وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کشت و خالص‌سازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد (تیوباسیلوس)

نگارندگان

حسین بشارتی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

اکرم اوتادی، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 644

1403

مشخصات اثر

عنوان: کشت و خالص‌سازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد (تیوباسیلوس)

نگارندگان: حسین بشارتی و اکرم اوتادی

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار: ناصر دواتگر

سال انتشار: 1403

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 65447 در تاریخ 1403/3/7 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 36201900- 026

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info.swri@areeo.ac.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه 1
1- آماده‌سازی نمونه‌ها و کشت باکتری 2
2- محیط کشت‌ها 3
2-1- محیط کشت استارکی 3
2-1-1- ارزیابی رشد باکتری‌ها 6
2-2- محیط کشت پستگیت 7
2-3- محیط کشت تیوسولفات 10
2-4- محیط کشت نه کی (K9) 12
2-5- محیط کشت برای رشد غیرهوازی و دنیتریفیکاسیون 14
2-6- محیط کشت پیشنهادی DSMZ برای باکتری‌های تیوباسیلوس 15
2-7- محیط کشت پیشنهادی ATCC برای باکتری‌های تیوباسیلوس 18
3- شمارش جمعیت اکسیدکننده‌های گوگرد به روش MPN 19
4- روش نگهداری باکتری‌های تیوباسیلوس 21
منابع 22

مقدمه

گوگرد از عناصری ضروری موردنیاز گیاهان و میکروارگانیسم‌ها بوده و در خاک به دو شکل آلی و معدنی یافت می‌شود. چرخه گوگرد در طبیعت شامل چهار مرحله معدنی شدن، آلی شدن، اکسیداسیون و احیا است. بخش اندکی از اشکال قابل اکسید شدن گوگرد موجود در خاک به شکل شیمیایی ولی بیشتر آن به شکل بیولوژیک و توسط میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود. استفاده از گوگرد عنصری با هدف تأمین سولفات موردنیاز گیاه (بویژه در خاک‌های سبک مناطق پرباران)، اصلاح خاک (در خاک‌های سدیمی و شور سدیمی) و بهبود وضعیت تغذیه گیاهان (در خاک‌های آهکی و خاک‌هایی با pH بالا) در صورتی اثربخش خواهد بود که ابتدا گوگرد اکسید شود. دامنه گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های خاکزی توانایی اکسایش ترکیبات احیاء گوگرد را دارا هستند و باکتری‌های جنس تیوباسیلوس مهمترین اکسیدکنندگان گوگرد در خاک محسوب می‌شوند.

باکتری‌های جنس تیوباسیلوس بصورت باسیل‌های کوتاه گرم منفی، بدون اسپور، مزوفیل، کمولیتوتروف، تاژکدار و هوازی بوده و برای رشد و فعالیت به مواد آلی نیاز ندارند. این باکتری‌ها از دی اکسیدکربن بعنوان منبع کربن و از اکسیداسیون ترکیبات احیاء گوگرد بعنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند. کلنی باکتری‌های جنس تیوباسیلوس در محیط‌های کشت اختصاصی معمولاً به رنگ زرد روشن تا نارنجی روشن، صاف، گرد، کم تحدب، کدر با قطر تقریباً 2-1 میلی‌متر دیده می‌شوند. برخی از گونه‌ها مقاوم به غلظت زیاد نمک، برخی مقاوم به دمای زیاد و برخی نیز میکسوتروف (استفاده همزمان از موادآلی و دی اکسیدکربن بعنوان منبع کربن) هستند. همه گونه‌های جنس تیوباسیلوس (بجز دنیتریفیکانس) هوازی بوده ولی شدت تهویه بدلیل محدود کردن غلظت دی‌اکسیدکربن برای رشد آنها مناسب نیست. تعدادی از گونه‌ها در pHهای اسیدی و تعدادی در pHهای بازی فعالیت بهتری از خود نشان می‌دهند، از این‌رو گونه‌های این جنس به دو گروه کلی اسیددوست (Acidophile) و خنثی‌دوست (Neutrophile) تفکیک می‌شوند. این باکتری‌ها بیشتر در مکان‌هایی که اشکال قابل اکسیدشدن گوگرد وجود داشته باشند، یافت می‌شوند. از این‌رو در خاک‌های اطراف چشمه‌های گوگردی، در آب‌های معدنی گوگرددار، در خاک‌هایی که قبلا با گوگرد تیمار شده‌اند، پساب‌های

اسیدی، فاضلاب‌ها، دریاچه‌ها و دریاها و باتلاق‌های شور و شیرین یافت می‌شوند که این موضوع در تهیه نمونه به منظور دستیابی به این باکتری‌ها باید مدنظر قرار گیرد. بدلیل کمبود یا فقدان ترکیبات احیاء گوگرد در اکثر خاک‌ها، جمعیت باکتری‌های تیوباسیلوس در خاک‌ها معمولاً بسیار اندک است، در چنین شرایطی در صورتی که جداسازی باکتری از چنین خاک‌هایی مدنظر باشد، بهتر است نخست نمونه خاک با مقداری گوگرد عنصری تیمار شده و برای مدتی در رطوبت و دمای مناسب، خوابانده شود، سپس از نمونه خاک برای جداسازی این باکتری‌ها استفاده شود.

1- آماده‌سازی نمونه‌ها و کشت باکتری

مقداری نمونه آزمون (خاک، آب، کود زیستی و...) که دارای باکتری‌های جنس تیوباسیلوس می باشد، با دقت 0/01گرم در شرایط استریل توزین شود. مقدار نمونه توزین شده می‌تواند از 1تا 100گرم متغیر باشد. بهتر است 10 گرم نمونه در 90 میلی لیتر آب مقطر استریل یا سرم فیزیولوژیک ریخته و به مدت 0/5تا 1ساعت روی شیکر با چرخش حدود 120 دور در دقیقه مخلوط شود. نمونه در این حالت 10 بار رقیق شده است. نخستین سری رقت تهیه شده 10^{-1} می‌باشد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقت 10^{-1} با پی‌پت استریل برداشته و به لوله آزمایش دارای 9 میلی‌لیتر آب مقطر استریل یا سرم فیزیولوژیک افزوده و با ورتکس بخوبی مخلوط شود (رقت10^{-2})؛ به همین ترتیب سری رقت‌های بالاتر تهیه می‌شود.

