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

آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط

مطالعه و بررسی میکروبهای خاک

- در خاک موجودات ذره بینی متنوعی از قبیل باکتری، اکتینومیستها، قارچها، جلبک ها و پروتوزوئر وجود دارند. برای بررسی میکروبهای خاک، روشی وجود ندارد که مطمئن باشیم تمام باکتریهای آن را بررسی کرده ایم، اما به هر حال روش های تقریبی وجود دارد. این روش های به دو دسته تقسیم می شوند :

- ۱- مستقیم

- ۲- غیرمستقیم

I. روش های مستقیم :

1. کشت خاک :

   a. تعیین جمعیت کلی باکتریها

   b. تعیین جمعیت کلی قارچ ها

   c. کشت در محیط های اختصاصی برای جدا کردن انواع جنس باکتری ها

2. تهیه لام های مستقیم : با رنگ آمیزی و بدون رنگ آمیزی

3. تهیه اسلاید پنهان یا اسلاید دفن شده (buried slide)

4. استفاده از میکروسکوپ الکترونی

روش غیرمستقیم

- سنجش تنفس : بیکربنات رادیو اکتیو را در وارد خاک می کنند و با تعیین CO_2 رادیو اکتیو خارج شده میزان تنفس را می سنجیم . در روش ساده تر میزان تنفس را با تغییر سطح آب بر اثر تولید CO2 اندازه گیری می نمایند .
- سنجش ATP : بهترین روش برای بررسی فعالیت میکروبی خاک است . چون تمام میکروب های اتوتروف ، هتروتروف و فتوتروف ATP تولید می کنند و فقط موجودات زنده قادر به تولید ATP هستند . که این دستگاه در واقع یک نوع Scintillation است که با دادن فسفر رادیو اکتیو به محلول حاوی خاک می توان ATP را مورد بررسی قرار داد . (با افزودن آمونیوم مولیبدات ، فسفومولیبدات حاصل می گردد که سپس توسط Scintillation بررسی می شود).
- سنجش میزان پروتئین ها : از دو روش استفاده می شود . استفاده از اسپکتروفتو متر UV و یا با استفاده از برخی معرف ها مثل برادفورد .
- سنجش میزان ازت : برای این آزمایش از روش کجلدال استفاده می کنند.

نمونه برداری خاک

- قبل از هر کدام از این آزمایش ها باید ابتدا از خاک مورد نظر نمونه برداری کرد. اولین شرط آزمایش خاک، برداشت و انتقال صحیح آن به آزمایشگاه است. نمونه ای که عاری از هر نوع آلودگی خارجی بوده و پس از برداشت تغییر در آن ایجاد نشود.
- برای این کار از ظرفی استفاده می کنیم که قبلاً استریل شده باشد و نمونه تا موقع آزمایش در یخچال نگهداری می شود .

۱.کشت خاک

- هدف این آزمایش شمارش باکتریها، قارچ ها و جلبک ها می باشد. برای شمارش کلنی باکتریها از خاکی که از آن رقت تهیه کرده ایم بر روی محیط کشت Nutrient Agar و یا Plate Count Agar کشت می دهیم؛ سپس در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) انکوباتور گذاری کرده و بعد از رشد تعداد کلنی را در ضریب رقت ضرب می کنیم.
- اگر شمارش اختصاصی باشد، محیط اختصاصی به کار می بریم. مثلاً برای باسیلوس سرئوس محیط های حاوی آنتی بیوتیک به کار برده می شود. و یا برای شمارش استرپتومیست از محیط «کازئین آگار» استفاده می شود.

- برای شمارش قارچ ها از PDA (Potato Dextrose Agar) و یا از محیط سابورو دکستروز آگار SDA استفاده می شود . اما شمارش قارچ ها با این روش کمتر به واقعیت نزدیک است ، چون گاهی تکه تکه شدن میسلیوم هر کدام یک کلنی تولید می کند و یا امکان دارد اسپور قارچهایی که در خاک فعالیت ندارند در محیط رشد کنند .

- برای شمارش مخمر ها محیط های اختصاصی وجود دارد و با انتخاب منبع کربن می توان مخمر های خاص را کشت داده و شمارش کرد .

- برای شمارش کلی جلبک ها از روش MPN استفاده می شود و به این ترتیب که خاک را رقیق کرده و به صورت اعشاری در لوله های حاوی Water Broth تلقیح نمود .
- لوله ها را در نور قرار داده و آن هایی که سبز می شود به عنوان شاخص رشد در نظر می گیرند . تعداد لوله های سبز را شمارش نموده و با مراجعه به جدول MPN می توان تعداد جلبک های خاک را به دست آورد.

- ولی این روش (شمارش) دارای اشکالاتی است:

a. همه باکتریها و قارچ ها رشد نمی کنند

b. باکتری های موازی از قلم می افتند.

c. در رقابت باکتریهای تند رشد برنده می شوند و اجازه به کند رشد ها نمی دهند.

۲.تهیه ی لام مستقیم

- در این روش باید ذرات خاک در آب حل شوند . سپس آن را روی Shaker قرار داده تا ذرات خاک به صورت سوسپانسیون در آیند. سپس صبر می کنیم تا ذرات خاک ته نشین شوند و مایع رویی را فیلتر می کنیم .
- در مرحله بعد اولترا سانتریفوژ حدود ۱۱۰۰۰ دور در مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام می شود ، زیرا این ذرات با سانتریفوژ معمولی ته نشین نمی شوند
- در اینجا مشکلی وجود دارد و آن این است که ذرات خاک خاصیت کاتیونی دارند و باکتریها خاصیت آنیونی ، پس بدین صورت با shaking هم از هم جدا نمی شوند پس رنگ آمیزی مشکل می شود . برای رفع این اشکال در ابتدای سوسپانسیون کردن خاک ۱٪ محلول کلگان را اضافه می کنیم .

- محلول کلگان بافر است و حاوی چندین نمک (بیکربنات سدیم و پلی فسفات سدیم) که باعث می شود در محلول ذرات بار مثبت را از دست بدهند و میکروبها از آن رها شوند.
- بعد از ۲۴ ساعت از آن لام تهیه می شود و می توان آن را رنگ آمیزی و مشاهده نمود.

