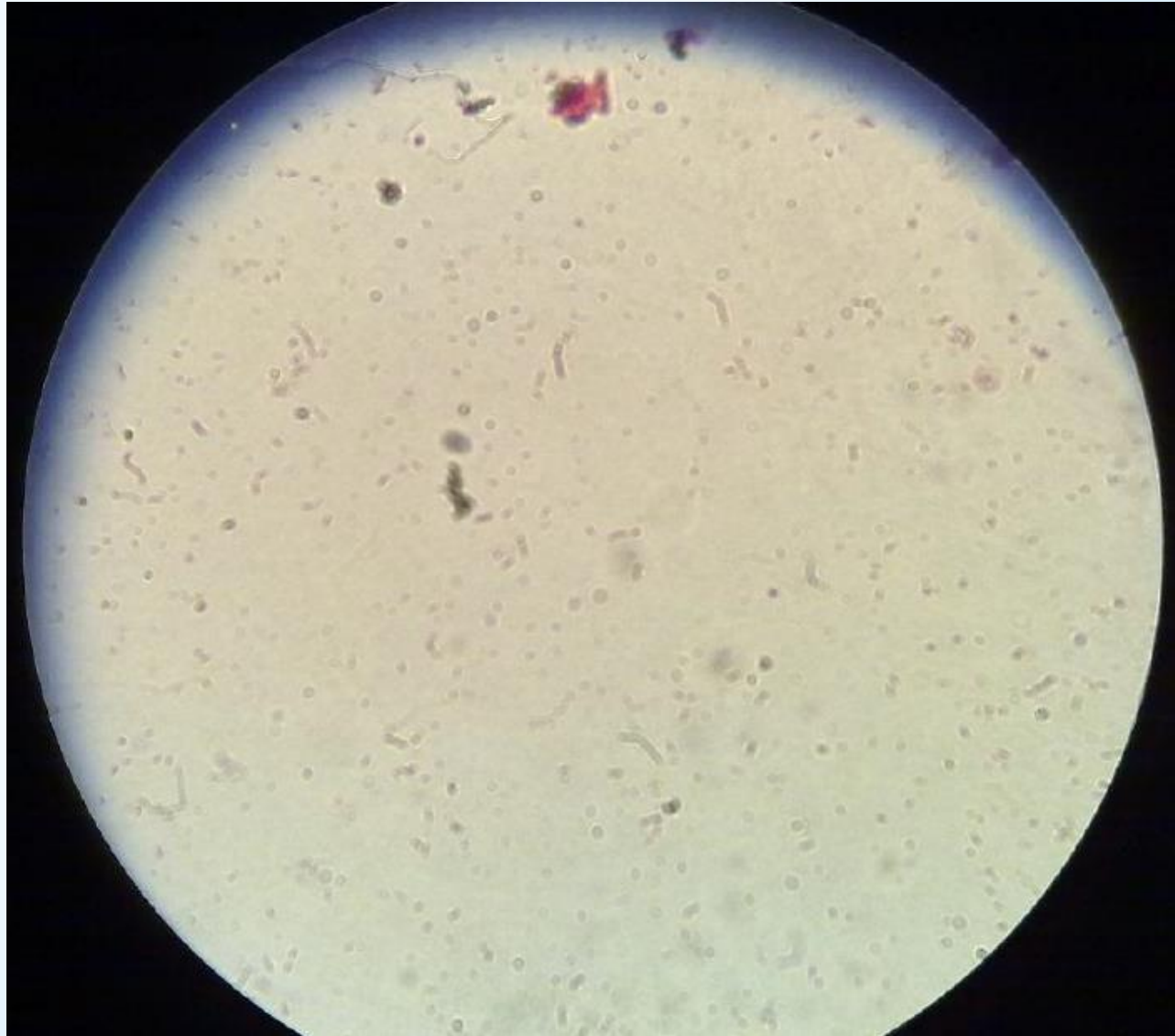
تهیه کننده : سهیلا عباسی

نیتروزوموناس



تهیه کننده : سهیلا عباسی

نیتروباکتر



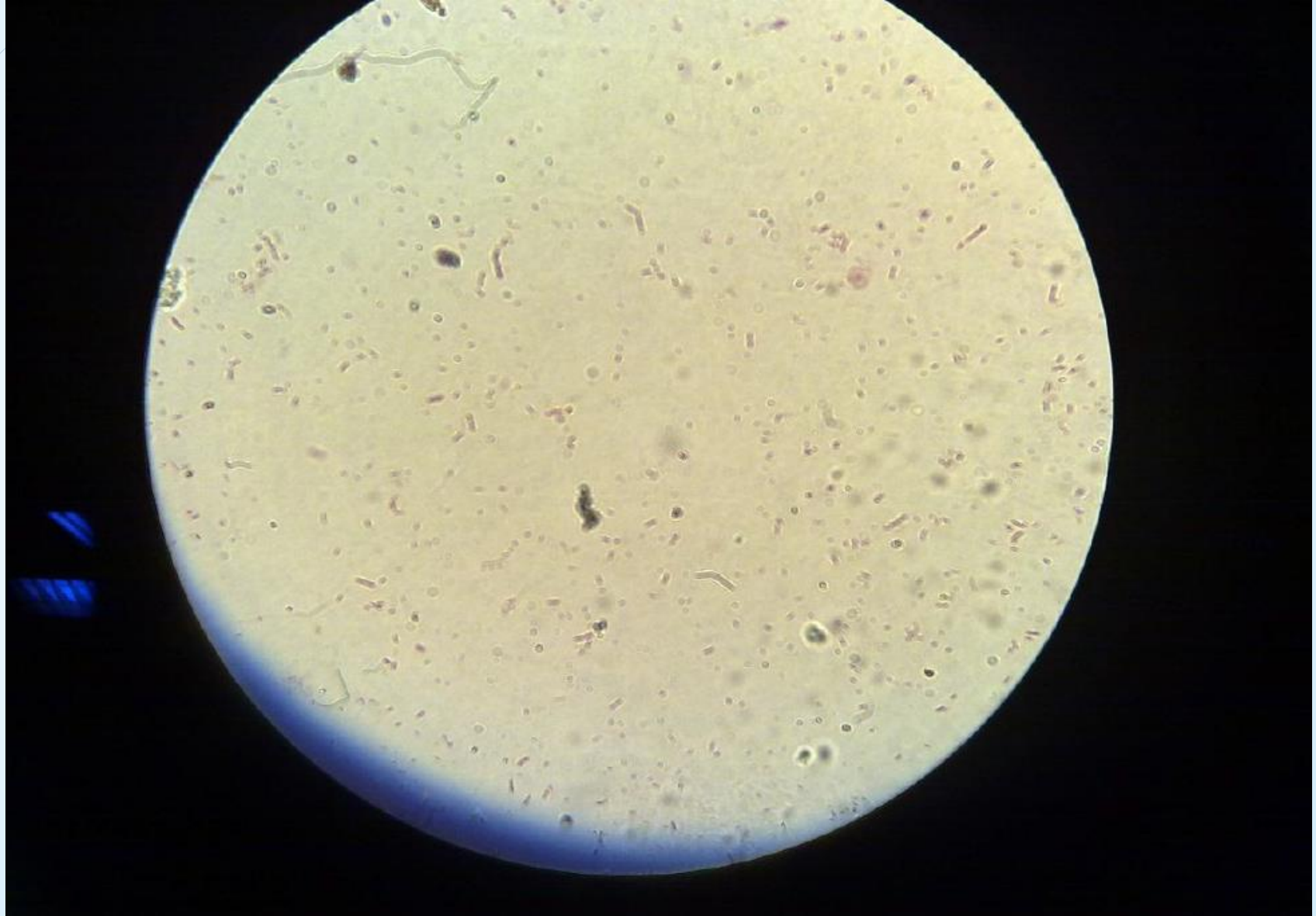
تهیه کننده : سهیلا عباسی

نیتروباکتر



تهیه کننده : سهیلا عباسی

نیتروباکتر



تهیه کننده : سهیلا عباسی



با سپاس فراوان از توجه شما