



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

# جداسازی و مطالعه ریزوبیوم *Rhizobium*

1

# خصوصیات ریزوبیوم

2

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

➤ گونه های مختلف ریزوبیوم به منظور معمول در خاک هستند و می توانند در گیاهان ایجاد ندولهای ریشه ای کنند. ارگانیزم هایی که زندگی آزاد دارند قادر به تثبیت ازت نیستند.

▶ 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 لوبیا، نخود، بادام زمینی و یونجه شرح داده شده است.





تهیه کننده : سهیلا عباسی

➤ برای جداسازی ریزوبیوم چند غده داریم :

➤ ریزوبیوم ملیوتی (شبدر)

➤ ریزوبیوم سی زر (عدس)

➤ ریزوبیوم لوپنی (لوبیا)

➤ ریزوبیوم لگومینوزاروم (نخود)

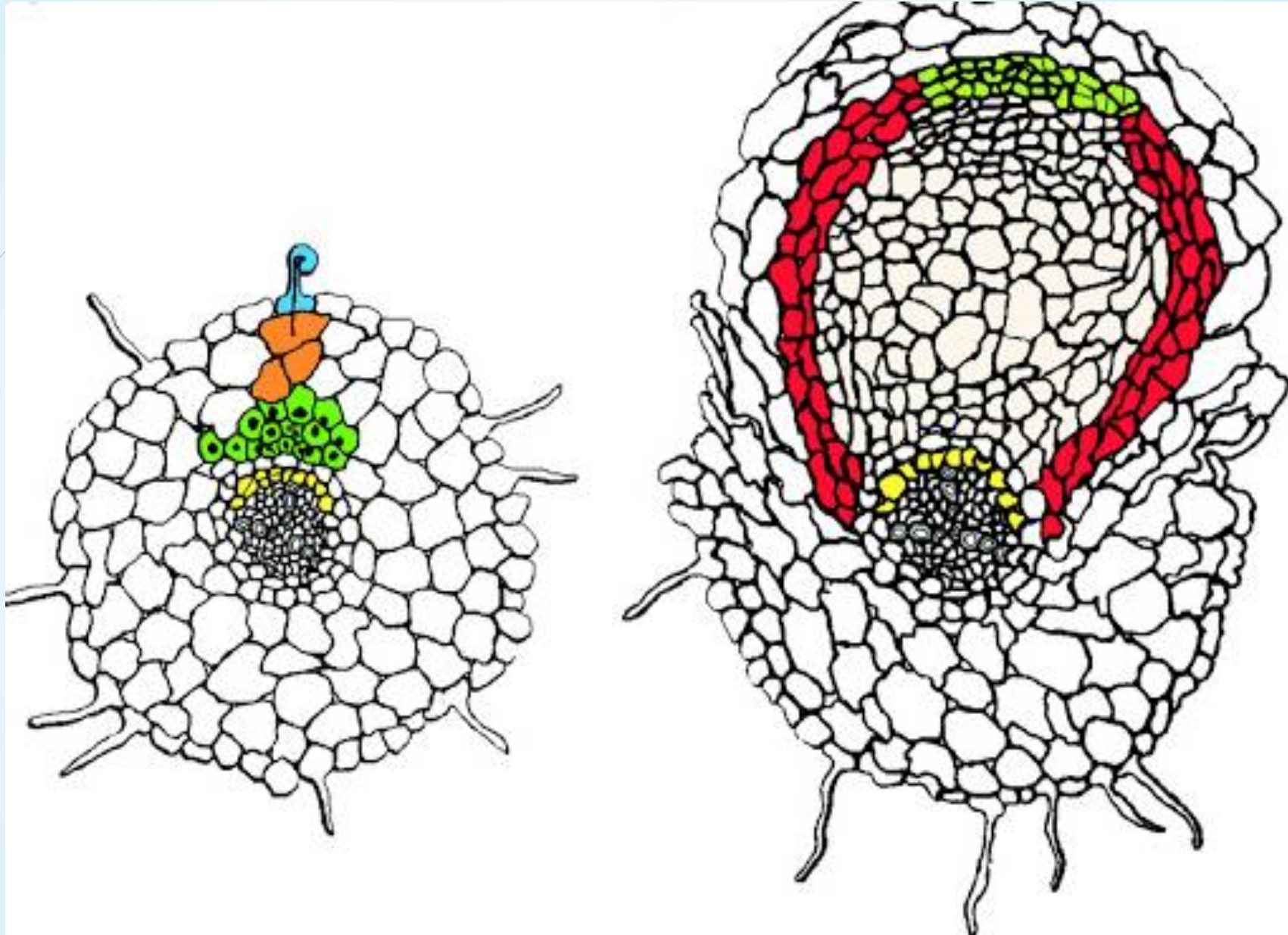
➤ شکل باکترئیدهای هر کدام متفاوت است .

▶ باکتریهای ریزوبیوم به ریشه ی گیاهان میزبان معمولاً در ناحیه ی تارهای کشنده متصل می شوند.

