٨٣٠١٠١٠٩٨
٨٣٠٧

١٠٨٠٠٧

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی دکتری رشته‌ی زیست شناسی-میکروبیولوژی

بهینه‌سازی فیزیولوژیکی و ژنتیکی سولفورزدایی از دی‌بنزوتیوفن توسط میکروارگانیسم‌ها

استادان راهنما:

دکتر گیتی امتیازی

دکتر ایرج نحوی

استاد مشاور:

دکتر سید حمید زرکش اصفهانی

پژوهشگر:

زهرا اعتمادی‌فر

تیر ماه ۱۳۸۷

۱۳۸۷/۹/۲۳

۱۰۸۰۰۷

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، 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 نامه‌ی دکتری رشته‌ی زیست شناسی-میکروبیولوژی خانم زهرا اعتمادی‌فر تحت عنوان:

بهینه‌سازی فیزیولوژیکی و ژنتیکی سولفورزدایی از دی‌بنزوتیوفن توسط میکروارگانیسم‌ها

در تاریخ ۱۳۸۷/۰۴/۲۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ...عالی... به تصویب نهایی رسید.

۱- استادان راهنمای پایان نامه: دکتر گیتی امتیازی با مرتبه‌ی علمی استاد امضاء

دکتر ایرج نحوی با مرتبه‌ی علمی استاد امضاء

۲- استاد مشاور پایان نامه: دکتر سید حمید زرکش اصفهانی با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

۳- استادان داور داخل گروه: دکتر رسول روغنیان با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

دکتر مجید بوذری با مرتبه‌ی علمی استادیار امضاء

۴- استادان داور خارج از گروه: دکتر روحا کسری کرمانشاهی با مرتبه‌ی علمی استاد امضاء

دکتر حاجیه قاسمیان صفایی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

امضای مدیر گروه

با سپاس از استاد گرانقدرم

سرکار خانم دکتر گیتی امتیازی

که در تمام مراحل اجرای این تحقیق همواره راهنما و پشتیبان من بوده اند.

تشکر و قدردانی:

امیدوارم بتوانم با کلماتی نه‌چندان کامل، از وجود سراسر دانش و ایمان اساتید فرزانه، سرکار خانم **دکتر گیتی امتیازی، جناب آقای دکتر ایرج نحوی و جناب آقای دکتر حمید زرکش** سپاس‌گزاری نمایم و خدای را شاکر باشم که توفیق بهره‌وری از محضر ایشان را بهره‌ی من ساخت.

خدای را بسیار شکر که توفیق شاگردی اساتید گران‌مایه دانشگاه اصفهان را در طول دوران تحصیل به بنده عطا فرمود؛ بلاخص اساتید برجسته‌ی بخش میکروب‌شناسی جناب آقای **دکتر نحوی**، سرکارخانم **دکتر کرمانشاهی**، سرکار خانم **دکتر امتیازی**، جناب آقای **دکتر گلبانگ**، جناب آقای **دکتر زرکش** جناب آقای **دکتر روغنیان** و جناب آقای **دکتر بوذری**، که در اینجا کمال تقدیر و تشکر را از حضرات عالی دارم.

تشکر ویژه‌ای دارم از سرکار خانم **دکتر صفایی** استاد ارجمند دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و سرکار خانم **دکتر کرمانشاهی**، استاد ارجمند دانشگاه الزهرا تهران، داوران خارج گروه، و جناب آقایان **دکتر روغنیان و دکتر بوذری** که زحمت داوری این پایان‌نامه را تقبل فرمودند. از جناب آقای **دکتر زینی** استاد برجسته‌ی گروه شیمی نیز که به عنوان استاد ناظر در این جلسه تشریف داشتند بسیار سپاسگزارم.

سپاس و تشکر بسیار صمیمانه خود را تقدیم استاد گرامی جناب آقای **دکتر توسلی** به خاطر راهنماییهای ارزنده‌شان و توفیق بهره‌وری از کلاس ایشان را دارم.

از آقای دکتر کمالی صمیمانه تشکر می‌نمایم. همچنین از آقای دکتر ربانی و آقای دکتر امامی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر مشتاقیان جناب آقای دکتر زرکش و جناب آقای دکتر **قادریان** که به عنوان مدیران گروه زیست‌شناسی در طول تحصیل دکتری اینجانب بودند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

از جناب آقای دکتر حبیبی، جناب آقای دکتر محمدپور و جناب آقای دکتر **تنگستانی‌نژاد** که به عنوان رؤسای محترم دانشکده علوم در طول تحصیل دکتری اینجانب بودند، و همچنین از معاونین محترم ایشان کمال تشکر و امتنان را دارم.

از آقای دکتر مبینی، خانم دکتر میرحسینی، خانم دکتر خالقی، خانم مهندس حریرجی، خانم صالح و خانم مهندس قاضی عسگر بسیار سپاسگزارم.

از کارشناسان محترم گروه، همکاران گرامی جناب آقایان **دباغ**، **انتشاری**، **حیدری** و جناب **آقای مردانی** و سرکار خانم‌ها **عباسی**، مهندس **ضویی**، **حکمیان**، مهندس **فروهرفر**، مهندس **کشفی**، **مومن زاده**، مهندس **یاوری**، **محمد زاده**، زرگران، مهندس **حاجیان**، **بلوکی**، **روحانی**، **باقری**، **طاهری** و **قربانی** نیز کمال تشکر و امتنان را دارم.

