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 گوگرد

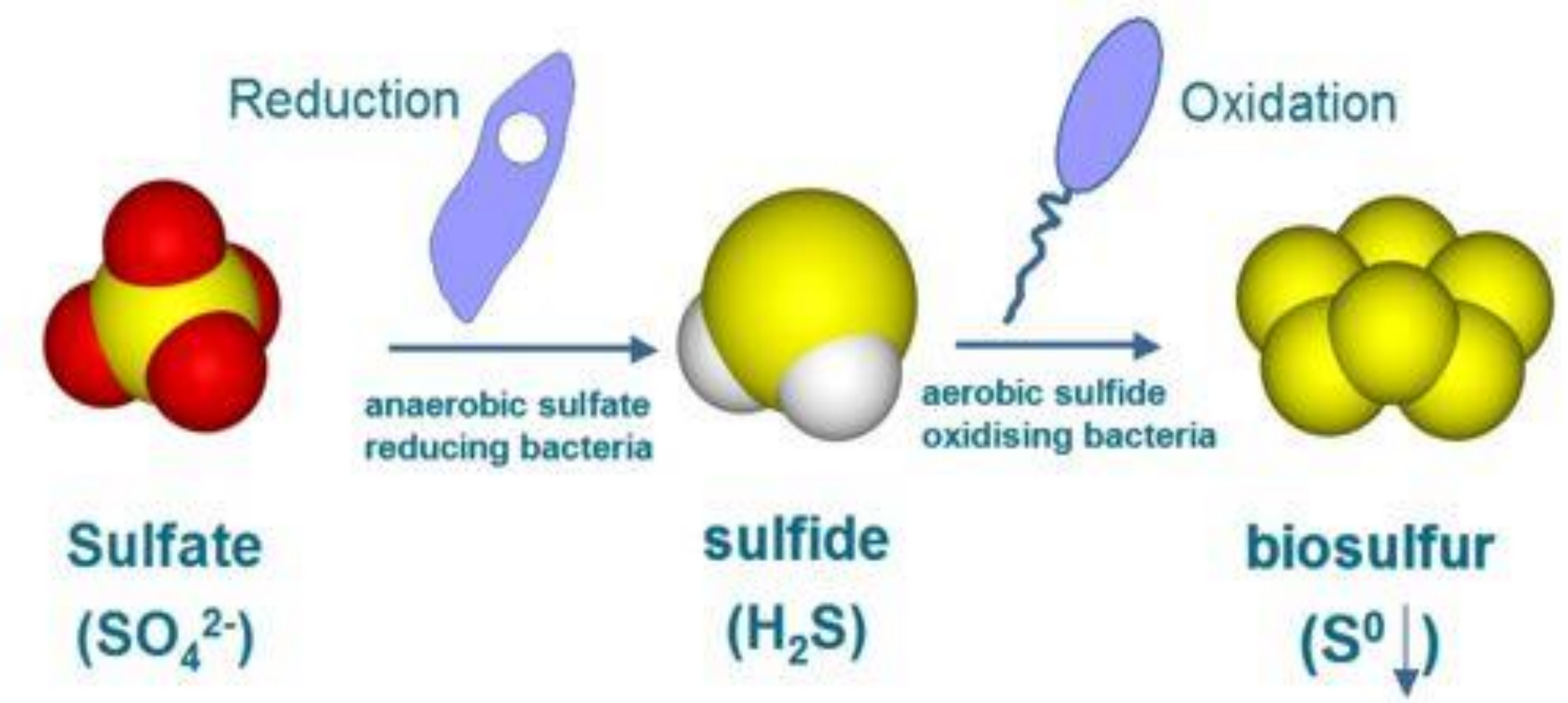
تهیه کننده : سهیلا عباسی

- گوگرد جزو ساختمان شیمیایی بسیاری از مواد حیاتی مانند برخی از اسید های آمینه (سیستئین، متیونین) و ویتامینها مانند (تیامین، بیوتین، اسید لیپوئیک) است.
- منشأ اصلی گوگرد خاک از سنگ های مادری است که در بسیاری از کانیهای آن این عنصر به شکل سولفورهای مختلف بویژه آهن، مس و نیکل وجود دارد و پس از تخریب آن ها اکسید شده، با خاک مخلوط می گردند در بعضی از مواد مثلاً سنگ های رسوبی، گوگرد بیشتر حالت سولفات وجود دارد.
- در خاک های معمولی گوگرد به صورت ترکیب های بسیار متعددی است که هیچ یک از آن ها وضع کاملاً پایداری ندارند. در معرض تغییرات پی در پی هستند.

- ماده گوگردی که در مرحله ی نهایی تجزیه بوجود می آید بر حسب نوع ماده آلی در حال تجزیه و شرایط محیطی ممکن است به صورت سولفات و یا سولفور و یا ترکیبات گوگردی فرار مانند متیل مرکاپتان باشد که در بین آن ها آزاد شدن سولفور بخصوص در ضمن تجزیه مواد پروتئینی بیشتر دیده می شود. اکثر موجودات ذره بینی و گیاهان، پس از جذب سولفات آن را به ترکیب های آلی سولفیدریل (R-SH) تبدیل می کنند که در اغلب موارد در حین تجزیه ی بازمانده ی این موجودات گوگرد به صورت هیدروژن سولفوره آزاد می شود.

$$R - SH \rightarrow R + SH_2$$

- این عمل سولفوری شدن و یا به علت تولید ترکیبات بدبو گندیدگی نیز نامیده می شود که انجام آن در شرایط هوازی و بی هوازی مقدور می باشد.


Reduction
Oxidation
anaerobic sulfate
reducing bacteria
aerobic sulfide
oxidising bacteria
Sulfate
(SO_4^{2-})
sulfide
(H_2S)
biosulfur
$(S^0\downarrow)$

باکتری های اکسید کننده گوگرد

- $H_2S + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow S + H_2O$

- باکتری های اکسید کننده گوگرد باکتریهایی هستند که می توانند SH_2 ، گوگرد ، تیوسولفات و تتراتیونات را اکسید کنند و از اکسیداسیون این مواد گوگرد و یا اسید تولید کنند. این باکتریها اکثراً گرم منفی هستند و در شرایطی که گوگرد به عنوان تنها منبع انرژی است می توانند رشد کنند.

- به طور کلی باکتریهای اکسید کننده گوگردچهاردسته اند :

- **۱. باکتری های اتوتروف**
- **۲.باکتری های فتوتروف**
- **۳.باکتری های میکسوتروف**
- **۴.میکروارگانیسم های هتروتروف**

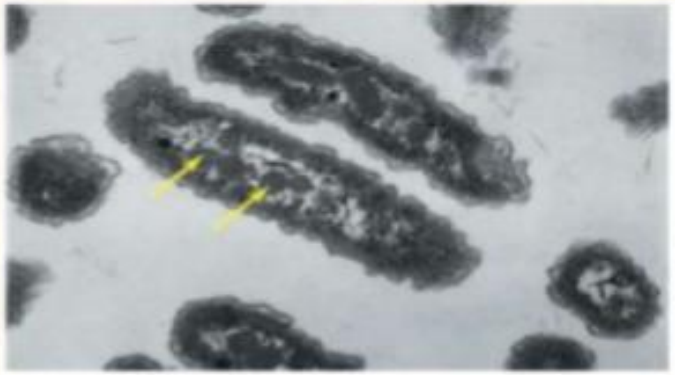
۱. باکتری های اتوتروف

- باکتری هوازی، گرم منفی و کوتاه هستند. در ایران برای استخراج معادن در صنعت معدن مس استفاده می شود ولی در محیط در لوله های آب، خوردگی ایجاد می کنند. مهمترین جنس این باکتریها اسید تیوباسیلوس می باشد.

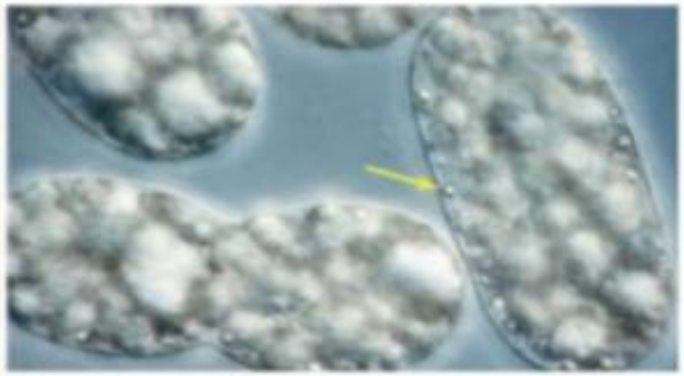
- از این جنس ۵ گونه ی *تیوپاروس*، *دنیتریفیکانس* ، *تیواکسیدانس* ، *فرواکسیدانس* و *ناولوس* به طور دقیق تری مورد مطالعه قرار گرفته اند. گونه های *تیوپاروس* و *دنیتریفیکانس* و *ناولوس* دامنه ی انتشار وسیعتری دارند و در اکثر خاک ها پیدا شده اند زیرا این گونه ها pH حدود خنثی را ترجیح می دهند.

