بسم الله الرحمن الرحيم

١٢٩٨٢٥

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی دکتری رشته ی میکروبیولوژی

بررسی مولکولی و اکولوژیکی باکتریهای تجزیه کننده آلکان ها در خلیج فارس و دریای خزر

استادان راهنما

دکتر گیتی امتیازی

دکتر روحا کسری کرمانشاهی

استادان مشاور

دکتر بیژن بمبئی

دکتر سیمون کاپلو

مرکز اطلاعات مدارک علمی
تهیه مدارک
۱۳۸۸/۱۰/۲۷

پژوهشگر

مهدی حسن شاهیان

تیر ماه ۱۳۸۸

۱۲۹۸۲۵

کلیه حقوق مادی مترتب بـر نتـایج مطالعـات،
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع
این پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی دکتری رشته ی زیست شناسی- میکروبیولوژی آقای مهدی حسن شاهیان تحت عنوان

بررسی مولکولی و اکولوژیکی باکتریهای تجزیه کننده آلکان ها در خلیج فارس و دریای خزر

در تاریخ ۸۸/۴/۳۱ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه بسیار خوب... به تصویب نهایی رسید.

۱. استادان راهنمای پایان نامه	دکتر گیتی امتیازی با مرتبه ی علمی	استاد	امضا
	دکتر روحا کسری کرمانشاهی با مرتبه ی علمی	استاد	امضا
۲. استادان مشاور پایان نامه	دکتر بیژن بمبئی با مرتبه ی علمی	استادیار	امضا
	دکتر سیمون کاپلو با مرتبه ی علمی	استاد	امضا
۳. استادان داور داخل گروه	دکتر سید حمید زرکش اصفهانی با مرتبه ی علمی	استادیار	امضا
	دکتر محمد ربانی خوراسگانی با مرتبه ی علمی	دانشیار	امضا
۴. استادان داور خارج از گروه	دکتر محمد ربانی با مرتبه ی علمی	استاد	امضا
	دکتر حاجیه قاسمیان صفایی با مرتبه ی علمی	دانشیار	امضا

امضای مدیر گروه

تقدیم به:

مادر مهربانم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودش که در سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است.

و

پدر عزیزم

به پاس قلب بزرگش که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهش به شجاعت می‌گراید.

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که همواره در جهت نیل به آرزوهایم رنج مسیر را بر من هموار نموده است و سپاس بیکران خدای را که عشق به آموختن و توفیق آنرا به من اعطا فرمود.

درود بیکران خود را نثار خانواده ا م می کنم که با صبر وحوصله آسایش فکری من را فراهم ساختند تا به دور از دغد غه هایی که مانع از پیشرفتم می شدند، تحصیل علم کنم و هرچه دارم از وجود مقدسشان است.

از استاد راهنمای اول، سرکار خانم دکتر گیتی امتیازی که با نهایت دقت و دلسوزی در طی انجام این پایان‌نامه همراه و مشوقم بودند تشکر می‌نمایم.

از سرکار خانم دکتر روحا کسری کرمانشاهی، استاد راهنمای دوم، که حضورشان در تک تک لحظه هایم پرثمر، خاطره انگیز و باعث افتخارم بوده است صمیمانه سپاسگزارم.

از استاد مشاور گرامیم، جناب آقای دکتر بیژن بمبئی که در مرکز ملی تحقیقات ژنتیک کمک فراوانی به من نمودند، نهایت تشکر را دارم.

از آقای دکتر کاپلو و تمامی اساتید محترم مرکز تحقیقات میکروبی و بیوتکنولوژی دریا که به مدت ۷ ماه در کشور ایتالیا در پیشرفت این پایان نامه کمک زیادی کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تشکر فراوان دارم از جناب آقای دکتر زرکش و دکتر ربانی که داوری داخل گروه این پایان‌نامه را تقبل فرمودند.

از سرکار خانم دکتر صفایی و جناب آقای دکتر ربانی که داوری خارج گروه این پایان نامه را عهده دار بودند قدردانی می نمایم.

از تمامی اساتید گروه زیست شناسی بویژه اساتید ارجمندم در بخش میکروب شناسیی: جناب آقای دکتر زرکش، جناب آقای دکتر بوذری، جناب آقای دکتر روغنیان، جناب آقای دکتر امامی و جناب آقای دکتر نحوی که ۷ سال در محضر شان کسب علم و تجربه کردم کمال تشکر وقدردانی را دارم.

از دوستان و همکلاسی های عزیزم آقایان: رستم زاد، مبینی، شاکری، آشنگروف، قائم مقامی، مهتدی، مهدی پور، حسینی وجعفری نیا و خانم ها: خالقی، میرحسینی، اعتمادی فر و حسین خانی قدردانی می نمایم.

