بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين
انعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

همه امتیازات این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سیناتعلق دارد. در صورت استفاده ازتمام یا بخشی از مطالب پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا (یا استاد یا اساتید راهنمای پایان‌نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

پایان‌نامه:
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی باکتری‌های گرمادوست جدا شده از چشمه‌های آب گرم بر اساس توالی ژنی 16 SrRNA و امکان سنجی تولید آنزیم سلولاز در آنها

استاد راهنما:
دکتر علی دلجو

اساتید مشاور:
دکتر غلامرضا صالحی جوزانی
دکتر مهدی رهایی

پژوهشگر:
زهرا رحم‌جو

تابستان ۱۳۸۹

تابستان ۱۳۸۹

دانشکدهٔ کشاورزی

با نام و یاری خداوند متعال

پایان نامهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی

تحت عنوان

به ارزش ۶ واحد در تاریخ ..... و در محل ..... با حضور جمعی از اساتید و دانشجویان برگزار گردید و با نمرهٔ ..... و درجهٔ..... به تصویب کمیتهٔ تخصصی زیر رسید.

۱- استاد راهنما: امضاء

۲- اساتید مشاور: امضاء

امضاء

۳- اساتید داور: امضاء

امضاء

۴- مدیر گروه: امضاء

۵- سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده

امضاء

تقدیم

به پدر بزرگوار و دلسوزم

و مادر مهربان و فداکارم

که سرچشمه هرچه پاکی، خلوص،

از خودگذشتگی و عشق

را در وجود نازنین ایشان می باید جست.

و تقدیم به

خواهر و برادر

همراهان همیشگی لحظه های شادی و اندوهم.

تشکر و قدردانی

ستایش و سپاس، خالق هستی که علم را مایه مباهات بشر قرار داد و بر این بنده کمترین، منت گذارده، تائیداتش همواره هادی و راهنمایم بوده است. اکنون که به لطف و یاری خداوند متعال، مراحل نگارش و تدوین پایان نامه به اتمام رسیده است لازم می‌دانم مراتب امتنان و قدردانی فراوان خویش را تقدیم سرورانی نمایم که ارائه اثر حاضر مرهون مساعدت های بی شائبه آنان بوده است.

قبل از همه از پدر و مادر عزیزم که در تمامی مراحل زندگی و تحصیل، مشوق من بودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از اساتید فرزانه و اندیشمند، جناب آقای دکتر علی دلجو که زحمت راهنمایی پایان نامه را بر عهده داشتند و با نظرات ارزشمند و مساعدت های بی دریغ خودشان، راه گشای تحقیق حاضر شدند، نهایت امتنان و تشکر را دارم.

از اساتید مشاور ارجمند آقایان دکتر صالحی و رهایی که زحمت مشاوره پایان نامه را بر عهده داشتند و با همکاری صادقانه و نظرات سازنده خویش، باعث غنی تر شدن هر چه بیشتر پژوهش حاضر گردیدند، تشکر و قدردانی می‌کنم.

از جناب آقای دکتر پیری و سرکار خانم دکتر سنبل ناظری و سرکار خانم کیهان‌فرکه افتخار شاگردیشان را در طول دوران تحصیل داشتم، تشکر و قدردانی می‌کنم.

از جناب آقای دکتر هوشنگ علیزاده که با همکاری‌های بی منتشان باعث تکمیل شدن تحقیق حاضر گشتند، تشکر و قدردانی می‌کنم.

از سرکار خانم استاد احمدی مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی به خاطر کمک ها و همکاری-های بدریغ شان، تشکر و قدردانی می‌کنم.

از دوستان و همکاسی‌های مهربانم خانم ها فلاح، نیکنام، فریدونی، بدر حداد، سلیمانی، ، حاجیان و آقایان اسکندری، رفیع پور و رمضانی زاده و دوستانم در ورودی کارشناسی ارشد ۸۷ که در طول دوران کارشناسی ارشد یاری گر بنده بودند، بی نهایت سپاسگزارم.

در نهایت سعادت و موفقیت روز افزون این عزیزان را از خداوند متعال خواهانم.