- در حالی که دو گونه *تیواکسیدانس* و *فرواکسیدانس* معمولاً در خاک های شدیداً اسیدی و سرشار از گوگرد یا سولفورهای مختلف پیدا می شوند. به طور کلی تعداد *تیوباسیل ها* در خاک چندان زیاد نیست. زیرا ترکیب های گوگردی که باید به عنوان منبع انرژی اختصاصی مورد استفاده ی آن ها قرار گیرد در اکثر خاک ها به مقدار بسیار جزئی وجود دارند و برای ازدیاد سریع آن ها کافی نیستند.

- ***Thiobacillus*** **and close relatives are best studied**
  - **Rod-shaped**
  - **Sulfur compounds most commonly used as electron donors are H_2S, S^o, $S_2O_3^{2-}$; generates sulfuric acid**
- ***Achromatium***
  - **Common in freshwater sediments**
  - **Spherical cells**
  - **Pylogenetically related to purple bacteria *Chromatium***
  - **A classic example of a sulfur-oxidizing bacterium is *Beggiatoa*, a microbe originally described by Sergei Winogradsky, one of the founders of environmental microbiology. Another example is *Paracoccus*.**



(a)



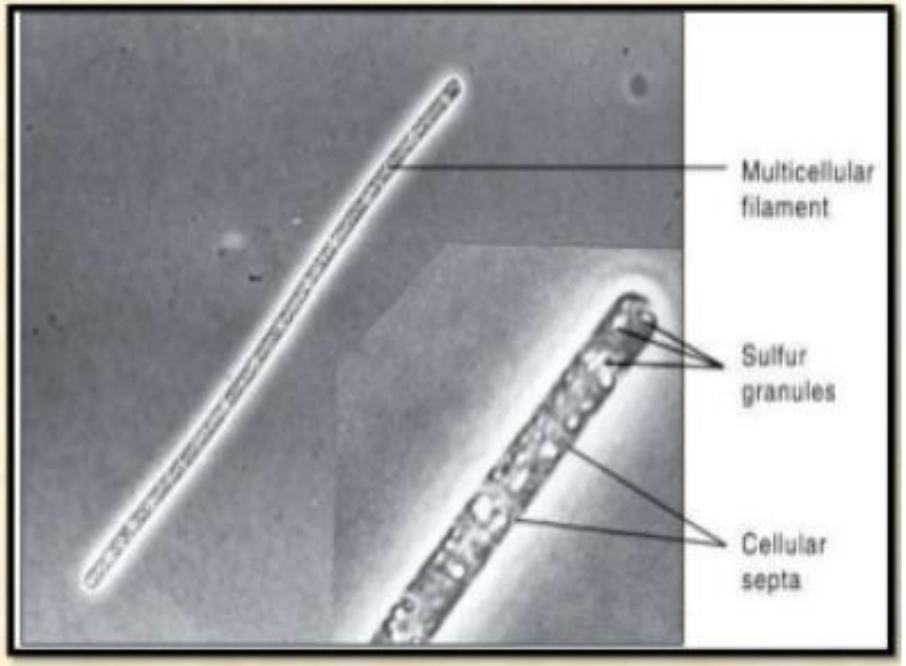
(b)

(a)Halothiobacillus neapolitanus

(b)Achromatium sp.

Aerobic Chemolithotrophs- Sulfur oxidizers

- Sulfur-oxidizing bacteria are Gram-negative rods or spirals
- Grow in filaments
- Obtain energy through oxidation of reduced sulfur
  - Including hydrogen sulfide, elemental sulfur and thiosulfate
  - Molecular oxygen serves as terminal electron acceptor
    - This produces sulfuric acid



۲. باکتری های فتوتروف

- بیضی یا خمیده درشت می باشند مانند سه خانواده ی *کروماتیاسه*، *اکتوتیورودواسپیراسه*، *کلروبیاسه* که در شرایط بی هوازی قادر به اکسیداسیون SH_2 هستند. *کلروبیوم* هاشرایط میکروآئروفیل را هم می توانند تحمل کنند ولی *کروماتیوم* بی هوازی مطلق است.
- چون این نوع اکثراً آبزی هستند اهمیت نسبی آن ها در خاک کمتر است.

- *کلروبیوم* و *کروماتیوم* برای از بین بردن ترشی گاز و حذف SH_2 استفاده می شود ولی در لوله های آبرسانی بیوفیلم ایجاد می کند.

- این باکتریهای فتوسنتزی گوگردی زمانی که SH_2 را به S اکسید کنند قادر به احیای نوری CO_2 هستند که این عمل مشابه فتوسنتز یوکاریوت ها می باشد. *کروماتیاسه* گوگرد را به صورت درون سلولی ذخیره می کند در حالی که *اکتورودواسپیراسه* و *کلروبیاسه* آن را خارج می کنند.

- همه ی آن ها قابلیت محدودی در اکسید کردن گوگرد به سولفات دارند و ممکن است در استخراج بیولوژیکی گوگرد نقش داشته باشند

۳.باکتری های میکسوتروف

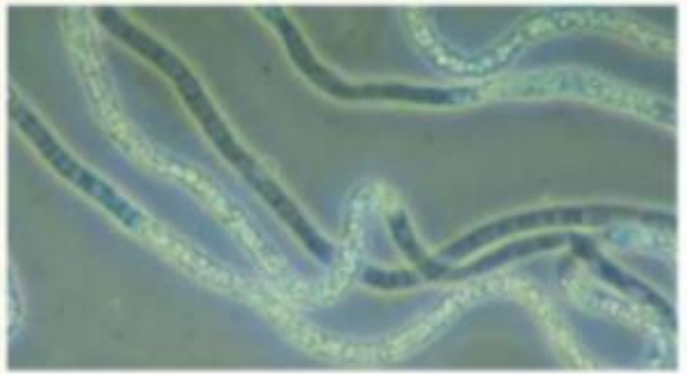
- مانند *بژیاتوآ* که باکتریهای رشته ای گرم منفی هستند.
- باکتری های این جنس به شکل رشته های طویلی متشکله از سلول های کوتاه و مدور هستند. از لحاظ ساختمان ظاهری به سیانوفیسم ها شباهت دارند ولی بر خلاف آن ها فاقد دانه های رنگی می باشند. حرکت آن ها به طریق لغزشی است.
- محلی اصلی فعالیت این باکتریها چشمه های گوگردی، آب های آلوده به فاضلاب و لجن زارها است. همین طور در بعضی از خاک های هیدرومورف نیز فعالیت قابل توجهی دارند .

- این باکتری ها انرژی مورد نیاز خود را به وسیله اکسیده کردن هیدروژن سولفوره تأمین می کنند و نتیجه ی این اکسیداسیون ابتدا تولید گوگرد است که به صورت دانه های شفاف در داخل یاخته های آن ها متراکم می گردد . این گوگرد نقش ماده ی غذایی ذخیره را به عهده دارد . زیرا در مواقعی که باکتری سولفور کافی در اختیار نداشته باشد . از اکسیده کردن آن برای تأمین انرژی خود استفاده می کنند .

- در عین حال مشاهده شده که تمام کشت های خالص *بژیاتوآ* قادر به رویش هتروتروفی هستند و هیچیک از آن ها نمی توانند CO_2 را به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار دهند و بنابراین میکسوتروف به حساب آمده اند .

Beggiatoa

- Filamentous, gliding bacteria
- Found in habitats rich in H_2S
  - e.g., sulfur springs, decaying seaweed beds, mud layers of lakes, sewage polluted waters, and hydrothermal vents
- Most grow mixotrophically
  - with reduced sulfur compounds as electron donors
  - and organic compounds as carbon sources (∵ lack Calvin cycle enzymes)



(a)

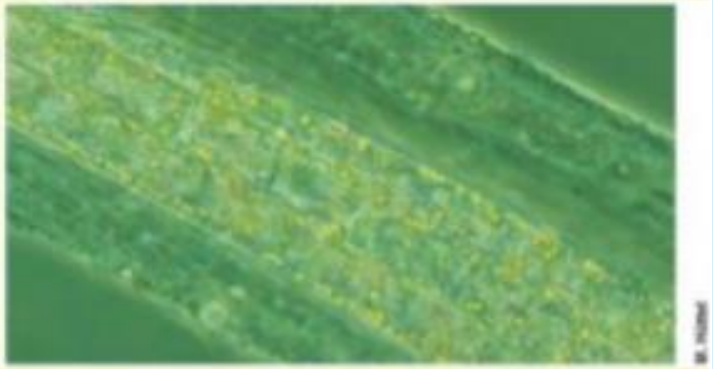
(b)

۴.میکروارگانیسم های هتروتروف

- علاوه بر باکتری های اتوتروف ، بسیاری از میکروارگانیسم های هتروتروف نیز قادر به اکسیده کردن ترکیب های گوگرد می باشند. مثلاً *سودوموناس* و *آکروموباکتر* و *اسفروتیلوس* و *تیوتریکس* می توانند تیوسولفات را به تتراتیونات تبدیل کنند. اکسیده شدن این مواد نتیجه واکنش های فرعی یا منحنی متابولیسم طبیعی این موجودات است و انرژی مورد نیاز آن ها اساساً از مواد آلی تأمین می گردد.
- بسیاری از قارچ های رشته ای بخصوص گونه هایی از *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم* و *میکروسپوروم* می توانند گوگرد موجود در بعضی ترکیب های آلی مانند سیستئین، تیورو و تورین را به سولفات تبدیل کنند. بطور کلی هر چند در مقایسه با *تیوباسیلوس ها* اکسیداسیون گوگرد و سایر ترکیب های آن به وسیله ی هتروتروف ها بسیار کند و بطنی انجام می شود. ولی به علت فراوانی تعداد این موجودات و قدرت سازشی که با محیط و شرایط مختلف آن دارند. نقش آن ها در انجام سولفواکسیداسیون در خاک می تواند قابل توجه باشد .