چکیده:

هیدروکربن های نفتی مخلوط پیچیده ای هستند و به چهار گروه: ترکیبات اشباع، آروماتیک ها، رزین ها و آسفالتن ها تقسیم بندی می شوند. آلکانها بیش از ۶۰ درصد ترکیب نفت خام را تشکیل می دهند. تجزیه زیستی مشتقات نفتی در محیط های دریایی موثرتر و قوی تر از روش های فیزیکوشیمیایی است. در این پژوهش جهت جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت ابتدا نمونه برداری از مناطق آلوده در خلیج فارس و دریای خزر بعمل آمد. باکتری های جداسازی شده با روش های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. صفاتی در این باکتری ها همچون تنفس، تولید بیوفیلم و تجزیه غلظت های مختلف آلکانها با روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. میزان حذف نفت و ترکیبات آلکانی با روش گاز کروماتوگرافی برای هر سویه مشخص گردید. حضور گروه های ژنی آلکان هیدروکسیلاز به کمک PCR با پرایمر های ویژه این ژن ها در سویه ها مورد بررسی قرار گرفت. برای درک اثر نفت بر روی دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای خزر شمارش تجزیه کننده ها، هتروتروف ها و فعالیت های آنزیمی انجام گرفت. تنوع زیستی در رسوبات آلوده و غیر آلوده دو اکوسیستم با روش PCR-DGGE بررسی گردید. با روش کلون سازی چسبنده ژن سیتوکروم P450 باکتری *Alcanivorax* کلون و به *E. coli* منتقل گردید و پروتئین مربوطه بیان شد. با طراحی آزمایشات در مقیاس مزوکازم با ۱۲ هزار لیتر آب دریا اثرات ارزیابی زیستی و تحریک زیستی بر روی جامعه میکروبی دریایی و تجزیه نفت بررسی شد. در این پژوهش از بین ۳۰ سویه تجزیه کننده نفت جداسازی شده ۱۳ سویه بر اساس حذف نفت بیشتر انتخاب شدند. این سویه ها به جنس هایی همچون *Pseudomonas, Alcanivorax, Marinobacter, Halomonas, Microbacterium, Acinetobacter, Rhodococcus* تعلق داشتند. این باکتری ها قادر به تشکیل بیوفیلم و حداکثر تنفس در غلظت ۱/۵٪ اکتادکان بودند و در طی هفت روز بیش از نیمی از نفت را حذف می کردند. ژن آلکان هیدروکسیلاز گروه (III) از فراوانی بالاتری در این سویه ها نسبت به گروه (II) برخوردار بود. نتایج مطالعات اکولوژیک نشان داد که نفت خام موجب افزایش تعداد تجزیه کننده ها در اکوسیستم های آلوده می شود. این آلودگی نفتی فعالیت آنزیم های دهیدروژناز و لیپاز را افزایش داده در حالیکه موجب کاهش فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز می گردد. نتایج حاصل از تنوع زیستی در دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای خزر نشان داد که گروه های فیلوژنی پس از آلودگی نفتی کاهش یافته و گروه های باکتریایی خاصی غالب می شوند. وجود ژن *alk-B1* باکتری *Alcanivorax* تنها در آب دریایی آلوده هر دو اکوسیستم نشان دهنده امکان استفاده از آن بعنوان اندیکاتور آلودگی نفتی است. آزمایشات کلون سازی ژن *cyt-P450* به *E. coli* ثابت کرد که این ژن وارد وکتور pET-26a گردیده و حضور باند پروتئینی دلالت بر بیان مناسب در میزبان *E. coli* BL21 دارد. آزمایشات در سطح مزوکازم نشان دادند که هر دو تیمار ارزیابی و تحریک زیستی تنوع باکتریایی در آب دریای طبیعی را کاهش می دهد. بهترین حالت تجزیه نفت از تیمار ارزیابی زیستی با باکتری *Alcanivorax* بدست آمد. با بکارگیری این باکتری ها و تلفیق نتایج بدست آمده در مقیاس مزوکازم می توان آلودگی نفتی در محیط های دریایی ایران و بویژه خلیج فارس را به بهترین وجه مدیریت نمود و اثرات آلودگی نفتی را بر این اکوسیستم دریایی کاهش داد.

کلید واژه ها: آلودگی، تجزیه زیستی، باکتری های هیدروکبنوکلاستیکوس، آلکانی ورکس، ارزیابی زیستی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع	۱
۱-۱- تعریف اصطلاح ها	۱
۱-۲. آلودگی نفتی	۴
۱-۳. ترکیب نفت خام	۴
۱-۴. آلودگی نفتی در خلیج فارس	۹
۱-۵. آلودگی نفتی در دریای خزر	۱۰
۱-۶. عواقب ناشی از آلودگی نفتی	۱۱
۱-۷. واکنش مابین خاک و هیدروکربن‌های آلیفاتیک	۱۲
۱-۸. انواع میکروارگانیسم های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آلیفاتیک	۱۳
۱-۹. جذب میکروبی هیدروکربن‌های آلیفاتیک	۱۴
۱-۱۰. راه‌های متابولیکی هوازی برای هیدروکربن‌های آلیفاتیک	۱۵
۱-۱۱. ژنتیک تجزیه هیدروکربن‌های آلیفاتیک	۱۹
۱-۱۲. اکولوژی تجزیه زیستی هیدروکربن ها	۲۲
۱-۱۳. آنزیم آلکان هیدروکسیلاز	۲۵
۱-۱۴. سیتوکروم P450	۳۰
۱-۱۵. کاربردهای بیوتکنولوژیکی متابولیسم هیدروکربن‌های آلیفاتیک	۳۲
۱-۱۶. باکتری‌های دریایی تجزیه کننده نفت اجباری: هیدروکربنوکلاستیکوس	۳۴
۱-۱۷. *Alcanivorax*: الگوی جهانی باکتریهای دسته هیدروکربنوکلاستیکوس	۳۷
۱-۱۸. اهداف تحقیق	۴۳
فصل دوم: مواد و روشها	۴۴
بخش اول: مواد و روشهای مرتبط با آزمایشات فیزیولوژیک	۴۴
۲-۱-۱. محیط های کشت مورد استفاده	۴۴
۲-۱-۲. دستگاههای مورد استفاده	۴۶
۲-۱-۳. نمونه برداری از مناطق آلوده و غیر آلوده در خلیج فارس و دریای خزر	۴۶
۲-۱-۴. جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت خام	۴۷

