

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

روش‌های کاربردی آزمایشگاه

بیولوژی خاک

برای دانشجویان رشته خاک‌شناسی مقطع کارشناسی و کارشناسی ارشد

تألیف

دکتر حسینعلی علیخانی

(استاد دانشگاه تهران)

دکتر ایرج اله‌دادی

(دانشیار دانشگاه تهران)

مهندس مهدی رشتبری

مهندس بهنام رجب‌پور

تابستان ۱۳۹۳



شماره مسلسل ۸۱۹۲

شماره انتشار ۳۵۴۶

انتشارات دانشگاه تهران

سرشناسه	روش‌های کاربردی آزمایشگاه بیولوژی خاک برای دانشجویان رشته خاک‌شناسی مقطع کارشناسی و کارشناسی ارشد / تألیف حسینعلی علیخانی - [و دیگران]؛ ویراستار فرشاد رضوان
مشخصات نشر	تهران: دانشگاه تهران، مؤسسه انتشارات، ۱۳۹۳.
مشخصات ظاهری	۲۷۱ ص: مصور، جدول، نمودار.
قروبت	انتشارات دانشگاه تهران؛ شماره انتشار ۳۵۴۶.
شابک	978-964-03-6638-7
وضعیت فهرست‌نویسی	فیبا
یادداشت	تألیف حسینعلی علیخانی، ایرج اله‌دادی، مهدی رشتیری، بهنام رجب‌پور.
یادداشت	کتابنامه.
موضوع	خاک - زیست‌شناسی - - دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	خاک - زیست‌شناسی - - راهنمای آموزشی (عالی)
موضوع	خاک - زیست‌شناسی - روش‌شناسی - - راهنمای آموزشی (عالی)
شناسه افزوده	علیخانی، حسینعلی، ۱۳۴۲
شناسه افزوده	رضوان، فرشاد، ۱۳۵۱، ویراستار.
شناسه افزوده	دانشگاه تهران. مؤسسه انتشارات
رده‌بندی کنگره	QH ۸۴ / ۸۸ . ۹۴ : ۱۳۹۳
رده‌بندی دیویی	۵۷۸/۲۵۱
شماره کتابشناسی ملی	۲۵۷۹۴۷

این کتاب مشمول قانون حمایت از حقوق مؤلفان و مصنفان است. تکثیر کتاب به هر روش اعم از فتوکپی، ریسوگرافی، تهیه فایل‌های pdf، لوح فشرده، بازنویسی در وبلاگ‌ها، سایت‌ها، مجله‌ها و کتاب، بدون اجازه کتبی ناشر مجاز نیست و موجب پیگرد قانونی می‌شود.

ISBN 978-964-03-6638-7



9 789640 366387

عنوان: روش‌های کاربردی آزمایشگاه بیولوژی خاک

تألیف: دکتر حسینعلی علیخانی - دکتر ایرج اله‌دادی - مهندس مهدی رشتیری - مهندس بهنام رجب‌پور

ویراستار: فرشاد رضوان

نوبت چاپ: اول

تاریخ انتشار: ۱۳۹۳

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

چاپ و صحافی: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

«مسئولیت صحت مطالب کتاب با مؤلفان است»

«کلیه حقوق برای ناشر محفوظ است»

بها: ۱۴۰۰۰ ریال

خیابان کارگر شمالی - خیابان شهید فرشی مقدم - مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

پست الکترونیک: press @ ut. ac. ir - تارنما: http://press.ut.ac.ir

پخش و فروش: تلفکس ۸۸۳۳۸۷۱۲

فهرست مطالب

فصل اول. ایمنی در آزمایشگاه بیولوژی خاک

- ۱..... در آزمایشگاه چه نکات مهمی باید رعایت شود؟
- ۲..... ایمنی در آزمایشگاه‌های زیستی
- ۳..... راه‌های سرایت عوامل بیماری‌زا
- ۴..... اصول و روش‌های کار در آزمایشگاه
- ۴..... تجهیزات ایمنی فردی (PPE)
- ۶..... رعایت نظم و ترتیب در آزمایشگاه
- ۷..... روش‌های رفع آلودگی (گندزدایی و سترون‌سازی)
- ۸..... شیوه صحیح نظافت، در صورت ریختن مواد خطرناک

فصل دوم. تجهیزات آزمایشگاه بیولوژی خاک

- ۱۱..... هودهای زیست ایمنی
- ۱۳..... اتوکلاو
- ۱۴..... انکوباتور (گرمخانه)
- ۱۵..... سانتریفیوژ
- ۱۶..... انواع سانتریفیوژ
- ۱۸..... میکروتیوب‌های سانتریفیوژ
- ۱۹..... وسیله‌ها و دستگاه‌های آزمایشگاهی