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/ پایان نامه تحصیلی

عنوان

: بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی باکتری‌های گرمادوست جدا شده از چشمه‌های آب گرم بر اساس توالی ژنی 16 SrRNA و امکان سنجی تولید آنزیم سلولاز در آن‌ها

نویسنده: زهرا رحم جو

استاد راهنما: دکتر علی دلجو

اساتید مشاور: غلامرضا صالحی جوزانی، مهدی رهایی

دانشکده: کشاورزی	**گروه آموزشی: بیوتکنولوژی**	
رشته تحصیلی: بیتکنولوژی	**گرایش تحصیلی:کشاورزی**	**مقطع تحصیلی: فوق لیسانس**
تاریخ تصویب: ۱۳۸۷/۵/۱	**تاریخ دفاع:۱۳۸۹/۴/۱۳**	**تعداد صفحات: ۸۲**

چکیده

تنش‌های شیمیایی و فیزیکی موجود در چشمه‌های آب گرم موجب جداسازی جامعه باکتری‌های وابسته به آن شده است. هدف از انجام این تحقیق جداسازی، شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های باکتری‌های گرمادوست از یکی از چشمه‌های آب گرم ایران و همچنین بررسی بعضی از خصوصیات فنوتیپی و توانایی تولید آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز در آن‌ها بود.بدین منظور ۳ جدایه باکتری از چشمه آب گرم قینرجه واقع در استان آذربایجان شرقی بدست آمده و DNA آن‌ها جداسازی شد و برای تکثیر ژن 16SrRNA از آغازگرهای جهانی (۱۴۹R و ۲۷f) استفاده شد. محصولات تکثیر شده توالی یابی شدند و در پایگاه های اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم افزار BLAST مورد جستجو قرار گرفتند و نزدیکترین توالی‌هایی که بیشترین شباهت را داشتند نمایش داده شدند. درخت فیلوژنی به روش نیبرجوینینگ و با استفاده از نرم افزار وگاوسایت BIBI ترسیم شد. جدایه‌های باکتری از نظر تولید آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز بررسی شدند و pH و دمای مناسب برای فعالیت آنزیم‌های تولید شده تعیین شد. نتایج حاصل شباهت ۹۹٪ دو سویه گونه *Bacillus licheniformis* و با جنس *Anoxybacillus* را نشان داد. هر دو آنزیم تولیدی برون سلولی بودند. دو جدایه AZ_2 و Q تولید آلفا آمیلاز زیادی داشتند. بهینه فعالیت دمایی آن‌ها در دما و pH به ترتیب در محدوده ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد و بهینه برابر۷ مشخص گردید. جدایه AZ_1 نیز تولید سلولاز خوبی داشت و بهینه فعالیت دمایی آن ۶۵ درجه سانتی‌گراد و pH برای آن معادل ۷/۵ بود.

کلمات کلیدی: چشمه‌های آب گرم، ژن 16SrRNA، NCBI، BLAST ، *Bacillus licheniformis*، *Anoxybacillus*

فهرست مطالب صفحه

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۲- انواع میکروارگانیسم-های گرمادوست ٤

۱-۲-۱- باسیلهای گرمادوست ٤

۱-۳- معرفی جنس باسیلوس ٤

۱-۳-۱- جنس *Anoxybacillus* ٦

۱-۳-۲- گونه *Bacillus licheniformis* ٦

۱-۴- ساختار غشاء سلولی و دیواره سلولی در باکتریهای گرمادوست: ۷

۱-۵- مکانیسم مقاومت به گرما در گرمادوست ۷

۱-۶- کاربردهای بیولوژیکی و صنعتی گرمادوستها ۱۰

۱-۷- آنزیمهای گرمادوست ۱۱

۱-۸- آنزیم آمیلاز ۱۱

۱-۸-۱- چشم اندازی از آلفا آمیلازهای میکروبی ۱۲

۱-۸-۲- کاربرد آمیلازها در بیوتکنولوژی ۱٤

۱-۹- سلولازها ۱۵

۱-۹-۱- چشم اندازی بر سلولازهای میکروبی ۱۷

۱-۹-۲- کاربردهای سلولاز در بیوتکنولوژی ۱۸

۱-۱۰- جداسازی باسیلهای گرمادوست ۱۹

۱-۱۱- روشهای شناسایی باکتری ۲۰

۱-۱۱-۱- روشهای شناسایی فنوتیپی ۲۰

۱-۱۱-۲- روشهای شناسایی مولکولی ۲۱

۱-۱۱-۳- ژن 16 Sr RNA و اهمیت آن در مطالعات فیلوژنتیکی ۲۳

۱-۱۲- بررسی های فیلوژنتیکی ۲٤

۱-۱۳:معرفی بانک اطلاعاتی مخصوص باکتری ۲۵

۱-۱۴- پژوهشهای مبتنی بر جداسازی و شناسایی باکتریهای گرمادوست از چشمه های آب گرم ۲٦