تعداد سری‌های رقتی که باید تهیه شوند به جمعیت باکتری‌های تیوباسیلوس در نمونه آزمون بستگی دارد. معمولا در نمونه‌های کودهای زیستی تا رقت 10^{-8} نیز ممکن است نیاز به تهیه باشد. در حالیکه در نمونه‌های خاک یا دیگر محیط‌ها که حاوی جمعیت کمتری هستند، تا رقت 10^{-3} یا رقت 10^{-4} کفایت دارد. چند تا از رقت‌های تهیه شده (بسته به جمعیت تخمینی موجود در نمونه آزمون) انتخاب و از هریک به میزان 0/1 میلی‌لیتر در سه تکرار در محیط کشت مورد نظر تلقیح شوند.

محیط کشت‌های تلقیح شده با سری‌های رقت در شرایط دمایی مناسب (28 -25 درجه سلسیوس) انکوباسیون شوند. بعد از یک هفته تا حداکثر 10روز کلنی‌ها باید در

پلیت‌ها بررسی شوند. اگر هدف جداسازی و خالص‌سازی باکتری از نمونه‌ها باشد، کلنی‌های باکتری‌های تیوباسیلوس (با توجه به ویژگی‌های ظاهری ذکر شده در منابع علمی معتبر) انتخاب و در محیط کشت جدید واکشت شود. این تجدید کشت تا به دست آمدن کلنی خالص باکتری ادامه می‌یابد. در صورتیکه هدف شمارش جمعیت باکتری‌ها در نمونه (مثلا کود زیستی یا خاک ...) باشد، تعداد کلنی‌ها در پلیت‌هایی که دارای300-30 کلنی می‌باشند، شمارش شوند. میانگین تعداد کلنی‌ها در هر رقت بدست آمده و سپس با اعمال ضریب رقت تعداد باکتری‌ها در واحد وزن یا واحد حجم نمونه مورد بررسی بدست می‌آید (بشارتی و همکاران، 1396).

پیش از جداسازی و یا شمارش جمعیت باکتری‌های تیوباسیلوس در نمونه‌های تهیه شده، از هرگونه عملیاتی که موجب تغییر در جمعیت باکتری‌ها شود، باید خودداری شود. مثلاً باید از خشک شدن نمونه، قرار گرفتن طولانی مدت در معرض تابش مستقیم آفتاب یا فشردگی زیاد آنها ممانعت شود. نمونه‌ها بلافاصله پس از تهیه با درج مشخصات در ظروف درب‌دار (ترجیحاً کدر) به آزمایشگاه منتقل و تا زمان اندازه‌گیری، در دمای حدود 4 درجه سلسیوس نگهداری شوند. از آنجا که این باکتری‌ها کمولیتوتروف هستند، محیط کشت پیشنهادی برای رشد و تکثیر، شمارش و جداسازی آنها فقط دارای مواد معدنی می‌باشد. در منابع علمی معتبر تاکنون چندین محیط کشت برای جداسازی، خالص‌سازی، شمارش و تکثیر این باکتری‌ها معرفی شده است که به چکیده برخی از آنها اشاره می‌شود:

2- محیط کشت‌ها

2-1 - محیط کشت استارکی (Starkey)

ترکیبات این محیط کشت در جدول یک ارائه شده است. برای جداسازی اکسیدکننده‌های هتروتروف باید به محیط کشت گلوگز (به میزان 5 گرم در لیتر) اضافه نمود. برای جداسازی اتوتروف نیازی به استفاده از گلوکز در محیط کشت نیست.

جدول 1- ترکیبات شیمیایی محیط کشت استارکی

ترکیب		مقدار(گرم در لیتر)
فسفات دی هیدروژن پتاسیم	KH_2PO_4	3
سولفات منیزیم	$MgSO_4.7H_2O$	0/2
کلرور کلسیم	$CaCl_2.2H_2O$	0/2
سولفات امونیم	$(NH_4)_2SO_4$	0/5
گوگرد عنصری	S^o	10
سولفات آهن فرو	$FeSO_4$	0/01

- مقدار 3 گرم KH_2PO_4، 0/2 گرم $MgSO_4.7H_2O$ ، 0/2 گرم $CaCl_2.2H_2O$ ، 0/5 گرم $(NH_4)_2SO_4$ و مقدار0/01$FeSO_4$ توزین و در یک لیتر آب مقطر حل شود. توجه شود که پس از افزودن هر ترکیب و انحلال آن در آب مقطر، ترکیب بعدی توزین و اضافه شود (Starkey, 1935).

pH محیط کشت را تنظیم نمایید. برای جداسازی تیوباسیلوس‌های خنثی دوست، pH باید روی هشت و برای انواع اسیددوست حدود سه تنظیم شود. برای تنظیم pH از مواد اسیدی و قلیایی (محلولKOH و اسید سولفوریک) استفاده می‌شود.

- محیط کشت آماده شده که pH آن نیز تنظیم شده است را به مقادیر موردنیاز در ارلن‌هایی با حجم مناسب توزیع و در اتوکلاو با دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید.

برای توزیع محیط کشت در ظروف به منظور کشت باکتری‌ها و جداسازی آنها باید توجه داشت که حداکثر 50 تا 40 درصد حجم ظرف از محیط پر شود.

استریل کردن گوگرد بهتر است به روش تندالیزاسیون[1]انجام شود. در این روش پس از توزین مقادیر موردنیاز گوگرد، آن را در یک ظرف مناسب (مثلا فویل ضخیم) ریخته و چند قطره آب نیز به آن اضافه کنید. البته گوگرد آب گریز بوده و این کار برای تولید

[1]Tyndallization

بهتر بخار در ظرف دارای گوگرد و استریل شدن بهتر گوگرد انجام می‌شود. سپس گوگرد را سه بار در سه روز متوالی و هر بار به مدت 60 تا90 دقیقه در حرارت 80 تا100 درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر اتوکلاو کنید. معمولاً برای ایجاد این شرایط در اتوکلاو، شیر اطمینان اتوکلاو را کمی باز می‌گذارند تا دما از 80 تا 90 درجه و فشار نیز از یک اتمسفر بالاتر نرود. البته در چنین شرایطی باید از کافی بودن مقدار آب در مخزن اتوکلاو و نیز بازدید و تنظیم مقدار آب بعد از اتوکلاو شدن نیز اطمینان حاصل نمود. گوگرد استریل شده را پس ازخنک شدن محیط کشت استارکی، در شرایط استریل به آن اضافه و مخلوط کنید.

