به نام خدا

دانشکده مهندسی معدن، نفت و ژئوفیزیک

پایان نامه جهت اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

عنوان پایان نامه

معرفی و بکارگیری روش ملکولی PCR بعنوان شاخه‌ای از ژئومیکروبیولوژی اکتشافی در اکتشاف ذخایر فلزی؛ مطالعه‌ی موردی ذخایر مس

اساتید راهنما

دکتر منصور ضیائی

دکتر مجتبی ممرآبادی

استاد مشاور

دکتر سید حسین مجتهدزاده

دکتر هوشنگ علیزاده

مشاور صنعتی

زهرا منافی

نگارنده

مهدی کمالی

بهمن ۱۳۹۰

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

چکیده:

امروزه، تعداد کانسارهايي که شناخت آنها به واسطه‌ی رخنمون کانی سازی شده مستقیماً امکان‌پذیر باشد رو به کاهش می‌باشد؛ در نتیجه عرصه‌ی اکتشاف معدن بیشتر روی نواحی‌ای متمرکز شده است که کانی سازی پنهان احتمالی، توسط روباره‌ی ضخیم پوشیده شده است. در این نواحی تکنیکهایی می‌توانند موفق باشند که فهم درستی از فرآیندهایی که منجر به پراکندگی و تمرکز عناصر کمیاب در خاکهای سطحی می‌شوند، داشته باشند.

خاک‌های رویی کانسار، عمدتاً سرشار از عناصری است که به عنوان ریزمغذی برای میکروب‌ها مصرف می‌شود. لذا میکروب‌ها با استفاده از این عناصر، قادر به رشد و نمو بوده و اثرهای بیولوژیکی ویژه‌ای را روی خاک می گذارند. این فرآیندهای میکروبی منجر به تشکیل هاله‌های میکروبی و نوعی غنی‌شدگی ثانویه در خاک رویی کانسار می گردد. ژئومیکروبیولوژی اکتشافی، با تعیین فرآیندهای بیوژئوشیمیایی و شناخت ساختار جوامع میکروبی خاک رویی کانسار و دیگر فرآیندهای ژئومیکروبیولوژیکال، مفاهیمی همچون تمرکز، پراکندگی، مهاجرت و حمل و نقل عناصر فلزی مانند Zn, Au, Cu, Co, Mo, Fe , ... را تشریح کرده و با ابزارهای ملکولی و تکنیکهای سنتی کشت آزمایشگاهی، سعی در تبیین فرآیندهای ژئوشیمیایی و زمین‌شناسی مرتبط با این عناصر دارد. ژئومیکروبیولوژیکی اکتشافی شامل روشهای مستقل از کشت آزمایشگاهی میکروبها و تکنیکهای وابسته به کشت آزمایشگاهی میکروبها می‌باشد.

در این پروژه، از ۴ معدن مس سونگون، جارو، دره‌زرشک و علی‌آباد نمونه‌برداری ژئومیکروبیولوژیکال صورت گرفت و روی نمونه‌ها تستهای میکروبی شامل روشهای آزمایشگاهی و روشهای ملکولی صورت گرفت. به بیان ساده، در طرح حاضر، با انتخاب محیط کشت انتخابی مس‌دار و تزریق آنتی‌بیوتیک به محیط کشت، تفاوتهای بین نواحی کانساری و غیر کانساری مشخص شدند و در نتیجه با بررسی‌های بیوانفورماتیک، طراحی پرایمر و بهینه‌سازی PCR، باکتری مقاوم به مس و بیومعرف احتمالی ذخایر مس، شناسایی و معرفی شد.

تقدیرنامه:

در این مجال بر خود دانسته از استاد عزیزم دکتر منصور ضیایی کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم، چرا که ایشان به من شجاعت آموخت و گزافه نیست که بگویم اگر ایشان نبودند هرگز چنین طرحی عملی نمی‌شد.

در ادامه از استاد گرانقدر، دکتر هوشنگ علیزاده ، به خاطر راهنماییهای بیشمار، بیدریغ و دلسوزانه‌اش و مهربانی هر چه تمامترشان کمال تشکر و قدردانی را دارم. همچنین لازم می‌دانم که از تشویقها و پیگیریهای مجدانه‌ی استاد عزیز دکتر سید حسین مجتهدزاده و نیز مهندس زهرا منافی یاد نمایم.

در نهایت از تمامی دوستان عزیز حاضر در دانشگاه تهران- پردیس کرج، آزمایشگاه‌های فیزیولوژی، ژنومیکس و کشت بافت دانشکده زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران و همچنین واحد تحقیق و امور توسعه مس سرچشمه، به خاطر همراهی و تحمل این حقیر، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

فهرســـــــــت مطالب

فصل۱ کلیات

۱-۱ مقدمه ۲
۱-۲ مروری بر اکتشافات ژئومیکروبیولوژیکال در ایران ۴
۱-۲-۱ تاریخچه‌ی ژئومیکروبیولوژی اکتشافی ۴
۱-۲-۲ اساس ژئومیکروبیولوژی اکتشافی ۶
۱-۲-۳ روشهای ژئومیکروبیولوژی اکتشافی ۹
۱-۲-۳-۱ تکنیکهای وابسته به کشت آزمایشگاهی میکروبها ۹
۱-۲-۳-۲ تکنیکهای مستقل از کشت آزمایشگاهی میکروبها ۹
۱-۲-۴ مروری بر کارهای قبلی انجام شده ۱۱
۱-۳ تعریف موضوع مورد تحقیق و ضرورت انجام آن ۱۲
۱-۴ روش انجام تحقیق ۱۳
۱-۵ سازماندهی پایان نامه ۱۳