۲-۱- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه های باکتری ۲۹

۲-۲- خالص‌سازی ایزوله‌ها ۳۰

۲-۳- نگهداری ایزوله‌ها ۳۰

۲-۴ - محیط کشت مورد استفاده در جداسازی اولیه و شناسایی ایزوله‌ها ۳۰

۲-٤-۱- محیط کشت نوترینت آگار ۳۰

۲-۵- آزمون پتریدیش ۳۱

۲-۵-۱- آزمون پتریدیش سلولاز ۳۱

۲-۵-۲- آزمون پتریدیش آمیلاز ۳۱

۲-۶- آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی ایزوله‌ها ۳۲

۲-۷- استخراج DNA ژنومی ۳۲

۲-۷-۱- رشد ایزوله‌ها جهت آماده‌سازی برای استخراج DNA ۳۲

۲-۷-۲- استخراج DNA به روش اسوبل و همکاران (۲۰۰۲) ۳۲

۲-۷-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۳۳
۲-۸- بهینه‌سازی PCR برای تکثیر ۳٤
۲-۸-۱- پرایمرها ۳۵
۲-۸-۲- dNTPs ۳٦
۲-۸-۳- کلرید منیزیم $MgCl_2$ ۳٦
۲-۸-٤- بافر PCR (۱۰ برابر) ۳٦
۲-۸-۵- آنزیم Taq DNA polymerase ۳٦
۲-۹- الکتروفورز محصولات PCR ۳٦
۲-۱۰- توالی‌یابی محصولات PCR ۳۷
۲-۱۰-۱- مشاهده توالی‌ها و کروماتوگرام‌های مربوط به آنها ۳۷
۲-۱۰-۲- مقایسه توالی‌ها و رسم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن 16s rRNA ۳۷
۲-۱۱- الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌آکریل‌آمید ۳۹
۲-۱۱-۱- محلول پایه آکریل‌آمید ۳۰ درصد و متیلن‌بیس آکریل‌آمید ۰/۸ درصد ۳۹
۲-۱۱-۲- بافرژل جداکننده (Tris-Hcl ۱/۵ مولار، pH ۸/۸) ۳۹
۲-۱۱-۳- بافر ژل متراکم‌کننده (Tris-Hcl ۱/۵ مولار، pH ٦/۸) ۳۹
۲-۱۱-٤- بافر الکترود ٤۰
۲-۱۱-۵- بافرنمونه ٤۰
۲-۱۱-٦- تهیه ژل جداکننده ۱۲ درصد ٤۰
۲-۱۱-۷- تهیه ژل متراکم‌کننده ۵ درصد ٤۰
۲-۱۱-۸- آماده کردن نمونه‌ها جهت الکتروفورز ٤۰
۲-۱۱-۹- الکتروفورز و ردیابی و ظهور باندها به روش استنلی و مالوی ٤۱
۲-۱۲- سنجش فعالیت آنزیمی ٤۱
۲-۱۲-۱- رسم منحنی استاندارد گلوکز ٤۱
۲-۱۲-۲- رسم منحنی استاندارد نشاسته ٤۲
۲-۱۲-۳-سنجش فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز ٤۳
۲-۱۳- آزمون ژل زیموگرام آنزیم آمیلاز ٤۳
۲-۱٤- مواد و محلول‌های مورد استفاده در مطالعات مولکولی ٤٤
۲-۱٤-۱- محلول یک مولار Tris HCl pH 8.0 ..... ٤٤
۲-۱٤-۲- محلول ۰/۵ مولار EDTA ٤٤
۲-۱٤-۳- محلول کلریدسدیم ۵ مولار ٤٤
۲-۱٤-٤ تهیه محلول فنول با بافر TE ٤٤
۲-۱٤-۵- تهیه بافر TAE (۵ X) ٤۵
۲-۱٤-٦- تهیه بافر TBE (۵ x) ٤۵
۲-۱٤-۷- تهیه بافر نمونه‌گذاری (برای استفاده در ژل آگارز) ٤۵
۲-۱٤-۸- تهیه اتیدیوم‌بروماید (۱ mg/l) ٤۵
۲-۱٤-۹- تهیه محلول یداین ٤٦
۲-۱٤-۱۰- تهیه محلول ۰/۵٪ نشاسته ٤٦
۲-۱٤-۱۱- تهیه واکنشگر DNS ٤٦