– *Thioploca*

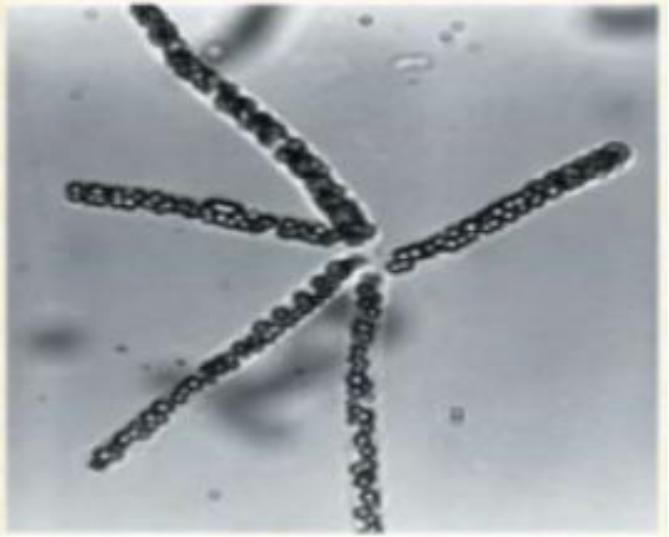
- Large, filamentous sulfur-oxidizing bacteria that form cell bundles surrounded by a common sheath
- Thick mats found on ocean floor off Chile and Peru
- Couple anoxic oxidation of H_2S with reduction of NO_3^- to NH_4^+



Thioploca sp.

– *Thiothrix*

- Filamentous sulfur-oxidizing bacteria in which filaments group together at their ends by a holdfast to form cellular arrangements called rosettes
- Obligate aerobic mixotrophs



Thiothrix

جداسازی بژیاتوآ

- برای شمارش *بژیاتوآ* ابتدا از محیط های کشتی استفاده می کنند که باکتری را غنی کند. برای غنی سازی باکتریها از محیط کشت حاوی عصاره ی یونجه استفاده می کنند. چون عصاره یونجه غنی از سیستئین است در هنگام استریل کردن محیط کشت SH_2 آزاد شده و SH2 آزاد شده باعث از بین رفتن باکتریهای دیگر شده و بژیاتوآ رشد می کند. املاح نیز از آب تأمین می شود .

روش کار

۱. از محیط کشت عصاره یونجه استفاده کرده که برای تهیه آن ۰/۸گرم پودر یونجه آماده شده را به ۱۰۰ سی سی آب معمولی اضافه کرده و در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ – ۱۰ دقیقه اتوکلاو می کنیم .

۲. نمونه می تواند از پساب ، فاضلاب و لجن باشد از محیط های بی هوازی هم می توان نمونه برداری کرد . مانند دیواره ی چاه ها

۳. در حدود ۰/۵ سی سی از نمونه و اگر نمونه خاک بود یک گرم خاک را به محیط عصاره ی یونجه اضافه می کنیم محیط را به هم می زنیم در دمای ثابت، بدون حرکت قرار می دهیم و در مدتی که انکوبه شده است نباید جابه جا شود.

۴. بعد از یک هفته محیط را بررسی می کنیم چون یک باکتری هوازی است در سطح یک لایه سفید تشکیل می دهد برای خواندن جواب از لایه ی تشکیل شده با لوپ یک فروتی تهیه کرده و رنگ آمیزی گرم انجام می دهیم .

- *بژیاتوآ* به صورت باکتری رشته ای گرم منفی مشاهده می شود که دارای دانه های گوگردی است .
- (تفاوت دانه های گوگردی با دانه های چربی در این است که دانه های چربی گرد و منظم می باشد ولی دانه های گوگردی چند وجهی و نامنظم هستند.)
- در لام *بژیاتوآ* ممکن است باکتری های *کلروبیوم* و *کوماتیوم* را هم مشاهده می کنیم چون شرایط بی هوازی ایجاد شده است و مخصوصاً اگر در معرض نور قرار گرفته باشد .
- این باکتریها به صورت میله ای گرم منفی و به رنگ سبز دیده می شوند . (رشته ای نیستند.)

برای خالص سازی *بژیاتوآ* تکه ی غنی شده را به مرکز محیط کشت انتقال داده و *بژیاتوآ* با حرکت لغزنده ای که دارد از مرکز تلقیح دور شده و می توان با چند بار پاساژ دادن کشت های رشد کرده ی بژیاتوآ آن را خالص کرد.

نکته : کلر *انتروباکتریاسه* را از بین می برد ولی *بژیاتوآ* را که در بیوفیلم است را از بین نمی برد .

جداسازی *تیوباسیلوس*

- **روش کار :**

۱. نمونه مورد استفاده برای جداسازی *تیوباسیلوس* معمولاً خاک می باشد .

۲. محیط مناسب برای جداسازی هر یک از *تیوباسیلوس ها* متفاوت می باشد .

- محیط کشت مورد استفاده برای جداسازی *تیوباسیلوس تیواکسیدانس* :

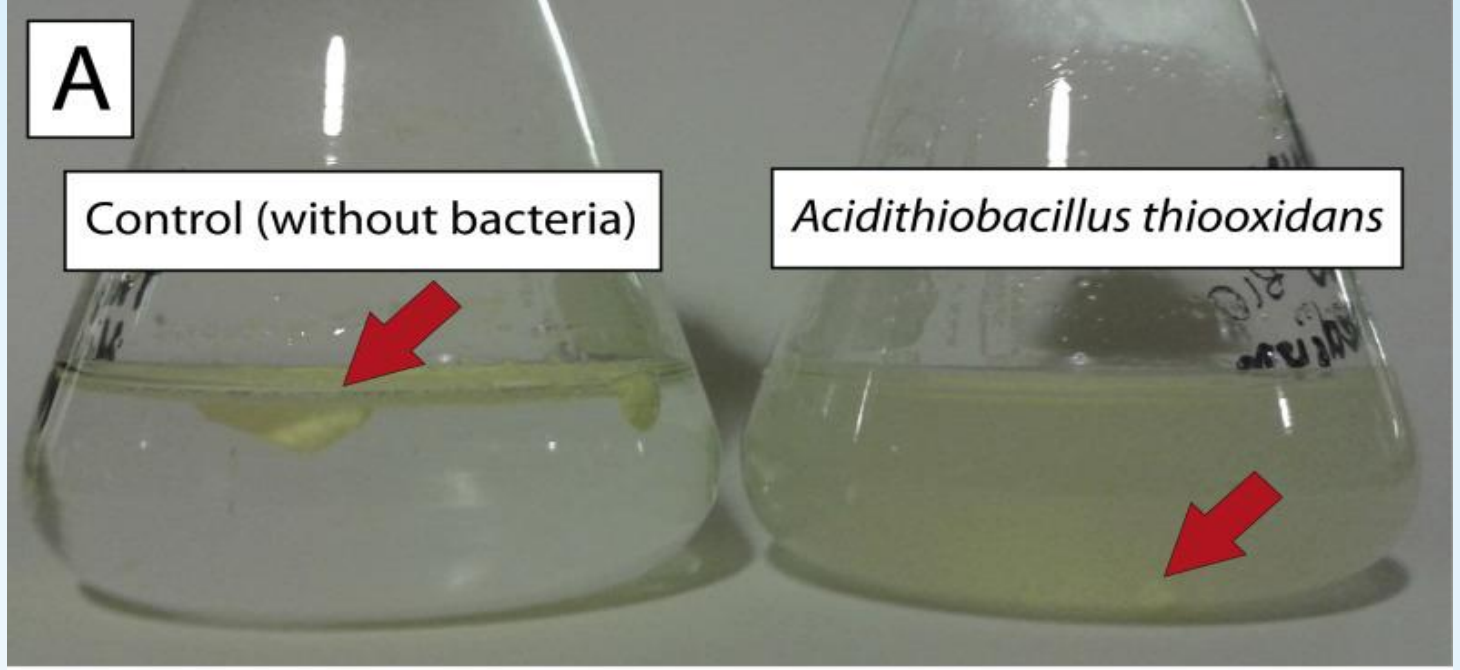
آگار	۲۰ gr
گوگرد	۱۰ gr
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۳ gr
سولفات منیزیوم	۵/۰ gr
سولفات آمونیوم	۲۵/۰ gr
کلرور فریک	۰۲/۰ gr
آب مقطر	۱ Lit