از خانم **جعفری** و آقای **تیموری** برای تمام زحماتشان تشکر می‌نمایم.

تقدیم به پدر و مادرم گرامی‌ام

به پاس تمام زحمت‌هایشان

تقدیم به همسر عزیزم

به پاس محبت‌ها و همراهی صمیمانه‌اش

و تقدیم به فرزندان دلبندم

مهرنوش و مهسا

چکیده

سوخت‌های حاصل از نفت حاوی انواعی از ترکیبات آلی سولفوردار هستند، که در هنگام سوختن آنها ترکیب سمی سولفور دی‌اکسید تولید، و منجر به ایجاد آلودگی اتمسفر و خاک می‌شود. طی مرحله هیدرودسولفوریزاسیون نفت خام در پالایشگاه برای حذف سولفور، ترکیبات آلی سولفوردار شامل تیوفن‌ها مثل بنزوتیوفن و دی‌بنزوتیوفن (DBT) بدون تغییر باقی می‌مانند؛ ترکیب DBT اغلب به عنوان یک مدل برای جداسازی باکتری‌هایی با قدرت حذف انتخابی سولفور جهت کاربرد در سولفورزدایی از سوخت‌های نفتی و تکمیل پالایش آن استفاده شده است.

اهداف این پایان نامه مشتمل بر جداسازی و بررسی میکروارگانیسم‌های بومی سولفورزدا در ایران، بررسی پروفایل پلاسمیدی آنها، بررسی نقش پلاسمیدهای جدا شده در تجزیه یا گوگردزدایی از DBT، بهینه‌سازی شرایط فیزیولوژیک سولفورزدایی از DBT، مطالعه تنفس و تشکیل بیوفیلم سویه‌های جداسازی شده در محیط حاوی DBT، انتقال پلاسمید سولفورزدایی به سویه‌های HBP-منفی شامل *اشرشیا کلی* و *رودوکوکوس* و ساختن سویه‌های نوترکیب با شرایط بهینه سولفورزدایی بوده است.

برای رسیدن به اهداف فوق، جداسازی میکروارگانیسم‌های سولفورزدا بر محیط استاندارد جداسازی حاوی DBT انجام گرفت. سویه‌های جدا شده به وسیله تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. یکی از باکتری‌های جدا شده که فعالیت بالایی از سولفورزدایی نشان داد، با استفاده از روش‌های مولکولی شامل تهیه پروفایل پروتئینی و تعیین توالی ژن 16S rRNA هم شناسایی گردید. سولفورزدایی از DBT با استفاده از تست گیبس برای بررسی تولید ۲-هیدروکسی‌بی‌فنیل (HBP)، اندازه‌گیری جذب اختصاصی DBT با استفاده از طیف‌سنج UV، و همچنین تکثیر PCR ژن *dsz*C در باکتری جدا شده تعیین گردید. شرایط بهینه سولفورزدایی در باکتری‌ها و مخمر جدا شده، همچنین میزان تنفس و تشکیل بیوفیلم آنها در محیط سولفورزدایی به وسیله سنجش در میکرو پلیت بدست آمد. پلاسمید سنگین با روش تغییر یافته لیز قلیایی جداسازی، و با پاساژهای متوالی بر محیط غنی موتان‌های گیبس منفی از سویه باکتری جدا شده تهیه گردید. پلاسمید طبیعی جدا شده از سویه بومی به سلول‌های مستعد *اشرشیاکلی* و پروتوپلاست‌های *رودوکوکوس* با فنوتیپ Dsz-منفی انتقال داده شد تا سویه نوترکیب *رودوکوکوس* Dsz-مثبت بدست آید. همچنین بخشی از ژن *dsz*C به طول ۴۰۰bp به وسیله PCR تکثیر، و در وکتور pET 28a کلون گردید. پلاسمید کلون شده ابتدا به *اشرشیاکلی* BL21، و پس از تکثیر در این باکتری، به سویه بومی R1 انتقال داده شد.

در میان میکروارگانیسم‌های جداسازی شده یک سویه باکتریایی با توانایی بالای سولفورزدایی از DBT از خاک آلوده به گازوئیل در اصفهان برای مطالعات بعدی انتخاب گردید. این سویه با استفاده از مسیر متابولیکی 4S، سولفورزدایی از DBT را با تولید HBP به عنوان محصول نهایی انجام داد، و جذب اختصاصی مربوط به DBT پس از سه روز در محیط حاوی این باکتری به صفر رسید. سویه فوق به وسیله تست‌های شناسایی مختلف تحت نام *رودوکوکوس اریتروپولیس* سویه R1 شناخته شد. *رودوکوکوس* سویه R1 توانایی سولفورزدایی سریع را در محیط حاوی DBT به عنوان تنها منبع سولفور داشت. شرایط اپتی‌مم سولفورزدایی از DBT به وسیله سنجش در میکرو پلیت

بدست آمد، و نتایج نشان داد که سویه R1 در غلظت‌های بالای DBT رشد نموده، فعالیت متابولیکی خود را حفظ کرده، و تشکیل بیوفیلم هم می‌دهد. بنابراین، سویه فوق می‌تواند برای حذف DBT از محیط‌های مختلف بکار برده شود.