فهرست مطالب صفحه

۲-۱٤-۱۲- تهیه بافر فسفات سدیم(M ۰/۰۵) ٤٦
۲-۱٤-۱۳- تهیه بافر استات سدیم(M ۰/۰۵) ٤٧
۳-۱- جداسازی ایزوله‌های باکتریایی ٤٨
۳-۲- آزمونهای فنوتیپی ٤٨
۳-۳- آزمون پتریدیش: ٤٩
۳-۳-۱- آزمون پتریدیش سلولاز ٥٠
۳-۳-۲- آزمون پتری دیش آمیلاز ٥٠
۳-۴- زیموگرام آنزیم آمیلاز ٥٠
۳-۵- استخراج DNA ٥١
۳-۶- واکنش زنجیرهای پلیمراز ٥٢
۳-۷- توالی یابی محصولات واکنش زنجیرهای پلیمراز ٥٢
۳-۸- آنالیز فیلوژنتیکی توالیهای ۱۶Sr RNA و رسم درخت فیلوژنتیکی ٥٣
۳-۹- بحث ٦٣
پیشنهادات ٦٨

فهرست جداول صفحه

جدول۱-۱-. برخی از عوامل ایجادپایداری پروتئین نسبت به دمای بالا در گرمادوست‌ها..... ۹

جدول۱-۲-خصوصیات برخی آلفا آمیلازها از منابع میکروبی مختلف..... ..... ۱۳

جدول۱-۳- سه گروه آنزیمی برای هیدرولیز سلولز کریستالی همکاری می‌کنند. ۱۶

جدول ۲-۱- نوع و مقدار مواد برای محیط کشت نوترینت‌آگار..... ..... ۳۰

جدول ۲-۲- نوع و مقدار مواد برای محیط کشت جامد حاوی نشاسته..... ۳۱

جدول ۲-۳- مواد لازم و مقدار هر یک برای تهیه محلول پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۳٤

جدول ۲-٤- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با پرایمرهای1495R و27F..... ۳۵