عنوان	صفحه
۲-۱-۵. جداسازی *Alcanivorax* از آب دریا	۴۷
۲-۱-۶. شناسایی باکتری‌های جدا شده	۴۷
۲-۱-۷. سنجش حذف نفت خام توسط باکتری‌های جدا شده	۴۸
۲-۱-۸. سنجش هیدروفوبیسیته سطح سلولی	۴۹
۲-۱-۹. سنجش تولید بیوسورفکتانت	۵۰
۲-۱-۱۰. بررسی صفات فیزیولوژیک با روش سنجش در میکروتیتر پلیت	۵۱
۲-۱-۱۱. سنجش آنزیم آلکان هیدروکسیلاز	۵۲
۲-۱-۱۲. بررسی رشد سویه های عادی روی هیدروکربن های آروماتیک و آلیفاتیک	۵۴
۲-۱-۱۳. اثر برخی شرایط روی تجزیه نفت خام با طراحی تاگوچی	۵۴
۲-۱-۱۴. شناسایی ژن آلکان هیدروکسیلاز گروه (II) و (III) در سویه ها	۵۷
۲-۱-۱۵. اثبات وجود ژنهای آلکان هیدروکسیلاز (*alk-B1*)	۶۰
بخش دوم: مواد و روشهای مرتبط با آزمایشات اکولوژیک	۶۲
۲-۲-۱. طراحی میکروکازم برای رسوبات خلیج فارس و دریای خزر	۶۲
۲-۲-۲. شمارش تعداد کل هتروتروف ها، تجزیه کننده های غیر شورپسند و شورپسند (HCB) در رسوب آلوده و غیر آلوده خلیج فارس و دریای خزر با روش MPN	۶۳
۲-۲-۳ . سنجش فعالیت برخی آنزیم ها در رسوبات آلوده و غیر آلوده دریای خزر و خلیج فارس	۶۳
۲-۲-۴. استخراج نفت از رسوبات میکروکازم ها و سنجش میزان کل هیدروکربن ها	۶۴
۲-۲-۵. استخراج DNA از رسوبات	۶۵
۲-۲-۶. خالص سازی DNA استخراج شده	۶۶
۲-۲-۷. استخراج DNA از آب دریا	۶۶
۲-۲-۸. تکثیر DNA استخراج شده از آب و رسوب با پرایمرهای عمومی	۶۷
۲-۲-۹. تشخیص ژنهای عملکردی تجزیه زیستی در آب دریا و رسوبات	۶۷

عنوان	صفحه
۲-۲-۱۰. مقایسه جامعه باکتریایی در رسوبات آلوده و غیر آلوده خلیج فارس و دریای خزر با DGGE	۶۷
بخش سوم: مواد و روشهای مرتبط با آزمایشات مولکولی (کلونینگ)	۶۸
۲-۳-۱. مواد	۶۸
۲-۳-۳. تکثیر ژن *cyt-P450*	۷۱
۲-۳-۴. تهیه ژل آگارز و الکتروفورز آن	۷۲
۲-۳-۵. استخراج محصول PCR از ژل آگاروز	۷۳
۲-۳-۶. استخراج پلاسمیدpBluescript با استفاده از کیت(Metabion)	۷۳
۲-۳-۷. خطی کردن پلاسمید pBluescrip	۷۴
۲-۳-۸. کلون سازی ژن *cyt-P450* داخل پلاسمید pBluescript (کلون سازی بلانت)	۷۵
۲-۳-۹. تهیه سلولهای مستعد برای پذیرش DNA پلاسمیدی خارجی	۷۵
۲-۳-۱۰. انتقال پلاسمید به سلول های مستعد	۷۶
۲-۳-۱۱. غربال کردن کلون های نوترکیب در محیط کشت LB آگار حاوی Xgal-IPTG	۷۷
۲-۳-۱۲. اثبات کلون سازی	۷۷
۲-۳-۱۳. تعیین ترتیب قرار گیری ژن *cyt-P450* درون پلاسمید pBluescript	۷۷
۲-۳-۱۴. برش آنزیمی پلاسمید pET-26a و پلاسمید نوترکیب pBluescript	۷۸
۲-۳-۱۵.کلون سازی چسبنده، انتقال ژن *cyt-P450* به پلاسمید pET-26a	۷۸
۲-۳-۱۶. انتقال pET-26a نوترکیب به میزبان بیانی (*E. coli* BL-21)	۷۹
۲-۳-۱۷.کشت باکتری برای بررسی بیان پروتئین	۷۹
۲-۳-۱۹. سنجش فعالیت آنزیم نوترکیب Cyt-P450	۸۲
بخش چهارم: مواد و روشهای مرتبط با آزمایشات ارزیابی زیستی در سطح مزوکازم	۸۴
۲-۴-۱. مشخصات مزوکازم مورد استفاده	۸۴
۲-۴-۲. طراحی آزمایشات در مزوکازم	۸۶
۲-۴-۳. تهیه کشت باکتریایی جهت تلقیح به مزوکازم	۸۷
۲-۴-۴. نمونه برداری از مزوکازم و شاخص های مورد بررسی در هر نمونه برداری	۸۷