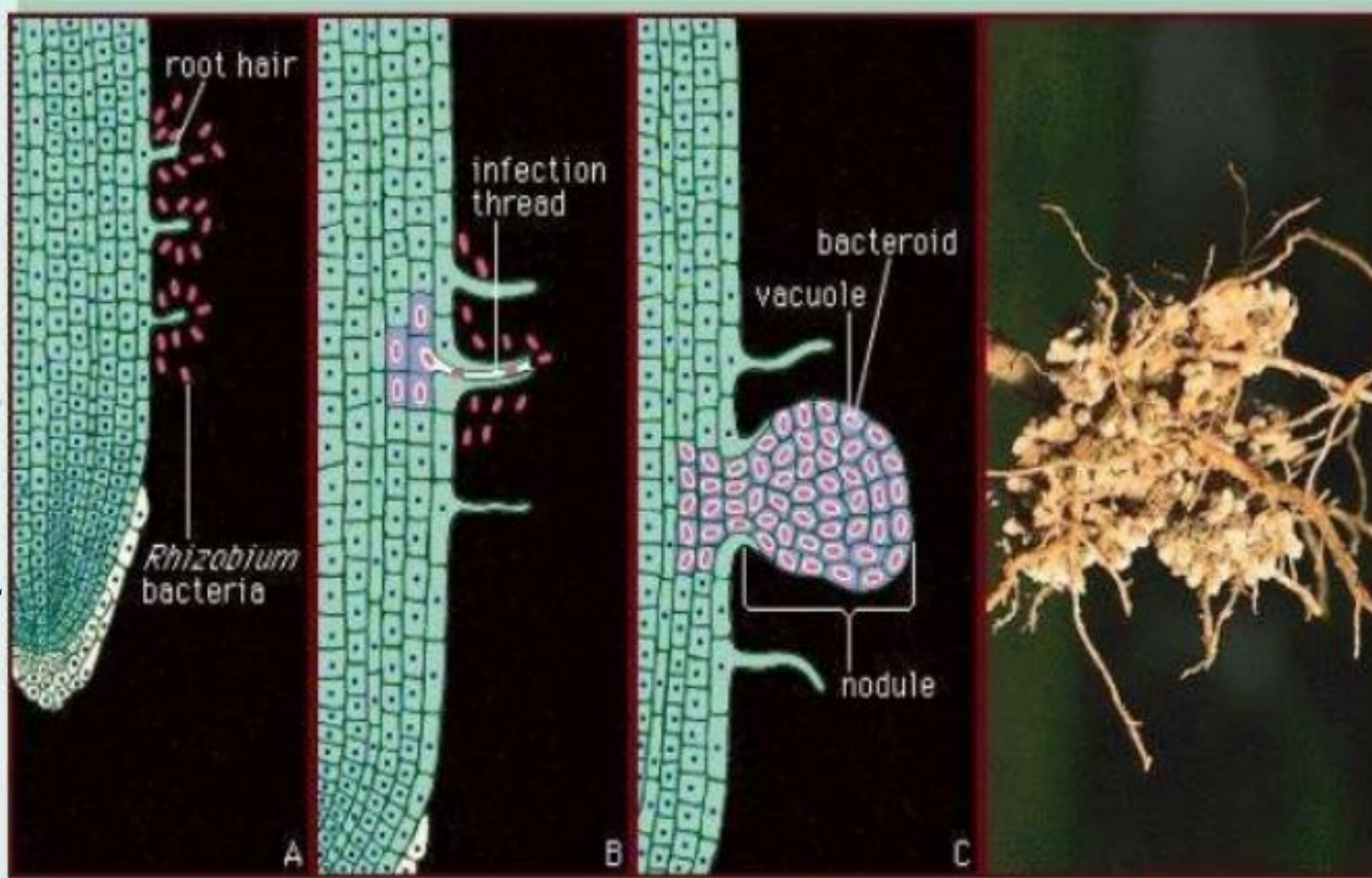
▶ تار کشنده در نتیجه آلودگی با باکتری متورم می شود که منجر به پیدایش رشته ی آلودگی گشته و این رشته از تار کشنده گذشته و وارد ریشه می گردد. باکتریها این رشته آلودگی را دنبال کرده و وارد سلول های ریشه می شوند در درون سلول ها شکل آن ها تغییر یافته به صورت اشکال درشت تری بنام باکتروئید در می آیند

▶ سلول های ریشه در اثر آلودگی تحریک شده و گره های تومور مانند مرکب از سلول های پر از باکتروئید تشکیل می دهند. آنگاه ازت جوی با همزیستی بین گیاه و باکتری تثبیت می گردد. گیاه شرایط بیهوازی فراهم ساخته و مواد غذایی لازم در اختیار باکتری می گذارد و باکتری ازت جوی را ثابت می کند که بعد این ازت در ساختمان پروتئین ها وارد می گردد .