۳. تهیه اسلاید دفن شده یا اسلاید پنهان (Buried Slide)

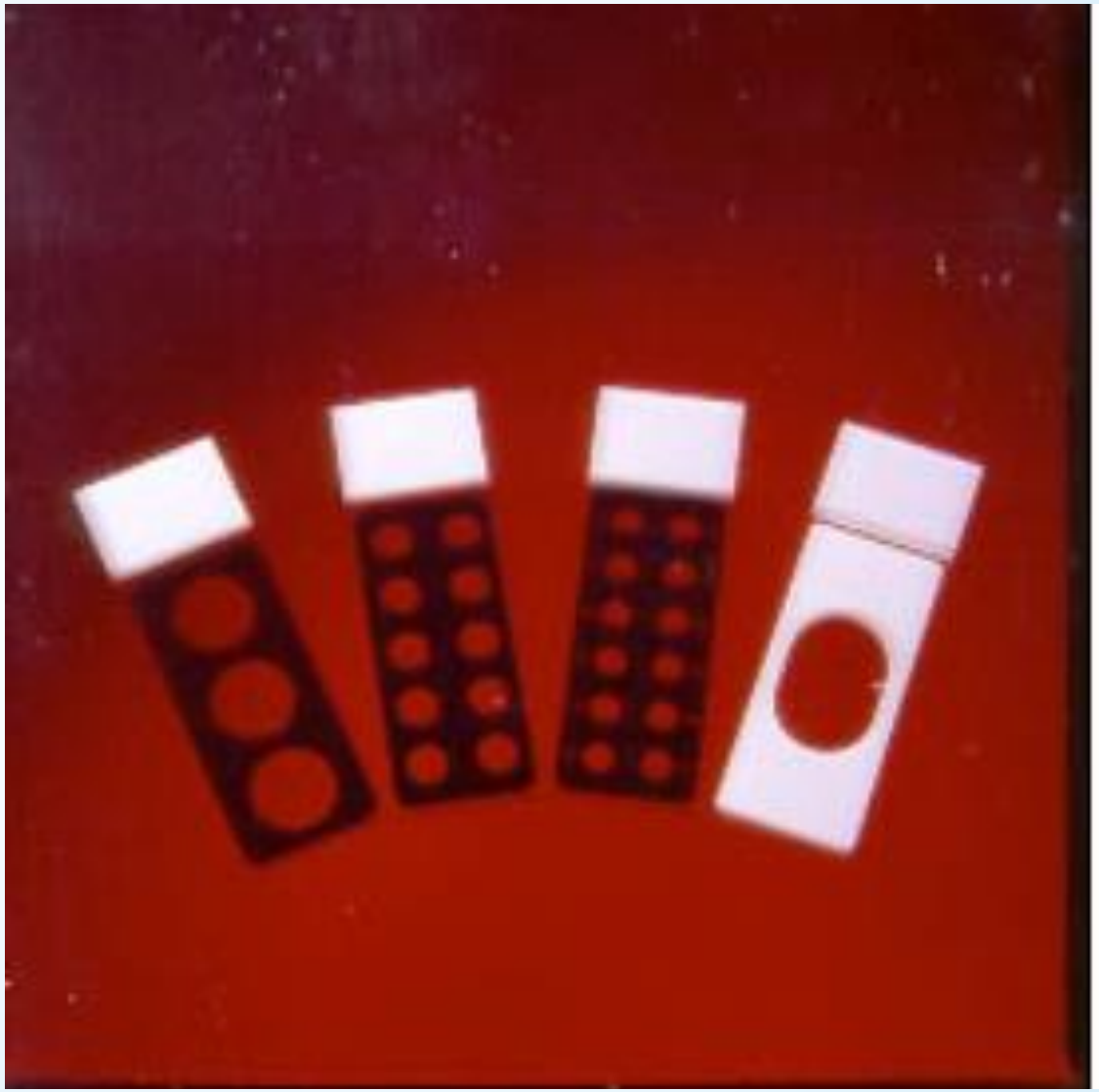
- این روش که بصورت کیفی است به دو شکل می تواند انجام شود :

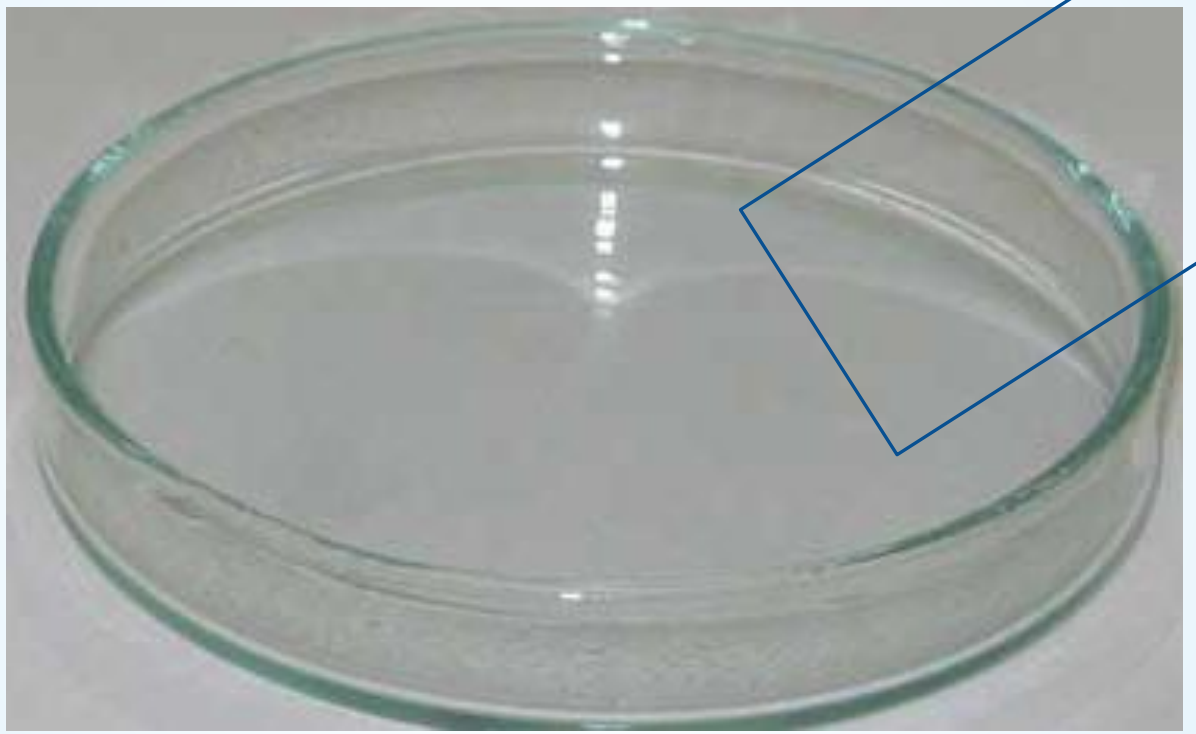
a. یک اسلاید تمیز بدون ژلوز را در خاک دفن کرده ، رطوبت خاک را فراهم می کنند. پس از دو تا سه ماه یک طرف لام را تمیز نموده و طرف دیگر را رنگ آمیزی می کنند.