فصل۲ موقعیت جغرافیایی و زمین‌شناسی مناطق مورد مطالعه

۲-۱ مقدمه ۱۶
۲-۲ معدن مس سونگون ۱۶
۲-۲-۱ موقعیت جغرافیایی معدن ۱۶
۲-۲-۲ وضعیت آب و هوایی و زیست محیطی منطقه سونگون ۱۸
۲-۲-۳ زمین‌شناسی منطقه ۱۹
۲-۳ معدن مس دره زرشک و علی آباد ۲۰
۲-۳-۱ موقعیت جغرافیایی منطقه ۲۱
۲-۳-۲ وضعیت آب و هوایی و زیست محیطی ناحیه‌ی علی‌آباد - دره زرشک ۲۲
۲-۳-۳ برخی از نتایج پژوهش‌های قبلی درباره زمین‌شناسی نواحی غرب و جنوب غربی یزد (مناطق علی آباد و دره‌زرشک) ۲۲
۲-۴ معدن متروکه مس جارو ۲۶
۲-۴-۱ موقعیت جغرافیایی معدن ۲۶
۲-۴-۲ وضعیت زیست محیطی و آب و هوایی روستای جارو ۲۷
۲-۴-۳ زمین شناسی جارو ۲۷

فصل۳ پروسه‌ی نمونه برداری ژئومیکروبیولوژیکال

۳-۱- کلیات ۳۰
۳-۲- اصول نمونه برداری ۳۰
۳-۲-۱- طرح شبکه‌ی نمونه برداری ۳۱
۳-۲-۲- فواصل نمونه گیری ۳۱
۳-۲-۳- محل نمونه گیری ۳۲
۳-۲-۳-۱- تذکّرات ۳۲
۳-۲-۴- عمق نمونه گیری ۳۴
۳-۲-۵- مقدار نمونه ۳۴
۳-۲-۶- مدت زمان نمونه گیری ۳۵
۳-۲-۷- محل نگهداری نمونه‌های برداشتی ۳۵
۳-۲-۸- دمای محل نگهداری نمونه ۳۶
۳-۲-۹- موارد دیگر ۳۶
۳-۳- فعالیت‌های آزمایشگاهی پس از نمونه‌برداری ۳۷
۳-۴- نمونه گیری از محلهای تعیین شده ۳۷

فصل٤ مطالعات ژئومیکروبیولوژیکی

۴-۱- مقدمه ۴۴
۴-۲- کارهای بیوانفورماتیک ۴۴
۴-۲-۱- بررسی مطالعات قبلی ۴۵
۴-۲-۲- بررسی ژن 16S rRNA باکتریهای مذکور با استفاده از نرم افزار blast ۴۵
۴-۲-۳- بررسی هومولوژی ناحیه‌ی 16S با نرم افزار clustalw2 ۴۷
۴-۲-۴- طراحی پرایمر ۴۸
۴-۲-۴-۱- باسیلوس سروس ۵۱
۴-۲-۴-۲- باسیلوس پامیلوس ۵۲
۴-۲-۴-۳- تیو باسیلوس فرواکسیدان ۵۴
۴-۲-۴-۴- Staphylococcus pasteuri ۵۵
۴-۲-۴-۵- Proteus mirabilis ۶۳
۴-۲-۴-۶- Pseudomonas chlororaphis ۶۶
۴-۲-۴-۷- Pseudomonas putida ۶۸

۴.۲.۴.۸ سنتز پرایمر ۷۰
۴.۳ تست‌های آزمایشگاهی ۷۰
۴.۳.۱ جداسازی و خاص‌سازی باکتری مقاوم به مس ۷۰
۴.۳.۲ تهیه‌ی محیط کشت NB ۷۱
۴.۳.۳ اضافه کردن نمونه‌های خاک ۷۱
۴.۳.۴ خالص‌سازی ۷۳
۴.۳.۵ تهیه‌ی محیط کشت جامد NA ۷۳
۴.۳.۶ کشت جامد ۷۵
۴.۳.۷ تزریق آنتی‌بیوتیک به محیط کشت جامد ۸۰
۴.۳.۸ تست UV ۸۳
۴.۴ پروسه‌ی ملکولی (شامل هر دو روش RNA و DNA) ۸۳
۴.۴.۱ استخراج و خالص‌سازی نا کلئیک اسیدها ۸۳
۴.۴.۲ فزونسازی ژن های معرف هدف RNA یا DNA استخراجی ۸۴
۴.۴.۳ ارزیابی تنوع ژنتیکی ۸۷
۴.۴.۴ تستهای ملکولی ۸۷
۴.۴.۴.۱ استخراج DNA، با استفاده از روش فیزیکی ۸۷
۴.۴.۴.۲ تست نمونه‌های DNA با نانودراپ ۸۹
۴.۴.۴.۳ بهینه‌سازی PCR ۹۱
۴.۴.۴.۴ استخراج DNA، با استفاده از کیت ۹۷
۴.۴.۴.۲ بازیابی DNA، با استفاده از روش glassmilk ۱۰۰
۴.۴.۵ توالی‌یابی ۱۰۲

فصل پنجم نتایج و پیشنهادات

۵.۱ تکنولوژی‌های آتی و در حال توسعه‌ی ژئومیکروبیولوژی اکتشافی ۱۰۵
۵.۲ نتایج ۱۰۸
۵.۲.۱ نتایج کلی ۱۰۸
۵.۲.۲ نتایج حاصله از این طرح ۱۰۹
۵.۲.۳ پیشنهادات ۱۱۰