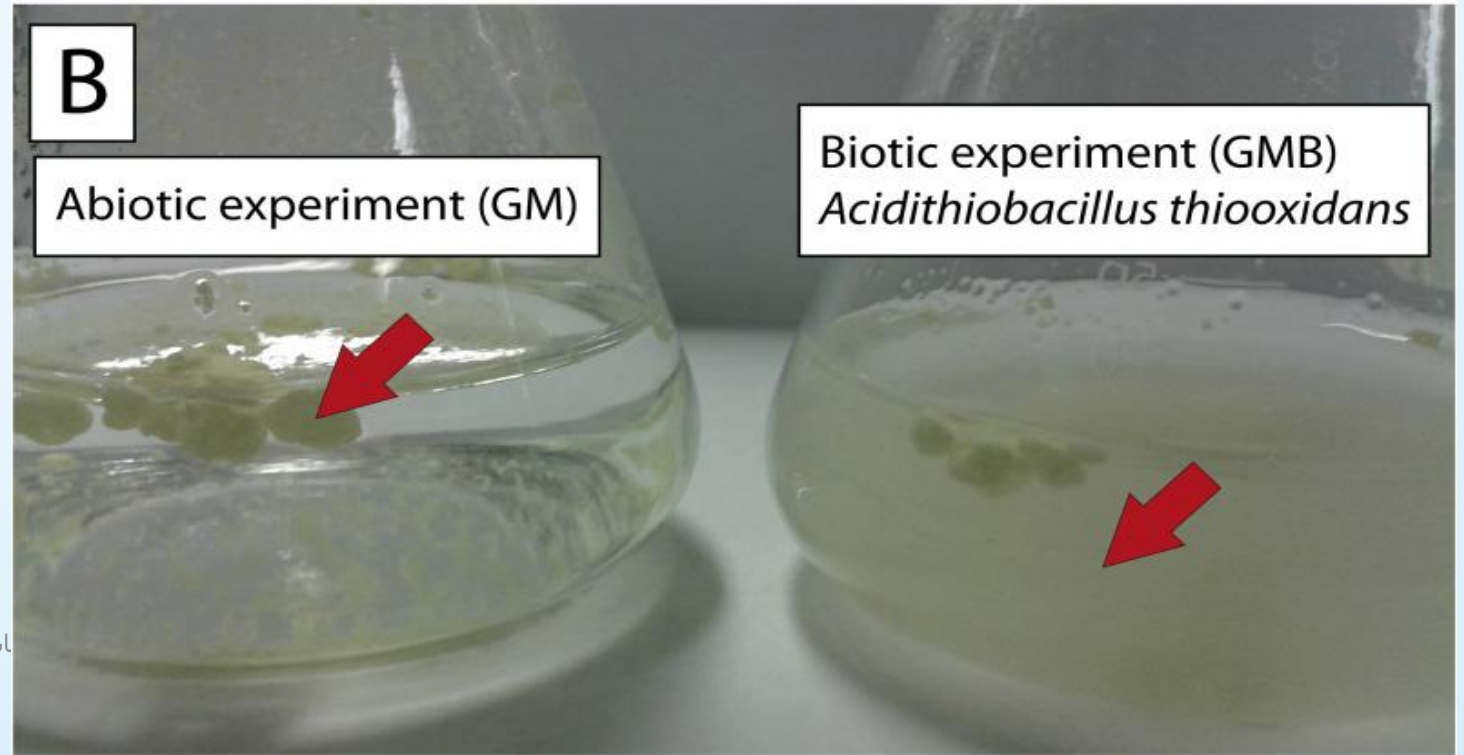
- پس از تهیه محیط را در ارلن ۲۵۰ سی سی به میزان هر ارلن ۱۰۰ سی سی می ریزیم و استریل می کنیم.

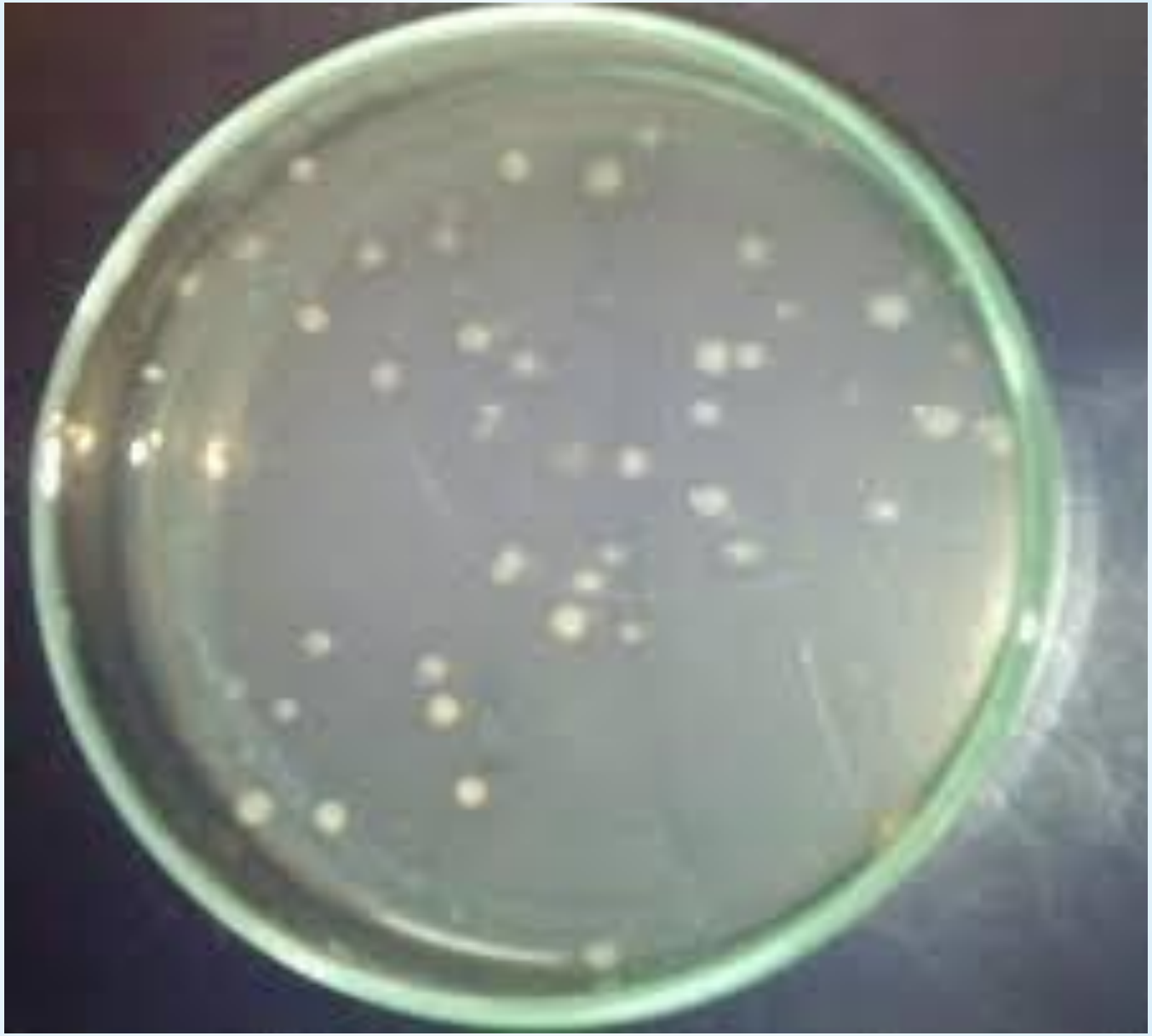
۳. یک گرم خاک را به محیط جداسازی *تیوباسیلوس* اضافه می کنیم و یک هفته روی شیکر قرار می دهیم.

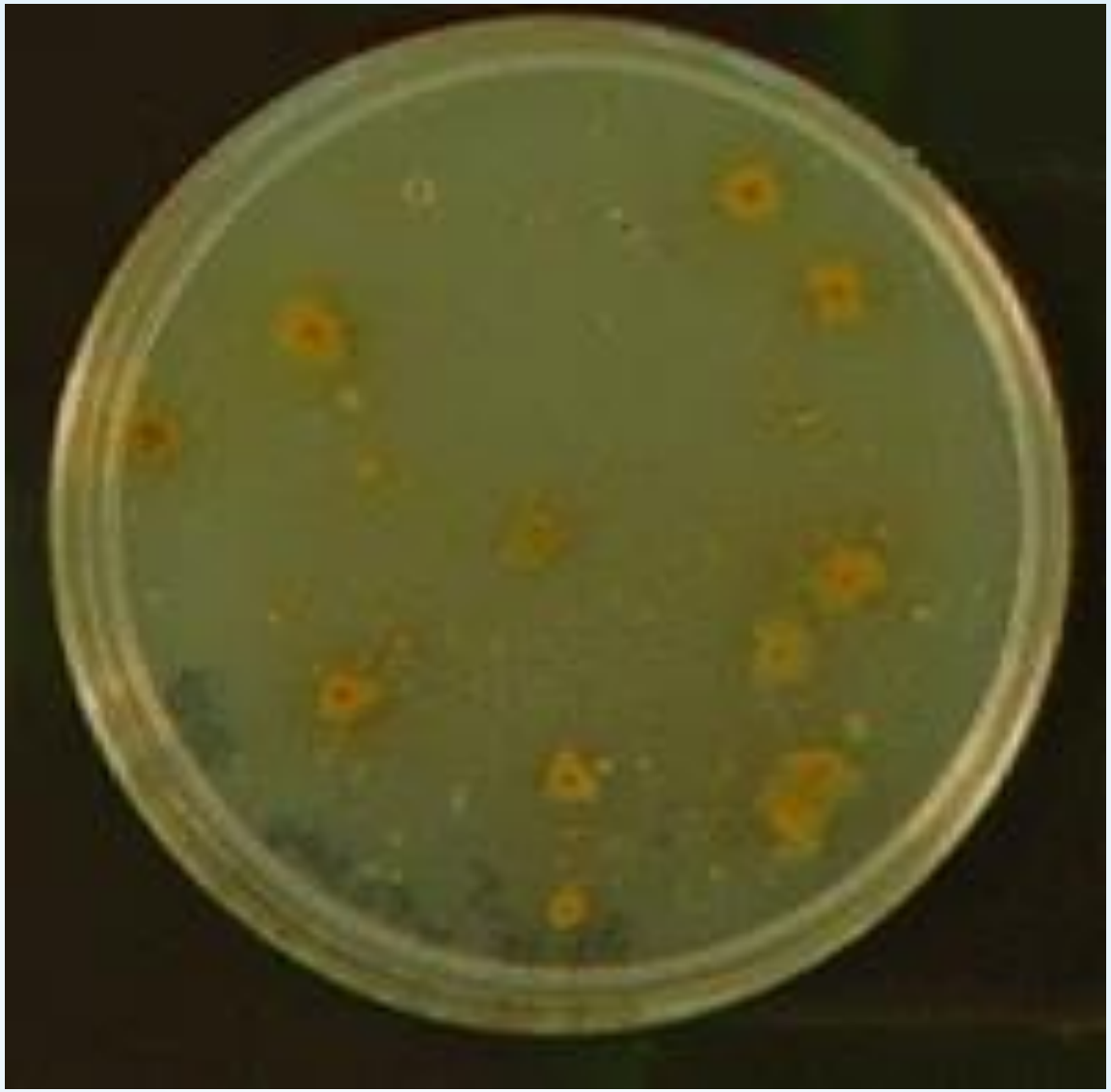
۴. بعد از غنی سازی روی محیط جامد ایزوله می کنیم.