توجه: محیط کشت آماده شده مایع را می‌توان پس از آماده شدن به میزان موردنیاز در ارلن‌های استریل با حجم‌های مناسب توزیع و سپس نمونه (خاک، آب، کود زیستی...) را به آنها اضافه نمود. محیط کشت آماده شده جامد (دارای آگار) را پس از رسیدن درجه حرارت مناسب (40 تا 50 درجه سلسیوس) در شرایط استریل و در زیر هود لامینار در پلیت‌ها توزیع کنید. همچنین در صورتی‌که هدف، بررسی رشد باکتری در لوله‌های آزمایش است، محیط کشت مایع را داخل لوله‌های آزمایش استریل با حجم موردنظر توزیع نمایید. برای کار با محیط کشت مایع، برای آسانی کار و نیز کاهش آلودگی‌های احتمالی، بهتر است محیط کشت استارکی پس از آماده شدن و تنظیم pH در ظرف موردنظر (لوله آزمایش یا ارلن...) توزیع و سپس ظروف در اتوکلاو قرار گیرند. در این صورت بهتر است گوگرد موردنیاز برای هر ظرف نیز ابتدا توزین و سپس به طو جداگانه در اتوکلاو قرار گرفته و پس از استریل در زیر لامینار به هر ارلن یا لوله اضافه شود. از این‌رو نیازی به توزین گوگرد استریل شده در زیر لامینار نیست.

- نمونه کشت داده شده در محیط کشت استارکی (ارلن‌ها، لوله‌های آزمایش یا پلیت‌ها) را به مدت 25 روز در دمای محیط یا به مدت 25 روز در انکوباتور در دمای 32 درجه سلسیوس قرار دهید.

1-1-2- ارزیابی رشد باکتری‌ها

بطورکلی برای اندازه‌گیری میزان رشد و فعالیت باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد در محیط کشت استارکی یا دیگر محیط‌های کشت که در ادامه وصف خواهند شد، چند شیوه پیشنهادی وجود دارد:

- یکی از این روش‌ها اندازه گیری میزان تغییرات (کاهش) pH محیط کشت می‌باشد که یا با pH متر اندازه‌گیری می‌شود یا با بکارگیری محلول معرف‌های رنگی (بروموتیمول بلو، بروموکروزول، ...) تغییرات pH محیط کشت را بررسی می‌کنند. مثلاً در صورت استفاده از معرف رنگی بروموتیمول بلو، محیط کشت اولیه استارکی به رنگ آبی تیره است و در صورتی که باکتری اکسیدکننده گوگرد در آن رشد کند، به دلیل تغییر pH محیط، رنگ محیط کشت زرد می‌شود (شکل 1). معرف برمو تیمول بلو در محیط اسیدی زرد، در محدود خنثی سبز رنگ و در محدوده pHهای قلیایی به رنگ آبی تیره است (بشارتی، 1377).

شکل 1- محیط کشت مایع استارکی (لوله آبی رنگ سمت چپ) که در اثر اکسایش گوگرد و کاهش pH به رنگ زرد تغییر یافته است (لوله‌های سمت راست).

- از دیگر روش‌های ارزیابی و سنجش رشد و فعالیت باکتری‌ها در محیط کشت‌های توصیه شده برای باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد، اندازه‌گیری و سنجش میزان سولفات تولید شده در محیط در مقایسه با شاهد است. در این روش پس از صاف کردن

محیط و تهیه محلول شفاف، میزان سولفات موجود در محیط کشت را به روش‌های مناسب (کدورت سنجی، وزن سنجی،...) اندازه می‌گیرند.

- روش پیشنهادی دیگر کشت باکتری‌ها روی محیط جامد است. در این روش، از محیط کشت استارکی (یا سایر محیط‌های مورد استفاده برای اکسیدکنندگان گوگرد) که با نمونه آب یا خاک یا کود زیستی تلقیح شده و احتمالاً باکتری‌ها در آن رشد یافته‌اند، سری رقت تهیه می‌کنند. سپس سری‌های رقت را روی محیط کشت جامد در پتری دیش‌ها توزیع و در دمای مناسب برای مدت زمان کافی قرار می‌دهند. با شمارش تعداد کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌ها میزان رشد و فعالیت باکتری‌ها ارزیابی می‌شود.
- از دیگر روش‌های پیشنهادی اندازه گیری میزان کدورت محیط کشت است. پس از تهیه محلول صاف و مناسب، میزان کدورت (ناشی از رشد باکتری‌ها یا متابولیت‌های تولید شده یا ترکیبات شیمیایی ایجاد شده...) را در مقایسه با شاهد ارزیابی می‌کنند (بشارتی، 1377). در این حالت از روش‌های اسپکتروفتومتری استفاده می‌شود و میزان کدورت محیطی که باکتری در آن رشد یافته است را در مقایسه با شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین می‌نمایند.