منابع و مآخذ

الف) مراجع فارسی ۱۱۳
ب) مراجع انگلیسی ۱۱۵
ج) سایتهای مورد استفاده ۱۱۹

فهرست اشکال

شکل۱-۱ ارتباط شماتیک ژئومیکروبیولوژی اکتشافی با سایر علوم ۸
شکل۲-۱ موقعیت معدن سونگون ۱۷
شکل۲-۲ راه دسترسی به سونگون ۱۸
شکل۲-۳ ژئومورفولوژی و پوشش گیاهی معدن سونگون ۱۸
شکل۲-۴ نقشه‌ی زمین‌شناسی سونگون ۱۹
شکل۲-۵ عیار مس در سونگون با توجه به مقطع C-C ۲۰
شکل۲-۶ راه دسترسی به منطقه(اطلس راههای ایران ۱:۱۰۰۰۰۰۰) ۲۱
شکل۲-۷ نقشه زمین‌شناسی خضرآباد(۱:۱۰۰۰۰۰) ۲۵
شکل۲-۸ موقعیت جغرافیای معدن جارو ۲۶
شکل۳-۱ خطوط نمونه‌گیری تصادفی ۳۱
شکل۳-۲ لایروب اکمان ۳۵
شکل۴-۱ توالی کامل ژن 16S rRNA باسیلوس سروس ۴۷
شکل۴-۲ صفحه‌ی نرم افزار blast ۴۸
شکل۴-۳ خروجی نرم افزار nblast ۴۹
شکل۴-۴ انتخاب و بررسی تفاوتهای توالیها ۴۹
شکل۴-۵ فایل فستای خروجی نرم‌افزار nblast در نرم افزار bioedit ۵۰
شکل۴-۶ ژنوم کامل باکتری پروتئوز ۵۰
شکل۴-۷ انتخاب 16S rRNA در ژن cDs با استفاده از ژنوم کامل باکتری ۵۱
شکل۴-۸ پنل ورودی نرم افزار clustalW ۵۲
شکل۴-۹ خروجی نرم افزار clustalW2 هومولوژی بد ۵۳
شکل۴-۱۰ هومولوژی خوب ۵۴
شکل۴-۱۱ نتیجه‌ی حاصله از nblast ژن 16S rRNA باسیلوس سروس ۵۵
شکل۴-۱۲ هومولوژی بد ژن 16S rRNA باسیلوس سروس ۵۶
شکل۴-۱۳ هومولوژی بسیار خوب پس از اصلاح فایل فستای ژن 16S rRNA باسیلوس سروس ۵۶

شکل۴ ۱۴ nblast ژن 16S rRNA باسیلوس سرِوس با پرایمر 27F ۵۶
شکل۴ ۱۵ nblast بخشی از ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس با پرایمر 27F ۵۷
شکل۴ ۱۶ قسمتی از ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس ۵۷
شکل۴ ۱۷ nblast بخشی از ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس ۵۷
شکل۴ ۱۸ هومولوژی خوب بخشی ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس ۵۸
شکل۴ ۱۹ ژنوم کامل باسیلوس پامیلوس ۵۸
شکل ۴ ۲۰ انتخاب 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس ۵۹
شکل۴ ۲۱ nblast ژن 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس با پرایمر 27F ۵۹
شکل۴ ۲۲ nblast ژن 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس با پرایمر 1492R ۵۹
شکل۴ ۲۳ nblast ژن 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس با پرایمر عمومی ۶۰
شکل۴ ۲۴ nblast ژن 16S rRNA تیوباسیلوس فرواکسیدان با پرایمر F1 .... ۶۰
شکل۴ ۲۵ هومولوژی خوب ژن 16S rRNA تیوباسیلوس ۶۰
شکل۴ ۲۶ هومولوژی ژن 16S rRNA Staphylococcus pasteuri ۶۱
شکل۴ ۲۷ Staphylococcus pasteuri 16S ribosomal RNA gene ۶۱
شکل۴ ۲۸ nblast Staphylococcus pasteuri 16S ribosomal RNA gene با پرایمر 27F ۶۲
شکل۴ ۲۹ nblast Staphylococcus pasteuri 16S ribosomal RNA gene با پرایمر 1492R ۶۲
شکل۴ ۳۰ nblast Staphylococcus pasteuri 16S ribosomal RNA gene با پرایمر عمومی ۶۲
شکل۴ ۳۱ هومولوژی ژن Proteus mirabilis 16S rRNA ۶۳
شکل۴ ۳۲ nblast Proteus mirabilis 16S ribosomal RNA gene با پرایمر ۶۴
شکل۴ ۳۳ nblast Proteus mirabilis 16S ribosomal RNA gene با پرایمر دوم ۶۴
شکل۴ ۳۴ Proteus mirabilis strain HI4320, complete genom ۶۴
شکل۴ ۳۵ انتخاب 16S rRNA در ژن cDs Proteus mirabilis دارای ۵۴۶ جفت مبنا ۶۵
شکل۴ ۳۶ nblast، ناحیه ژنی شکل ۴ ۳۵ با پرایمر عمومی جدول ۴ ۲ .... ۶۵
شکل۴ ۳۷ nblast، ناحیه ژنی شکل ۴ ۳۵ با پرایمر اول جدول ۴ ۴ .... ۶۵
شکل۴ ۳۸ توالی ژن Pseudomonas chlororaphis 16S rRNA ۶۶
شکل۴ ۳۹ هومولوژی ژن Pseudomonas chlororaphis 16S rRNA ۶۶
شکل۴ ۴۰ nblast ژن Pseudomonas chlororaphis 16S rRNA با پرایمر 27F ۶۷
شکل۴ ۴۱ nblast ژن Pseudomonas chlororaphis 16S rRNA با پرایمر 1492R ۶۷
شکل۴ ۴۲ nblast ژن Pseudomonas chlororaphis 16S rRNA با پرایمر عمومی ۶۷
شکل۴ ۴۳ nblast ژن 16S rRNA Pseudomonas putida با پرایمر 27F ... ۶۸