فصل سوم. کاربرد میکروسکوپ نوری و بررسی مرفولوژی کلنی باکتری‌ها

- ۲۹..... میکروسکوپ نوری
- ۳۲..... چگونگی تشکیل و مشاهده تصویر
- ۳۳..... تمیز کردن لام‌های میکروسکوپی
- ۳۳..... تهیه لام مرطوب
- ۳۴..... اندازه‌گیری سلول‌های میکروسکوپی
- ۳۵..... انواع آرایش اجتماع باکتری‌ها
- ۳۶..... ویژگی‌ها و مشخصات رشد باکتری در محیط‌های کشت

فصل چهارم. نحوه تهیه و توزیع انواع محیط کشت میکروبی

۴۱	تعریف کشت
۴۱	تعریف محیط کشت
۴۲	محیط کشت مایع (براث)
۴۳	محیط کشت جامد
۴۳	محیط کشت نیمه جامد
۴۳	انواع محیط کشت
۴۶	آگار
۴۷	توزین بودر خشک محیط کشت میکروبی
۴۸	روش تهیه عمومی انواع محیط کشت
۴۹	توزیع آگار غذایی
۵۰	ریختن آگار در پلیت به روش استریل (سترون)

فصل پنجم. برخی از انواع رایج محیط کشت های کشت میکروبی

۵۵	محیط کشت نوترینت براث
۵۶	محیط کشت نوترینت آگار
۵۷	محیط کشت بلاد آگار
۵۸	محیط کشت اتوزین متیلن بلو آگار
۶۰	محیط کشت مانیتول سالت آگار
۶۱	محیط کشت مک کانکی آگار
۶۲	محیط کشت فنیل اتیل الکل آگار
۶۳	محیط کشت سالمونلا - شیگلا
۶۳	محیط کشت مالت اکستراکت آگار
۶۴	محیط کشت باکتری باسیلوس
۶۵	محیط کشت آگار شیر
۶۶	محیط کشت نیترات آگار
۶۷	محیط کشت نیترات براث
۶۸	محیط کشت نوترینت آگار با نشاسته سیب زمینی
۶۸	محیط کشت نوترینت آگار با عصاره خاک

محیط کشت اوت‌میل آگار.....	۶۹
محیط کشت اکسیداتیو-فرمنتاتیو O/F.....	۷۰
محیط کشت پیتون برات.....	۷۱
محیط کشت شمارش درون پلیت آگار.....	۷۱
محیط کشت دکستروز آگار.....	۷۲
محیط کشت دکستروز برات.....	۷۲
محیط کشت جداسازی سودوموناس آگار.....	۷۳
محیط کشت ریزوبیوم.....	۷۴
محیط کشت سیمون سترات آگار.....	۷۴
محیط کشت سوی بیس آگار.....	۷۵
محیط کشت نشاسته آگار.....	۷۶
محیط کشت آب آگار.....	۷۶
محیط کشت تریپتون سویا برات.....	۷۷
محیط کشت عصاره مخمر آگار.....	۷۷
محیط کشت مخمرمانیتول آگار.....	۷۸
محیط کشت King B.....	۷۸
محیط کشت SI.....	۷۹
محیط کشت سابورد دکستروز آگار.....	۸۰
محیط‌های کشت مورد استفاده در شمارش اکتینومایسها.....	۸۰

فصل ششم. روش‌های استریل کشت، انتقال و نگهداری ذخایر کشت باکتری‌ها

انواع کشت باکتری.....	۸۳
روش کشت باکتری.....	۸۳
روش تهیه محیط‌های کشت.....	۸۹
روش تهیه محیط کشت پیش‌ریخته.....	۸۹
انتقال ریزموجودات به روش استریل.....	۹۰
حفظ و نگهداری ذخایر کشت باکتری‌ها.....	۹۴
روش فریز کردن کشت باکتریایی.....	۹۵

فصل هفتم. روش‌های شمارش مستقیم و غیرمستقیم باکتری‌ها

۹۷	برآورد غیرمستقیم زیتوده میکروبی
۹۷	روش‌های مختلف تعیین زیتوده میکروبی
۹۸	شمارش مستقیم باکتری‌ها با استفاده از لام مشیک پتروف- هوسر
۱۰۰	روش شمارش محتمل‌ترین تعداد (MPN)
۱۰۴	روش شمارش تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (CFU)
۱۰۷	کاربرد کدورت‌سنجی برای برآورد میزان تراکم سلول‌های باکتریایی

فصل هشتم. رنگ‌آمیزی باکتری‌ها

۱۱۱	تهیهٔ انبودهٔ باکتریایی
۱۱۲	رنگ‌آمیزی ساده
۱۱۳	رنگ‌آمیزی گرم
۱۱۵	رنگ‌آمیزی مقاوم اسید فست
۱۱۷	رنگ‌آمیزی منفی
۱۱۹	رنگ‌آمیزی کپسول
۱۲۰	رنگ‌آمیزی آندوسپور