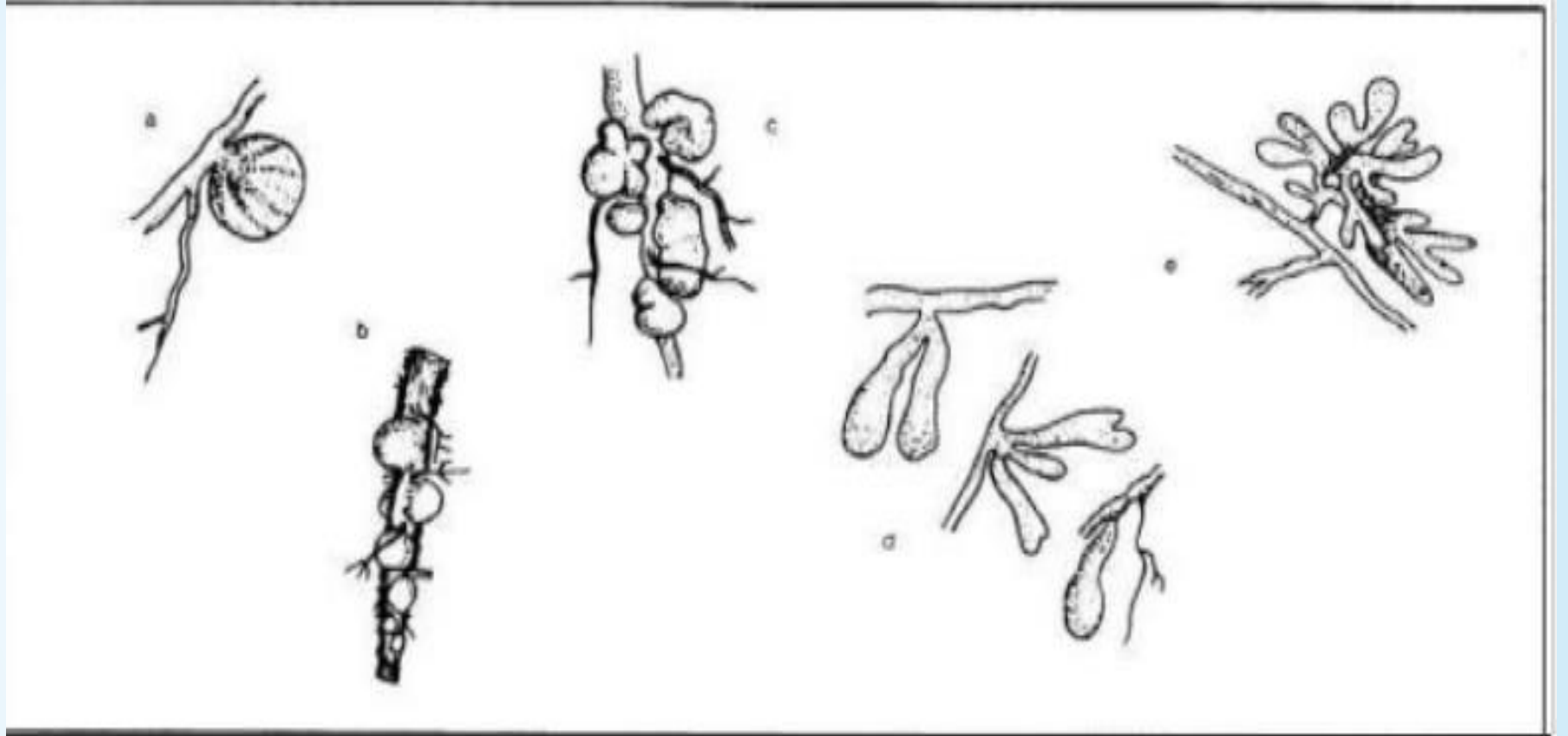




تهیه کننده : سهیلا عباسی







تهیه کننده : سهیلا عباسی

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 گالاکتوروناز سوراخ می شود .



# روش کار

11

▶ 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 تار های کشنده خارج کرده و غده ها را با پنس جدا می کنیم. غده ممکن است گرم یا صورتی رنگ باشد .

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

▶ یکی از غده ها را روی لام له کرده و از شیرابه ای که از آن خارج می شود فروتی 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 باکتروئید گفته می شود که به اشکال حروف انگلیسی X,Y,Z,V دیده می شوند .

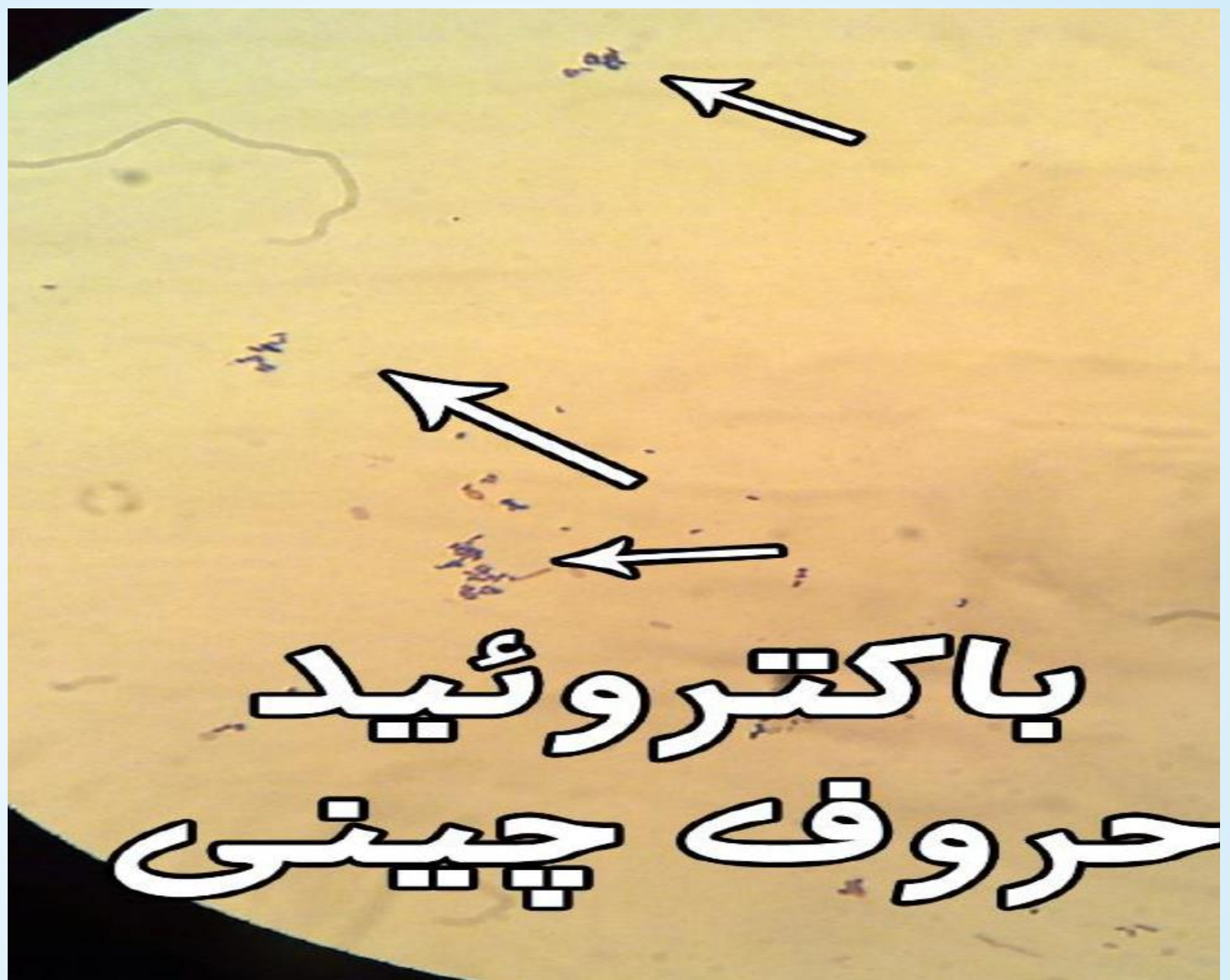




تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی





# کشت

15

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 ۱٪ به مدت ۲-۳ دقیقه و غده های بزرگتر را به مدت ۵ دقیقه در کلرور جیوه ۵٪