جدول ۲-۵- نام و توالی پرایمرهای اختصاصی..... ..... ۳۵

جدول ۲-٦- نام و شماره دستیابی سوش‌هایی که در ترسیم درخت فیلوژنتیکی..... ۳۹

جدول۲-۷ مواد مورد استفاده برای تهیه غلظت استاندارد گلوکز..... ..... ٤۱

جدول۲-۸ مواد مورد استفاده برای تهیه غلظت استاندارد نشاسته..... ٤۲

جدول ۲-۹- مواد مورد استفاده در تهیه واکنشگر DNS..... ٤٦

جدول ۲-۱۰مقدار محلول مورد استفاده در تهیه محلول با pH.قلیایی..... ٤۷

جدول ۲-۱۱مقدار محلول مورد استفاده در تهیه محلول با pH.اسیدی..... ٤۷

جدول۳-۱- نتایج آزمون‌های فنوتیپی AF نشان دهنده بی‌هوازی اختیاری..... ٤۹

شکل۱-۱- انواع مختلف آنزیم آمیلاز همراه نوع عملکرد و محصول حاصله..... ۱۲
شکل۲-۱- ساختار سلولز..... ۱۵
شکل۳-۱- نمای گرافیکی آنالیز BIBI ۲۵
شکل۲ -۱-موقعیت جغرافیایی چشمه قینرجه..... ۲۹
شکل ۲-۲- همترازی چندگانه توالی‌ها در نرم‌افزار مگا (٤)..... ۳۸
شکل ۲-۳- منحنی استاندارد گلوکز..... ٤۲
شکل ۲-٤- منحنی استاندارد نشاسته..... ٤۳
شکل ۳-۱- نمودار آزمون تعیین دمای بهینه برای سویه‌های مختلف..... ٤۸
.شکل ۳-۲- نمودار آزمون تعیین pH در جدایه‌های مختلف..... ٤۹
شکل۳-۳ –نتایج آزمون پتری دیش سلولاز..... ۵۰
شکل ۳-٤-آزمون پتری دیش آمیلاز..... ۵۰
شکل ۳-۵- ژل SDSPAGEو وزیموگرام آنزیم آمیلاز ۵۱
شکل ۳-٦-باندهای حاصل از استخراج DNA ژنومی..... ۵۱
شکل۳-۷-باندهای حاصل از تکثیر اختصاصی قطعه..... ۵۲
شکل۳-۸- بخشی از کروماتوگرام مربوط به توالی یابی..... ۵۲
شکل۳-۹-توالی خوانده شده AZ1 بوسیله پرایمر 27f..... ۵۳
شکل۳-۱۰-توالی خوانده شدهQ بوسیله پرایمر 27f..... ۵۳
شکل۳-۱۱-توالی خوانده شدهQ بوسیله پرایمر 27f..... ۵۳
شکل۳-۱۲- همترازی توالی AZ_1 سایت NCBI درجه شباهت بالا و کمترین درجه خطا صفر..... ٥٤
شکل۳-۱۳- همترازی توالی AZ_2 سایت NCBI درجه شباهت بالا و کمترین درجه خطا صفر ٥٤
شکل۳-۱٤- همترازی توالیQ سایت NCBI درجه شباهت بالا و کمترین درجه خطا صفر..... ٥٥
شکل۳-۱۵-درخت فیلوژنتیک سویه Q رسم شده در سایت NCBI..... ٥٦
. شکل۳-۱٦-درخت فیلوژنتیک سویه Q رسم شده در سایت BIBI..... ٥۷
شکل۳-۱۷-درخت فیلوژنتیک سویه Q رسم شده در برنامه مگا٤..... ٥۸
شکل۳-۱۸-درخت فیلوژنتیکی سویه Az_2 رسم شده در سایت‌های NCBI..... ٥۹
.. شکل۳-۱۹-درخت فیلوژنتیکی سویه Az_2 رسم شده در برنامه مگا ٤..... ٥۹
شکل۳-۲۰-درخت فیلوژنتیکی سویه Az_2 رسم شده در سایت BIBI..... ٦۰
شکل۳-۲۱-درخت فیلوژنتیکی سویه Az_1 رسم شده در سایت NCBI..... ٦۱
. شکل۳-۲۲-درخت فیلوژنتیکی سویه Az_1 رسم شده در سایت BIBI..... ٦۲
شکل۳-۲۳-درخت فیلوژنتیکی سویه Az_1 رسم شده در برنامه مگا٤..... ٦۳

مقدمه

مقدمه:

بیش از یک قرن از اولین گزارش وجود باکتری گرمادوست، هوازی، دارای اسپور و با توانایی رشد در دمای $70^{o}C$ می‌گذرد(مایکوئل[1]، ۱۸۸۸). کشف وجود زندگی در دمای بالا و جداسازی باکتری *Thermus aquaticus* از پارک ملی سنگ زرد[2] شروع یک مرحله بزرگ در بیوتکنولوژی بود. پس از آن تکنولوژی PCR به منظور تکثیر اختصاصی DNA در شرایط آزمایشگاهی پدید آمد. موفقیت استفاده از *Thermus aquaticus* در تولید آنزیم دانشمندان را به جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های ناشناخته از منابع گرمایی زمین تشویق نمود. پس از گذشت سالها، میکروارگانیسم‌های گرمادوست دارای شکل اندوسپور بسیاری از منابع زمین گرمایی شناسایی شده‌اند که عموما متعلق به راسته‌های *Bacillus* و *Clostridium* می‌باشند (گوالگیاردی[3]، ۱۹۹۶). بیشتر باکتری‌های گرما دوست مطالعه شده در گروه ۵ که متعلق به راسته *Bacillus* است دسته‌بندی شده‌اند (برگی[4]، ۲۰۰۱). باکتری‌های گرمادوست این جنس هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، گرم مثبت، دارای اندوسپورمی‌باشند. بر اساس نتایج مطالعات فنوتیپی و فیلوژنتیکی و بررسی توالی ژن 16s rRNA راسته باسیلوس را می‌توان به جنس‌های *Amphibacillus*(نیمور[5]،۱۹۹۲)، *Alicyclobacillus*(ویسوتزکی[6]،۱۹۹۳) *Paenibacillus*(اش[7]،۱۹۹۳) *Aneurinibacillus* و *Brevibacillus*(شیدا[8]۱۹۹۶)،*Halobacillus* (اسپرینگ[9]،۱۹۹۶)، *Virgibacillus*(هیندریکس[10]،۱۹۹۸)، *Gracilibacillus* و *Salibacillus*(وینو[11]،۱۹۹۹)، *Anoxybacillus*(پیکوتا[12]،۲۰۰۰)، *Coprobacillus*(کاگیاما[13]،۲۰۰۰)، *Thermobacillus*(توزل[14]،۲۰۰۰)، *Filobacillus*(اسچلسنر[15]،۲۰۰۱)، *Geobacillus*(نازینا[16]،۲۰۰۱)، *Ureibacillus*(فورتینا[17]،۲۰۰۱)، می‌توان دسته‌بندی نمود.