شکل ۴ ۴۴ nblast ژن 16S rRNA Pseudomonas putida با پرایمر 1492R ۶۸
شکل ۴ ۴۵ ژن 16S rRNA Pseudomonas putida ۶۹
شکل ۴ ۴۶ هومولوژی ژن 16S rRNA Pseudomonas putida ۶۹
شکل ۴ ۴۷ همزن برقی اجاق دار ۷۲
شکل ۴ ۴۸ اتوکلاو ۷۲
شکل ۴ ۴۹ هود لامینار ۷۴
شکل ۴ ۵۰ انکوباتور شیکر ۷۵
شکل ۴ ۵۱ فالکونها ، خاک شاهد(W1) و خاک معدن علی‌آباد (ACM) ۷۶
شکل ۴ ۵۲ کشت با لوپ پاشکل ۷۷
شکل ۴ ۵۳ نمونه کشت خطی در محیط کشت جامد شامل رشد زیاد باکتری ۷۷
شکل ۴ ۵۴ تک کلون‌ها در پلت ۷۸
شکل ۴ ۵۵ تک کلون‌ها در پتری دیش ۷۸
شکل ۴ ۵۶ نمونه‌ای از تقسیم پتری دیش ۷۹
شکل ۴ ۵۷ نمونه‌ی شاهد (W2) ۷۹
شکل ۴ ۵۸ کلونهای بسیار کم باکتریها در نمونه شاهد (W1) ۸۰
شکل ۴ ۵۹ نمونه‌ی شاهد، شامل هر دو آنتی‌بیوتیک (W2) ۸۲
شکل ۴ ۶۰ محیط کشت با دو آنتی‌بیوتیک و نمونه‌ی خاک ۸۲
شکل ۴ ۶۱ نمای شماتیک فزونسازی DNA هدف با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز ۸۶
شکل ۴ ۶۲ ژل الکتروفورز آگارز ۵۱۰ جفت اولیه ۸۶
شکل ۴ ۶۳ دستگاه نانودراپ ۹۰
شکل ۴ ۶۴ نتیجه‌ی تست نمونه‌ی DNA استخراجی با استفاده از نانو دراپ ۹۰
شکل ۴ ۶۵ نتیجه‌ی تست نمونه‌ی DNA استخراجی با استفاده از نانو دراپ ۹۱
شکل ۴ ۶۶ تصویر سیکل PCR، با دمای آنلینگ ۵۴ درجه سانتی گراد ۹۳
شکل ۴ ۶۷ تصویر سیکل PCR، با دمای آنلینگ ۵۴ ۵۰ درجه سانتی گراد گرادیان ۹۴
شکل ۴ ۶۸ تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگوی اولیه ۹۴
شکل ۴ ۶۹ تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگو ۹۵
شکل ۴ ۷۰ تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ با استفاده از سیکل PCR ۵۲/۵ درجه‌ی سانتی گراد ۹۵
شکل ۴ ۷۱ تصویر سیکل PCR، با طرح دمایی touch down ۹۶
شکل ۴ ۷۲ تصویر ژل الکتروفورز آگارز DNA الگو ۹۷
شکل ۴ ۷۳ تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR با استفاده از سیکل PCR جدول ۴ ۷ ۹۸

شکل۴ -۷۴ تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگو ۹۹
شکل۴ -۷۵ تست نمونه‌ی DNA بازیابی شده باکتریال معدن علی آباد(AAM_1) ۱۰۱
شکل۴ -۷۶ تست نمونه‌ی DNA بازیابی شده باکتریال معدن علی آباد(ABM_{2PT}) ۱۰۲
شکل۴ -۷۷ توالی حاصل سنتز نمونه‌ی DNA باکتری خاک معدن علی‌آباد با پرایمر 27F ۱۰۳
شکل۴ -۸۷ توالی سنتز نمونه‌ی DNA ی باکتری خاک معدن علی‌آباد با در نرم افزار Bioedit ۱۰۳
شکل۵ -۱ میکروآرایه‌های DNA در آنالیزهای بیان حالت ژنی متفاوت ۱۰۶

فهرست جداول

جدول۳ -۱ مقایسه جمعیتهای باسیلوس سروس (CFU/g) در افق B,A نواحی مختلف ۳۳
جدول۳ -۲ نمونه‌برداری از معدن علی آباد ۳۹
جدول۳ -۳ نمونه‌های معدن دره زرشک ۴۰
جدول۳ -۴ نمونه‌های معدن جارو ۴۱
جدول۳ -۵ سه نمونه گرفته شده از معدن مس سونگون ۴۲
جدول۴ -۱ باکتریهای مقاوم به مس در مقالات ۴۶
جدول۴ -۲ پرایمرهای فرضی در مرحله‌ی نخست بررسی .. ۵۱
جدول۴ -۳ پرایمرهای مورد استفاده در PCR، برای شناسایی تیوباسیلوس ۵۵
جدول۴ -۴ پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن pcoA ۶۳
جدول۴ -۵ نمونه‌ها در مرحله‌ی اول .. ۷۴
جدول۴ -۶ ترکیب محلول مورد استفاده در استخراج DNA ۸۸
جدول۴ -۷ سیکل PCR ۹۲

فصل-۱ کلیات

۱-۱ مقدمه

آدمیزاد طی سالیان متمادی نیاز آشکار خود به منابع معدنی را هویدا نموده است؛ سرنیزه های آهنی و دیگر تجهیزات جنگی انسانهای نخستین این مطلب رابه اثبات می رساند. امروزه نیز این احتیاجات از آدمی رفع نشده بلکه فزونی هم یافته است؛ لذا دانشمندان همیشه برآن بوده اند تا روشهای جدیدی جهت کشف منابعی که از نظر روشهای معمول اکتشاف دور مانده اند را ابداع کنند، بطبع منابع معدنی دارای رخنمون به راحتی کشف شده و به موازات آن رفته رفته کانسارهای سطحی، کم عمق و عمیق توسط روشهای جدید اکتشاف کشف می شوند. علاوه بر روشهای غیرمستقیم زمین شناسی، دورسنجی و روش مستقیم حفاری، روشهای ژئوفیزیکی و ژئوشیمیایی اکتشاف کانسارها از روشهای مهم در این زمینه به حساب می‌آید.

روشهای ژئوفیزیکی با تعیین خواص فیزیکی زمین و پارامترهای فیزیکی موجود سعی بر اکتشاف کانسارها دارند. ازجمله روشهای مهم ژئوفیزیکی می توان به لرزه نگاری، گراویمتری، ثقلسنجی، مغناطیس-سنجی و غیره اشاره کرد؛ روشهای ژئوشیمیایی اکتشاف نیز با ربط مسائل زمین به شیمی و استفاده از مواردی راجع به این موضوع در راستای کشف کانی‌ها گام برمی‌دارند. از روشهای معروف ژئوشیمی بررسی هاله-های اولیه و ثانویه کانسارها، مطالعه‌ی هاله‌های هیدروژئوشیمیایی، گازی، روشهای بیوژئوشیمیایی و ... می-باشد. کانسارهایی که به واسطه‌ی رخنمون آشکار می شوند به خوبی کشف شده و مستقیماً تمام پارامترها قابل اندازه‌گیری هستند. بنابراین امروزه نظر اکتشاف معدن به نواحی‌ای جلب شده است که لایه‌ی ضخیم روباره کانی سازی را پنهان کرده است(Reith and Rogers, 2007). در استرالیا و دیگر کشورهای پیشرفته دنیا، قسمت های زیادی از زمینها توسط سنگپوش‌های[1] رسوبی و آبرفتی پوشیده شده است که گاهی ضخامت این رسوبات به صدمتر نیز می‌رسد(Reith et al., 2005).