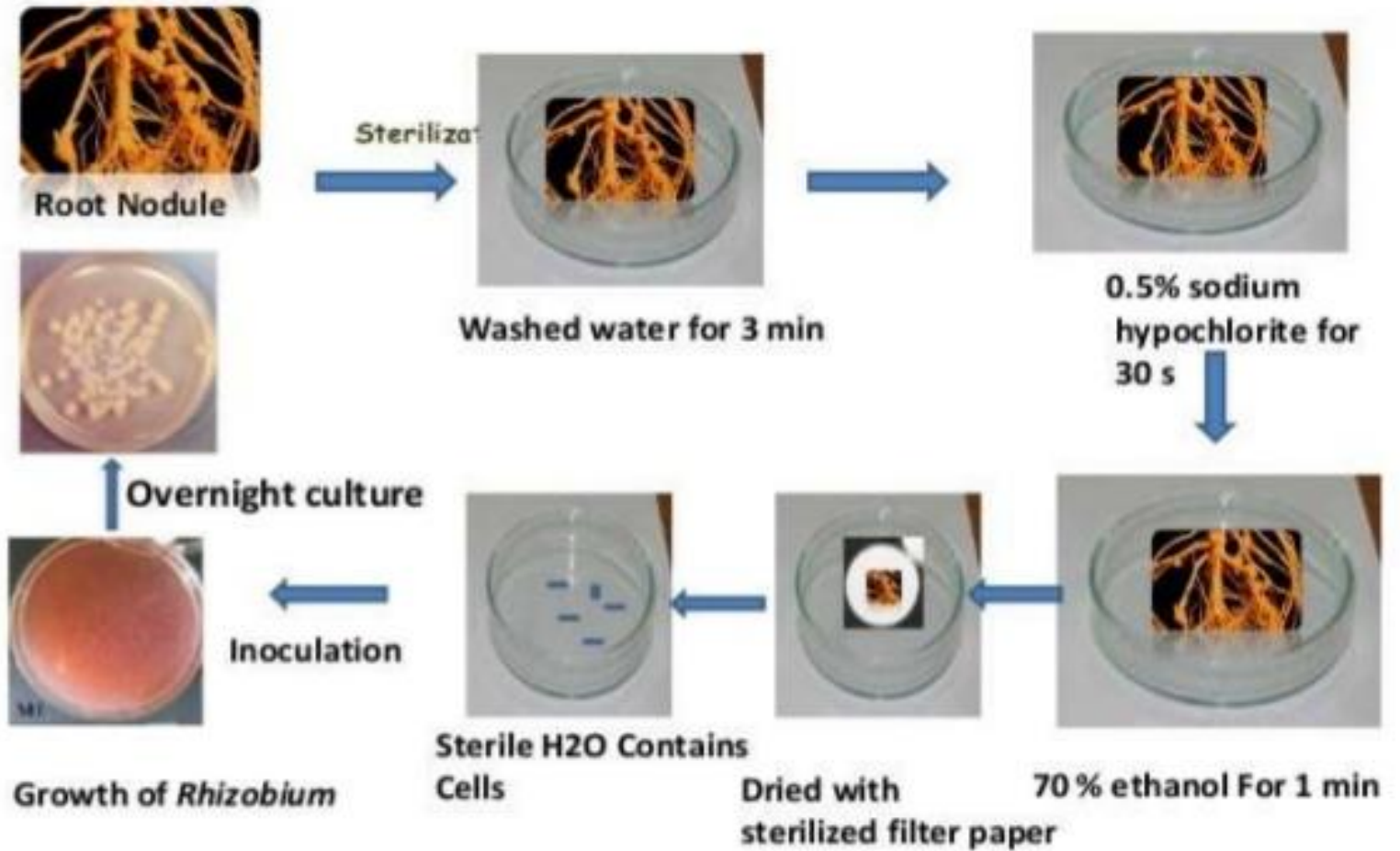
تهیه کننده : سهیلا عباسی

## شستشو با آب مقطر استریل

- 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 .



## ISOLATION OF BACTERIAL BIOFERTILIZERS



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 .

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

➡ مواد مورد نیاز جهت کشت ریزوبیوم

▶ 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 .