فصل نهم. واکنش‌های فیزیولوژیک باکتریایی

۱۲۳	آزیم‌های هیدرولیتیک (هضم‌کننده)
۱۲۳	آزمایش هیدرولیز نشاسته
۱۲۵	آزمایش هیدرولیز کازئین
۱۲۶	آزمایش تولید سیتراتاز
۱۲۷	آزمایش هیدرولیز ژلاتین (ذوب ژلاتین)
۱۲۹	آزمایش هیدرولیز چربی تری گلیسیرید
۱۳۱	تست لسیتیناز
۱۳۲	تست سلولاز
۱۳۳	آزمایش هیدرولیز اوره
۱۳۵	آزمایش فسفاتاز
۱۳۶	مصرف کربوهیدرات‌ها

۱۳۶.....	آزمایش مصرف سیترات
۱۳۸.....	تست متیل رد و ووزس پروس کار
۱۴۱.....	تست‌های تخمیر کربوهیدرات‌ها
۱۴۳.....	آزمایش اکسایش - تخمیر گلوکز
۱۴۶.....	تجزیه اسیدهای آمینه
۱۴۶.....	آزمایش اندول (تجزیه تربیتوفان)
۱۴۷.....	تست فنیل آلانین دامیناز
۱۴۸.....	آزمایش تولید سولفید هیدروژن
۱۵۰.....	آزمایش‌های تنفس
۱۵۰.....	آزمایش کاتالاز
۱۵۲.....	آزمایش اکسیداز
۱۵۳.....	آزمایش حرکت
۱۵۴.....	آزمون بررسی خاصیت فلورسنت جدایه‌های باکتریایی
۱۵۵.....	آزمون رشد جدایه‌ها در دمای ۴۱ و ۴ درجه سانتی گراد
۱۵۵.....	آزمون توان استفاده از قندهای تری‌هالوز و آرایینوز
۱۵۶.....	آزمون تولید لوآن

فصل دهم. مطالعه جانداران خاکزی

۱۵۷.....	مفاهیم کلی
۱۵۷.....	موجودات خاکزی
۱۵۸.....	روش‌های مطالعه جانداران خاکزی
۱۵۸.....	مشاهده و تعیین فراوانی پروتوزوئا در خاک
۱۶۰.....	روش اختصاصی برای تعیین فراوانی آمیب‌ها
۱۶۱.....	مشاهده و تعیین فراوانی نماتدها
۱۶۲.....	شناسایی کرم‌ها
۱۶۴.....	مطالعه میکروآرتروپودای خاک
۱۶۵.....	آزمایش قیف برلیس تالگرین
۱۶۶.....	ستون وینوگراسکی
۱۶۷.....	تنفس میکروبی (تنفس خاک)

فصل یازدهم، مطالعه ریزوسفر و جوامع میکروبی آن

ریزوسفر	۱۷۱
روش‌های مطالعه میکروفلور ریزوسفر	۱۷۲
تعیین نسبت R/S گروه‌های میکروبی	۱۷۳

فصل دوازدهم، واکنش‌های چرخه نیتروژن

تثبیت نیتروژن مولکولی	۱۷۷
روش جداسازی باکتری‌های ریزوبیومی از گره‌ها	۱۷۷
کشت باکتری‌های ریزوبیومی درون گره‌ها	۱۷۹
آماده سازی مایه تلقیح ریزوبیومی	۱۸۱
آزمون تلقیح گیاه با باکتری ریزوبیومی	۱۸۲
مطالعه فرایند تثبیت نیتروژن	۱۸۲
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز به روش احیای استیلن به اتیلن	۱۸۴
معدنی شدن نیتروژن آلی	۱۸۵
مطالعه پدیده آمونیاک‌سازی	۱۸۵
احیای نیترات	۱۸۷
مطالعه فرایند نیتریفیکاسیون	۱۸۷
آزمایش احیای نیترات	۱۸۹

فصل سیزدهم، اندازه‌گیری مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه توسط PGPR

باکتری‌های محرک رشد گیاه	۱۹۳
اکسیداسیون گوگرد	۱۹۳
توان انحلال فسفات‌های معدنی و آلی	۱۹۵
توان تولید سیدروفورهای میکروبی	۲۰۰
توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز	۲۰۴
توان تولید هورمون ایندول ۳-استیک اسید IAA	۲۰۷
توان تولید سیانید هیدروژن	۲۰۹
آزمون مقاومت به شوری	۲۱۰
آزمون مقاومت به خشکی	۲۱۱

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های مقاوم در برابر فلزات سنگین از خاک..... ۲۱۱