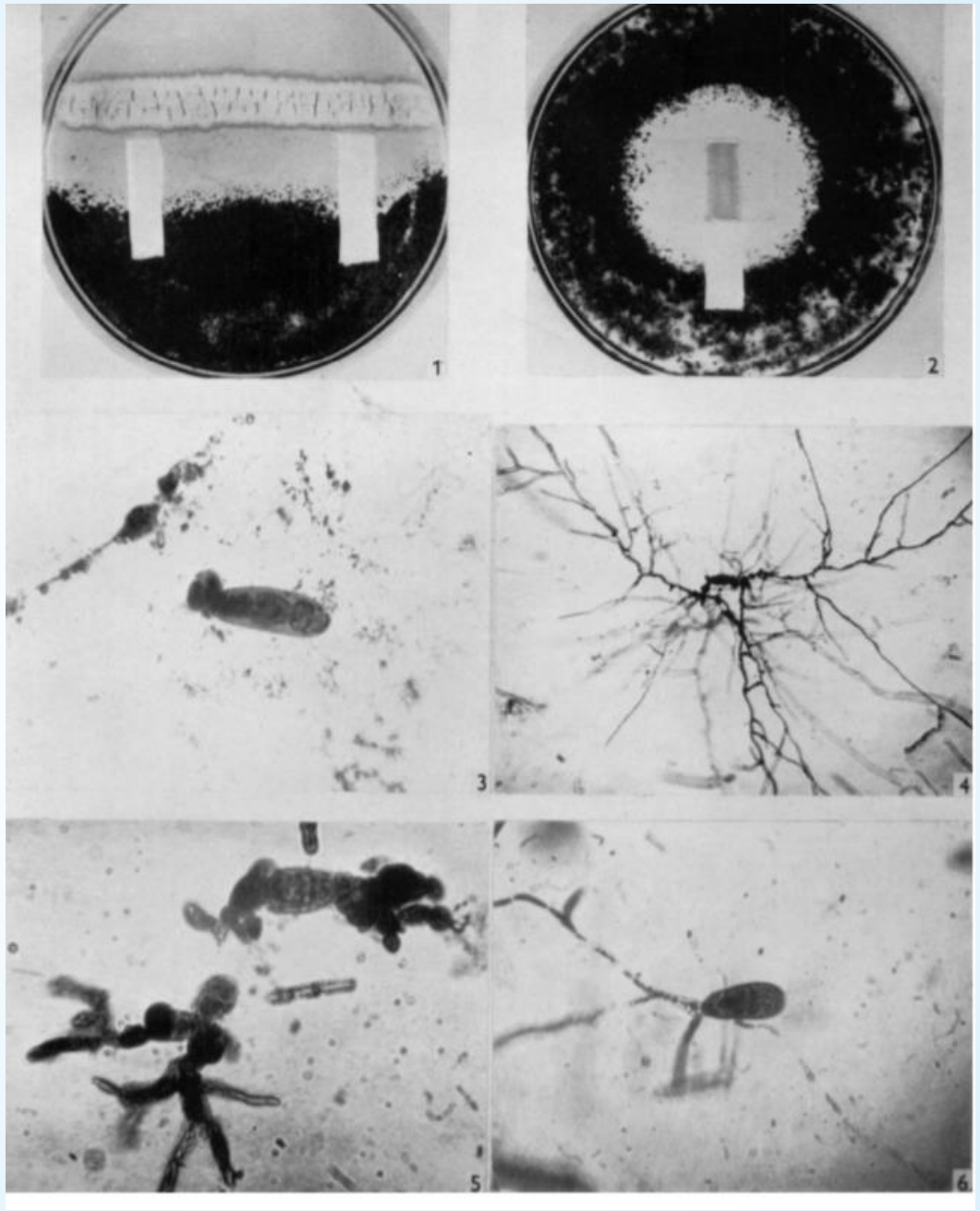
b. در این روش هر چه باکتری وجود دارد را می توان مشاهده کرد. روی یک لام را رلایه ای نازک از ژلوز نوترینت آگار (N.A) تهیه می کنیم و از سمت ژلوز روی خاک قرار می دهیم و پس از یک هفته آن را بر می داریم. تمام میکرو ارگانیسم های موجود در خاک چه آن هایی که قادر به رشد هستند مانند برخی قارچ ها و باکتریها، و چه آن هایی که رشد نمی کنند مانند دیاتومه ها و جلبک ها به ژلوز متصل می شوند. اما آن هایی که قادر به رشد هستند علاوه بر چسبیدن به نوترینت آگار رشد می کنند و میکرو کلنی تشکیل می دهند و تجمعی از باکتریها را بعد از رنگ آمیزی مشاهده می نماییم .

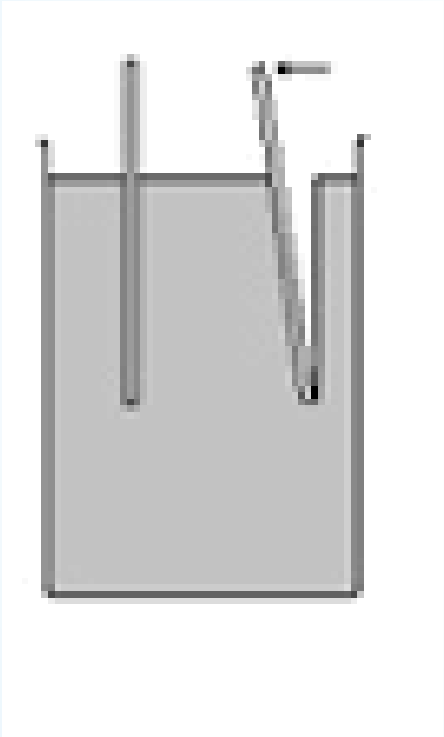
روش تهیه ی اسلاید پنهان خاک

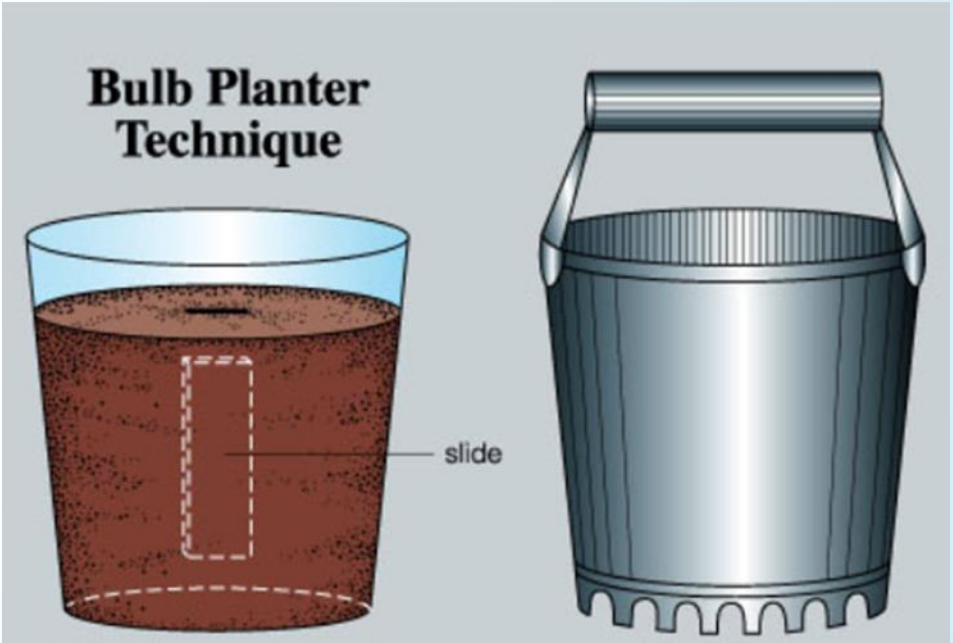
- برای تهیه اسلاید پنهان ابتدا ژلوز را روی لام قرار می دهیم . برای انجام این عمل ابتدا نوترینت آگار را در لوله آزمایش تهیه و استریل می کنیم و سپس آن را سرد کرده تا به دمای ۴۵ درجه برسد.
- سپس روی لامی که به صورت اریب روی یک سطح قرار دارد می ریزیم، به طوری که یک لایه نازک از آگار در همه جای لام قرار گیرد. بعد از آن صبر می کنیم تا ژلوز سرد شود و لام را از طرفی که ژلوز دارد روی خاکی که درون یک پلیت استریل ریخته شده قرار دارد و اطراف آن را آب می پاشیم تا خاک مرطوب شود و میکروبها بتوانند حرکت کرده و به سمت ژلوز بیایند.
- یک هفته در دمای ۲۵ درجه قرار داده و بعد لام را به طریقه گرم رنگ آمیزی نموده و مشاهده می کنیم .