۵. باکتریها به شکل میله ای ریز گرم منفی دیده می شوند.


A
Control (without bacteria)
Acidithiobacillus thiooxidans


B
Abiotic experiment (GM)
Biotic experiment (GMB)
Acidithiobacillus thiooxidans





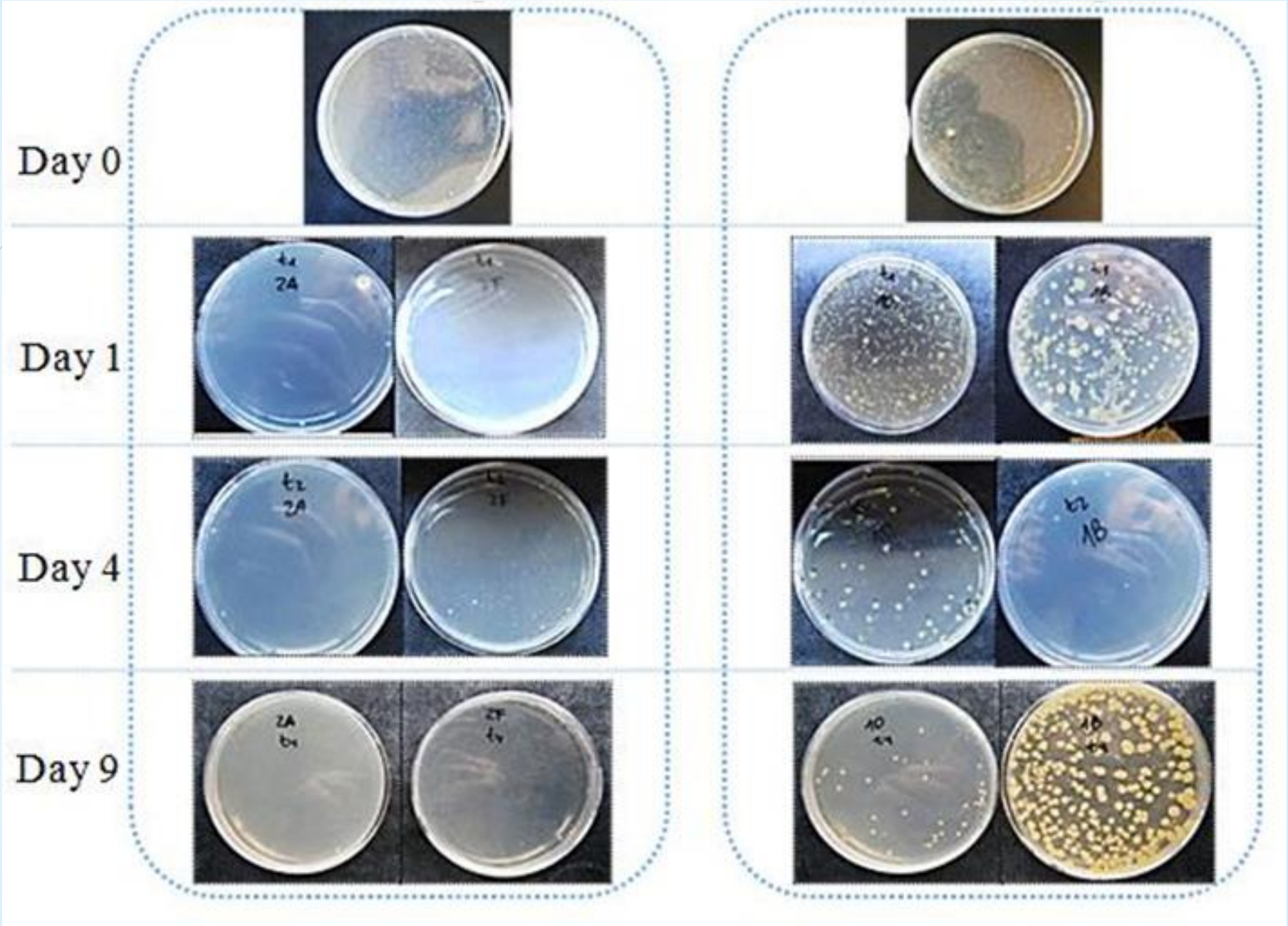
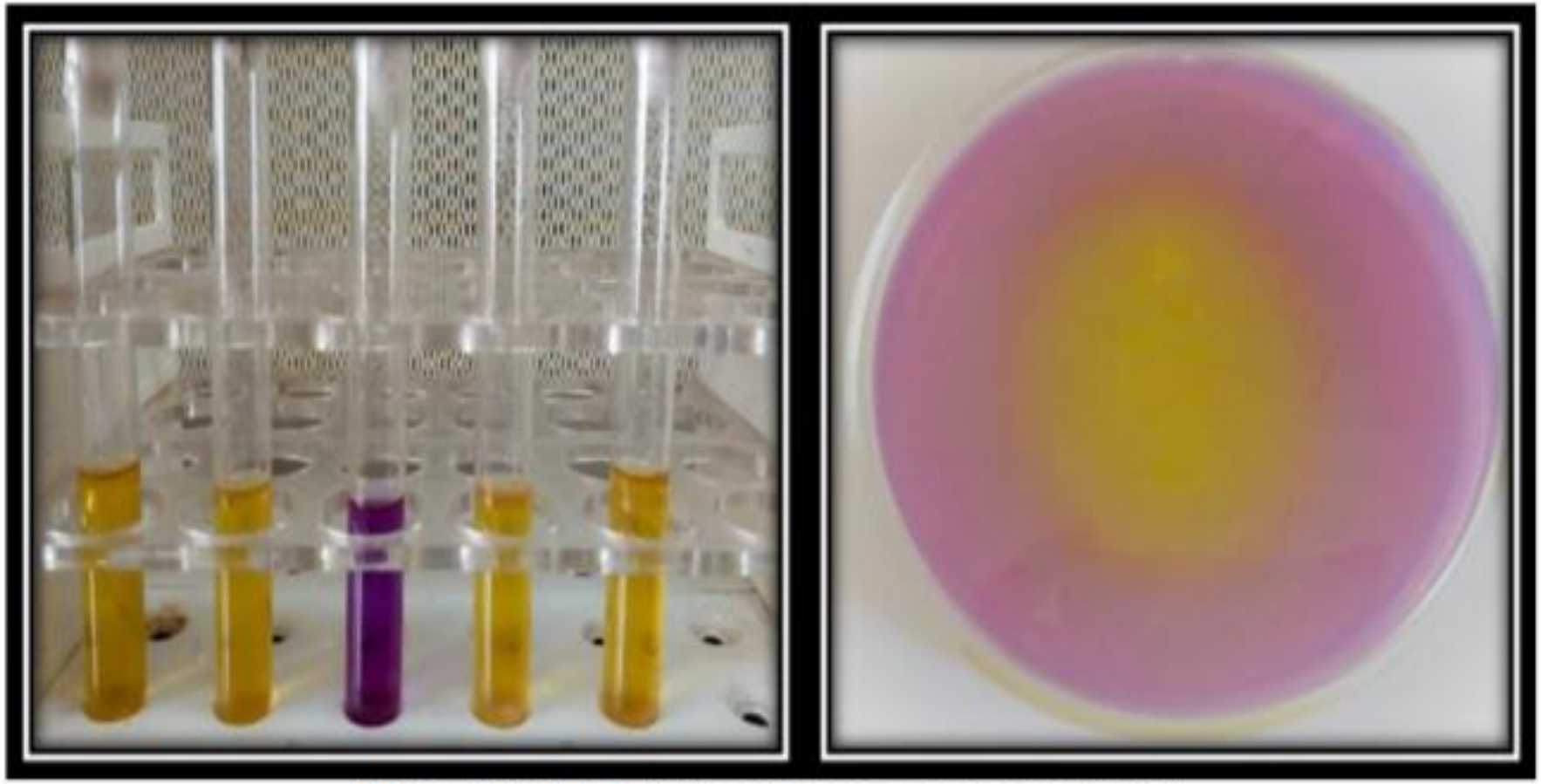
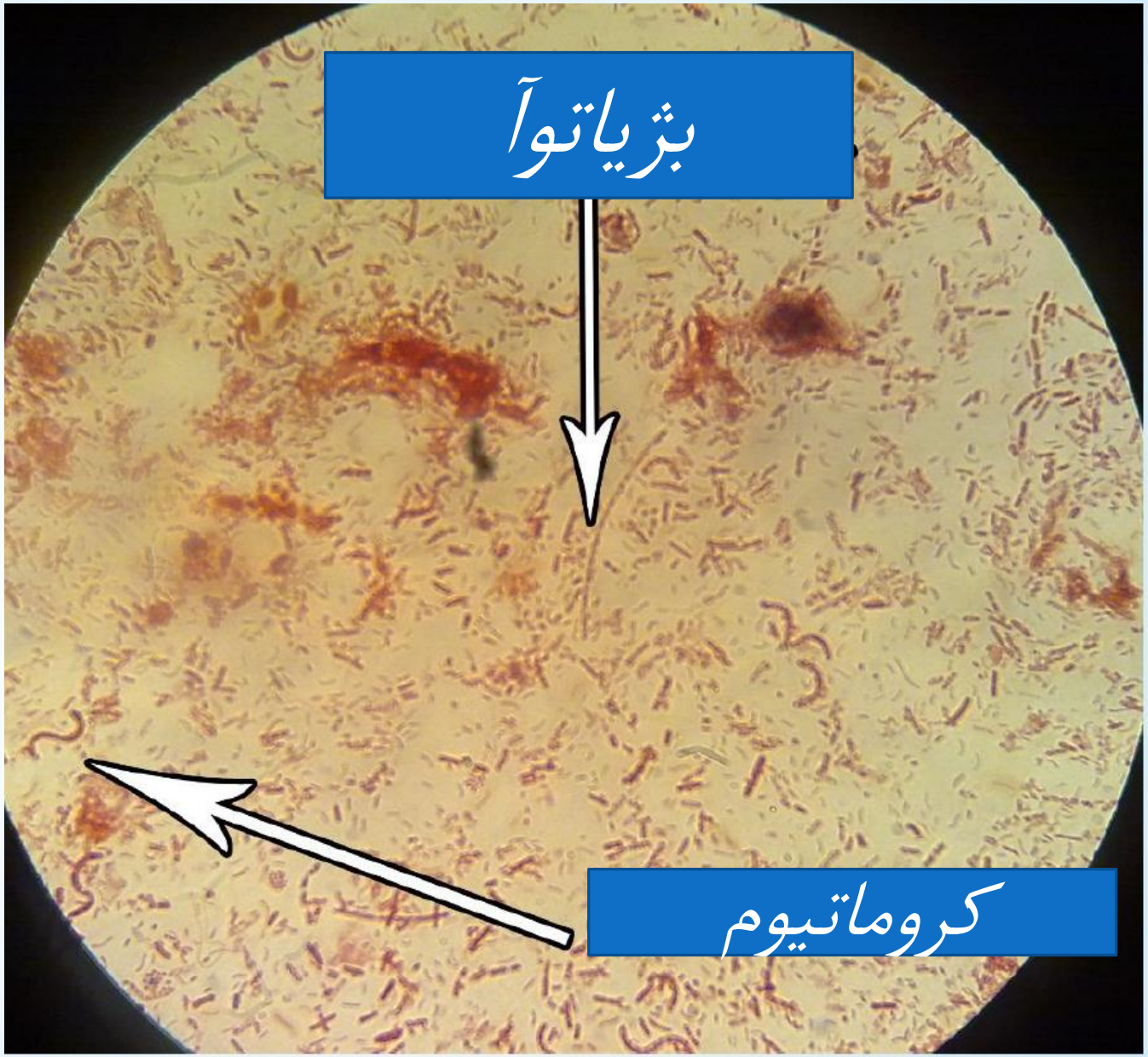
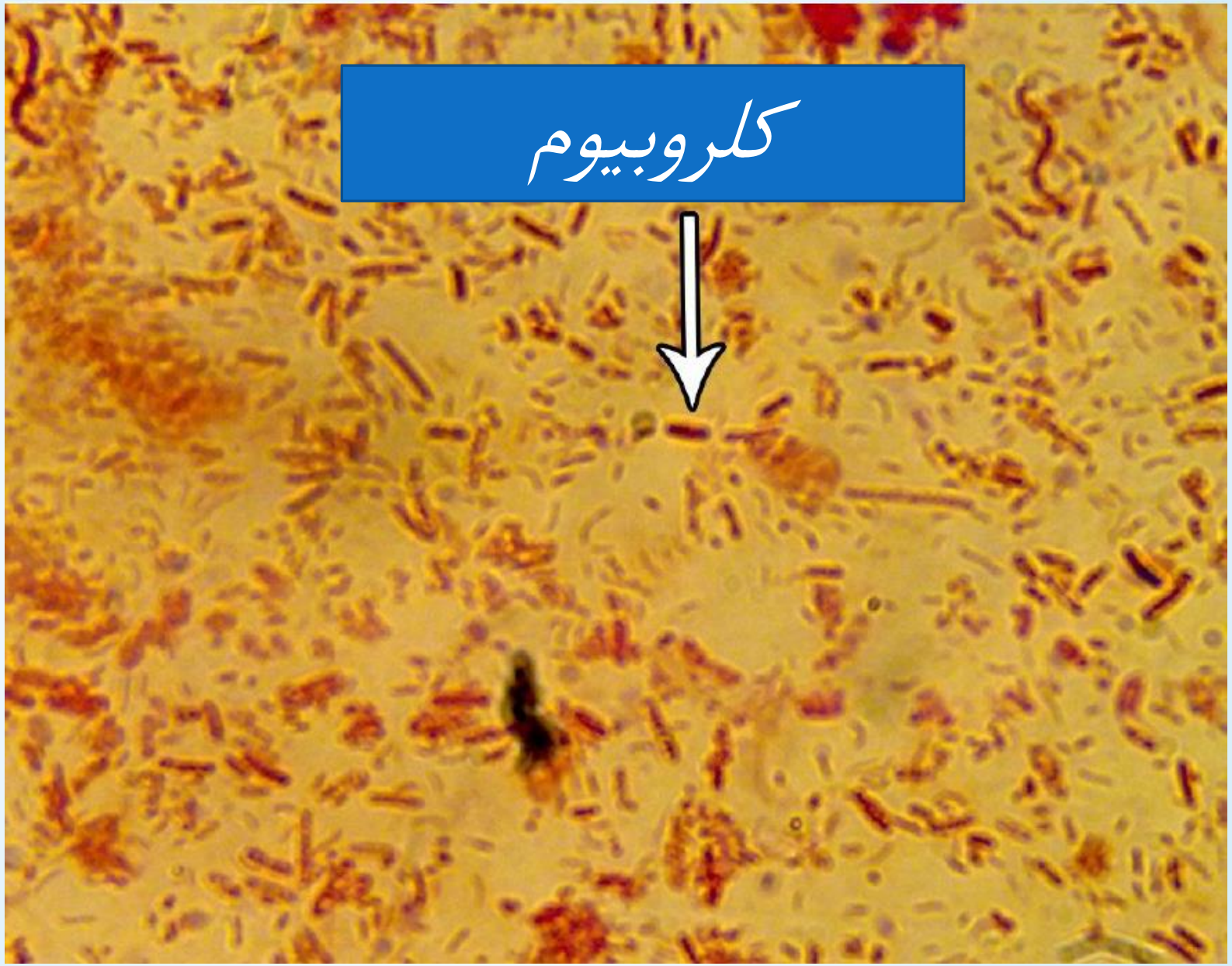