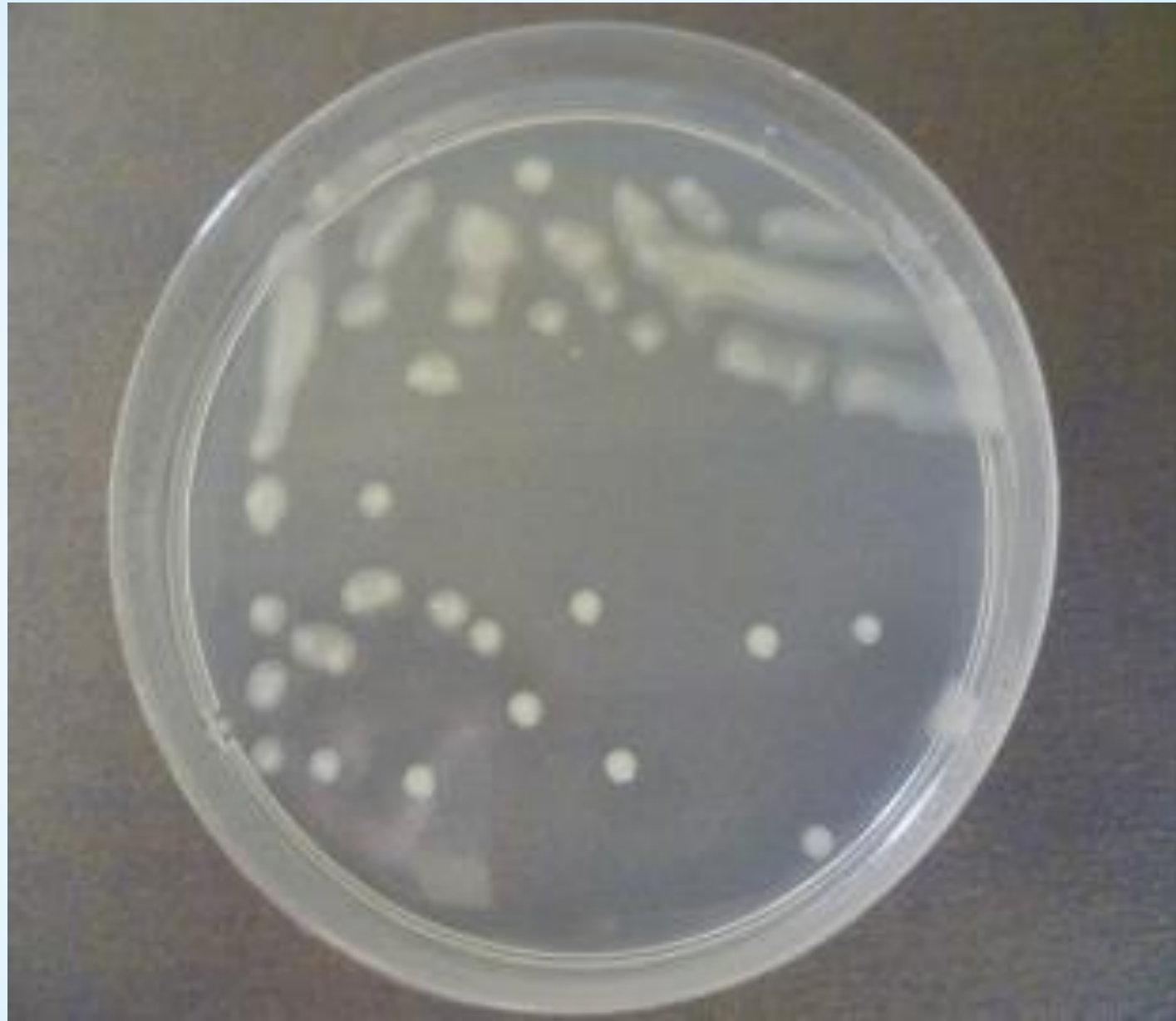
تهیه کننده : سهیلا عباسی



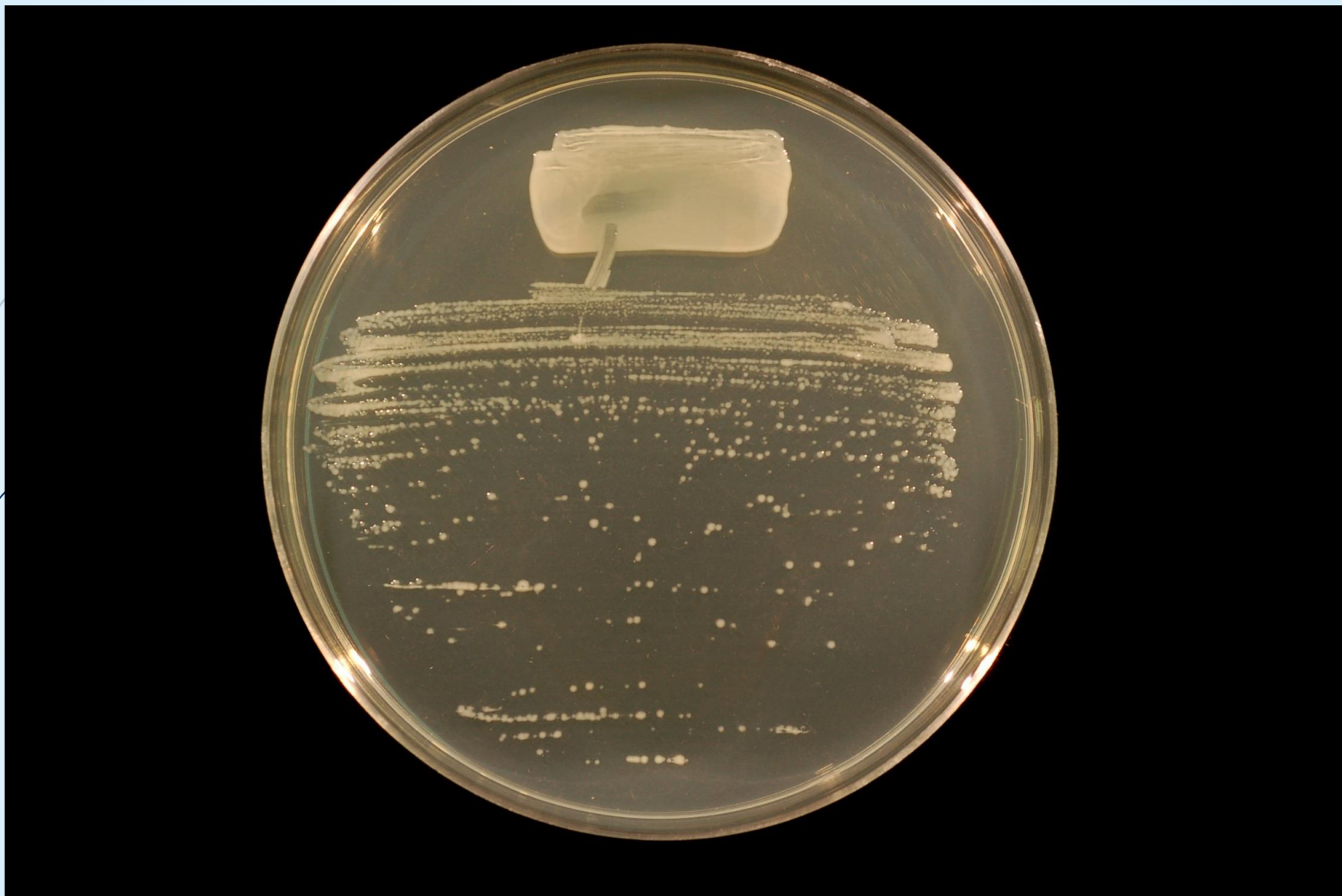
## ریزوبیوم



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