2-2- محیط کشت پستگیت (Postgate)

این محیط کشت دارای چند ماده با ترکیب شیمیایی متفاوت است که هر یک از آن‌ها در جدول (2) و (3) نشان داده شده‌اند (Postgate, 1951):

❖ محلول اصلی

جدول 2- ترکیبات شیمیایی موجود در محلول اصلی (گرم در لیتر) محیط کشت پستگیت

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
$MgSO_4.7H_2O$	0/7
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	5
$(NH_4)_2SO_4$	3/5
$CaCl_2.2H_2O$	0/4

❖ محلول عناصر کم مصرف

جدول 3- ترکیبات شیمیایی موجود در محلول عناصر کم مصرف (گرم در لیتر) محیط کشت پستگیت

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در 100 میلی لیتر)
$(C_{10}H_{16}N_2O_8)$(Titriplex II) EDTA	5
$ZnSO_4.7H_2O$	2/2
$FeSO_4.7H_2O$	0/499
$MnCl_2.4H_2O$	0/161
$CoCl_2.6H_2O$	0/161
$CuSO_4.5H_2O$	0/161
$CaCl_2.2H_2O$	0/72
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0/11

- مواد ترکیب شیمیایی در 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل شود. حل کردن هر یک از مواد و سپس افزودن ترکیب بعدی باید با دقت مورد توجه باشد. پس از تهیه، pH محلول روی 6 تنظیم می‌شود. تنظیم pH با افزودن مواد اسیدی (اسید سولفوریک) و مواد قلیایی (محلول KOH) صورت می‌گیرد.

لازم به یادآوری است که EDTA در آب مقطر به راحتی حل نمی‌شود، لذا بهتر است برای تهیه 100 میلی لیتر از استوک عناصر کم مصرف ابتدا کمتر از 100 میلی‌لیتر (مثلاً حدود 60 میلی لیتر) آب مقطر در ارلن ریخته و 5 گرم EDTA به ارلن اضافه شود، سپس با افزودن محلول KOH و همزدن محلول، EDTA را حل و پس از شفاف شدن محلول، ترکیب بعدی اضافه شود. بعد از افزودن تمامی مواد باید، pH محلول به 6 برسد (بشارتی، 1377).

❖ معرف بروموتیمول بلو: بروموتیمول بلو به میزان 0/15 گرم در 100 میلی‌لیتر

❖ محلول فسفات: KH_2PO_4 به میزان 30 گرم در 200 میلی‌لیتر آب مقطر

❖ محلول‌های اسیدی و قلیایی: KOH 2 نرمال - اسید سولفوریک 0/5 تا 1 مولار

هر یک از محلول‌ها در ظروف جداگانه تهیه و در اتوکلاو استریل شوند. بعد از استریل کردن وقتی دمای آنها به 50-40 درجه سلسیوس رسید، در شرایط استریل در زیر لامینار با یکدیگر مخلوط شوند. مقدار ترکیبات محلول اصلی در 960 میلی‌لیتر حل می‌شوند و سپس، 10 تا 12 میلی‌لیتر محلول عناصر میکرو ، 10 میلی‌لیتر محلول معرف رنگی و 20 میلی‌لیتر محلول فسفات اضافه شود.

معرف بروموتیمول بلو در pHهای خنثی سبزرنگ، در pHهای بازی آبی‌رنگ و در pHهای اسیدی زردرنگ می‌باشد. اگر هدف جداسازی، خالص‌سازی، شمارش و یا تکثیر باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد از نوع خنثی دوست باشد، pH محیط کشت در حد خنثی یا کمی قلیایی (رنگ محلول سبز یا آبی) باید باشد، اما اگر هدف انواع اسید دوست باشد، باید pH محیط اسیدی (حدود 3 و رنگ محیط زرد) باشد. برای تنظیم pH موردنظر از محلول‌های KOH 2 نرمال و اسید سولفوریک استفاده شود.

- یادآوری: میزان 10 میلی‌لیتر از محلول عناصر کم مصرف برای یک لیتر محیط کشت استفاده می‌گردد؛ اضافی محلول بالا باید در ظروف پرشده و سربسته نگهداری شود تا تغییر رنگ ندهد. در صورت مشاهده چنین حالتی، با حرارت دادن، محیط کشت و یا احتمالا تنظیم دوباره pH، سبزرنگ و قابل استفاده خواهد شد.
- برای تهیه محیط کشت پستگیت جامد مقدار 15-12 گرم در لیتر آگار استفاده می‌شود. هرچقدر مقدار آگار کمتر باشد بهتر است. در pHهای اسیدی که آگار منجمد نمی‌شود از ترکیبات دیگری مانند آگارز و سیلیکاژل بجای آگار می‌توان استفاده نمود.

همان‌طور که قبلا اشاره شد، باکتری‌های جنس تیوباسیلوس کمولیتوتروف (Chemolithotroph) و هوازی بوده، از دی اکسیدکربن به عنوان منبع کربن و از انرژی اکسیداسیون ترکیبات احیاء گوگرد به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و برای رشد و فعالیت به مواد آلی نیاز ندارند. از این‌رو حضور این باکتری‌ها در محیط‌های طبیعی منوط به وجود ترکیبات احیاء گوگرد بوده و محیط کشت آنها نیز فقط دارای مواد معدنی است. این باکتری‌ها با اکسید کردن گوگرد موجود در محیط کشت پُستگیت باعث کاهش pH محیط کشت و تغییر رنگ محیط معرف رنگی بکار رفته در محیط کشت می‌شوند. معرف برمو تیمول بلو موجود در محیط کشت که

در pH حدود 7 به رنگ سبز است، با رشد تیوباسیلوس‌ها و اسیدی شدن محیط کشت به رنگ زرد تغییر می‌یابد. این معرف برای باکتری‌هایی که توانا به اکسیداسیون ترکیبات گوگردی نیستند، به رنگ آبی و در مورد باکتری‌هایی که بسیار ضعیف این عمل را انجام می‌دهند، سبز باقی می‌ماند.

شکل 2- تغییر رنگ محیط کشت پستگیت جامد با رشد تیوباسیلوس از سبز (چپ) به زرد (راست) (بشارتی، 1377)

2-3- محیط کشت تیوسولفات (Thiosulphate) آگار و تیوسولفات براث

محیط کشت تیوسولفات دارای مواد با ترکیبات شیمیایی زیر است:

جدول 4- ترکیبات شیمیایی محیط کشت تیوسولفات (گرم در لیتر)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
$Na_2S_2O_3$	5
K_2HPO_4	0/1
$NaHCO_3$	0/2
NH_4Cl	0/1

- برومو فنلبلو (Bromo phenol blue (BPB)) به میزان 0/0025 گرم در لیتر بکار می‌رود. به جای برومو فنل بلو از برومو کروزول پرپل (Bromocresol Purple) نیز می‌توان استفاده کرد.