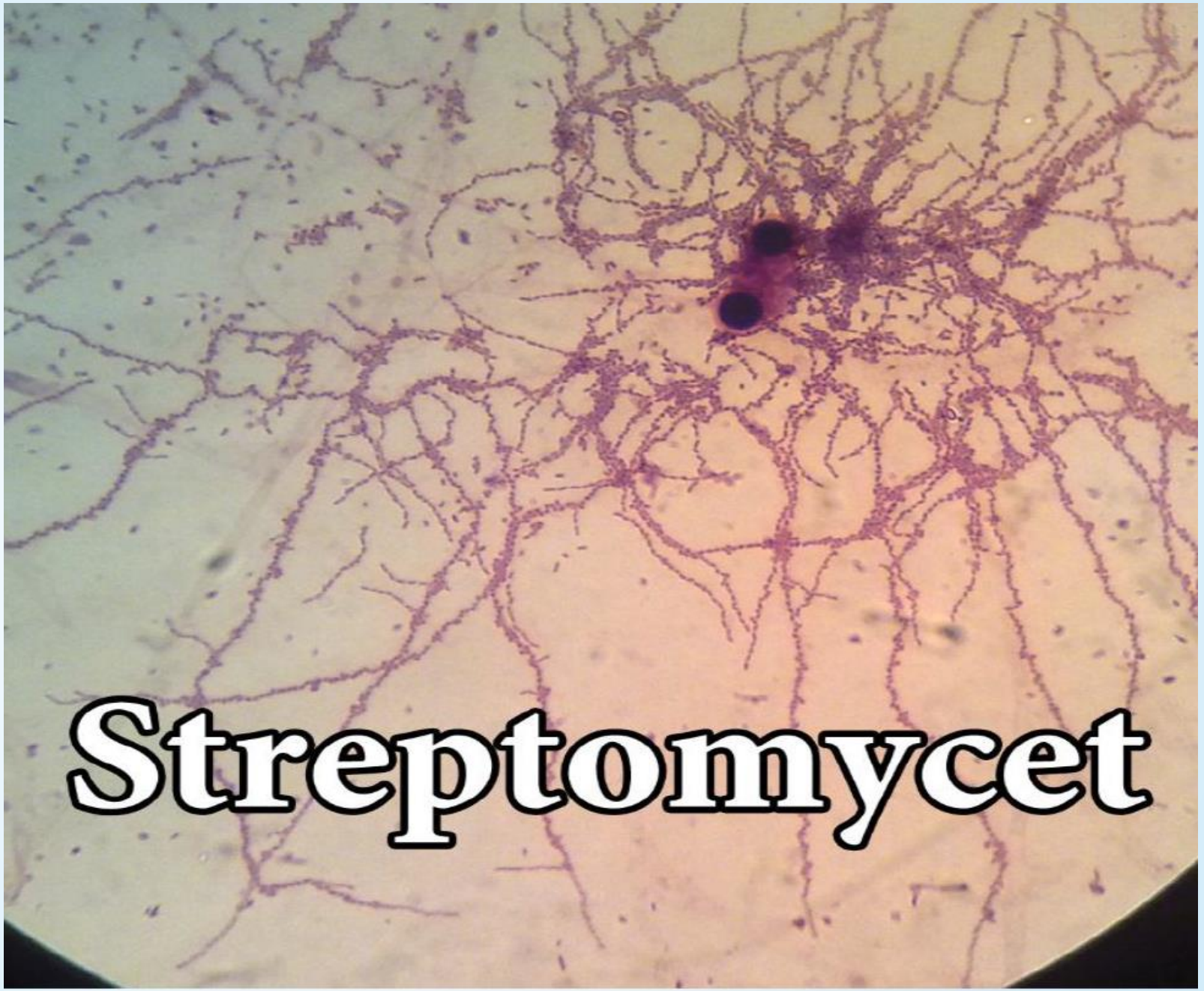




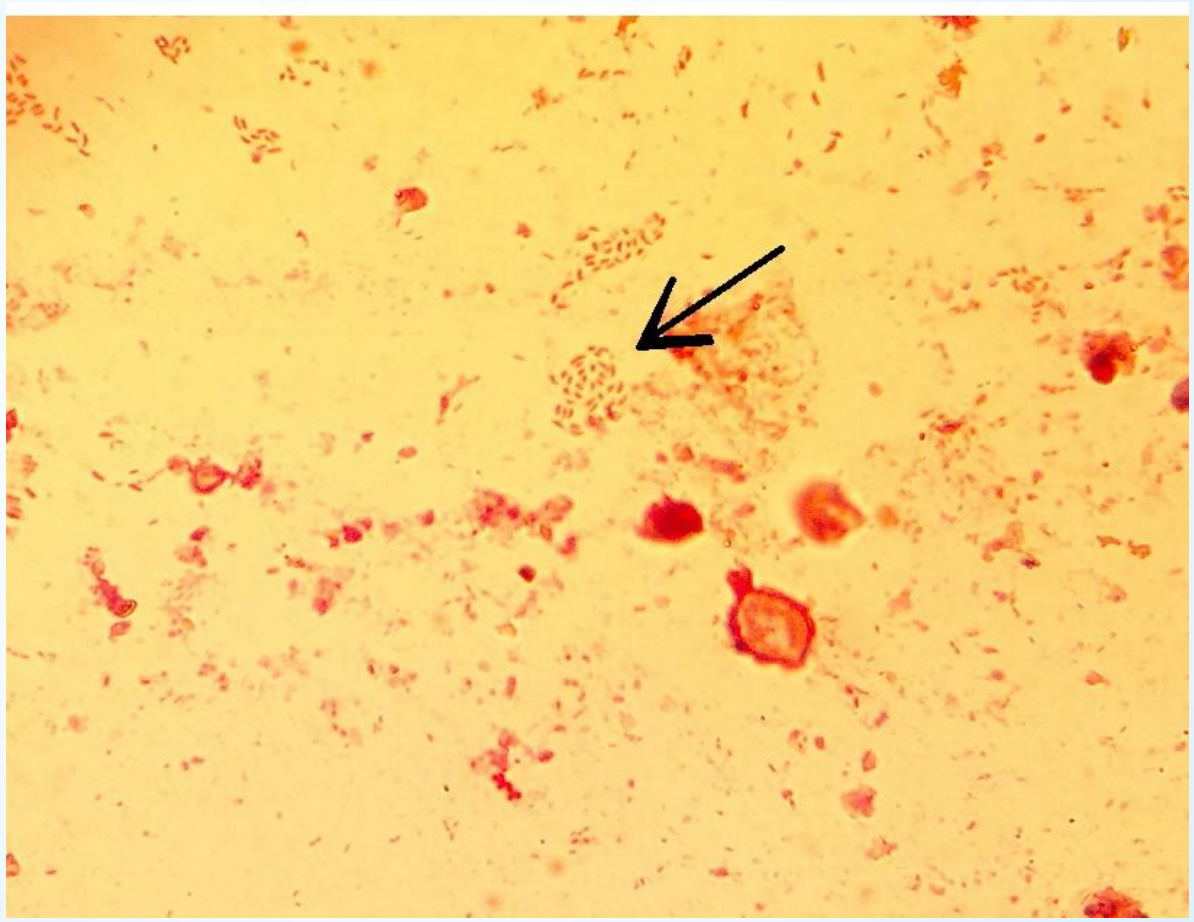

1
2
3
4
5
6



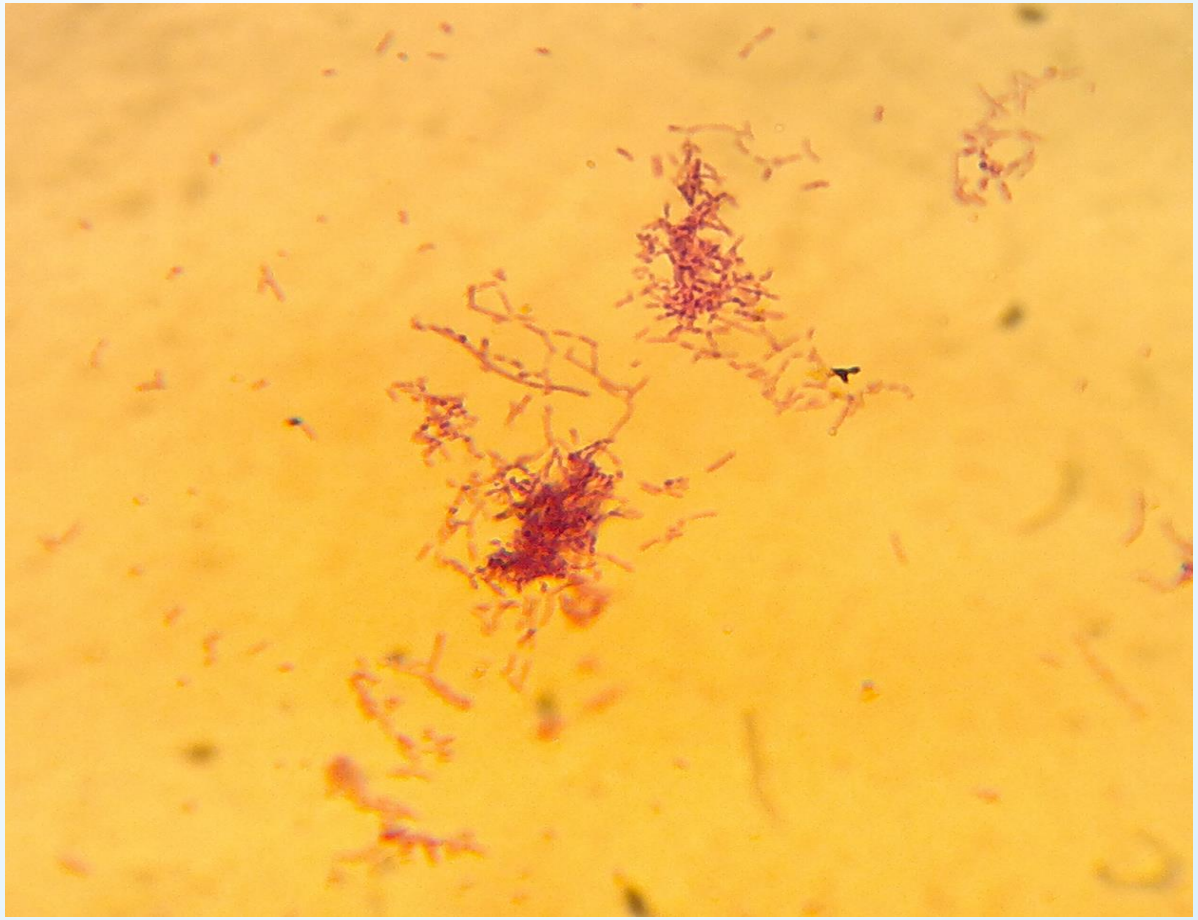