عنوان	صفحه
۲-۴-۵. آنالیز مقدار نفت باقیمانده با روش GC-MS	۸۸
۲-۴-۶. شمارش تعداد باکتری های هتروتروف (CFU)	۸۸
۲-۴-۷. شمارش تعداد حداکثر احتمالی باکتری های تجزیه کننده (MPN)	۸۸
۲-۴-۸. شمارش تعداد کل باکتری ها (زنده و مرده	۸۸
۲-۴-۹. سنجش نیاز اکسیژن بیولوژیکی (BOD)	۸۹
۲-۴-۱۰. سنجش آنزیمی	۸۹
۲-۴-۱۱. استخراج همزمان DNA و RNA از نمونه های مزوکازم با استفاده از کیت کیاژن	۸۹
۲-۴-۱۲ حذف DNA ژنومی از RNA استخراج شده با کیت Turbo DNA Free	۹۱
۲-۴-۱۳. واکنش نسخه برداری معکوس (RT) و ایجاد cDNA	۹۲
۲-۴-۱۴. بررسی دینامیک مولکولی جامعه باکتریایی دریایی در مزوکازم با روش PCR-DGGE	۹۳
۲-۴-۱۵. انجام واکنش PCR-DGGE	۹۸
۲-۴-۱۶. تعیین توالی باند های ژل DGGE	۹۸
۲-۴-۱۷. غربالگری حضور ژنهای عملکردی در نمونه های مزوکازم	۹۹
۲-۴-۱۸. بررسی بیان ژن های عملکردی با (QRT-PCR)	۱۰۱
فصل سوم: نتایج	۱۰۷
بخش اول: نتایج مربوط به آزمایشات فیزیولوژیک	۱۰۸
۳-۱-۱. جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی نفت خام: خصوصیات باکتری‌ها و محل جداسازی	۱۰۸
۳-۱-۲. انتخاب سویه های برتر با غربالگری رشد در نفت خام	۱۱۲
۳-۱-۳. شناسایی سویه های قوی در تجزیه نفت	۱۱۲
۳-۱-۳-۲. شناسایی مولکولی	۱۱۷
۳-۱-۴- رشد و حذف نفت خام توسط سویه ها	۱۲۲
۳-۱-۵- طیف های گاز کروماتوگرافی حذف نفت خام بوسیله سویه ها	۱۲۳
۳-۱-۶. درصد تجزیه هر یک از آلکان ها حاضر در نفت خام توسط سویه های تجزیه کننده	۱۳۰

عنوان	صفحه
۳-۱-۷- نتایج حاصل از تولید بیوسورفکتانت، هیدروفوبیسته سطح سلولی، فعالیت امولسیونه کنندگی و کاهش کشش سطحی بوسیله سویه های تجزیه کننده نفت خام	۱۳۲
۳-۱-۸- میزان رشد، تنفس و بیوفیلم سویه ها در غلظت های مختلف از آلکان های متفاوت با روش میکروتیتر پلیت	۱۳۴
۳-۱-۹- اثر غلظت نفت خام روی رشد چهار سویه	۱۳۸
۳-۱-۱۰- نتایج حاصل از فعالیت آنزیم آلکان هیدروکسیلاز	۱۴۰
۳-۱-۱۱- رشد روی هیدروکربن های آلیفاتیک و آروماتیک	۱۴۲
۳-۱-۱۲- بهینه سازی تجزیه نفت با روش تاگوچی	۱۴۳
۳-۱-۱۳. وجود ژنهای گروه (II) و (III) آلکان هیدروکسیلاز در سویه های ایزوله شده	۱۵۱
۳-۱-۱۴. حضور ژن های آلکان هیدروکسیلاز (*alk-B1*) و سیتوکروم منواکسیژناز در سویه *Alcanivorax* PG-12	۱۵۷
بخش دوم: نتایج مربوط به آزمایشات اکولوژیک	۱۵۹
۳-۲-۱. مشخصات فیزیکی و شیمیایی رسوبات	۱۵۹
۳-۲-۲. نتایج حاصل از MPN باکتری های هتروترف و تعداد تجزیه کننده ها در میکروکازم دو اکوسیستم	۱۶۰
۳-۲-۳. فعالیت آنزیمی در رسوبات آلوده و غیر آلوده دو اکوسیستم	۱۶۱
۳-۲-۴. میزان کل هیدروکربن ها (TPH) در هر میکروکازم	۱۶۲
۳-۲-۵. استخراج DNA از رسوبات: تعیین کمیت، خلوص و قابل تکثیر بودن آن با ژن های عمومی (16S rDNA)	۱۶۷
۳-۲-۶. نتایج حاصل از تنوع زیستی در جامعه میکروبی رسوبات با روش DGGE	۱۶۹
۳-۲-۷. تجزیه و تحلیل آماری نتایج ژل DGGE	۱۷۰
۳-۲-۸. بررسی وجود ژن های عملکردی آلکان هیدروکسیلاز گروه (II) و (III) در رسوبات دو اکوسیستم	۱۷۵
۳-۲-۹. تشخیص آلودگی نفتی با ژن *alk-B1* از باکتری *Alcanivorax*	۱۷۸
بخش سوم: نتایج مربوط به آزمایشات مولکولی (کلونینگ)	۱۸۰