- گلوکز به میزان 5 گرم در لیتر (برای جداسازی اکسیدکننده‌های هتروتروفیک)

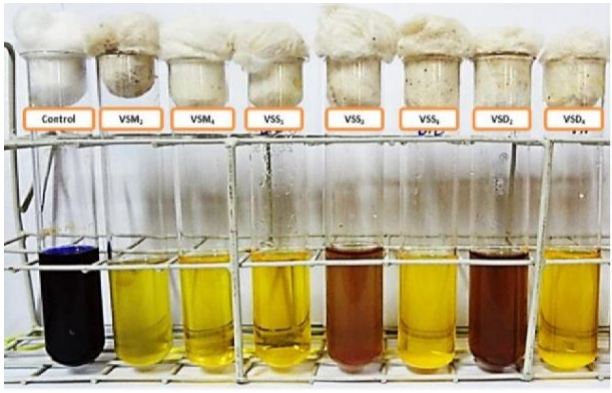
- آب مقطر به میزان 1000 میلی‌لیتر
- آگار به میزان 15 میلی‌گرم در لیتر (برای تهیه محیط کشت تیوسولفات آگار)

pH محیط کشت را توسط pH متر با استفاده از HCl یک مولار بر روی 8 تنظیم نمایید. محیط کشت را در حرارت 121 درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر به مدت 15 دقیقه اتوکلاو کنید (Vishniac and Santer, 1957).

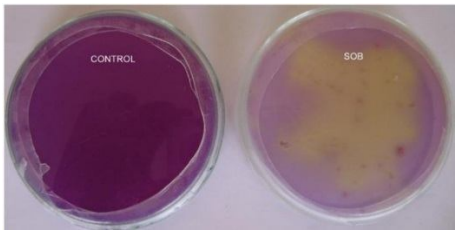
محیط کشت آماده شده مایع را به میزان 50 میلی‌لیتر در ارلن‌های استریل 100 میلی‌لیتری توزیع نمایید. در صورتی که هدف بررسی رشد باکتری در لوله‌های آزمایش است، محیط کشت مایع را داخل لوله‌های آزمایش 30 میلی‌لیتری استریل توزیع کنید. همچنین محیط کشت جامد آماده شده همراه با آگار را پس از رسیدن درجه حرارت محیط کشت به حدود 45 تا 50 درجه سلسیوس، زیر هود لامینار در پلیت‌ها توزیع نمایید.

نمونه کشت داده شده در محیط کشت تیوسولفات را به مدت لازم در دمای مناسب در انکوباتور قرار دهید.

از نظر ویژگی ظاهری، کلنی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد در محیط کشت تیوسولفات آگاردار، از زردکاهی تا نارنجی با هاله‌ای از گوگرد در اطراف کلنی، با حاشیه منظم تا نامنظم متغیر بوده و سطح کلنی اکثر جدایه‌ها، برجسته و صاف است (شکل 3 و4).



شکل 3- محیط‌کشت تیوسولفات مایع همراه با معرف رنگی بروموکروزول (چپ اولین لوله) و رشد جدایه‌های مختلف اکسیدکننده‌های گوگرد در این محیط



شکل 4- محیط کشت تیوسولفات آگار همراه با بروموکروزول بنفش خام (چپ)، رشد باکتری اکسیدکننده سولفات (SOB) و تغییر رنگ محیط (راست)

4-2- محیط کشت نه کی (9K)

از محیط کشت نه کی برای کشت و جداسازی باکتری‌های اکسیدکننده گوگرد و به‌طور اختصاصی جدایه‌های *ferrooxidansAcidithiobacillus* استفاده می‌شود (Liu et al., 2009). برای تهیه این محیط کشت در ابتدا محلول با ترکیب شیمیایی با نام محلول **A** آماده شود:

جدول 5- ترکیبات شیمیایی محیط کشت نه کی (گرم در لیتر)محلول A

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
K_2HPO_4	0/5
KCl	0/1
$MgSO_4.7H_2O$	0/5
$Ca(NO_3)_2$	0/01
$(NH_4)_2SO_4$	3

ترکیبات اشاره شده در جدول پنج در 1000 میلی‌لیتر آب حل شده و به مدت 15دقیقه در حرارت 121درجه سلسیوس و فشار 1/2 اتمسفر اتوکلاو شود.

محلول B:

- $FeSO_4.7H_2O$ به میزان 0/01 گرم در 1000 میلی‌لیتر آب حل شده و به مدت 15دقیقه در حرارت 121 درجه سلسیوس و فشار 1/2 اتمسفر اتوکلاو شود.

مواد دیگر:

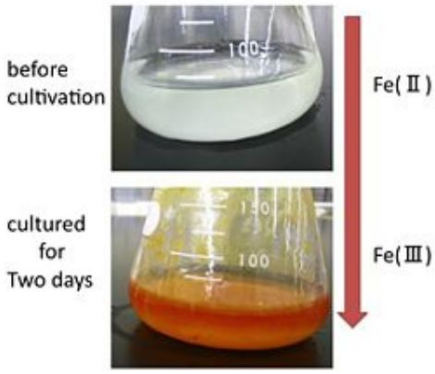
- گوگرد عنصری (Elemental Sulfur) استریل شده به میزان 1 گرم در لیتر
- آگار به میزان 15گرم در لیتر (برای تهیه محیط کشت 9K جامد)
- 700 میلی لیتر از محلول A و 300 میلی‌لیتر از محلول B با هم مخلوط شوند. برای تنظیم pH محیط کشت از محلول‌های H_2SO_4 و$NaOH$ (10نرمال) استفاده شود. پیش از استریل شدن تنظیم pH محیط کشت توسط pH متر انجام می‌شود. برای جداسازی *A.ferrooxidans*، pH باید بر روی 2/2-2 تنظیم شود.

- برای تهیه محیط کشت 9کی، محیط کشت آماده شده مایع[2]ژا در ارلن‌های استریل و محیط کشت آماده شده همراه با آگار را پس از رسیدن درجه حرارت محیط کشت به حدود 45 تا 50 درجه سلسیوس در زیر هود لامینار در پلیت‌ها توزیع نمایید. در صورتی که نیاز است رشد باکتری را در لوله‌های آزمایش بررسی کنید محیط کشت مایع را داخل لوله‌های آزمایش در زیر هود لامینار توزیع نمایید. نمونه کشت داده شده در محیط کشت را به مدت لازم در دمای مناسب قرار دهید.