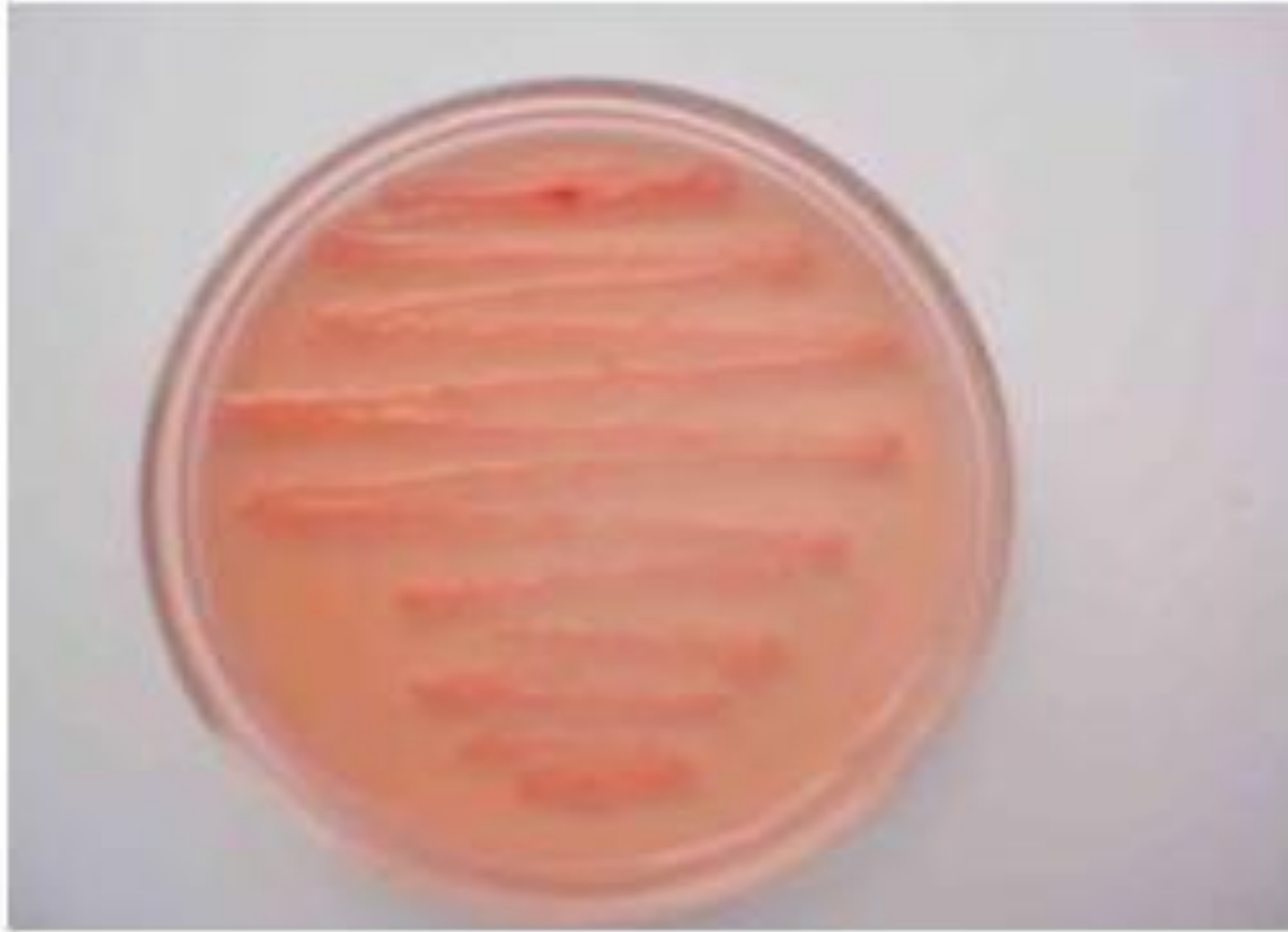




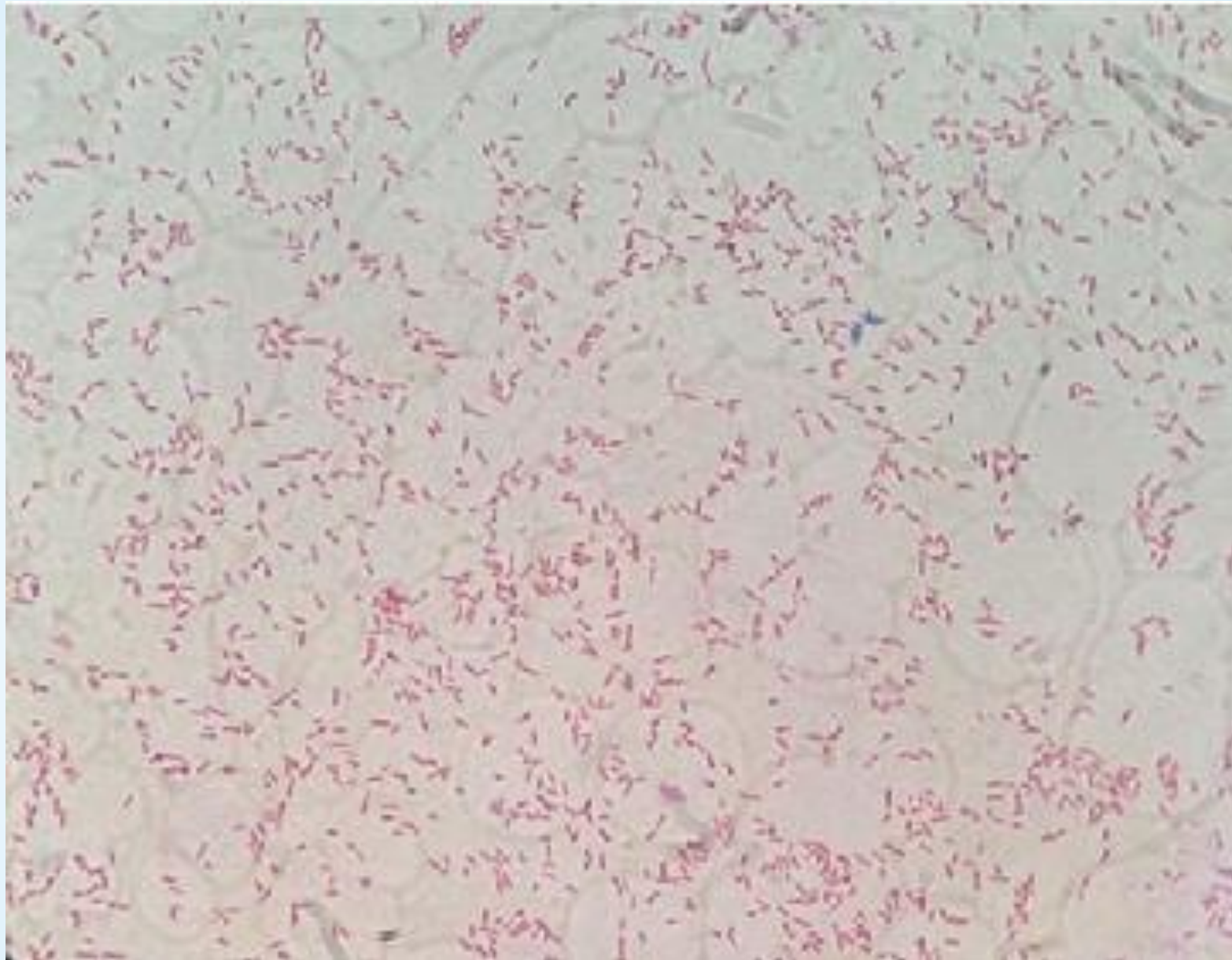
*Figure 1: Rhizobium colonies: (a) on YEMA media (b) on CRYEMA media*