عنوان	صفحه
۳-۳-۱. تکثیر ژن *cyt-P450*	۱۸۰
۳-۳-۲. انتخاب وکتور مناسب	۱۸۱
۳-۳-۳. استخراج محصول PCR از ژل آگاروز	۱۸۱
۳-۳-۴. استخراج پلاسمید pBluescript از باکتری *E. coli* DH5α و خطی کردن آن	۱۸۲
۳-۳-۵. کلون سازی بلانت ژن *cyt-P450* داخل پلاسمید pBluescript وترانسفورماسیون آن در باکتری *E. coli* DH5α	۱۸۳
۳-۳-۶. غربال کلونی های نوترکیب	۱۸۴
۳-۳-۷. بررسی کلنی های نوترکیب توسط PCR	۱۸۵
۳-۳-۸. ترتیب قرار گیری ژن *cyt-P450* در پلاسمید pBluescript	۱۸۶
۳-۳-۹. آماده سازی پلاسمید pET-26a جهت کلون کردن ژن *cyt-P450*	۱۸۸
۳-۳-۱۰. کلون سازی چسبنده: انتقال ژن *cyt-P450* به پلاسمید pET-26a	۱۸۹
۳-۳-۱۱. غربال کردن کلونهای حاوی پلاسمید نوترکیب pET-26-Cyt	۱۸۹
۳-۳-۱۲. کلنی PCR و تایید ترانسفورماسیون	۱۹۰
۳-۳-۱۳. انتقال پلاسمید نوترکیب pET-26-Cyt به *E. coli* BL-21 جهت بیان	۱۹۰
۳-۳-۱۴. بیان ژن *cyt-P450* در *E. coli* BL-21	۱۹۱
۳-۳-۱۵. اثبات داخل سلولی بودن پروتئین نوترکیب Cyt-P450	۱۹۲
۳-۳-۱۶. سنجش فعالیت آنزیمی پروتئین نوترکیب Cyt-P450	۱۹۳
بخش چهارم: نتایج مربوط به آزمایشات ارزیابی زیستی در مقیاس مزوکازم	۱۹۶
۳-۴-۱. تعداد کل هتروتروف ها در هر سه مزوکازم	۱۹۶
۳-۴-۲. تعداد باکتری های تجزیه کننده نفت در هر سه مزوکازم	۱۹۶
۳-۴-۳. تعداد کل باکتری ها (زنده و مرده) در هر سه مزوکازم	۱۹۷
۳-۴-۴. نیاز اکسیژن بیولوژیکی (BOD) در هر سه مزوکازم	۱۹۸
۳-۴-۵. میزان درصد باکتری های قابل کشت در مقایسه با کل باکتری ها	۲۰۰
۳-۴-۶. میزان درصد باکتری های تجزیه کننده نفت در مقایسه با کل باکتری ها	۲۰۱
۳-۴-۷. رابطه بین نیاز اکسیژن بیولوژیکی با تعداد کل توده باکتریایی	۲۰۲

عنوان	صفحه
۳-۴-۸. سنجش آنزیمی مزوکازم ها	۲۰۳
۳-۴-۹. منحنی رشد *Alcanivorax* و *Thalassolituus*	۲۰۵
۳-۴-۱۰. نتایج مزوکازم اول، مزوکازم ارزیابی زیستی کشت منفرد	۲۰۷
۳-۴-۱۰-۱. تجزیه زیستی نفت در طول دوره زمانی مزوکازم	۲۰۷
۳-۴-۱۰-۲. میزان DNA استخراج شده از نمونه ها	۲۰۹
۳-۴-۱۰-۳. انجام PCR با پرایمرهای 16S rDNA بر روی DNA استخراج شده از نمونه های مزوکازم	۲۰۹
۳-۴-۱۰-۴. بررسی دینامیک جمعیتی باکتریایی مزوکازم با روش PCR-DGGE	۲۱۰
۳-۴-۱۰-۵. شباهت جمعیتی جامعه میکروبی در زمان های مختلف نمونه برداری	۲۱۱
۳-۴-۱۰-۶. شاخص های تنوع زیستی مزوکازم	۲۱۳
۳-۴-۱۰-۷. گرو ه های باکتریایی حاضر در مزوکازم	۲۱۴
۳-۴-۱۰-۸. فیلوژنی جمعیت باکتریایی مزوکازم	۲۱۴
۳-۴-۱۱. نتایج مزوکازم دوم، مزوکازم تحریک زیستی	۲۱۶
۳-۴-۱۱-۱. تجزیه زیستی نفت در طول دوره زمانی مزوکازم	۲۱۶
۳-۴-۱۱-۲. میزان DNA استخراج شده از نمونه ها	۲۱۸
۳-۴-۱۱-۳. انجام PCR با پرایمرهای 16S rDNA بر روی DNA استخراج شده از نمونه های مزوکازم	۲۱۸
۳-۴-۱۱-۴. بررسی دینامیک جمعیتی باکتریایی مزوکازم با روش PCR-DGGE	۲۱۹
۳-۴-۱۱-۵. شباهت جمعیتی جامعه میکروبی در زمان های مختلف نمونه برداری	۲۲۰
۳-۴-۱۱-۶. شاخص های تنوع زیستی مزوکازم	۲۲۲
۳-۴-۱۱-۷. گرو ه های باکتریایی حاضر در مزوکازم	۲۲۲
۳-۴-۱۱-۸. فیلوژنی جمعیت باکتریایی مزوکازم	۲۲۳
۳-۴-۱۲. نتایج مزوکازم سوم، مزوکازم ارزیابی زیستی با کشت مخلوط	۲۲۵
۳-۴-۱۲-۱. تجزیه زیستی نفت در طول دوره زمانی مزوکازم	۲۲۵
۳-۴-۱۲-۲. میزان DNA استخراج شده از نمونه ها	۲۲۷