پلاسمیدهای سنگین از سویه R1 جداسازی، و به وسیله الکتروفورز خطی جدا گردید، و با توجه به اینکه در سویه‌های موتان فاقد پلاسمید صفت سولفورزدایی از دست رفت، این پلاسمید مسئول ایجاد فنوتیپ سولفورزدایی در سویه R1 شناخته شد. پلاسمیدهای طبیعی سنگین سویه بومی R1 به وسیله انتقال به واسطه PEG به پروتوپلاست یک سویه Dsz–منفی (*رودوکوکوس اریتروپولیس* ۶۸) سبب تولید یک موتان پایدار سولفورزدا (سویه موتان mut23) گردید. *رودوکوکوس اریتروپولیس* سویه R1 و سویه ترانسفورمه شده *رودوکوکوس* (mut23)، قادر به تجزیه کامل DBT طی سه روز بودند.

مخمر جدا شده، که قادر به مصرف DBT به عنوان تنها منبع سولفور در محیط کشت بود، گونه‌ای از جنس *تریکوسپورون* شناسایی گردید. این بیوکاتالیست علاوه بر حذف DBT، قابلیت حذف ترکیبات سمی فنل و HBP را هم نشان داد.

بیوکاتالیست‌های جداسازی شده در این پایان نامه، همچنین *رودوکوکوس* نوترکیب بدست آمده با توانایی بیشتر برای سولفورزدایی، می‌توانند کاندیداهایی برای سولفورزدایی از نفت خام هیدرودسولفوریزه شده در پالایشگاه محسوب شوند.

کلید واژه‌ها: دی‌بنزوتیوفن، *رودوکوکوس اریتروپولیس*، ژن *dszC*، سولفورزدایی، مخمر

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: تاریخچه ۱

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- اثرات سوء وجود سولفور در نفت ۱

۱-۳- انواع ترکیبات آلی سولفوردار در نفت خام ۲

۱-۴- انواع ترکیبات آلی سولفوردار درزغال سنگ ۴

۱-۵- حذف ترکیبات سولفوردار نفت ۴

۱-۵-۱- روش هیدرودسولفوریزاسیون (HDS) ۴

۱-۵-۲- روش پالایش زیستی ۴

۱-۵-۲-۱- امتیازات فرایندهای زیستی ۵

۱-۵-۳- سولفورزدایی میکروبی نفت ۵

۱-۵-۳-۱- تعریف ۵

۱-۵-۳-۲- تاریخچه سولفورزدایی ۶

۱-۶- مسیرهای متابولیسم ترکیبات آلی سولفوردار ۸

۱-۶-۱- متابولیسم DBT در سویه *رودوکوکوس* IGTS8 (مسیر اکسیداتیو 4S) ۸

۱-۶-۱-۱- مراحل تبدیل DBT به HBP طی مسیر متابولیکی 4S در *رودوکوکوس* IGTS8 ..... ۹

۱-۶-۱-۲- انواع باکتریهای سولفورزدا (مسیر متابولیکی4S) ۱۵

۱-۶-۱-۳- آنالیزژنتیکی اپرون سولفورزدایی (*dsz*) در سویه *رودوکوکوس* IGTS8 ..... ۱۷