# *Rhizobium*



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی

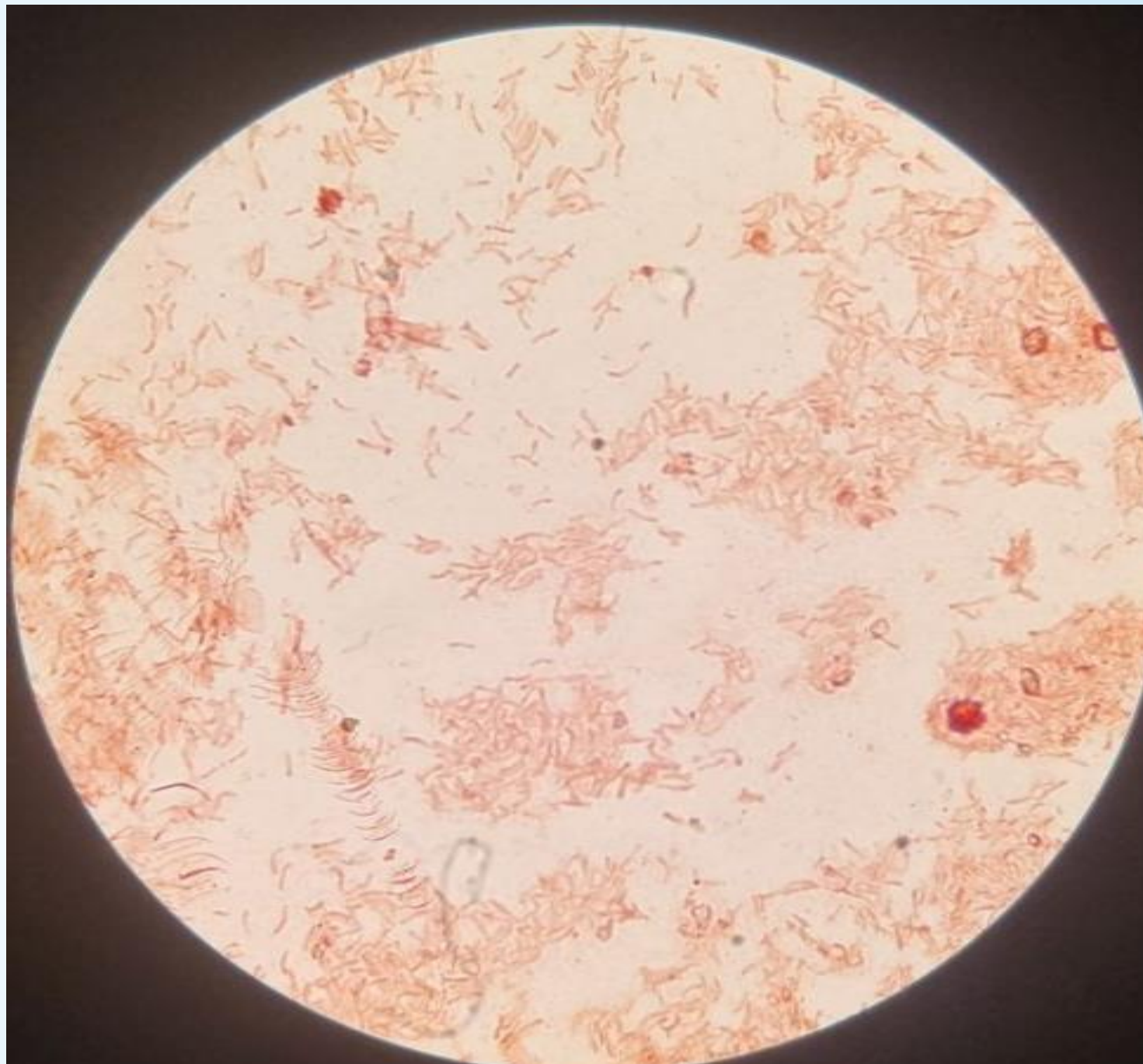




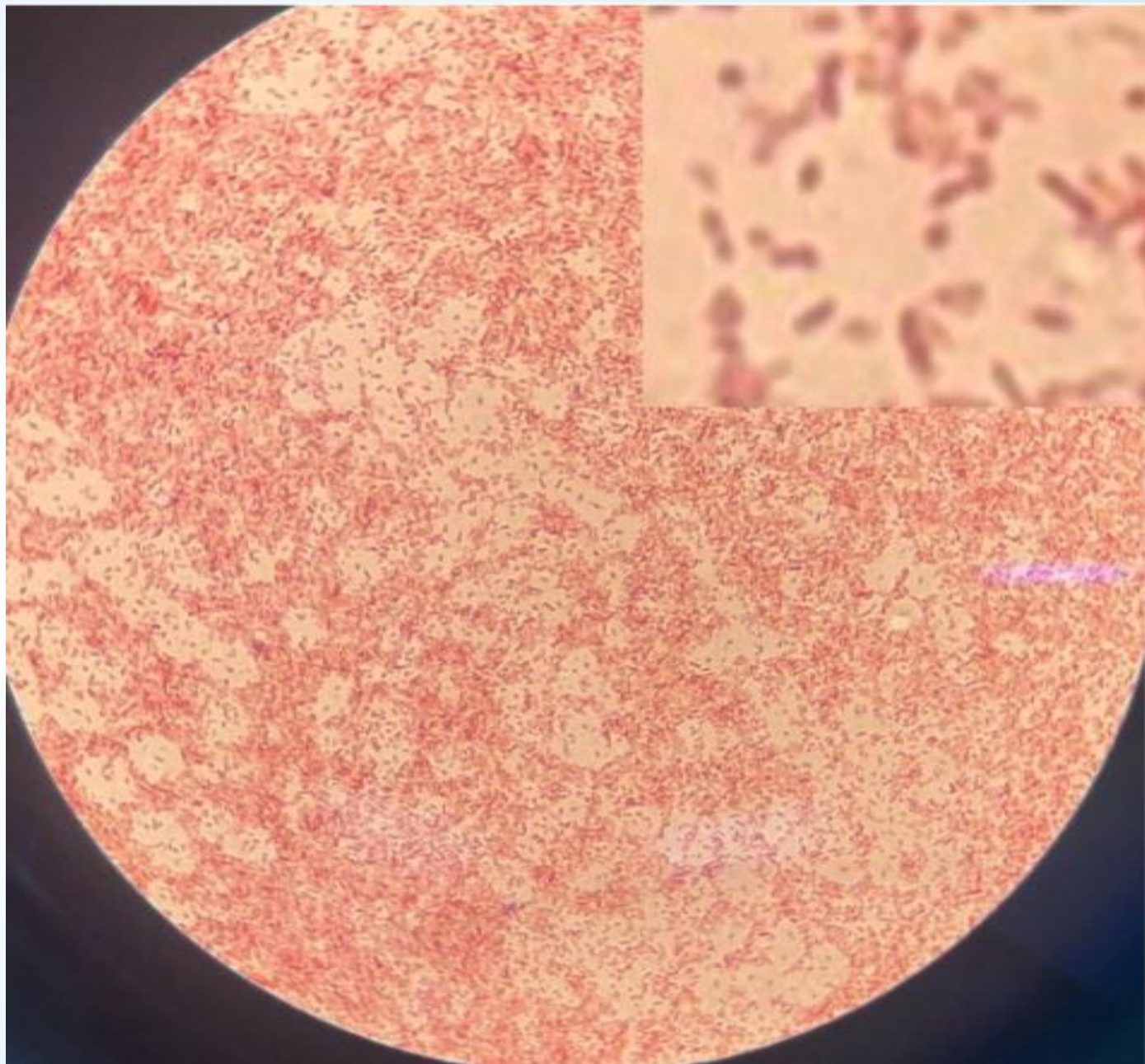
تهیه کننده : سهیلا عباسی