عنوان	صفحه
۳-۴-۱۲-۳. انجام PCR با پرایمرهای 16S rDNA بر روی DNA استخراج شده از نمونه های مزوکازم	۲۲۷
۳-۴-۱۲-۴. بررسی دینامیک جمعیتی باکتریایی مزوکازم با روش PCR-DGGE	۲۲۸
۳-۴-۱۲-۵. شباهت جمعیتی جامعه میکروبی در زمان های مختلف نمونه برداری	۲۲۹
۳-۴-۱۲-۶. شاخص های تنوع زیستی مزوکازم	۲۳۱
۳-۴-۱۲-۷. گرو ه های باکتریایی حاضر در مزوکازم	۲۳۱
۳-۴-۱۲-۸. فیلوژنی جمعیت باکتریایی مزوکازم	۲۳۲
۳-۴-۱۳. مقایسه شباهت سه مزوکازم به همدیگر	۲۳۲
۳-۴-۱۴. مقایسه میزان تنوع زیستی در سه مزوکازم	۲۳۳
۳-۴-۱۵. مقایسه میزان حذف نفت در سه مزوکازم	۲۳۴
۳-۴-۱۶. نتایج حاصل از غربالگری ژن های عملکردی در نمونه های DNA و cDNA هر سه مزوکازم	۲۳۵
۳-۴-۱۷. بررسی بیان ژن های عملکردی با QRT-PCR	۲۳۷
۳-۴-۱۷-۱. تیمار RNA با DNAse	۲۳۷
۳-۴-۱۷-۲. میزان cDNA سنتز شده توسط واکنش نسخه بردار معکوس	۲۳۷
۳-۴-۱۷-۳. منحنی استاندارد ژن *alk-B1* باکتری *Alcanivorax* و ژن *alk-BT* باکتری *Thalassolituus*	۲۳۸
۳-۴-۱۷-۴. گراف تکثیر ژن *alk-B1* و *alk-BT*	۲۳۹
۳-۴-۱۷-۵. آنالیز منحنی ذوب دو ژن *alk-B1* و *alk-BT*	۲۴۰
۳-۴-۱۷-۶. ژل الکتروفورز محصول QRT-PCR	۲۴۱
۳-۴-۱۷-۷. بیان ژن *alk-B1* باکتری *Alcanivorax* در سه مزوکازم	۲۴۲
۳-۴-۱۷-۸. بیان ژن *alk-BT* باکتری *Thalassolituus* در مزوکازم سوم	۲۴۳
۳-۴-۱۷-۹. مقایسه بیان ژن *alk-B1* و ژن *alk-BT* در مزوکازم سوم	۲۴۴
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری	۲۴۶
بخش اول: بحث مربوط به آزمایشات فیزیولوژیک	۲۴۶
۴-۱. غربالگری باکتری های تجزیه کننده نفت خام از محیط های گوناگون	۲۴۶

عنوان | صفحه

۴-۲.جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفت شور پسند ۲۴۸
۴-۳. مخمرهای تجزیه کننده نفت خام ۲۴۹
۴-۴. حذف نفت خام توسط باکتری های تجزیه کننده ۲۴۹
۴-۵. رابطه بین تولید بیوسورفکتانت، هیدروفوبیسیته سطح سلولی و تجزیه هیدروکربن های نفتی ۲۵۰
۴-۶. روش میکروتیترپلیت جهت بررسی رشد، تنفس و تشکیل بیوفیلم باکتری های تجزیه کننده آلاینده ها ۲۵۲
۴-۶. فعالیت آنزیم آلکان هیدروکسیلاز ۲۵۳
۴-۷. اثر عوامل بر روی تجزیه نفت (طراحی تاگوچی) ۲۵۴
۴-۸. توزیع ژنهای آلکان هیدروکسیلاز در بین باکتری های تجزیه کننده هیدروکربن ها ۲۵۵
بخش دوم: بحث مربوط به نتایج آزمایشات اکولوژیک ۲۵۷
۴-۹. اثر نفت بر روی فعالیت های میکروبی رسوبات دریایی با مقایسه دو اکوسیستم خلیج فارس و دریای خزر ۲۵۷
۴-۱۰. رابطه بین هیدروکربن های باقیمانده با فعالیت های آنزیمی ۲۶۰
۴-۱۱. تنوع زیستی در رسوبات آلوده و غیر آلود ۲۶۰
۴-۱۲. حضور ژنهای آلکان هیدروکسیلاز گروه (II) و (III) در رسوبات خلیج فارس و دریای خزر ۲۶۲
۴-۱۳. ژن *alk-B1* باکتری *Alcanivorax* بعنوان حسگر تشخیص آلودگی نفتی ۲۶۳
بخش سوم: بحث مربوط به نتایج آزمایشات مولکولی (کلونینگ) ۲۶۵
۴-۱۴. ژنهای مسئول تجزیه زیستی در *Alcanivorax* ۲۶۵
۴-۱۵. کلون سازی ژنهای آلکان هیدروکسیلاز ۲۶۶
۴-۱۶. ژنهای کلون سازی شده مسئول تجزیه زیستی در *Alcanivorax* ۲۶۶
۴-۱۷. کلونینگ ژنهای *cyt-P450* ۲۶۷
۴-۱۸. بیان و سنجش آنزیم سیتوکروم P450 کلون شده ۲۶۹