۱-۶-۲- مسیر متابولیکی تجزیه زیستی DBT (Kodama pathway) ۲۰

۱-۶-۳- مینرالیزاسیون DBT ۲۳

۱-۶-۴- مسیر بیهوازی جهت حذف سولفور ۲۳

۱-۷- تجزیه DBT توسط قارچها و مخمرها ۲۴

۱-۸- کلونینگ ژنهای *dsz* ۲۵

۱-۸-۱- کلونینگ ژنهای *dsz* در موتانهای dsz^- *رودوکوکوس* ۲۵

۱-۸-۲- انتقال دسته ژنی *dsz* به *اشرشیا کلی* و بیان اپرون *dsz* ۲۶

۱-۸-۳- تعیین فعالیت پروتئین‌های DszABC در سایر باکتریهای گرم منفی ۲۷

۱-۸-۴- اثبات فعالیت *dsz* در حالت نفوذ پایدار به کرموزوم میزبان ۲۹

۱-۸-۵- اصلاح فرآیند سولفورزدایی زیستی با طراحی یک بیوکاتالیست نوترکیب..... ۲۹
۱-۹- معرفی باکتری رودوکوکوس..... ۲۹
۱-۹-۱- خصوصیات و طبقه‌بندی *رودوکوکوس*..... ۳۰
۱-۹-۲- اهمیت *رودوکوکوس*..... ۳۱
۱-۹-۲-۱- برخی کاربردهای *رودوکوکوس* در بیوتکنولوژی محیطی..... ۳۱
۱-۹-۳- تشخیص رودوکوکوس‌ها..... ۳۲
۱-۱۰- تأثیر سورفاکتانت‌ها در سولفورزدایی..... ۳۲
فصل دوم: مواد و روش‌ها..... ۳۴
۲-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده..... ۳۴
۲-۲- نمونه‌ها، مواد شیمیایی، محلول‌ها، بافرها و معرف‌ها ۳۶
۲-۲-۱- نمونه‌های مورد استفاده برای جداسازی..... ۳۶
۲-۲-۲- مواد شیمیایی..... ۳۶
۲-۲-۲-۱- مواد شیمیایی معدنی..... ۳۶
۲-۲-۲-۲- مواد شیمیایی آلی..... ۳۶
۲-۲-۳- محلول‌ها..... ۳۸
۲-۲-۳-۱- محلول ذخیره دی‌بنزوتیوفن..... ۳۸
۲-۲-۳-۲- محلول ذخیره معرف گیبس..... ۳۸
۲-۲-۳-۳- محلول ذخیره ۲-هیدروکسی‌بی‌فنیل (HBP)..... ۳۸
۲-۲-۳-۴- محلول‌های اندازه‌گیری تنفس..... ۳۸
۲-۲-۳-۵- محلول‌های اندازه‌گیری بیوفیلم..... ۳۸
۲-۲-۳-۶- محلول‌های لازم جهت استخراج پلاسمید..... ۳۹
۲-۲-۳-۷- محلول‌های لازم برای استخراج DNA ژنومی..... ۳۹
۲-۲-۳-۸- محلول‌های لازم برای الکتروفورز افقی..... ۳۹
۲-۲-۳-۹- محلول‌های لازم برای SDS-PAGE..... ۴۰
۲-۲-۳-۱۰- محلول‌های مورد استفاده برای PCR ۴۱
۲-۲-۳-۱۱- محلول‌های استفاده شده در استخراج DNA از ژل آگاروز..... ۴۱
۲-۲-۳-۱۲- بافرهای مورد نیاز برای انتقال پلاسمید به پروتوپلاست بواسطه پلی‌اتیلن گلیکول..... ۴۲
۲-۲-۳-۱۳- آنزیم‌های استفاده شده در کلونینگ ژن *dszC*..... ۴۲
۲-۲-۳-۱۴- محلولهای مورد استفاده برای ترانسفورماسیون..... ۴۲

۲-۲-۳-۱۵- معرف برادفورد..... ۴۳
۲-۲-۳-۱۶- بافر فسفات نمکی (PBS)..... ۴۳
۲-۲-۳-۱۷- تهیه محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز افقی..... ۴۳
۲-۲-۳-۱۸- تهیه محلول استوک تتراسیکلین..... ۴۳
۲-۲-۴- محیط‌های کشت باکتریایی..... ۴۴
۲-۲-۴-۱- محیط پایه نمکی (BSM)..... ۴۴
۲-۲-۴-۲- محیط کشت لوریا برتانی برات (LB)..... ۴۴
۲-۲-۴-۳- محیط کشت لوریا برتانی آگار (LA)..... ۴۴
۲-۲-۴-۴- محیط کشت NBYE broth..... ۴۴
۲-۲-۴-۵- محیط کشت NBYE agar..... ۴۴
۲-۲-۴-۶- محیط کشت LBSG..... ۴۵
۲-۲-۴-۷- محیط کشت بازیابی پروتوپلاست..... ۴۵
۲-۲-۴-۸- محیط نگهداری باکتریهای سولفورزدا در یخچال (RM)..... ۴۵
۲-۲-۴-۹- محیط نگهداری باکتریهای سولفورزدا در فریزر..... ۴۶
۲-۲-۴-۱۰- محیط کشت نوترینت آگار و نوترینت برات..... ۴۶
۲-۲-۴-۱۱- محیط مالت آگار..... ۴۶
۲-۲-۴-۱۲- محیط مایع غنی از نیتروژن برای مخمر..... ۴۶
۲-۲-۴-۱۳- محیط کشت سابورو برات..... ۴۷
۲-۲-۴-۱۴- محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار..... ۴۷
۲-۲-۵- باکتریهای مورد استفاده..... ۴۷
۲-۲-۵-۱- باکتریهای استاندارد شناسایی شده..... ۴۷
۲-۲-۵-۲- میکروارگانیسم‌های جداسازی شده..... ۴۷
۲-۲-۶- پلاسمیدهای استفاده شده..... ۴۷
۲-۳- روش‌ها..... ۴۸
۲-۳-۱- جداسازی باکتری‌های سولفورزدا و تجزیه‌کننده DBT..... ۴۸
۲-۳-۱-۱- جداسازی باکتریهای سولفورزدا با غنی‌سازی از خاک..... ۴۸
۲-۳-۱-۲- جداسازی باکتریهای تجزیه کننده (دگراداتیو) DBT از خاک..... ۴۸
۲-۳-۱-۳- جداسازی از نفت و گازوئیل..... ۴۸
۲-۳-۱-۴- نگهداری سویه‌های میکروبی جداسازی شده..... ۴۹