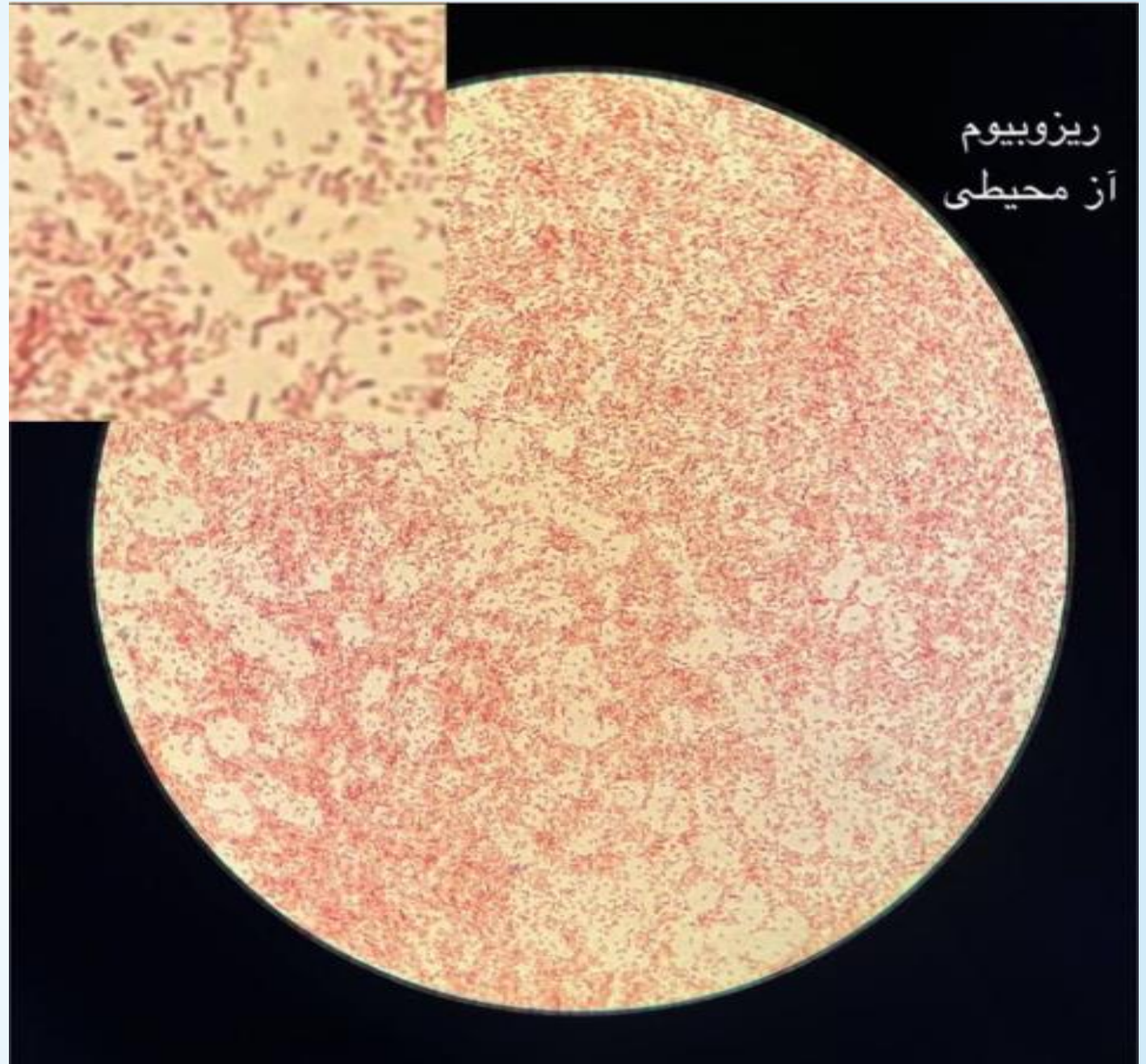
تهیه کننده : سهیلا عباسی



تهیه کننده : سهیلا عباسی







ریزوبیوم  
آز محیطی

تهیه کننده : سهیلا عباسی



*Thank you!*