بیولوژی مولکولی با استفاده از روش‌های مبتنی برDNA در تحقیقات تنوع میکروبی در کنار روش‌های فنوتیپی ، بیوشیمیایی و فیزیولوژی به سرعت توسعه یافته است. از روش‌های مولکولی

1 - Miquel
2 - Yellowish stone
3 - Guagliardi
4 - Bergy
5 - Niimura
6 -Wisotzkey-
7 - Ash
8 - Shida
9 - Spring.
10 - Heyndrickx
11 - Waino
12 - Pikuta
13 - Kageyama
14 - Touzel
15 - Schlesner
16 - Nazina
17 - Fortina

کارآمد در تجزیه و تحلیل مجموعه میکروب‌های موجود در آب، جداسازی ژن 16s rRNA از باکتری‌های جداسازی شده است (اید[1]،۲۰۰۵).

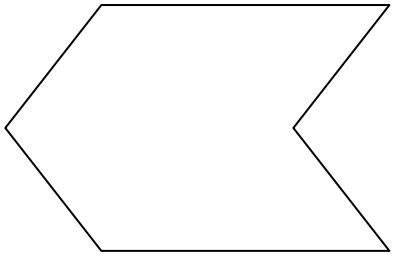
آنزیم‌های مقاوم به گرما به دلیل پایداری بسیار به طور ذاتی دارای کاربرد زیادی هستند (دمیرجیان[2]، ۲۰۰۱). پیشرفت در این حوزه با جداسازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست مفید از مناطق با شرایط سخت بر روی زمین سپس بررسی وجود و استحصال آنزیم از انها امکان پذیر است (بهات و هوندال[3]، ۱۹۹۸).

سلولاز به عنوان یک آنزیم صنعتی مهم در صنعت نساجی به عنوان شوینده زیستی، تغذیه دام و طیور ، فرآیند تولید آب میوه، بازیافت کاغذ و در تولید اتانل زیستی به منظور تولید شربت‌های الیگوساکاریدی که به اتانول تخمیر می‌شوند کاربرد دارد. در تمامی کاربردهای سلولاز شرایط دمایی بالا ترجیح داده می‌شود.وجود اندوگلوکانازهای مقاوم به گرما بدست آمده از باکتری‌های گرمادوست بسیار ارزشمند است (ویلی و زیکوس[4]، ۲۰۰۱).

آمیلازها نیز از جمله آنزیم‌های مهم با طیف وسیع استفاده در صنعت هستند. این آنزیم‌ها حدود ۳۰٪ از آنزیم‌های تولیدی در جهان را شامل می‌شوند (قبادی[5]، ۲۰۱۰). به علت مقاومت به گرما، آلفاآمیلاز کاربرد فزاینده‌ای پیدا کرده است. استفاده از آمیلازهای مقاوم به گرما به منظور مایع سازی نشاسته در دمای بالا در فرآیندهای شیرینی پذیریو یا به عنوان شوینده در نساجی و از این قبیل می‌باشند.