۲-۳-۲- شناسایی باکتری‌ها..... ۴۹
۲-۳-۲-۱- صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی..... ۴۹
۲-۳-۲-۲- صفات بیوشیمیایی..... ۴۹
۲-۳-۲-۳- تهیه نیمرخ پروتئین‌ها..... ۵۲
۲-۳-۲-۴- شناسایی ملکولی با تعیین توالی 16S rDNA..... ۵۶
۲-۳-۲-۴-۱- PCR ژن 16S rDNA..... ۵۶
۲-۳-۲-۴-۲- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز..... ۵۷
۲-۳-۲-۴-۳- تکثیر زیاد ژن 16S rRNA و استخراج محصول PCR از ژل آگاروز..... ۵۷
۲-۳-۲-۴-۴- تعیین غلظت DNA استخراج شده از ژل آگاروز..... ۵۸
۲-۳-۲-۴-۵- تعیین توالی 16S rDNA..... ۵۸
۲-۳-۳- شناسایی مخمر مصرف کننده دی‌بنزوتیوفن..... ۵۸
۲-۳-۴- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی *رودوکوکوس*..... ۵۹
۲-۳-۵- بررسی رشد و سولفورزدایی..... ۵۹
۲-۳-۵-۱- رشد در محیط حاوی DBT..... ۵۹
۲-۳-۵-۲- اندازه‌گیری رشد و تهیه منحنی رشد..... ۵۹
۲-۳-۵-۳- بررسی تجزیه DBT با اندازه‌گیری طیف جذبی و تهیه منحنی استاندارد DBT..... ۵۹
۲-۳-۵-۴- بررسی اکسیداسیون DBT و تولید HBP..... ۶۰
۲-۳-۵-۵- بررسی تغییرات pH در طی سولفورزدایی..... ۶۱
۲-۳-۵-۶- بررسی اثر مهاری HBP بر سولفورزدایی DBT..... ۶۱
۲-۳-۵-۷- بررسی اثر سورفاکتانت در سولفورزدایی DBT..... ۶۲
۲-۳-۶- بررسی برخی صفات فیزیولوژیک با روش سنجش در میکروتیتر پلیت..... ۶۲
۲-۳-۶-۱- آماده‌سازی کشت میکروبی..... ۶۲
۲-۳-۶-۲- رشد در منابع کربنی مختلف در حضور DBT و تولید HBP..... ۶۲
۲-۳-۶-۳- تنفس در حضور DBT..... ۶۳
۲-۳-۶-۴- رشد، تنفس و تولید HBP در غلظت‌های مختلف DBT..... ۶۳
۲-۳-۶-۵- رشد و تنفس در غلظت‌های مختلف HBP و غلظت‌های مختلف سولفات در حضور DBT یا گوگرد معدنی..... ۶۴
۲-۳-۶-۶- تشکیل بیوفیلم در محیط‌های کشت مختلف حاوی DBT..... ۶۴
۲-۳-۶-۷- بررسی رشد در حلالهای مختلف..... ۶۵

۲-۳-۷- بررسی سولفورزدایی از DBT بوسیله بیومس و تعیین فعالیت اختصاصی..... ۶۵
۲-۳-۸- بررسی تجزیه (دگراداسیون) DBT توسط باکتریهای جدا شده ۶۵
۲-۳-۸-۱ بررسی هاله شفاف تجزیه DBT ۶۶
۲-۳-۹- بررسی آنزیم‌های DszABC در سویه R1 و مقایسه با موتان 49mut ۶۶
۲-۳-۹-۱- آماده سازی عصاره آنزیمی فاقد سلول..... ۶۶
۲-۳-۹-۲- بررسی باندهای پروتئینی مربوط به پروتئین‌های Dsz ۶۶
۲-۳-۱۰- بررسی بیوترانسفورماسیون HBP توسط مخمر تریکوسپورون..... ۶۷
۲-۳-۱۱- جداسازی موتان‌های گیبس منفی از سویه رودوکوکوس R1 گیبس مثبت..... ۶۷
۲-۳-۱۲- روش استخراج DNA ژنومی از رودوکوکوس..... ۶۸
۲-۳-۱۲-۱- استخراج با جوشاندن..... ۶۸
۲-۳-۱۲-۲- استخراج با فنل..... ۶۸
۲-۳-۱۲-۳- تعیین غلظت DNA و میزان خلوص آن..... ۶۸
۲-۳-۱۳- اثبات مسیر متابولیک 4S با تکثیر ژن *dszC* با روش PCR ۶۹
۲-۳-۱۳-۱- روش کلنی-PCR..... ۷۰
۲-۳-۱۴- الکتروفورز افقی ژل آگاروز..... ۷۰
۲-۳-۱۵- جداسازی پلاسمید با لیز قلیایی مخصوص پلاسمیدهای سبک و سنگین..... ۷۰
۲-۳-۱۶- انتقال پلاسمید pDsz از سویه بومی R1 به باکتری مستعد *اشرشیا کلی*..... ۷۱
۲-۳-۱۶-۱- تهیه سلول‌های مستعد *اشرشیا کلی* BL21 ..... ۷۲
۲-۳-۱۶-۲- انتقال پلاسمید به درون باکتری مستعد (ترانسفورماسیون)..... ۷۲
۲-۳-۱۶-۳- اثبات ورود ژن *dsz* یا پلاسمید R1 به *اشرشیا کلی*..... ۷۳
۲-۳-۱۷- انتقال پلاسمید pDsz به *رودوکوکوس* گیبس منفی با ترانسفورماسیون پروتوپلاست بواسطه پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)..... ۷۳
۲-۳-۱۷-۱- روش تهیه پروتوپلاست و ترانسفورماسیون پروتوپلاست بواسطه PEG ۷۳
۲-۳-۱۷-۲- تعیین درصد تشکیل پروتوپلاست..... ۷۴
۲-۳-۱۷-۳- بررسی سولفورزدایی توسط سویه موتان ترانسفورمه..... ۷۴
۲-۳-۱۸- کلونینگ ژن *dszC* و انتقال به *اشرشیا کلی* BL21 با وکتور pET 28a و ساختن پلاسمید pET dszC ۷۴
۲-۳-۱۸-۱- طراحی پرایمرها و تکثیر ژن *dszC* با پرایمرهای طراحی شده برای آنزیم محدودالاثر..... ۷۴
۲-۳-۱۸-۲- الکتروفورز DNA تکثیر شده..... ۷۵