Day 0
Day 1
Day 4
Day 9

Fig.1 Reduction of pH in growth media by SOB

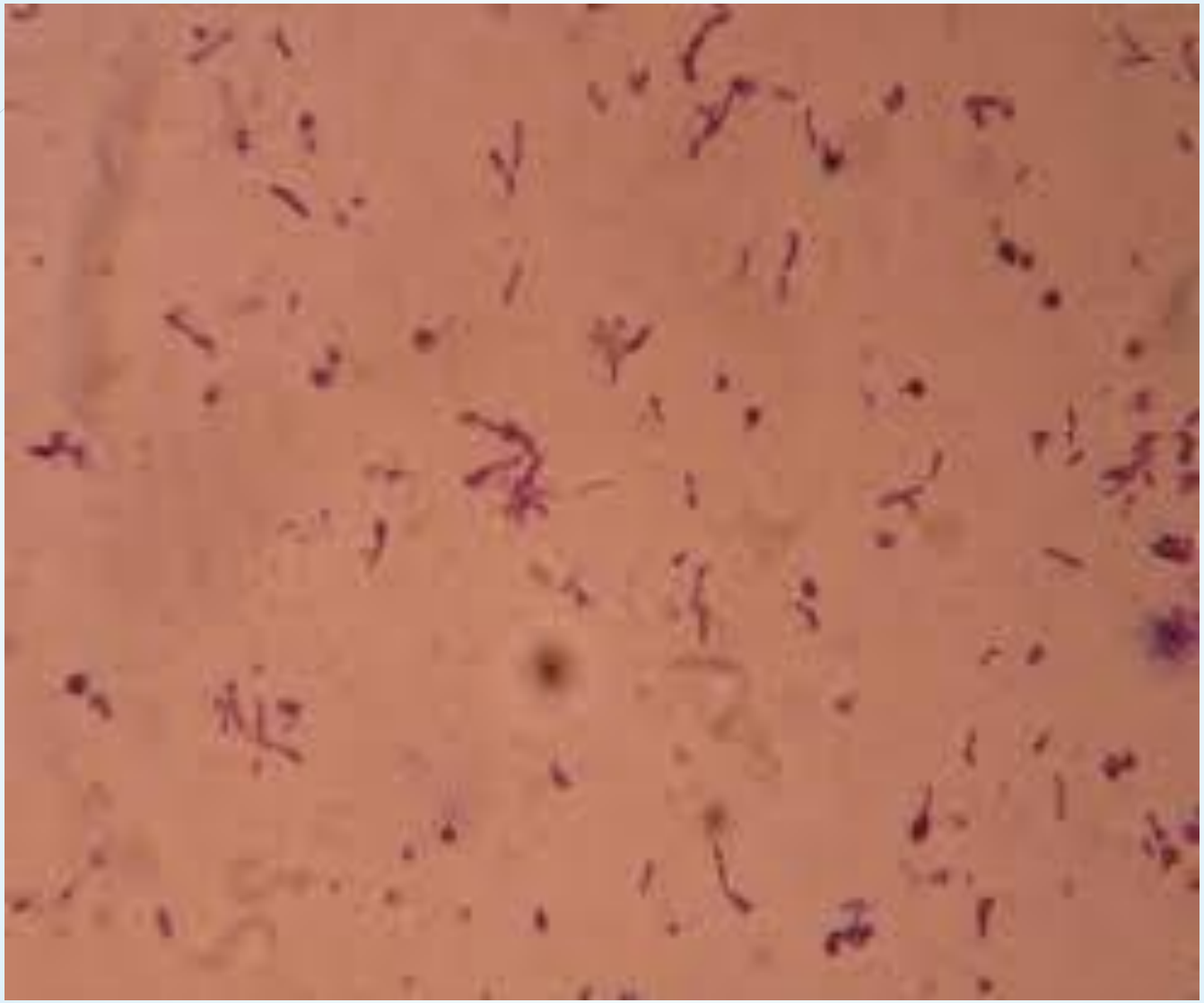


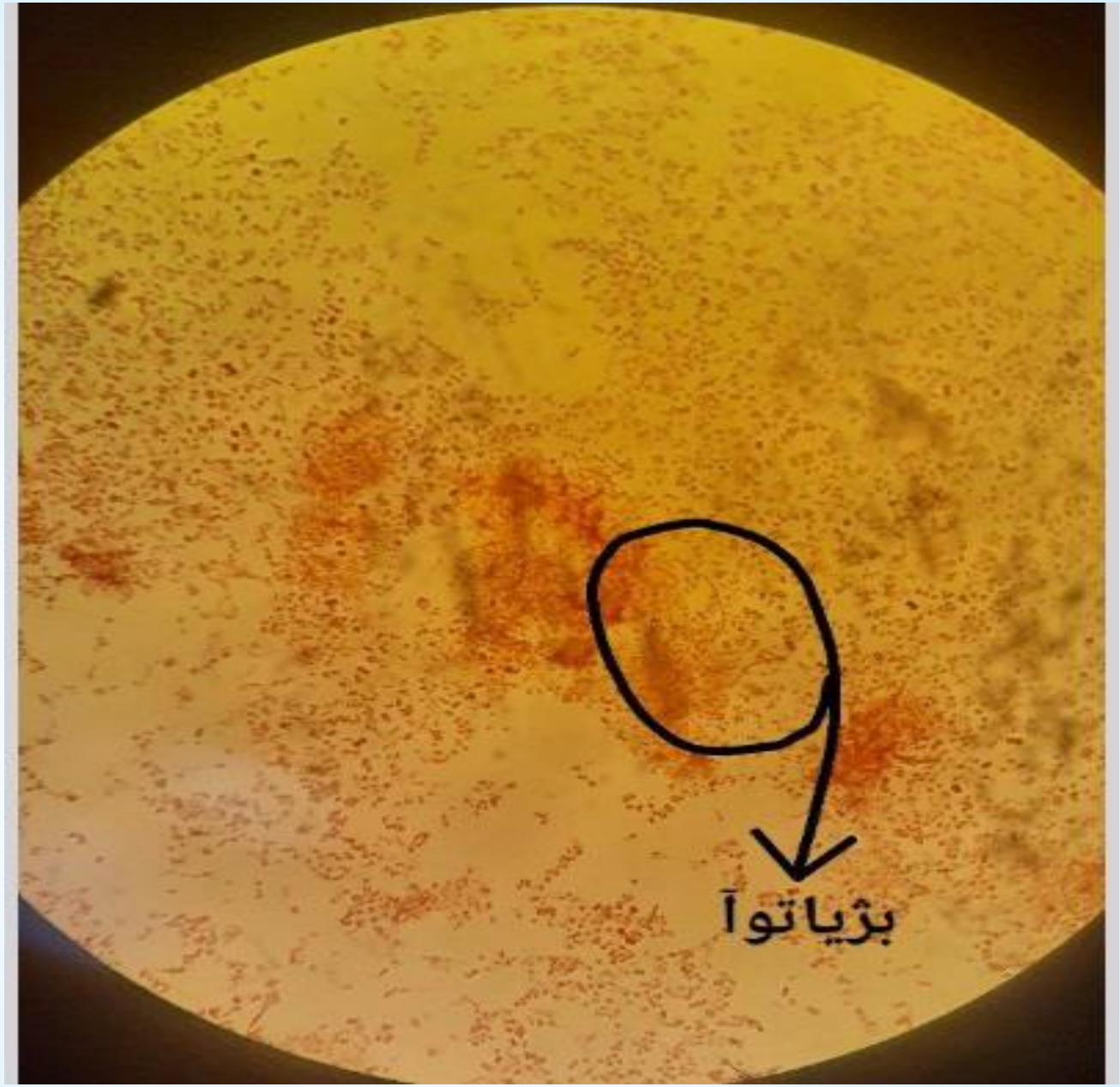
Thiosulphate brothThiosulphate agar (isolate NJS2)