Bulb Planter
Technique
slide

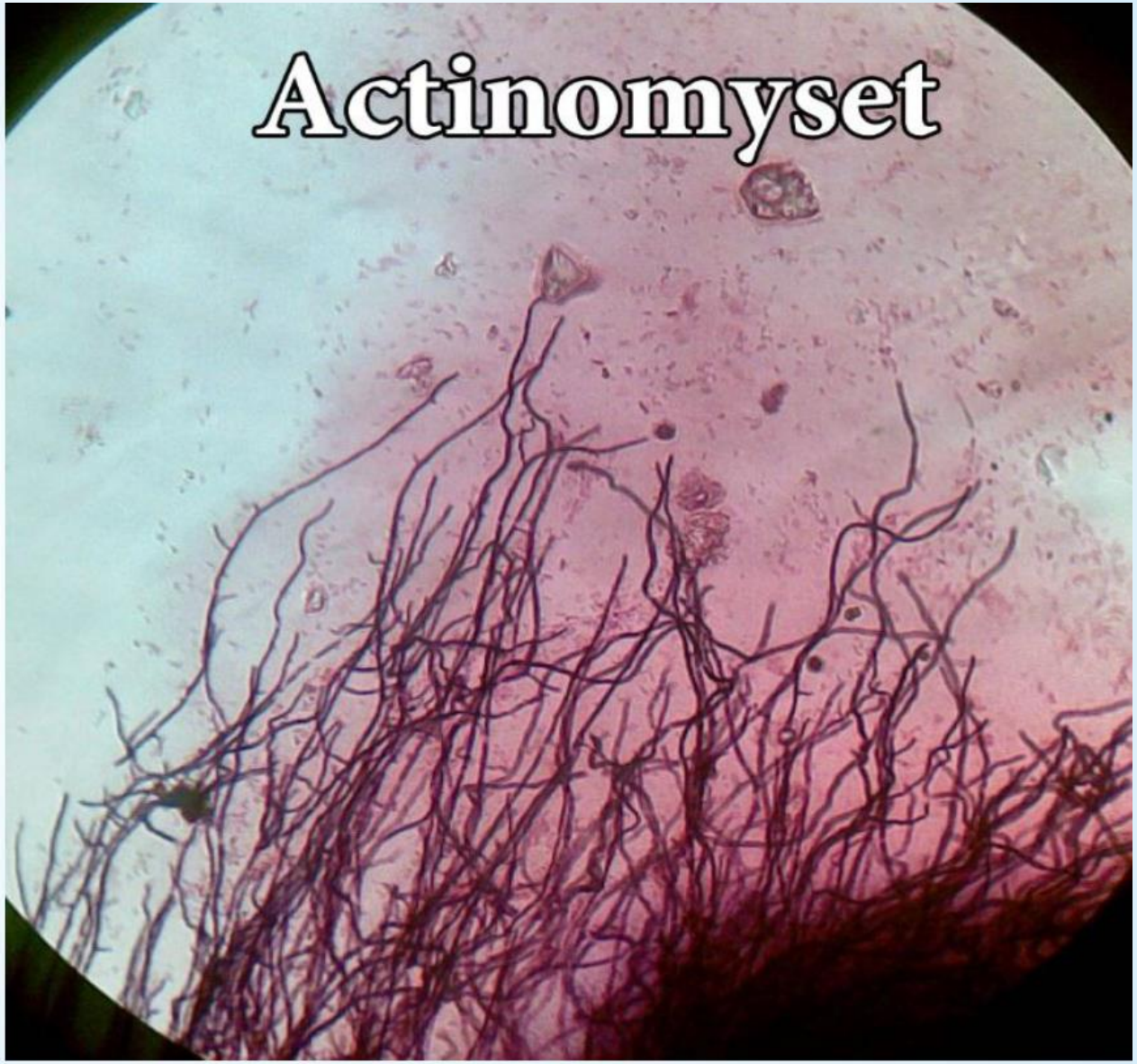

Streptomycet

سیتوفاگو

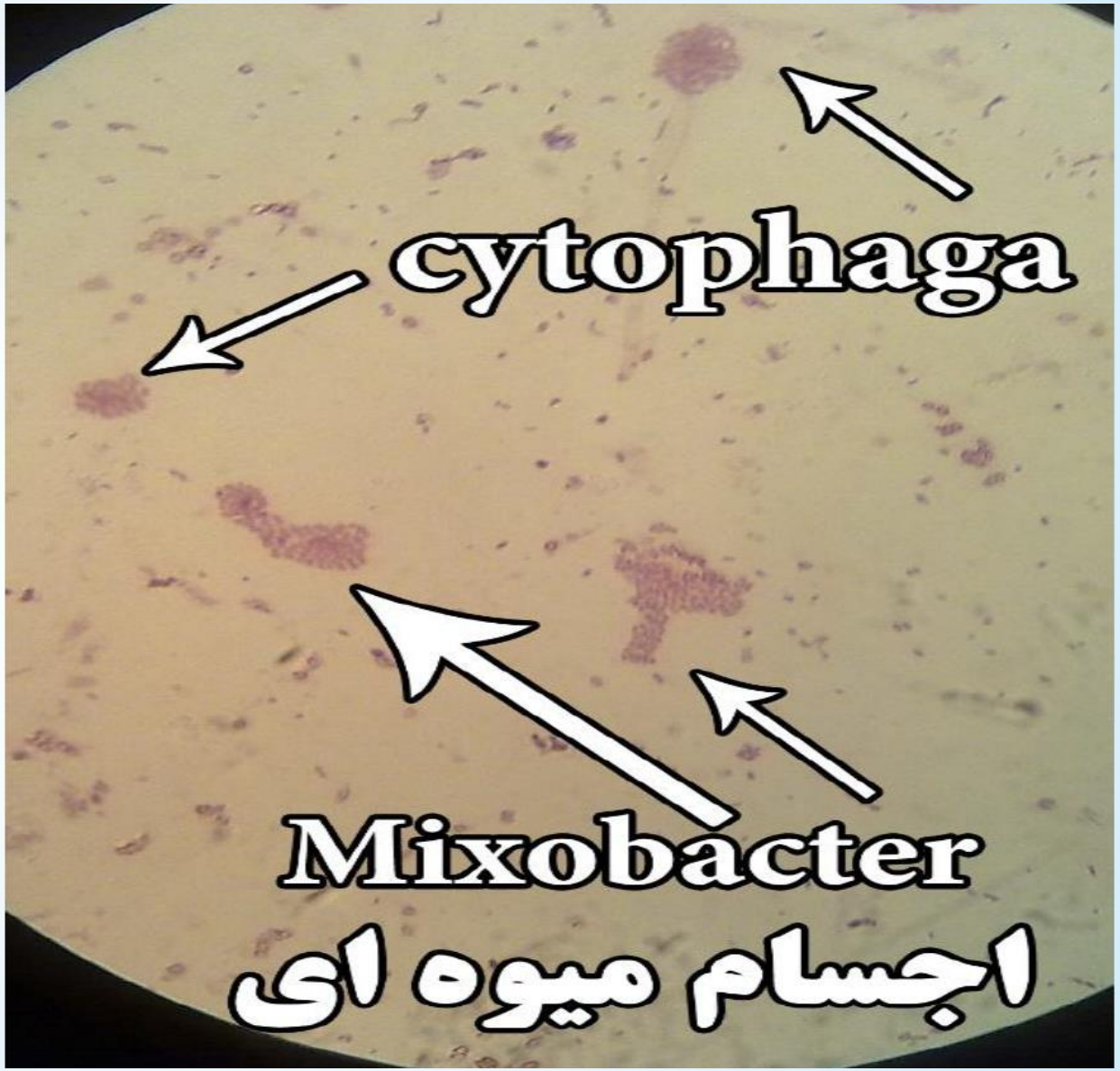