۲-۳-۱۸-۳- استخراج محصول PCR از ژل آگاروز با استفاده از کیت استخراج DNA ۷۵
۲-۳-۱۸-۴- برش توأم آنزیمی محصول PCR و وکتور pET 28a توسط آنزیم‌ها..... ۷۶
۲-۳-۱۸-۵- اتصال (ligation) قطعه تکثیر یافته با پلاسمید وکتور pET 28a..... ۷۶
۲-۳-۱۸-۶- انتقال پلاسمید ligate شده به سلول‌های competent *اشرشیا کلی* BL21 ..... ۷۷
۲-۳-۱۸-۷- کلنی-PCR از کلون‌های رشد یافته در آنتی‌بیوتیک کانامایسین..... ۷۷
۲-۳-۱۸-۸- استخراج پلاسمید از کلون‌های دارای ژن *dszC* با روش .midipreparation و انجام PCR مجدد ژن *dszC* ۷۷
۲-۳-۱۸-۹- انتقال پلاسمید کلون یافته به *رودوکوکوس* سویه R1 با روش ترانسفورماسیون پروتوپلاست... ۷۸
۲-۳-۱۹- آنالیز آماری نتایج..... ۷۹
فصل سوم: نتایج ۸۰
۳-۱- جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات سویه‌های دسولفوریزه کننده دی‌بنزوتیوفن (DBT)..... ۸۲
۳-۱-۱- جداسازی و خالص سازی سویه‌های تجزیه کننده DBT..... ۸۲
۳-۱-۲- حذف DBT از محیط کشت..... ۸۲
۳-۱-۳- بررسی ایجاد هاله شفاف در محیط کشت DBT..... ۸۵
۳-۱-۴- مصرف یا حذف DBT از محیط کشت به عنوان تنها منبع سولفور و کربن..... ۸۵
۳-۱-۵- برخی خصوصیات سویه‌های میکروبی جداسازی شده ۸۶
۳-۱-۶- شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده ۸۷
۳-۱-۶-۱- خصوصیات فنوتیپیک..... ۸۷
۳-۱-۶-۲- بررسی صفات میکروسکوپی..... ۸۸
۳-۱-۶-۳- بررسی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژی..... ۹۲
۳-۱-۶-۴- بررسی پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه R1 و برخی رودوکوکوس‌ها..... ۹۴
۳-۱-۷- شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده R1 ..... ۹۷
۳-۱-۷-۱- تهیه پروفایل پروتئینی..... ۹۷
۳-۱-۷-۲- تشخیص مولکولی با تعیین توالی 16S rDNA..... ۹۸
۳-۲- بررسی صفات رشد و سولفورزدایی DBT توسط سویه R1..... ۱۰۲
۳-۲-۱- رشد بر DBT به عنوان تنها منبع سولفور و حذف DBT..... ۱۰۲
۳-۲-۲- بررسی utilization یا مصرف DBT به عنوان تنها منبع کربن و سولفور..... ۱۰۳
۳-۲-۳- بررسی القایی بودن فعالیت سولفورزدایی DBT..... ۱۰۴
۳-۲-۴- بررسی اثر غلظت DBT در مهار سولفورزدایی..... ۱۰۶