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های یکی از گرم‌ترین چشمه‌های آب گرم ایران با استفاده از مارکر 16S rRNA بود. در مرحله بعد وجود آنزیم‌های مهم فعال در درجه حرارت‌های بالا مانند آمیلاز و سلولاز در این میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

1 - Iida
2 - Demirjian
3 - Behat and Hoondal
4- Willi and Zicus
5 - Ghobadi



فصل اول

بررسی منابع

۱-بررسی منابع

۱-۱-موجودات گرمادوست

چشمه‌های آب‌گرم و جریان‌های داغ کف اقیانوس دارای شرایطی مانند آغاز حیات بر روی کره زمین هستند. در ابتدای پیدایش حیات قبل از تشکیل لایه اوزون اشعه‌های نابودگر به سطح زمین می‌تابیدند، میکروارگانیسم‌های ابتدایی احتمالا در پایین‌تر از سطح زمین و کف اقیانوس‌ها رشد می‌کردند و با دمای بالا و فعالیت‌های انفجاری سازگار شدند. در نتیجه گرمادوست‌های موجود در چشمه‌های آب‌گرم اولین موجودات زنده سیاره زمین بوده‌اند. این موجودات بر اساس دماهایی که در آن رشد مطلوب دارند به سه دسته تقسیم می‌شوند (برتولدو و اترانیکیان[1]، ۲۰۰۲):

۱. گرمادوست‌های متوسط[2] که محدوده دمای رشد بهینه آنها ۳۵ الی ۷۰ درجه سانتی-گراد است.

۲. بسیار گرمادوست ها[3] که دارای دمای رشد بهینه در محدوده ۵۵ الی ۸۵ درجه سانتی-گراد هستند.

۳. مافوق گرمادوست ها[4] که در طیف دمایی ۷۵ الی ۱۱۳ درجه سانتی‌گراد بهینه رشد را دارند.

دسته‌بندی دیگری از گرمادوست‌ها به صورت زیر وجود دارد:

۱. گرما دوست‌های ضروری[5] دارای دمای رشد بهینه در محدوده ٦٥ الی ۷۵ درجه سانتی-گراد می‌باشند و در دمای پایین‌تر از ٤٠ درجه سانتی‌گراد رشد نمی‌کنند.

۲. گرمادوست‌های اختیاری[6] که در طیف دمایی ۵۰ الی ٦٠ درجه سانتی‌گراد دارای رشد مطلوب می‌باشندو دارای توانایی رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیز می‌باشند.

گرمادوست های مقاوم به گرما که دارای رشد بهینه در محدوده دمایی ٤٥ الی ۵۰ درجه سانتی‌گراد هستند و می‌توانند در زیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد نیز رشد کنند (هوقس و ویلیامز[7]، ۱۹۷۷).

1- Bertoldo and Antranikian
2- Moderate thermophiles
3- Extreme thermophiles
4- Hyperthermophiles
5- Obligate thermophiles
6- Facultative thermophiles
7-Hughes and Williams

میکروارگانیسم‌های گرمادوست ازمناطق مختلفی از کره خاکی شامل نواحی آتشفشانی و محیط‌های گرم آفتابی مانند خاک و خاک برگ[1] چشمه‌های آب‌های گرم و درنواحی مختلف اعماق زمین[2] جدا شده‌اند (امتیازی ٨٦).

١-٢- انواع میکروارگانیسم‌های گرمادوست

میکروارگانیسم‌های گرمادوست از بین بسیاری از گروه‌های پروکاریوتی میکروارگانیسم‌ها، شامل سیانو باکتری‌ها، باکتری‌های فتوسنتز کننده، باسیلوس‌ها، کلستریدیوم‌های اسپورزا، باکتری‌های اسید لاکتیک، تولید کننده‌های متان، مصرف کننده‌های متان،اکسید کننده‌ها و احیا کننده‌های گوگرد، مایکوپلاسماها، پسودوموناس‌ها، آکتینومایست‌ها و گرم منفی‌های هوازی شناسایی شده‌اند(امتیازی ٨٦).

١-٢-١- باسیل‌های گرمادوست

بسیاری از گونه‌های ترموفیل، سرمادوست، اسیددوست، قلیادوست و نمک‌دوست از جنس باسیل‌ها می‌باشند. باکتری‌های گرمادوست متعلق به جنس باسیل محدودهٔ دمای رشد ٤٥-٧٠ °C دارند (رینی[3] و همکاران ١٩٩٥). جدایه‌های باسیلوس گرمادوست را از محیط‌های گرمایی و معتدل می‌توان بدست آورد. اولین توصیف از *Bacillus thermophilus* به عنوان یک باکتری هوازی میله‌ای گرمادوست است. شناسایی این جدایه‌ها به وسیله روش‌های رایج دقیق نبود (فلینت[4]، ٢٠٠١). اهمیت باسیل‌های گرمادوست به دلیل ارزش بیولوژیکی آنها به عنوان منبع آنزیم‌های مقاوم به گرما (پروتئازها، آمیلازها، پولولاناز، گلوکوز ایزومرازها، لیپازها، زایلانازها، سلولازها و اندونوکلئازهای برشی) می‌باشد (مائوگری[5]، ١٩٩٣).