عنوان | صفحه

بخش چهارم : بحث مرتبط با آزمایشات مزوکازم ۲۷۱
۴-۱۹. جایگاه مطالعات مزوکازم در بررسی تجزیه زیستی و اکولوژی میکروبی ۲۷۱
۴-۲۰. پاسخ جامعه باکتریایی دریایی به آلودگی نفتی ۲۷۱
۴-۲۱. تنوع در جوامع میکروبی دریایی ۲۷۳
۴-۲۲. اثر ارزیابی زیستی روی جامعه میکروبی و تجزیه زیستی نفت ۲۷۴
۴-۲۳. اثر تحریک زیستی روی جامعه میکروبی و تجزیه زیستی نف ۲۷۶
۴-۲۴. مقایسه کارایی ارزیابی زیستی با تحریک زیستی در تجزیه نفت در سطح مزوکازم و اثر آنها بر روی جامعه میکروبی دریایی ۲۷۷
۴-۲۵. تعیین کمیت ژنهای تجزیه کننده در مطالعات ارزیابی و تحریک زیستی با Real Time PCR (QRT-PCR) ۲۷۸
۴-۲۶. آیا می توان نتایج آزمایشات در مقیاس مزوکازم را به سطح میدانی توسعه داد؟ ۲۸۱
۴-۲۷. نتیجه گیری کلی ۲۸۲
۴-۲۸. پیشنهادات ۲۸۳
فصل پنجم: منابع ۲۸۴

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱: ساختمان آلکانها	۶
شکل ۱-۲: ساختمان سیکلو آلکانها	۷
شکل ۱-۳: ساختمان آروماتیک ها	۷
شکل ۱-۴: ساختار مولکولی آسفالتن	۸
شکل ۱-۵: ساختار مولکولی رزین	۹
شکل ۱-۶: واکنش بین بافت خاک و هیدروکربن های آلیفاتیک	۱۳
شکل ۱-۷: مسیر هوازی تجزیه آلکان ها	۱۷
شکل ۱-۸: متابولیسم آلکان های با زنجیره منشعب	۱۸
شکل ۱-۹: مسیر ژنتیکی تجزیه آلکانها	۱۹
شکل ۱- ۱۰: نمای شماتیک از تجزیه آلکان ، موقعیت و عمل محصول ژن های ***alk***	
شکل ۱-۱۱: زنجیره تجزیه زیستی میکروبی	۲۲
شکل ۱-۱۲: دامنه سوبسترایی آلکان هیدروکسیلاز در ارتباط با طول زنجیره آلکانی	۲۶
شکل ۱-۱۳: سیستم انتقال الکترون در آلکان هیدروکسیلاز	۲۷
شکل ۱-۱۴: ساختار آلکان هیدروکسیلاز	۲۸
شکل ۱-۱۵: سازماندهی ژن های ***alk*** در باکتری های مختلف	۲۹
شکل ۱-۱۶ : چرخه واکنش سیتوکروم **P450**	۳۲
شکل ۱-۱۷: تصویر شماتیک ژنوم ***A. bukimensis***	۴۰
شکل ۱-۱۸: شماتیک کلی از مسیرهای متابولیسمی و انتقال در ***A. bukimensis***	۴۱
شکل ۲-۳-۱: نقشه ژنتیکی پلاسمید **pBluescript**	۷۴
شکل ۲-۳-۲: نقشه ژنتیکی پلاسمید **pET-26a**	۷۹
شکل ۲-۴-۱: تصویر شماتیک مزوکازم	۸۵
شکل ۲-۴-۲: تصویر واقعی مزوکازم	۸۶
شکل ۲-۴-۴: مراحل ساخت ژل	۹۷
شکل ۲-۴-۵: مراحل یک واکنش **QRT-PCR**	۱۰۱
شکل ۲-۴-۶: شماتیک طراحی میکروپلیت **QRT-PCR**	۱۰۵
شکل ۳-۱-۱ : تصویر ژل الکتروفورز تکثیر ژن **16S rDNA** جهت شناسایی مولکولی	۱۱۷