۳-۲-۵- بررسی تأثیر HBP بر مهار رشد و سولفورزدایی..... ۱۰۸
۳-۲-۶- تعیین سرعت واکنش و فعالیت اختصاصی سولفورزدایی..... ۱۱۰
۳-۲-۷- بررسی اثر سورفاکتانت بر سولفورزدایی از DBT..... ۱۱۰
۳-۳- بررسی برخی صفات فیزیولوژیک سویه R1 با روش سنجش در میکروتیتر پلیت ۱۱۲
۳-۳-۱- رشد، سولفورزدایی و تنفس در حضور DBT در منابع کربنی مختلف..... ۱۱۲
۳-۳-۲- رشد، سولفورزدایی و تنفس در غلظت‌های مختلف DBT..... ۱۱۴
۳-۳-۳- رشد و سولفورزدایی از DBT در مقادیر مختلف pH ۱۱۷
۳-۳-۴- رشد و تنفس در غلظت‌های مختلف HBP..... ۱۱۸
۳-۳-۵- تشکیل بیوفیلم توسط سویه R1 در شرایط متفاوت..... ۱۲۰
۳-۳-۶- رشد در برخی حلالها در حضور DBT ۱۲۲
۳-۴- نتایج سولفورزدایی از DBT توسط مخمر *تریکوسپورون* .sp..... ۱۲۳
۳-۴-۱- جداسازی و شناسایی مخمر مصرف کننده DBT و فنل..... ۱۲۳
۳-۴-۲- بررسی مصرف DBT ۱۲۴
۳-۴-۳- تاثیر بیومس مخمر و عصاره سلولی آن بر حذف DBT ۱۲۵
۳-۴-۴- تاثیر افزودن نمک طعام بر کاهش DBT ۱۲۷
۳-۴-۵- بیوترانسفورماسیون HBP بوسیله مخمر *تریکوسپورون*..... ۱۲۷
۳-۴-۶- نتایج حاصل از آزمایشات میکروتیتر *تریکوسپورون* در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت..... ۱۳۰
۳-۴-۶-۱- رشد، تنفس و تشکیل بیوفیلم در منابع کربنی مختلف..... ۱۳۰
۳-۴-۶-۲- رشد، تنفس و تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های مختلف DBT..... ۱۳۱
۳-۴-۶-۳- رشد و تنفس در غلظت های مختلف HBP و سولفات..... ۱۳۲
۳-۴-۶-۴- رشد و تنفس در مقادیر مختلف pH..... ۱۳۴
۳-۴-۶-۵- رشد در حلال‌های مختلف..... ۱۳۵
۳-۵- نتایج آزمایشات مولکولی و تهیه موتان‌ها..... ۱۳۶
۳-۵-۱- استخراج DNA ژنومی از باکتریها..... ۱۳۶
۳-۵-۲- استخراج پلاسمید..... ۱۳۸
۳-۵-۳- تکثیر ژن *dszC* (*soxC*) از دسته ژنی مسئول سولفورزدایی..... ۱۴۰
۳-۵-۴- Colony-PCR..... ۱۴۱
۳-۵-۵- تهیه موتان با فنوتیپ Dsz negative از *رودوکوکوس* سویه R1 و بررسی برخی صفات آن..... ۱۴۲
۳-۵-۵-۱- جداسازی موتان Dsz^- از سویه R1 *رودوکوکوس* و اثبات فنوتیپ گیبس منفی ۱۴۲

۳-۵-۵-۲- رشد سویه موتان گیبس منفی در حضور 2-HBP ۱۴۴
۳-۵-۵-۳- رشد در حضور DBT ۱۴۶
۳-۵-۵-۴- بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه موتان 49mut ۱۴۶
۳-۵-۶- انتقال پلاسمید سولفورزدایی (pDsz) از سویه R1 به *اشرشیاکلی* BL21 مستعد ۱۴۸
۳-۵-۷- انتقال پلاسمید سولفورزدایی (pDsz) از سویه R1 به پروتوپلاست *رودوکوکوس* گیبس منفی (Dsz^-) بواسطه پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) ۱۴۹
۳-۵-۷-۱- بررسی سولفورزدایی از DBT توسط سویه موتان mut23 ..... ۱۵۱
۳-۵-۷-۲- بررسی رشد در منابع مختلف کربنی در سویه‌های وحشی و ترانسفورمه با میکروتیتر پلیت ۱۵۲
۳-۵-۷-۳- بررسی رشد سویه‌های وحشی و ترانسفورمه در غلظت‌های مختلف DBT با میکروتیتر پلیت ۱۵۳
۳-۵-۸- انتقال ژن *dszC* به *اشرشیا کلی* BL21 توسط وکتور pET 28a ۱۵۵
۳-۵-۸-۱- تکثیر ژن *dszC* با پرایمرهای طراحی شده با جایگاه آنزیمی و استخراج از ژل آگاروز و برش آنزیمی ۱۵۵
۳-۵-۸-۲- برش آنزیمی وکتور و استخراج از ژل آگاروز ۱۵۶
۳-۵-۸-۳- اتصال (ligation) قطعه تکثیر یافته ژن *dszC* با پلاسمید وکتور pET 28a ۱۵۷
۳-۵-۸-۴- انتقال پلاسمید pETdszC به سلولهای مستعد BL21 ..... ۱۵۷
۳-۵-۸-۵- تأیید ترانسفورماسیون و ایجاد پلاسمید کلون یافته pETdszC ۱۵۸
۳-۵-۹- انتقال پلاسمید کلون یافته pETdszC به سویه R1 ..... ۱۶۳
۳-۵-۹-۱- تأیید ترانسفورماسیون در سویه موتان mut1 ..... ۱۶۴
۳-۵-۹-۲- بررسی رشد و سولفورزدایی DBT توسط *رودوکوکوس* سویه موتان mut1 ..... ۱۶۵
فصل چهارم: بحث ۱۶۷
۴-۱- جداسازی میکروارگانیسم‌های سولفورزدا ۱۶۸
۴-۲- شناسایی میکروارگانیسم‌های سولفورزدا ۱۶۸
۴-۳- رشد و مسیر متابولیکی سولفورزدایی ۱۷۰
۴-۴- فعالیت اختصاصی سولفورزدایی ۱۷۱
۴-۵- مهار سولفورزدایی ۱۷۲
۴-۶- برخی عوامل فیزیولوژیک مؤثر بر رشد و سولفورزدایی ۱۷۳
۴-۶-۱- تأثیر منابع کربنی ۱۷۳
۴-۶-۲-تأثیر غلظت DBT ۱۷۵