رنگ اولیه این محیط کشت آبی - سبز روشن است که در اثر اکسیداسیون آهن فرو و تولید آهن فریک در محیط، به رنگ قرمز متمایل به قهوه‌ای در می‌آید (شکل5). *A.ferrooxidans* (در طبقه‌بندی قدیمی با نام قبلی *Thiobacillus ferrooxidans*) باکتری کمولیتوتروف، گرم منفی و اسید دوست است. این باکتری به دلیل استفاده در فرآوری مواد معدنی صنعتی و فیزیولوژی غیرمعمولش مورد توجه بسیاری قرار گرفته است.

A ferrooxidans . می‌تواند آهن II، گوگرد عنصری و ترکیبات احیاء شده آن و مواد معدنی سولفیدی را اکسید کند. این توانایی باعث می‌شود در زیست معدن‌کاری (Biomining) برای بازیافت فلزاتی مانند مس، طلا و اورانیوم استفاده شود (Kai et al., 1989).

Broth



شکل 5- محیط کشت 9K برای جداسازی *A.ferrooxidans* محیط کشت اولیه آبی روشن (بالا) - محیط کشت دارای باکتری رشد یافته (پایین).

5-2- محیط کشت برای رشد غیرهوازی و دنیتریفیکاسیون

تمامی گونه‌های تیوباسیلوس هوازی بوده و در عین حال به وجود دی‌اکسیدکربن بعنوان منبع کربن نیز نیاز دارند. تنها گونه‌ای که می‌تواند در شرایط غیرهوازی رشد نماید، گونه تیوباسیلوس دنیتریفکانس است که در شرایط بی‌هوازی از نیترات بجای اکسیژن استفاده کرده و آن را احیا می‌کند. برای کشت و جداسازی این گونه از محیط تیوسولفات دارای نیترات استفاده می‌شود که شامل ترکیبات شیمیایی زیر است:

جدول6– ترکیبات شیمیایی محیط کشت تیوسولفات دارای نیترات (گرم در لیتر)

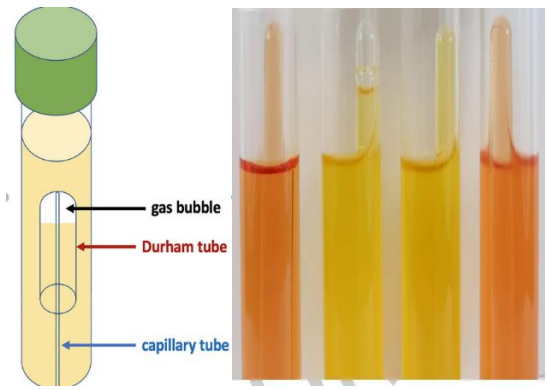
ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	5
KNO_3	2
K_2HPO_4	2
$NaHCO_3$	1
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0/6
NH_4Cl	0/5
$FeSO_4.7H_2O$	0/01

ترکیبات اشاره شده در جدولشش را در یک لیتر آب مقطر حل و pH آن روی 7 تنظیم شود.

توجه: سه ترکیب $NaHCO_3$،K_2HPO_4 و $FeSO_4.7H_2O$ باید جداگانه استریل و سپس به محیط اصلی اضافه شوند (Baalsrud, and Baalsrud, 1954, Vishniac. and Santer, 1957،).

توجه: بجای محلول سولفات آهن بهتر است از محلول عناصر کم مصرف (10 میلی لیتر در هر لیتر) که در جدول (3) تشریح شده، استفاده گردد.

محیط کشت تهیه شده در لوله‌های آزمایش (25میلی لیتر) توزیع و سپس در هر لوله آزمایش یک لوله کوچک دورهام بصورت وارونه قرار می‌گیرد. پس از تلقیح لوله‌ها توسط نمونه‌های جمع‌آوری شده، سطح لوله توسط پارافین پوشانده شود تا شرایط بی‌هوازی فراهم شود. لوله‌های تلقیح شده به مدت 2 هفته در دمای 25 تا 28 درجه سلسیوس قرار گیرند. تجمع گاز N_2 در لوله‌های دورهام نشانه وجود و فعالیت باکتری دنیتریفیکانس می‌باشد (شکل 6).



شکل 6- محیط کشت حاوی نیترات برای سنجش فعالیت تیوباسیلوس دنیتریفیکانس

6-2- محیط کشت پیشنهادی DSMZ برای باکتری‌های تیوباسیلوس

الف) محیط کشت پیشنهادی کلکسیون بین‌المللی DSMZ برای کشت و خالص‌سازی باکتری‌های تیوباسیلوس (بجز گونه دنیتریفکانس) شامل ترکیبات شیمیایی زیر است:

جدول 7- ترکیبات شیمیایی محیط کشت پیشنهادی DSMZ (گرم در لیتر)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
$(NH_4)_2SO_4$	0/1
K_2HPO_4	4
K_2HPO_4	4
$MgSO4.7\ H_2O$	0/1
$CaCl_2$	0/1
$.FeCl_3.\ 6\ H_2O$	0/02
$MnSO_4\ x\ H_2O$	0/02
Agar (برای محیط جامد)	15
$Na_2S_2O_3.5\ H_2O$	10

ترکیبات شیمیایی اشاره شده در جدول هفت به جز تیوسولفات را در آب مقطر حل کرده و pH را روی 6/6 تنظیم نمایید. محلول بدست آمده را در ظروف کشت مناسب (ارلن یا لوله آزمایش) توزیع و سپس اتوکلاو کنید. تیوسولفات را از محلول استوک استریل به محیط اتوکلاو شده اضافه کنید. برای این منظور مقدار کافی تیوسولفات در آب مقطر حل شده و جداگانه استریل شود. پس از خنک شدن محلول تیوسولفات، حجم مناسبی از آن به محیط کشت اصلی آماده شده افزوده شود بطوریکه مقدار 10 گرم تیوسولفات به محیط اصلی منتقل شود. باید توجه داشت که محلول تیوسولفات به اندازه کافی غلیظ و از افزودن حجم زیادی از آن به محلول اصلی خودداری شود تا ترکیبات محلول اصلی رقیق نشوند.