عنوان | صفحه

شکل ۳-۱-۲ طیف گاز کروماتوگرافی شاهد ۱۲۳
شکل ۳-۱-۳: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-3 ۱۲۴
شکل ۳-۱-۴: طیف گاز کروماتوگرافی سویه BS ۱۲۴
شکل ۳-۱-۵: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-11 ۱۲۵
شکل ۳-۱-۶: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-24 ۱۲۵
شکل ۳-۱-۷: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-31 ۱۲۶
شکل ۳-۱-۸: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-26 ۱۲۶
شکل ۳-۱-۹: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-39 ۱۲۷
شکل ۳-۱-۱۰: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-12 ۱۲۷
شکل ۳-۱-۱۱: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-20 ۱۲۸
شکل ۳-۱-۱۲: طیف گاز کروماتوگرافی سویه AS ۱۲۸
شکل ۳-۱-۱۳: طیف گاز کروماتوگرافی سویه PG-32 ۱۲۹
شکل ۳-۱-۱۴: طیف گاز کروماتوگرافی سویه CS-2 ۱۲۹
شکل ۳-۱-۱۵: طیف گاز کروماتوگرافی سویه CS-12 ۱۳۰
شکل ۳-۱-۱۶: اثرغلظت های مختلف آلکانها روی میزان رشد چهار سویه باکتریایی ۱۳۵
شکل۳-۱-۱۷: اثر غلظت های مختلف آلکانها روی میزان تنفس چهار سویه باکتریایی ۱۳۶
شکل ۳-۱-۱۸: اثرغلظت های مختلف آلکانه روی تشکیل بیو فیلم چهار سویه باکتریایی ۱۳۷
شکل ۳-۱-۱۹: حذف نفت خام بوسیله سویه ها ۱۳۸
شکل ۳-۱-۲۰: طیف اسپکتروفتومتری حاصل از فعالیت آنزیم آلکان هیدروکسیلاز ۱۴۱
شکل ۳-۱-۲۱: میانگین اثر دما روی تجزیه زیستی نفت ۱۴۳
شکل ۳-۱-۲۲: میانگین اثر منبع نیتروژن روی تجزیه زیستی نفت ۱۴۴
شکل ۳-۱-۲۳: : میانگین اثر سورفکتانت شیمیایی روی تجزیه زیستی نفت ۱۴۵
شکل۳-۱-۲۴: میانگین اثر غلظت نفت روی تجزیه زیستی نفت ۱۴۶
شکل ۳-۱-۲۵: میانگین اثر نوع سویه و کشت مخلوط روی تجزیه زیستی نفت ۱۴۷
شکل ۳-۱-۲۶: میانگین اثر منبع کربن اضافی روی تجزیه زیستی نفت ۱۴۸

عنوان	صفحه
شکل ۳-۱-۲۷: تصویر ژل الکتروفورز PCR سویه‌ها با پرایمرهای گروه (II) آلکان هیدروکسیلاز	۱۵۳
شکل ۳-۱-۲۸: تصویر ژل الکتروفورز PCR سویه‌ها با پرایمرهای گروه (III) آلکان هیدروکسیلاز	۱۵۴
شکل ۳-۱-۲۹: تصویر ژل الکتروفورز PCR سویه‌ها با پرایمرهای گروه (II) و (III) آلکان هیدروکسیلاز	۱۵۵
شکل ۳-۱-۳۰: درصد فراوانی گروه های ژنی(II) و (III) آلکان هیدروکسیلاز در سویه های تجزیه	۱۵۶
شکل ۳-۱-۳۱: فراوانی گروه های ژنی (II) و (III) آلکان هیدروکسیلاز در خلیج فارس و دریای خزر	۱۵۶
شکل ۳-۱-۳۲: تصویر ژل الکتروفورز PCR سویه PG-12 با پرایمرهای آلکان هیدروکسیلاز	۱۵۷
شکل ۳-۱-۳۳: تصویر ژل الکتروفورز PCR سویه PG-12 با پرایمرهای سیتوکروم P450 منواکسیژناز	۱۵۸
شکل۳-۲-۱: طیف گاز کروماتوگرافی رسوبات آلوده به نفت دریای خزر	۱۶۳
شکل ۳-۲-۲: طیف گاز کروماتوگرافی رسوبات غیر آلوده به نفت دریای خزر	۱۶۴
شکل ۳-۲-۳: طیف گاز کروماتوگرافی رسوبات آلوده به نفت خلیج فارس	۱۶۵
شکل ۳-۲-۴: طیف گاز کروماتوگرافی رسوبات غیر آلوده به نفت خلیج فارس	۱۶۶
شکل ۳-۲-۵: تصویر ژل الکتروفورز تکثیر ژن 16S rDNA بر روی DNA استخراج شده میکروکازم ها	۱۶۸
شکل ۳-۲-۶: تصویر ژل DGGE از محصول PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از میکروکازم	۱۷۱
شکل ۳-۲-۷: گراف شاخه ای از شباهت جمعیتی جامعه میکروبی رسوبات	۱۷۴
شکل ۳-۲-۸: گراف دو بعدی از شباهت جمعیتی جامعه میکروبی رسوبات	۱۷۴
شکل ۳-۲-۹: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از میکروکازم	۱۷۶
شکل ۳-۲-۱۰: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از میکروکازم	۱۷۷
شکل ۳-۲-۱۱: ژل الکتروفورز محصول DNA PCR با پرایمرهای ژن *alk-B1* از *Alcanivorax*	۱۷۹