استرپتومیست ها

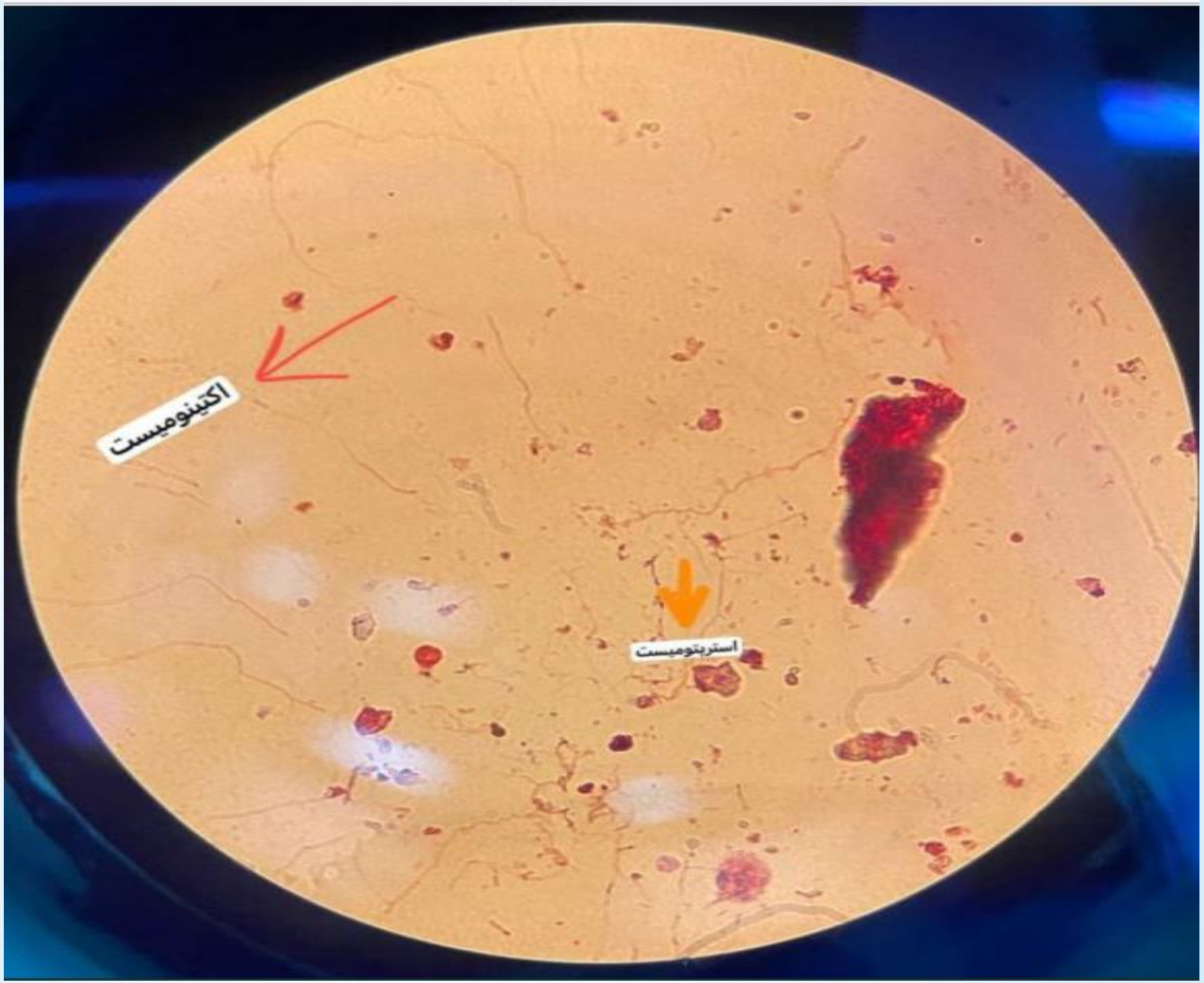


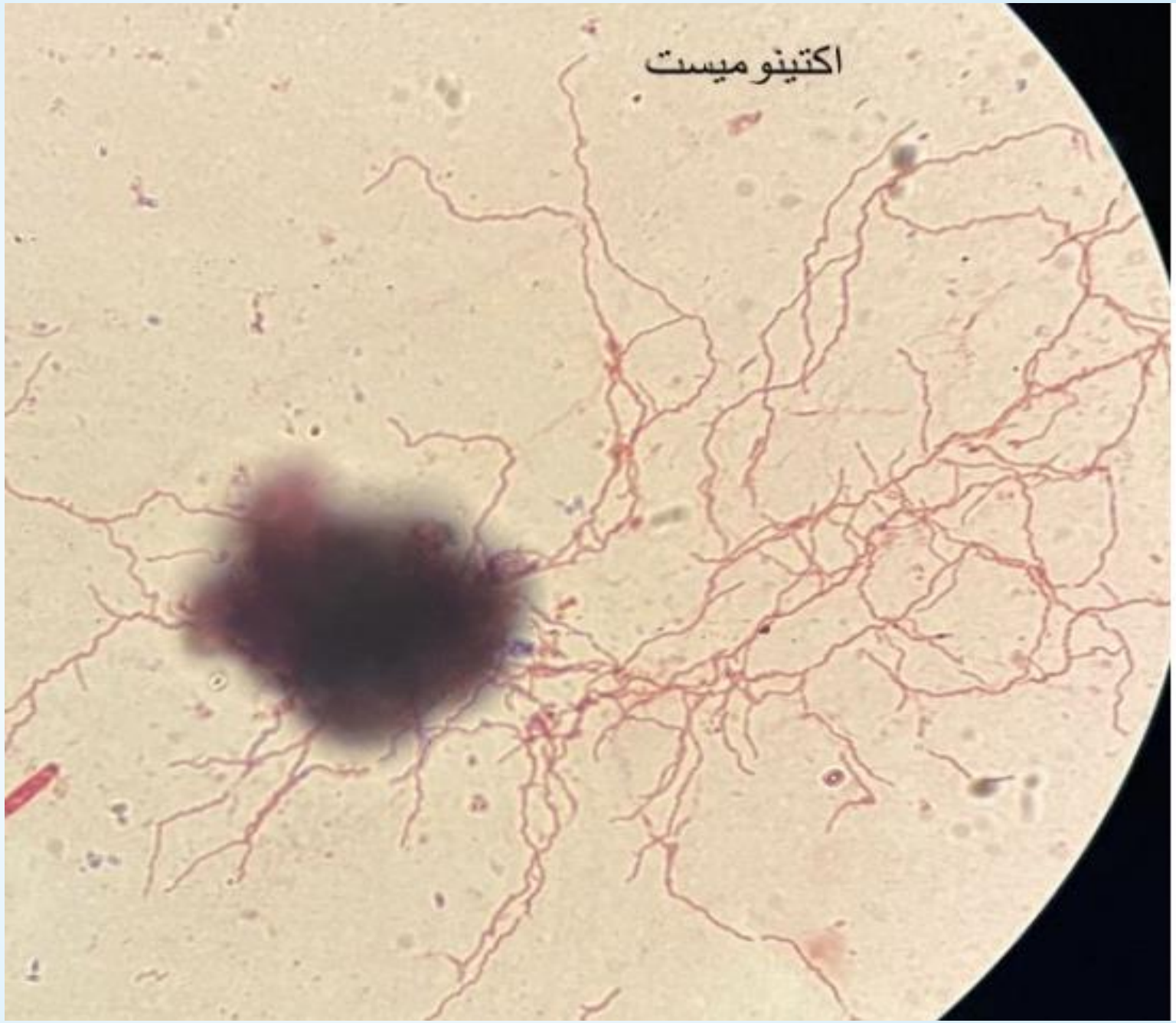


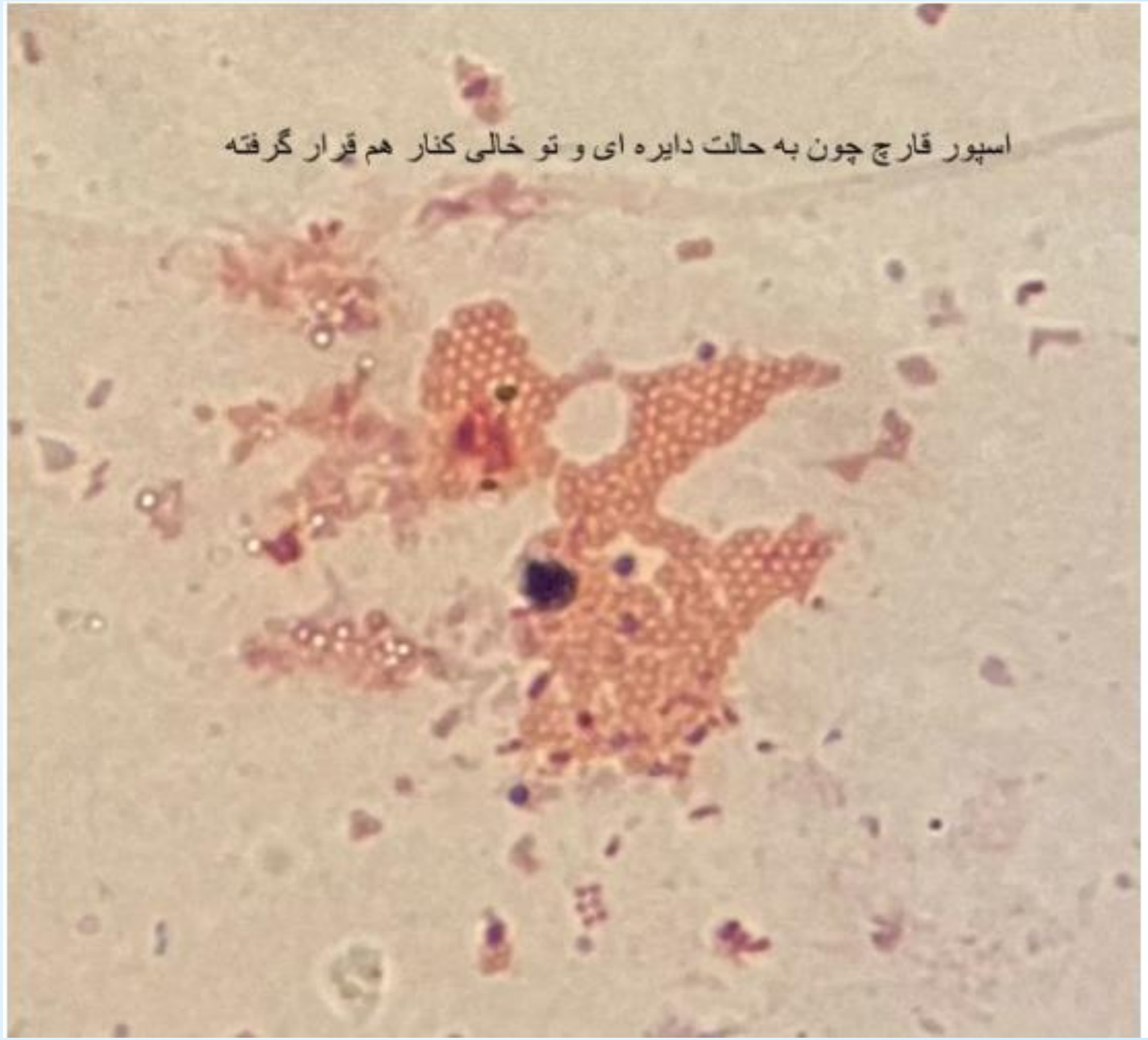