کارآیی روش ژئوشیمی اکتشافی در شناسایی نهشته های کم عیار و پوشیده با مواد آبرفتی، ذرات آواری یخچالی و خاک می باشد؛ این روش به ویژه برای نهشته‌ها و ذخایر کانساری‌ای است که شناخت ماکروسکوپی[2] آنها سخت و حتی غیرممکن بوده و تعیین محل و موقعیت آنها- مانند نهشته های کانساری پنهان مفید – با مشکل همراه می باشد(Reith and Rogers, 2007) .

در مورد نواحی ذکر شده تکنیکهایی موفق هستند که با فهم وتبین فرآیندهای منجر به پراکندگی یا تمرکز عناصر کمیاب در سطح یا نزدیک سطح بتوانند، ارتباطی را بین این فرآیندها با کانی سازی پنهان، بیان کنند(Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995; Reith, 2007). فعالیتهای میکروبی شناخته شدند تا با

1- Regolith
2- Macroscopic

به کارگیری تکنیکهای میکروبی[3]، مسایل مهاجرت[4]، پراکندگی[5] و قابلیت تحرک[6] بسیاری از عناصر کمیاب را در بازه‌ی وسیعی از شرایط مطرح کنند(Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995).

بکارگیری میکروبها در اکتشاف منابع طبیعی چیز چندان جدیدی نیست. مطالعات صورت گرفته بر روی توسعه‌ی روشهای کشف نفت و گاز توسط موگیلفسی[7] در سال ۱۹۳۸ و سکولوف[8] در سال ۱۹۳۶ مبانی اولیه روشهای کشف نفت خام به حساب می‌آید(Brooks et al., 1995)

در بررسی ژئوشیمی خاک، رسوبات و آبها میکروبها منابع غنی از اطلاعات می باشند، چرا که آنها خود را با خصوصیات شیمیایی محیط وفق می دهند. آنها از طریق واکنش‌هایی چون اکسیداسیون[9] و کاهش[10]، ژلاتینی‌شدن[11]، الکلاسیون[12] و غیره قادر به سازگاری با محیط هستند(Parduhn, 1995). باکتریها قادر به حفظ خود برابر تأثیرات زهرآگین[13] فلزات میباشند(Brown, 1995)؛ برای مثال برخی یون های سمی مثل As^{3+} ، Hg^{2+} توسط آنزیم‌هایی که بر اساس نیازهای متابولیک، بوسیله‌ی باکتریها ترشح می شود، به وضعیت غیر سمی یعنی As^{5+}، Hg^{0} در می‌آیند(Drewniak et al., 2008; Parduhn, 1995). از دیگر مکانیسم‌های باکتریال معروف در ژئومیکروبیولوژی، می‌توان به هیدروکسیدکردن، سولفیدی‌کردن و جذب بواسطه‌ی پلی‌ساکاریدها اشاره نمود (Ehrlich and Newman, 2009).

علاوه بر توانایی میکروبها برای وفق دادن خود با محیط شیمیایی، نیازهای بی‌نظیر متابولیک یک گونه‌ی خاص به آنها یک ارزش بالقوه‌ی مفیدی می دهد(Parduhn, 1995)؛ مثلاً ارگانیسم‌های آتروتروفیک در حضور موادمعدنی، مانند H_2S و دیگر نمونه ی سولفوری عناصر و یونها چون Fe^{2+} و Mn^{2+} رشد می‌کنند و بعلاوه قادر به تحمل چنین شرایطی هستند(Ehrlich and Newman, 2009; Parduhn, 1995)؛ بالطبع این میکروارگانیسم‌ها به صورت متغیر در زیستگاه‌هایی که منابع مناسبی از انرژی مهیا است مانند نواحی کانساری[14] یافت می‌شوند(Parduhn, 1995; Reith and Rogers, 2007).

روشهای میکروبی پی‌جویی دارای یکسری تواناییها و منافعی هستند که قابلیت تکمیل روش‌های ژئوشیمیایی استاندار را داشته و با تکیّه بر آنها می توان شاخص‌های ترکیبی ویژه‌ای را تعریف و مورد استفاده قرار داد (Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995; Reith, 2007; Brooks et al., 1995).

1- Microbial techniques
2- Migration
3- Dispersion
4- Mobilization
5- Mogilevsky
6- Sokolov
7- Oxidation
8- Reduction
9- Chelation
10- Methylation
11- Toxic effects
1- Ore deposite areas

مطالعات قبلی نشان دادند که برخی میکروارگانیسم‌ها حضور کانی سازی پنهان زیرسطحی را مشخص می‌کنند (Parduhn, 1991; Reith et al., 2005; Melchior et al., 1994; Michaels and Riese, 1986) به عنوان مثال از باسیلوس سروس[۱۵] بعنوان اندیکاتوری برای طلا و دیگر فلزات به طور موفق آمیز در کشورهای بلژیک، آرژانتین، مکزیک، چین، استرالیا، ایران و ... استفاده شده است (مهرنیا، ۱۳۸۶ ; Hongmei et al., 2003; Reith and McPhail, 2006; 2007; Melchior et al., 1994; Michaels and Riese, 1986). کلنی‌های بیشماری از سلولهای باسیلوس سروس درخاکهای پلی متالیک[۱۶] و زرخیز، خصوصاً آن خاکهایی که عیار طلا در آنها بالاتر از حد زمینه بود؛ دارند. با اصول متعددی در مقایسه با خاکهای حاوی مقدار زمینه طلا بوجود آمدند (Hongmei et al., 2003; Parduhn, 1995; Reith and Rogers, 2007) که این موارد انطباق بالای باسیلوس سروس و خاکهای فلزی را تصدیق می‌نماید. در ادامه ژئومیکروبیولوژی اکتشافی[۱۷] بعنوان زمینه‌ای برای درک ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها، محیط طبیعی ژئوشیمیایی آنها و فرآیندهای مربوط به اکتشاف کانسارها تشریح می‌شود.