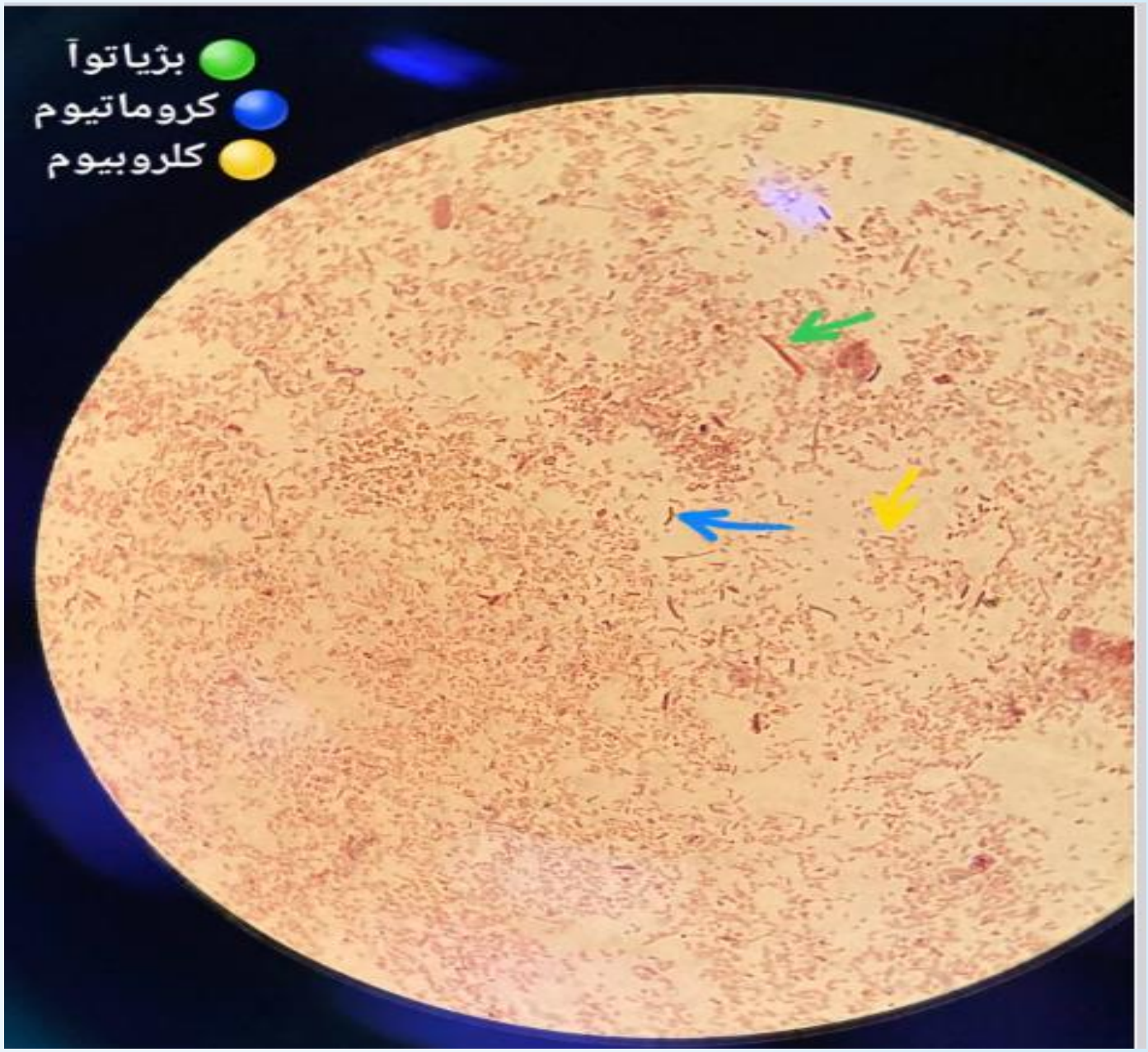

بژیاتوآ
کروماتیوم

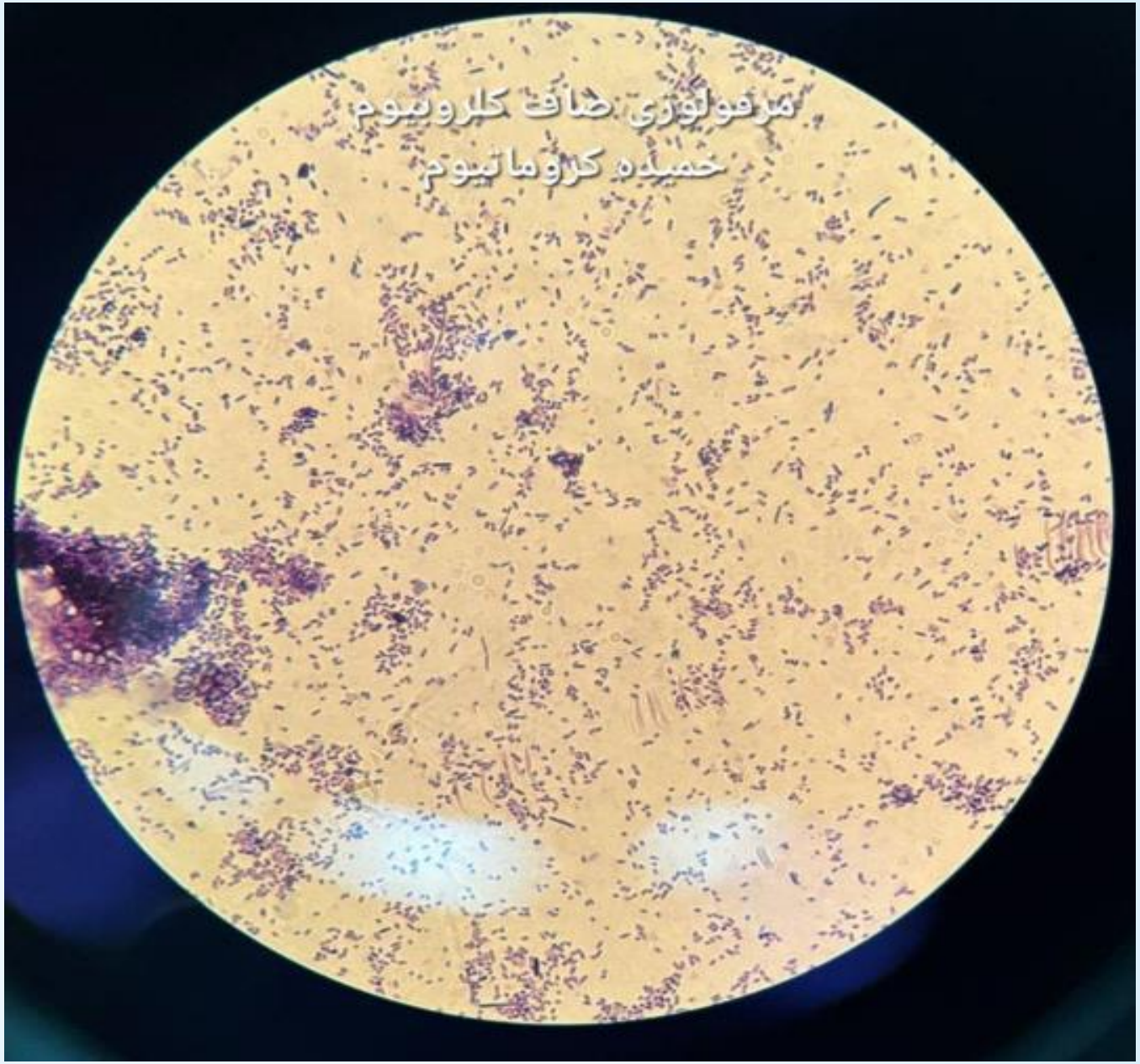

کلروبیوم

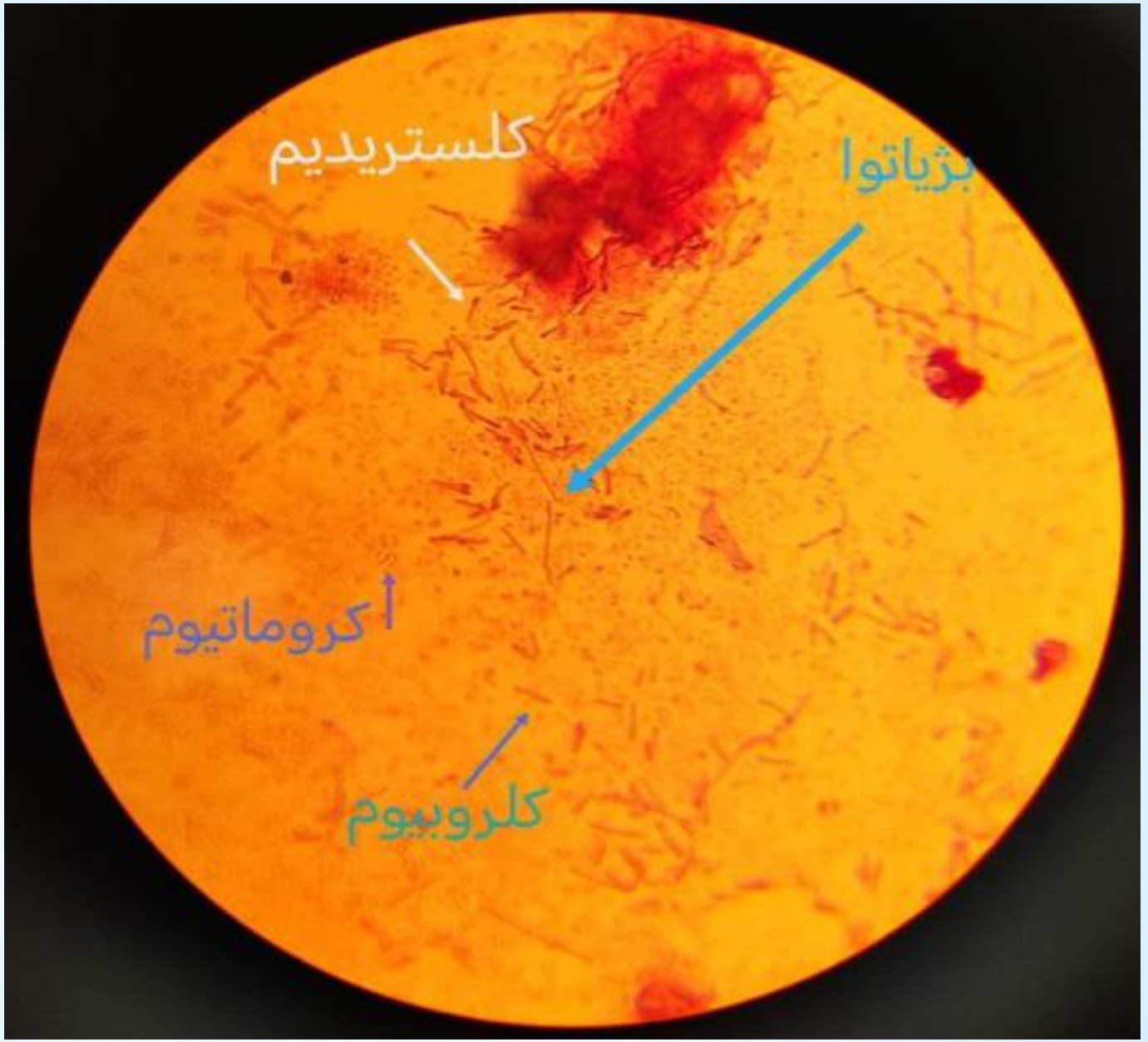
10 µm
Sulfur granules




بژیاتوآ


بژیاتوآ
کروماتیوم
کلروبیوم


مرفولوژی ظاهر کلرو یوم
خمیده کرو ماتیوم


کلستریدیم
بژیاتوا
اکروماتیوم
کلروبیوم

با سپاس فراوان از توجه شما