۴-۶-۳- تأثیر سورفاکتانت..... ۱۷۶
۴-۶-۴- تأثیر مقدار pH ۱۷۷
۴-۶-۵- تأثیر غلظت HBP بر رشد و فعالیت متابولیکی..... ۱۷۸
۴-۶-۶- تشکیل بیوفیلم در سویه R1 ..... ۱۷۸
۴-۶-۷- تحمل حلالها ۱۷۹
۴-۷- حذف DBT توسط مخمر *تریکوسپورون* .sp و فیزیولوژی آن..... ۱۷۹
۴-۸- مطالعات ژنتیکی رودوکوکوس..... ۱۸۱
۴-۸-۱- بررسی پلاسمید سنگین..... ۱۸۱
۴-۸-۲- بررسی ژن *dszC* مربوط به سولفورزدایی ۱۸۳
۴-۸-۳- بررسی موتان‌های Dsz^-..... ۱۸۴
۴-۸-۴- ترانسفورماسیون پلاسمید pDsz به سایر سویه‌ها..... ۱۸۴
۴-۸-۴-۱- ترانسفورماسیون پلاسمید pDsz به *اشرشیا کلی*..... ۱۸۴
۴-۸-۴-۲- ترانسفورماسیون پلاسمید pDsz به *رودوکوکوس*..... ۱۸۵
۴-۸-۵- کلونینگ ژن *dszC* ۱۸۷
نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات..... ۱۸۸
پیوست ۱: نتایج برخی آزمایشات انجام شده بر رودوکوکوس‌ها..... ۱۸۹
منابع و مآخذ..... ۱۹۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: انواع ترکیبات سولفوردار موجود در سوختهای فسیلی..... ۳

شکل ۱-۲: سیر پیشرفت سولفورزدایی در دهه ۹۰..... ۷

شکل ۱-۳: مسیر 4S در سولفورزدایی DBT توسط *رودوکوکوس* IGTS8 HPBS..... ۱۰

شکل ۱-۴: تبدیل DBT به DBTO2 توسط آنزیم DszC طی دومرحله..... ۱۱

شکل ۱-۵: مکانیسم تبدیل DBTO2 به $HBPSi^-$ در سویه *رودوکوکوس* IGTS8..... ۱۳

شکل ۱-۶: مسیر پیشنهادی برای سولفورزدایی DBT به دی‌هیدروکسی بی‌فنیل (DHBP) ۱۴

شکل ۱-۷: تبدیل $HBPSi^-$ به HBP توسط آنزیم DszB..... ۱۴

شکل ۱-۸: مسیر متابولیکی 4S و نقش پروتئین DszD در فعالیت آنزیم‌های منواکسیژناز ۱۵

شکل ۱-۹: سازماندهی اپرون dszABC در *رودوکوکوس* IGTS8 ..... ۱۷

شکل ۱-۱۰: اپرون سولفورزدایی و نقشه آنزیمی آن..... ۱۸

شکل ۱-۱۱: تأثیر منابع سولفور بر بیان پروتئین‌های سولفورزدایی..... ۱۹

شکل ۱-۱۲: مسیر متابولیکی کوداما برای تجزیه DBT بوسیله *پسودوموناس* سویه DDC 279..... ۲۲

شکل ۱-۱۳: مینرالیزاسیون DBT بوسیله *بروی‌باکتریوم* سویه DO..... ۲۴

شکل ۱-۱۴: ساختن سری پلاسمیدهای pESOX ۲۸

شکل ۲-۱: نمودار استاندارد DBT..... ۶۰

شکل ۲-۲: منحنی استاندارد HBP ۶۱

شکل ۳-۱: کاهش جذب UV در طول موج ۳۲۳/۸nm با استخراج محیط اسیدی شده ۸۴

شکل ۳-۲: بررسی تشکیل هاله شفاف در BSM حاوی DBT ۳ mM..... ۸۵

شکل ۳-۳ : مورفولوژی و واکنش گرم باکتری‌ها..... ۸۹

شکل ۳-۴ : رنگ آمیزی زیل-نلسون بوسیله اسید سولفوریک یک درصد ۹۰

شکل ۳-۵: بررسی تغییر مورفولوژی سلول در سیکل سلولی سویه R1 با رنگ‌آمیزی گرم..... ۹۱

شکل ۳-۶: پروفایل پروتئینی SDS-PAGE سویه‌های *رودوکوکوس*..... ۹۷

شکل ۳-۷: تکثیر ژن 16S rRNA سویه R1 با روش PCR..... ۹۸

شکل ۳-۸: قطعه DNA تکثیر شده و استخراج یافته از ژل آگاروز..... ۹۹

شکل ۳-۹: توالی قطعه تکثیریافته 16S rRNA مربوط به سویه R1..... ۱۰۰

شکل ۳-۱۰: بررسی هومولوژی ۴۵۴bp از توالی ژن 16S rRNA سویه R1 ..... ۱۰۰