تهیه کننده: سهیلا عباسی

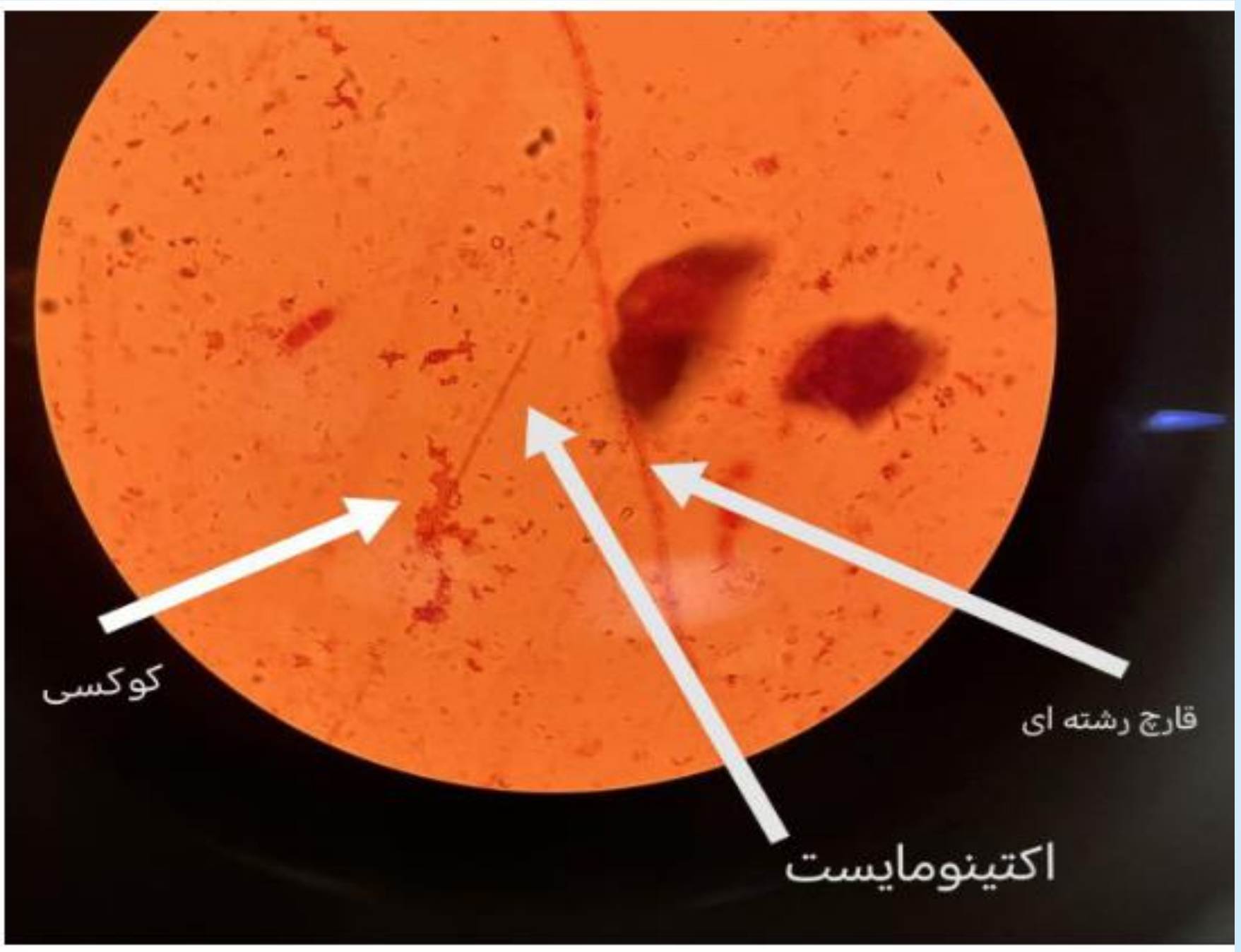


تهیه کننده: سهیلا عباسی


اکتینومیست
استربتومیست


اکتینو میست


اسپور قارچ چون به حالت دایره ای و تو خالی کنار هم قرار گرفته


کوکسی
قارچ رشته ای
اکتینومایست

با سپاس فراوان از توجه شما