ب) برای گونه تیوباسیلوس دنیتریفیکانس چندمحلول پیشنهاد شده‌اند که ترکیبات شیمیایی آنها در جداول 8تا 12 نشان داده شده است.

محلول A : 960 میلی‌لیتر

محلول B : 20 میلی‌لیتر

محلول C : 20 میلی‌لیتر

محلول D: 1 میلی‌لیتر

ترکیبات محلول‌های شیمیایی بالابه صورت زیر هستند:

جدول 8- ترکیبات شیمیایی محلول A (گرم در لیتر)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم)
KH_2PO_4	2
KNO_3	2
NH_4Cl	1
$MgSO_4.7\ H_2O$	0/8
Trace element solution	2 میلی لیتر
Agar, for solid medium	15
Distilled water	960 میلی لیتر

با استفاده از NaOH، pH محلول را روی 7 تنظیم نمایید.

جدول 9- ترکیبات شیمیایی محلول B (گرم)

$Na_2S_2O_3 . 5\ H_2O$	5 گرم
Distilled water	20 میلی لیتر

جدول 10- ترکیبات شیمیایی محلول C (گرم)

$NaHCO_3$	1 گرم
Distilled water	20 میلی لیتر

جدول 11- ترکیبات شیمیایی محلول D (گرم)

$FeSO_4.7\ H_2O$	2 میلی گرم
H_2SO_4 (0.1 N)	1 میلی لیتر

جدول 12- ترکیبات شیمیایی محلول عناصر کم مصرف (گرم در لیتر)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
Na_2-EDTA	0/5
$FeSO_4.7H_2O$	0/2
$ZnSO_4.7H_2O$	0/1
$MnCl_2.4H_2O$	0/03
H_3BO_3	0/3
$CoCl_2.6H_2O$	0/2
$CuCl_2.2H_2O$	0/01
$NiCl_2.6H_2O$	0/02
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0/03

ابتدا EDTA را در آب مقطر حل کرده و pH را با استفاده از2NaOH نرمال روی 7 تنظیم کنید. سپس ترکیبات دیگر را اضافه کنید.

محلول‌های A، B و D پس از آماده شدن به طور جداگانه با اتوکلاو در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1 اتمسفر به مدت 15 دقیقه استریل شوند. محلول C با فیلتر استریل شود. محلول‌های B، C وD به ترتیب به محلول A اضافه شوند.

نکته: پس از اتوکلاو مقدار کمی رسوب سفید تشکیل می‌شود، اما تاثیر منفی روی رشد ندارد.

2-7- محیط کشت پیشنهادی ATCC برای باکتری‌های تیوباسیلوس

کلکسیون بین‌المللی (American Type Culture Collection)ATCC برای کشت و تکثیر باکتری‌های جنس تیوباسیلوس محیط کشتی را پیشنهاد نموده است که ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده این محیط در جدول شماره (13) ارائه شده است.

جدول 13- ترکیبات شیمیایی محلول نمکی (گرم در لیتر)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
$(NH_4)_2SO_4$	0/2
MgSO4. 7H2O	0/5
CaCl2	0/25
KH_2PO_4	3
$FeSO_4$	5 میلی گرم
Tap water	1000 میلی لیتر
Sulfur (see below)	10

محلول نمکی را بدون گوگرد تهیه کرده و با فیلتراسیون استریل کنید. برای تهیه گوگرد مراحل زیر را انجام دهید:

برای ارلن‌های 100 میلی‌لیتری، تقریبا 0/1گرم پودر گوگرد را در یک ارلن خشک ریخته و درب آن را بپوشانید. ظروف را در اتوکلاو و به مدت 30 دقیقه در دمای 100 درجه سلسیوس استریل نمایید. این کار را سه روز متوالی انجام دهید تا فرآیند استریل شدن تکمیل شود. برای لوله‌های آزمایش، تقریبا 0/1گرم در هر لوله آزمایش پودر گوگرد ریخته و با فویل آلومینیومی روی لوله‌ها را بپوشانید.

نسبت حجم محلول نمکی به گوگرد، یک درصد می‌باشد. 0/1 گرم پودر گوگرد در هر 100 میلی‌لیتر محیط کشت استفاده می‌شود. محلول نمکی استریل را در شرایط استریل به هر یک از ظروف گوگرد استریل شده بریزید. پودر گوگرد "خیس" نشده، و روی مایع شناور می‌شود.

3- شمارش جمعیت باکتری‌ها (روش MPN)

از نمونه موردنظر (خاک، آب، کود زیستی و...) سری‌های رقت تهیه شود. چنانچه تخمین زده شود که جمعیت در نمونه‌ها قابل توجه باشد، رقت‌های بالاتر و در صورتیکه جمعیت اندک باشد رقت‌های پایین‌تر تهیه شود. لوله‌های حاوی محیط کشت با سری‌های

رقت تلقیح شده (یک دهم میلی لیتر از هر رقت در هر لوله) و سپس لوله‌های تلقیح شده در دمای 28 درجه سلسیوس به مدت چهار هفته قرار داده شوند.

در اثر فعالیت میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده گوگرد و اکسایش گوگرد عنصری، در لوله‌ها سولفات تولید می‌شود. برای تعیین وجود یا عدم وجود سولفات در لوله‌ها یک میلی‌لیتر از محلول رویی هر لوله را برداشته و 5 قطره محلول کلروباریم پنج درصد و سه قطره اسید کلریدریک غلیظ به آن اضافه شود. وجود سولفات با تشکیل رسوب سفید سولفات باریم در مقایسه با شاهد، مشخص می‌شود. لوله‌های دارای رسوب بعنوان لوله‌های مثبت در نظر گرفته می‌شوند. با توجه به تعداد لوله‌های مثبت در هر رقت و مقایسه آن با جداول مربوطه (جدول MPN)، جمعیت اکسیدکنندگان گوگرد در نمونه‌ها تعیین شود (بشارتی، 1377).