۱-۴ مروری بر اکتشافات ژئومیکروبیولوژیکال در ایران

۱-۱-۴ تاریخچه‌ی ژئومیکروبیولوژی اکتشافی

شاید نخستین بار ایده‌ی استفاده از میکروبها در اکتشاف ذخایر فلزی توسط سالوانینا[۱۸] و موگیلفسکی در سال ۱۹۵۷ در انستیتو تحقیقات نفتی[۱۹] و در ایالت شوروی سابق مطرح شده باشد(Parduhn, 1995)؛ سالوانینا اذعان داشت که ایده‌ی استفاده از میکروارگانیسم‌ها در اکتشاف معادن را از مقالات موگیلفسکی گرفته است؛ موگیلفسکی به نقش میکروارگانیسم‌ها در اکتشاف ذخایر نفت و گاز پرداخته بود. سالوانینا اثر خاکهای مولیبدن، منگنز، سرب، روی، مس و تنگستن را بعنوان محرک یا بازدارنده ی رشد باکتریهای اکسیداسیون، نیتراسیون، آزتوباکتری‌ها و نمونه های آسپرژیلوس بررسی نمود. در طول سالهایی که برروی کارهای ابتدایی سالوانینا بحث می‌شد، پیشنهادات او در مورد بکارگیری میکروارگانیسم‌ها (خصوصاً باکتریها) در اکتشاف معدن نیز مورد بررسی بود. کارمارنکو و لیالیکوا[۲۰] همراهی باسیلوس سروس با کانسارهای سولفیدی را مطالعه نمودند؛ همچنین کارمارنکو و پریزنوا[۲۱] در سالهای ۱۹۶۲ و ۱۹۶۱ طرح های

2- Bacillus cereus
3- Polymetalic soils
4- Exploration geomicrobiology
5- Salvanina
6- PRI: petroleum research institute
1- Karmarenko and N.N.Lyalikova
2- Prizrenova

متعددی جهت استفاده ازگونه های خاصی از باکتریها، برای اهداف پی‌جویی و اکتشاف ارائه دادند، امّا متاسفانه هیچکدام از این محققین فکری راجع به روشهای اکتشاف میکروبی نیاندیشیدند(Parduhn, 1995).

بعدها مؤسسه‌ی ورنادسکی با انتشار کتاب لتونوا، ژئومیکروبیولوژی اکتشافی را بعنوان شاخه ای از علم به جهانیان معرفی کرد(Parduhn, 1995)؛ لتونوا تجربیات ۲۰ ساله‌ی خود، حاصل از مطالعه‌ی رفتارهای میکروبی در برابر ایالت فلززایی[۲۲] گوناگون و بررسی روش های مختلف سازگاری میکروبها با محیط های آلوده‌ی فلزی و سمّی را درکتابش آورد(Parduhn, 1995).

در ایالت متحده‌ی آمریکا نیز میلر[۲۳] به سال ۱۹۸۳ وجود نمونه‌های تیوباسیلوس و دسولفوویبرو[۲۴] در را به عنوان طرحی برای پی‌جویی گوگرد مورد بررسی قرار داد؛ او نتیجه گرفت که اگرچه از باکتریهای متابولیسم کننده‌ی سولفور جهت تعیین محل سولفیدها و سولفورخالص می‌توان بهره برد امّا بکارگیری این باکتریهای شیمیوآتروتروف برای پی‌جویی تیپهای دیگر کانساری ثمربخش نخواهد بود(Parduhn, 1995). با این همه، ژئومیکروبیولوژی اکتشافی امروزه بعنوان روشی قدرتمند درکنار روشهای ژئوشیمیایی و بیوژئوشیمیایی بکار گرفته می‌شود، در حقیقت تلفیق روشهای میکروبی و بیوژئوشیمیایی نتایج مهم و قدرتمندی را به دست داده است(Reith and Rogers, 2007).

۱-۲-۲ اساس ژئومیکروبیولوژی اکتشافی

سالها بعد پس از انتشار کتاب لتونوا، در تحقیقات بعدی سه پیش فرض مهم اولیه جهت گسترش روشهای ژئومیکروبیولوژیکال تعریف شدند؛ این سه پیش فرض عبارتند از(Parduhn, 1995):

الف) بسط روشهایی که مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها و فلز یا تنها فلزات را در جمعیت‌های باکتریال خاک کانسار نشان می دهند.

ب) توسعه ی روش سنجش هاگ (اسپور[۲۵]) باسیلوس سروس- از روشهای دفاعی باسیلوس سروس در برابر غلظت‌های بالای فلز در محیط یا بااصطلاح محیط های آلوده فلزی، تولید هاگ می باشد(دورلند، ۱۳۸۴)- افزایش هاگ‌های تولیدی باسیلوس سروس می تواند فلز موجود در خاک را شناسایی و تعیین کند.

ج) آشکارسازی باکتریهایی که ممکن است، قادر به تولید بتالاکتاماز[۲۶] باشند.

3- Metallogenic provinces
4- Miller
5- Desulfovibrio
1- Spore assay
2- Beta-lactamase

در سال ۱۹۵۷ سالوانینا از مقاومت فلزات در باکتریها بعنوان وسیله‌ای بالقوه جهت اکتشاف کانسار بحث کرده است. روشهایی که منجر به کشف تنوع فلزات در باکتریها شده است، شامل: کدری‌سنجی[۲۷]، کشت روی آگار جبران شده (یا باصطلاح اصلاح شده) با نمک فلزات[۲۸] و جایگزینی دیسک‌های آغشته به نمک فلزات درسطح آگار[۲۹] می باشد(Parduhn, 1995).