١-٣- معرفی جنس باسیلوس

در سال ١٨٩٢ کوهن[6]، هم زمان با روبرت کخ نوعی از باکتری را شناسایی کرده و آن را باسیلوس سوبتلیس نامید. امروزه این جاندار یکی از اعضای جنس متنوع و گسترده باکتری به نام باسیلاسه است. مجموعه بزرگی از باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت

1-Ground litter
2 - Geothermal
3 - Rainey
4 - Flint
5 - Maugeri
6 - Cohn

می‌باشد که عموما شکل اندوسپرمی داشته و به صورت هوازی و یا بی‌هوازی اختیاری رشد می‌کنند. جنس باسیل به عنوان یک مجموعه غیرهمسان بزرگ از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری میله‌ای شکل گرم مثبت، دارای شکل اندوسپرم تعریف شده است (ویپاد و هاردوود[1]، ۱۹۹۹). تنوع بسیار بالا، حضور در اکوسیستم‌های گوناگون، تولید اندوسپرم‌های مقاوم به تنش فیزیکی و شیمایی، قابلیت تولید آنتی بیوتیک‌ها، پروتئین‌های کریستاله (که برای بیشتر حشرات حالت سمیت دارد) و پیدایش گونه پاتوژن باسیلوس آنتراسیس[2] در این جنس سبب علاقه‌مندی پژوهشگران به این جنس شده است.حضور این باکتری‌هادر شرایط بسیار متفاوت زیستی منجر به پیداش و تکامل انواع مختلفی از باکتری‌ها شده است که توانایی تجزیه و استفاده ترکیبات مختلف و بقایای زیستی مانند سلولز، نشاسته، پکتین، پروتئین‌ها، آگار، هیدروکربن‌ها و غیره را به دست آورده‌اند. به طور کلی، اغلب اعضای این جنس کموهتروتروف‌های چند کاره‌ای هستند که قادر به استفاده از ترکیبات آلی ساده در تنفس برای تامین انرژی و فرایند تنفس خودمی‌باشند. در برخی موارد آنها کربوهیدرات‌ها را در واکنش پیچیده‌ای تخمیر کرده و گلیسرول وبوتان دی اوال تولید می‌کنند. برخی از گونه‌ها مانند باسیلوس مگاتریوم هم به هیچ فاکتور رشدی آلی احتیاج ندارند. سایر گونه‌ها در این جنس نیازمند آمینواسیدها، ویتامین‌های گروه B یا هر دو می‌باشند. برخی اعضای این جنس قادر به تثبیت نیتروژن، آزاد سازی نیتروژن، لیتوتروفی اختیاری[3]، اتوتروفی[4] و زندگی در شرایط بسیار سخت می‌باشند. با اینکه بیشتر اعضا این جنس مزوفیل هستند و در دمای بهینه ^{o}C ۴۵- ۳۰ رشد می‌کنند، گروهی گرمادوست بوده و دمای بهینه آن‌ها ه بالای ^{o}C۶۵ است. تعدادی نیز سرمادوست[5] بوده وقادر به رشد و تولید اسپور در صفر درجه می‌باشند. گونه‌های این جنس در دامنه pH در حدود ۱۱-۲ توانایی رشد دارند. در شرایط بهینه رشد درآزمایشگاه گونه‌های باسیلوس زمان بازآوری در حدود ۲۵ دقیقه دارند (http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html).

انواعی از طبقه بندی‌ها پیشنهاد شده است که بر اساس یک سری از صفات فنوتیپی وجود دارد که ۳۶۸ جدایه از باسیلوس را به ۷۹ دسته تقسیم می‌کند (پریست[6] و همکاران ۱۹۸۸). در همین محدوده زمانی، پیدایش توالی‌های RNA ریبوزومی بخصوص تکنیک توالی یابی 16 Sr RNA به عنوان یک وسیله سنجش مولکولی مفید در اواخر دهه ۸۰ موجب شد که اساس این

1 - Wipat and Hardwood
2 - *Bacillus anthracis*
3 - Lithotrophy
4 - Autotrophy
5 - Psychrophil
1 - Priest