برای شمارش جمعیت اکسیدکنندگان گوگرد (کمولیتوتروف‌ها) به روش بیشترین تعداد محتمل (MPN[3]) از محیط کشت مایع بوشون[4] با ترکیب شیمیایی زیر استفاده می‌شود:

جدول 14- ترکیبات شیمیایی محیط کشت مایع بوشون (گرم در لیتر)

ترکیب شیمیایی	مقدار (گرم در لیتر)
NH_4NO_3	2
K_2HPO_4	0/25
NaCl	0/1
$MgCl_2.6H_2O$	0/1
$CaCO_3$	5

ترکیبات شیمیایی اشاره شده در جدول 14 در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس به میزان پنج میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش اضافه شود. لوله‌ها در اتوکلاو با دمای

[3]Most Probable Number
[4]Boschon

121 درجه سلسیوس و فشار 1 اتمسفر به مدت 30 دقیقه استریل شوند. سپس در شرایط استریل به هر لوله مقدار 50 میلی‌گرم گوگرد عنصری استریل شده اضافه شود.

4- روش نگهداری بلندمدت باکتری‌های تیوباسیلوس

باکتری‌های جنس تیوباسیلوس با اکسیدکردن ترکیبات گوگرد انرژی کسب می‌کنند، از این‌رو در نتیجه فعالیت آنها مقداری اسید سولفوریک در محیط تولید می‌شود. تولید اسید در محیط فعالیت آنها یکی از چالش‌های نگهداری بلندمدت این باکتری‌ها می‌باشد، زیرا اسید تولید شده با گذشت زمان باعث کاهش جمعیت آنها می‌شود (بویژه برای انواع خنثی دوست) و کلنی این باکتری‌ها بر روی محیط‌های کشت جامد (پلیت و اسلنت...) دوام چندانی ندارد.

یکی از روش‌های تجربی و با صرفه برای نگهداری این باکتری‌ها استفاده از مواد حامل می‌باشد. در این روش ابتدا گوگرد و آپاتیت با هم مخلوط و سپس به پرلیت اضافه می‌شود. معادل سه برابر وزن پرلیت پودری مایه تلقیح مایع باکتری اضافه می‌شود. در نهایت مخلوط تهیه شده کاملاً یکدست می‌شود. مایه تلقیح به مدت 24 ساعت در انکوباتوردر دمای 25 تا 28 درجه سلسیوس قرار داده شده و سپس برای نگهداری طولانی مدت به یخچال منتقل می‌شود. باکتری‌ها در این روش بین 1 تا 3 سال ماندگاری دارند. از اشکالات این روش، علیرغم نگهداری بلندمدت باکتری‌ها و مقرون به صرفه بودن، تجدید کشت و صرف وقت برای تجدید کشت باکتری‌ها و افزایش احتمال آلودگی در هنگام کار می‌باشد.

از دیگر روش‌هایی که بطور موفقیت‌آمیز برای نگهداری این باکتری‌ها به وسیله نویسندگان بررسی شد، استفاده از محلول‌های گلیسرول 15 و 30 درصد (در محلول سرم فیزیولوژیک) و سپس نگهداری در فریزر با دمای 30 و 80 درجه سلسیوس زیر صفر بود. در این روش ابتدا کشت تازه باکتری در محیط مایع تهیه می‌شود و سپس یک میلی لیتر از مایه تلقیح تحت شرایط استریل به ویال‌های تیمار شده با گلیسرول 15و30 درصد استریل منتقل می‌شود. روش‌های معمول برای نگهداری دیگر باکتری‌ها، در مورد این باکتری‌ها چندان موثر نیست، از این‌رو آزمون روش‌های مختلف و یافتن روشی موثر، کم هزینه و کارآمد برای ذخیره و نگهداری بلندمدت این باکتری‌ها، یکی از مسایلی است که نیاز به بررسی و پژوهش دارد.

منابع

1. بشارتی، ح. 1377. بررسی اثرات کاربرد گوگرد همراه با گونه‌های تیوباسیلوس در افزایش قابلیت جذب برخی از عناصر غذایی در خاک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران. تهران: 176 صفحه.
2. بشارتی، ح.، مختاری، ف.د.، اسدی رحمانی، ه.، اسمعیلی زاد، ا.، افشاری، م.، صفاری، ح.، رجالی، ف.، خسروی، ه.، فلاح، ع.، ملبوبی، ک. و نورقلی‌پور، ف. 1396. کودهای بیولوژیک حاوی باکتری‌های تیوباسیلوس ویژگی‌ها و روش‌های آزمون.. استاندارد ملی ایران، شماره 22306.
3. Starkey, R.L. 1935. Isolation of some bacteria which oxidize thiosulfate. Soil Science, 39:197-219.
4. Kai, M., Yano, T., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. 1989. Cytochrome oxidase of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*, functions at pH 3.5. Biochemical and Biophysical Research Communications, 160(2): 839-843.
5. Liu, J-Y., Xiu, X-X. and Cai, P. 2009. Study of formation of jarosite mediated by *Thiobacillus ferrooxidans* in 9K medium. Procedia Earth and Planetary Science; 1(1): 706- 12.
6. Postgate, J.R. 1951. Differential media for sulphur bacteria. Journal of the Science of Foodand Agriculture, 10 (12): 669-674.
7. Reddy, A.N., Gopal, A.V., Lakshmipathy, R. and Padma, V. 2018. Isolation, Characterization and Screening of Sulphur Oxidizing Bacteria from Rhizosphere Soils of Groundnut. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(8): 2639-2644.
8. Vidyalakshmi, R. and Sridar, R. 2007. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria. Journal of Culture collections, 5(1): 73-77.
9. Baalsrud, K. andBaalsrud, K.S. 1954 . Studies on *Thiobacillus denitrificans*. Arch. Microbiol., 20, 34-62.
10. Vishniac, W. and Santer,M. 1957.TheThiobacilli. Bacteriol Rev. 21(3):195-213.
11. Anonymous.https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium113.pdf.
12. https://www.atcc.org ATCC Medium 125.
13. Rupela, O.P. and Taura,P.1973. Isolation and characterization of *Thiobacillus* from alkali soils. Soil Biology and Biochemistry. 5:91-97.