ژئومیکروبیولوژی اکتشافی بر این اساس شکل گرفت، که مطالعات محیطی و پزشکی بعدها نشان دادند حضور فلزات سنگین در خاک، فرکانس مقاومت فلزات و آنتی بیوتیک‌ها را در جمعیتهای باکتریال بومی خاک بالا می برد(Parduhn, 1995). انطباق خوبی بین فرکانس مقاومت فلزات و آنتی بیوتیک‌ها در باکتری‌های محیط آلوده‌ی فلزی دیده شد، افزایش مقاومت در باکتری‌ها با واژه‌ی مکان مشترک، که ژن-های مقاومت در آن بر روی پلاسمید سوارند تعریف می شود(Reith and Rogers, 2007). میکروارگانیسم‌ها قادر به انحلال و رسوب کانسارها و ایجادکانی‌سازی ثانویه هستند لذا به منظور تعیین فرآیندهای بیوژئوشیمیایی که پراکندگی و تمرکز فلزات را در خاک مشخص می کنند و تشخیص کیفیت سینتیک عکس العمل این فرآیندها در مواد مختلف، ژئومیکروبیولوژی اکتشافی با ابزارهای مدل‌سازی پیش-گویی بیوژئوشیمیایی کمک شایانی به اکتشاف کانیها می نمایند(Ehrlich and Newman, 2009). ژئومیکروبیولوژی اکتشافی با تکنیکهای خاص، داده‌هایی را در اختیار مدل‌های بیوژئوشیمیایی و ژئوشیمیایی عددی قرار می‌دهد، تا با استفاده از آنها بتوان پدیده‌هایی همچون پراکندگی، تمرکز، مهاجرت، حمل و نقل و رسوب‌گذاری فلزات و عناصرکمیاب را اطراف زون کانی سازی پیش‌گویی نموده و محل کانه را مشخص کرد. این رشته با شناختن فرآیندهای میکروبیالی که منجر به وقوع پدیده‌های فوق می گردد، موفق به کشف میکروارگانیسم‌های معرف و همچنین توسعه‌ی بیوسنسورهای میکروبی برای آشکارسازی کانی‌سازی پنهان می شود(Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995).

نقش باکتریها در تمرکز، انحلال، پراکندگی، تغییر ترکیب و فرم و رسوب کانی‌ها به خوبی تشریح شد، باکتریها و به طور کلی میکروارگانیسم‌ها با اعمال فرآیندهای نامبرده کانی سازی ثانویه را به صورت هاله‌ای اطراف زون کانی سازی بوجود می‌آورند. این فرآیند طبیعی بعنوان آنومالی ژئومیکروبیولوژیکال شناخته می‌شود و همه‌ی اهتمام ژئومیکروبیولوژی بر این اصل استوار است که بتواند راهکارها و تکنیک‌هایی برای کشف آنومالی‌های ژئومیکروبیولوژیک و بیوژئوشیمیایی ابداع کرده و طرح‌های جدید و دقیقی را به صنعت اکتشاف کانسارها ارائه دهد.

باکتریها و قارچ های ساکن در ریزوسفرگیاهان نشان داده‌اند که قابلیت تحرک و انحلال فلزات و عناصر ردیابی همچون S, Zn, Se, Ni, Hg, Cu, Cd, As را تحت کنترل خود داشته و به طور درست منجر به

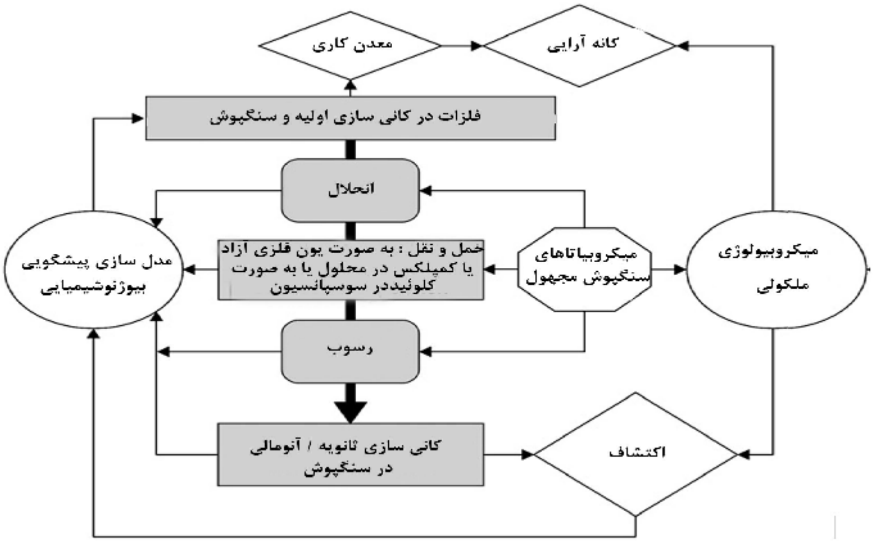
3- Turbidimetry
4- Culturing on agar amended with metal salts
5- Placement of paper disks impregnated with metal salts on agar surfaces

افزایش فزاینده‌ی این عناصر در گیاه می‌شوند(Lin et al., 2010; Khan, 2005). بنابراین مطالعات بعدی مشخص کرد که میکروبیوتاهای[۳۰] موجود در ریزوسفر شاید تحت شرایط مختلف، مقدار فلز گیاه را با جذب سطحی یا فرآیندهایی همچون مبادله ی یونی[۳۱]، کمپلکس سازی[۳۲]، رسوب و بلوری کردن[۳۳] روی دیواره‌ی سلولی‌شان، کاهش بدهند (Khan, 2005).

ارتباط مابین حل کردن و رسوب میکروبی کانی‌ها و حضور موجودات زنده‌ی مربوط به عناصر کمیاب در ریزوسفر[۳۴](زون احاطه کننده‌ی ریشه‌ی گیاه) ، در کاربرد بیوژئوشیمی اکتشافی[۳۵] و ژئومیکروبیولوژی اکتشافی مهم می باشد، زیرا فعالیت های بیوژئوشیمیایی میکروارگانیسم‌ها و گیاهان به طور حقیقی به یکدیگر پیوسته است. ساختار و فعالیت میکروبیوتاهای مقیم خاک، به طور نیرومندی تحت تاثیر شرایط ژئوشیمیایی معمول Eh, pH اکسایش- کاهش و مقدار محتوای فلزی خاک هستند، مطالعات قبلی نشان می دهندکه برخی میکروارگانیسم‌ها حضور کانی سازی پنهان زیرسطحی را تعیین میکنند(Parduhn, 1995). مطالعه در این شاخه‌ی وسیع علم، فهم جمعیت های میکروبی و عملیاتی که مستلزم توسعه‌ی موفق ابزارهای بیوپی‌جویی و مدل سازی پیش گویی‌های بیوژئوشیمیایی را فراهم می آورد؛ شکل۱-۱ ارتباط بین ژئومیکروبیولوژی اکتشافی، فرآیندهای بیوژئوشیمیایی و فرآوری کانه‌ها[۳۶] توسط موجود زنده را روشن می‌کند(Reith and Rogers, 2007).