فصل چهاردهم. مطالعه رابطه همزیستی میکوریزی

تعریف و اهمیت رابطه همزیستی میکوریزی.....	۲۱۳
انواع روابط همزیستی میکوریزی.....	۲۱۴
تهیه زادمایه قارچ میکوریزی.....	۲۱۷
تعیین درصد آلودگی ریشه به قارچ‌های میکوریزی.....	۲۱۸
روش Temant برای اندازه‌گیری طول ریشه‌ها.....	۲۲۰
روش جامع استخراج و شمارش جمعیت اسپور قارچ‌های میکوریزی.....	۲۲۰
تعیین جمعیت فعال قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک.....	۲۲۲
شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار.....	۲۲۲
مطالعه همزیستی اکتومیکوریزی (EM).....	۲۲۳
تعیین کمی اکتومیکوریزی.....	۲۲۴
شناسایی مرفولوژیک و آناتومیک ریشه‌های اکتومیکوریزی.....	۲۲۸
خصوصیات ضروری آناتومیک.....	۲۳۱

فصل پانزدهم. روش‌های پیشرفته بیوتکنولوژی خاک

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).....	۲۳۵
سازوکار واکنش PCR.....	۲۳۶
اجزای واکنش PCR.....	۲۳۶
وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR.....	۲۳۸
روش Real Time PCR.....	۲۴۰
مراحل آزمایشگاهی PCR.....	۲۴۱
مراحل نموداری PCR.....	۲۴۱
روش کار Real Time PCR.....	۲۴۲
کاربردهای Real Time PCR.....	۲۴۳
کاربرد تکنیک FRET.....	۲۴۴
الکتروفورز.....	۲۴۵
دستگاه الکتروفورز هوشمند.....	۲۴۷

۲۴۸.....	پروتکل الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE
۲۵۰.....	پروتکل الکتروفورز بر روی ژل آگارز
۲۵۲.....	پروتکل استخراج پلازمید
۲۵۳.....	تست الایزا ELISA
۲۵۵.....	مراحل یک آزمون ELISA
۲۶۰.....	اصول کار دستگاه الیزاریدر
۲۶۲.....	تکنیک پروتئومیکس
۲۶۳.....	اومیکس
۲۶۳.....	پروتئومیکس
۲۶۴.....	نقشه‌برداری پروتئوم
۲۶۵.....	منابع

www.ketablib.ir

پیشگفتار مؤلفان

سپاس و ستایش خدای را جل و جلاله که توفیق نگارش این کتاب را برای ارتقای سطح علم و دانش این سرزمین، به ما ارزانی فرمود. آفریدگاری که خویش را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

امروزه مبحث بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک به دلیل اهمیت منابع طبیعی به ویژه خاک، حفظ تنوع زیستی در سیستم‌های کشاورزی و مسائل زیست محیطی در زمینه افزایش تولیدات زراعی راهبردی، ترویج و جایگزینی کاربرد کودهای بیولوژیک با کودهای شیمیایی به واسطه آلودگی‌های اکوسیستم‌های خاکی در اثر مصرف مفرط آنها، توجهات بسیاری را به خود معطوف کرده است. امید است کتاب حاضر که به مبحث روش‌های کاربردی آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک می‌پردازد، گام موثری در این راه باشد.

گردآورندگان مجموعه حاضر با توجه به رویکرد نوین به موضوعات بیولوژی و بیوتکنولوژی در مباحث علوم خاک، ضرورت دیدن کتاب به تألیف و گردآوری آزمایش‌های کاربردی و رایج حوزه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک (که سالیان سال در دانشگاه‌ها و مؤسسات تحقیقاتی استفاده شده است) اهتمام ورزند، تا دانشجویان خاکشناسی برای دسترسی به این آزمایش‌ها با مشکلات کمتری مواجه باشند.

با توجه به اینکه تاکنون کتاب‌های کاربردی و آزمایشگاهی محدود برای کار در آزمایشگاه تخصصی بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک تدوین شده است، این مجموعه به خوبی نیازهای دانشجویان خاکشناسی را مرتفع کرده و برای کار در آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک بسیار مفید خواهد بود. مباحث کتاب دارای این قابلیت است که به عنوان راهنمای کار در آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، مورد استفاده دانشجویان و کارشناسان رشته‌های خاکشناسی، زیست‌شناسی میکروبیولوژی و محیط زیست قرار گیرد.

در تألیف و گردآوری این کتاب سعی بر کاربردی بودن مطالب بوده است. امید می‌رود خوانندگان محترم بر مؤلفان منت بگذارند و نقص‌ها را به دیده اغماض ننگرند، نظرها و پیشنهادهای خود را برای اعمال در چاپ‌های بعدی ارائه کنند.

مؤلفان

تابستان-۱۳۹۳