کاربرد اکتشاف کانسارها برای کشف تیپ‌های مختلف کانسارهای فلزی به طور مادام الازدیاد در حال اهمیت پیداکردن است، چرا که ذخایر مهم دنیا در حال اتمام است، لذا روشهای موثر و جدید اکتشاف نیاز به توسعه و گسترش دارند که این امکان در ژئومیکروبیولوژی اکتشافی داده شده است(Parduhn, 1995)

1- Microbiota
2- Ion-exchange
3- Complexation
4- Crystallization
5- Rhizosphere
6- Exploration biogeochemistry
7- Predictive biogeochemical modeling



شکل۱-۱: تصویر شماتیک ارتباط ژئومیکروبیولوژی اکتشافی با فرآیندهای ژئومیکروبیولوژیکال و بیوژئوشیمیایی(خاکستری)با نواحی پژوهشی و صنعت کانه‌آرایی و اکتشاف (Reith and Rogers, 2007)

۱-۲-۳ روشهای ژئومیکروبیولوژی اکتشافی

به طور کلی روشهای مطالعه‌ی گونه‌های میکروبی به دو دسته تقسیم می‌شوند (Ehrlich and Newman, 2009):

۱- تکنیکهای وابسته به کشت میکروبکها درآزمایشگاه[۳۷]

۲- تکنیکهای مستقل از کشت میکروبها در آزمایشگاه[۳۸]

۱-۱-۲-۳ تکنیکهای وابسته به کشت آزمایشگاهی میکروبها

این تکنیک‌ها به نام روشهای کلاسیک[۳۹] معروف شده‌اند و با استفاده از راههای مختلف کشت مصنوعی پرناترینت، میکروارگانیسم‌ها را در نمونه‌ی خاک تقویت کرده و آنها را از خاک جدا می‌کنند، در برخی مواقع این روشها مقدمه‌ای برای روشهای ملکولی محسوب می‌شوند (Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995). این تکنیک‌ها با استفاده از انکوباسیون[۴۰] در محیط‌های کشت جامد یا مایع با مقدار بسیارکمی از نمونه‌ی خاک برداشته شده از محل و رشد میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط مختلف مانند pH و درجه

1- Culture-dependent techniques
2- Culture-independent techniques
3- Classical methods
4- Incubation

حرارت‌های متفاوت، ترکیبات گازی و مقدار ناترینت یا بازدارنده‌ی متابولیکی شناخته شده‌اند (Reith and Rogers, 2007).

کشتهای مخصوص آزمایشگاهی، با بدست آوردن نمونه‌های منحصر به فرد در محیط کشتهای انتخابی، مسیر را برای تحلیل و آنالیزهای جامع مطالعات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تعیین خصوصیات ژنتیکی همین نمونه‌ها هموار می‌کنند (Reith and Rogers, 2007).

۱-۲-۳-۴ تکنیک های مستقل از کشت آزمایشگاهی میکروبها

تکنیک‌های مستقل ازکشت آزمایشگاهی میکروبها، بمنظور شناسایی و تعیین خصوصیات جمعیتهای میکروبی نمونه‌ی خاک، درسال های اخیر توسعه یافته و بر پایه‌ی آنالیز اجزاء سلولی[٤١] ، همچون دئوکسی ریبونوکلئیک اسید[۴۲] (DNA) ، ریبونوکلئیک اسید[۴۳] (RNA) یا اسیدهای چرب فسفولیپید[٤٤] (PLFA) شکل گرفته‌اند(Reith and Rogers, 2007; Ehrlich and Newman,2009).اجزاء سلولی نامبرده مستقیماً از سلولهای مقیم خاک، بدون هیچ کشت اولیه‌ی مهمی استخراج می شوند و مهمترین مزیت روشهای ملکولی این است که آنها اصرار بر کشت ارگانیسم‌های زنده نداشته و لذا اطلاعات صحیح‌تری از جوامع میکروبی ساکن نمونه‌های خاکی بدست می‌دهند، چرا که ترکیب و فعالیت جوامع میکروبی در شرایط در محل[۴۵] بررسی می‌شود(Widada et al., 2002) . شاید امید بخش‌ترین روش موجود ژئومیکروبیولوژی اکتشافی ردیاب ژنی[٤٦] باشد؛ نوعی از ردیاب DNA ، که یک سوسپانسیون خالص شده‌ی پرتوزا است و قطعه‌ی استاندارد منفرد DNA است که به طور ویژه‌ای با رشته‌های نوکلئوتید هومولوژس هیبرید می‌شود (Widada et al., 2002). این تکنیک‌ها به محقق امکان تعیین حضور و مقدار توالی‌های نوکلئوتیدی مخصوص در نمونه‌های خاک، رسوب و آب را در مکان‌هایی که DNA کامل و مستقیماً استخراج شود را فراهم می‌آورد(Widada et al., 2002). هنگامیکه قطعه‌ی ردیاب DNA محتوی تمام یا قسمتی ازسکانس های نوکلئوتید یک ژن دست نخورده باشد، آنرا ردیاب ژنی می‌نامند و مستقیماً برای تعیین اساس ژنتیکی بمنظور ارزیابی خصوصیات فنوتیپیکی[٤٧] ، چون مقاومت آنتی بیوتیکی یا فلزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995). روشهای فیلوژنتیک با تعیین ارگانیسم‌های کلیدی، ساختار جوامع میکروبی و ارتباط‌های ژنتیکی (مانند انگشت‌نگاری‌های ژنتیکی DNA در پزشکی قانونی) هدفمند شده

5- Celluar components
1- deoxyribonucleic acid
2- ribonucleic acid
3- Phospholipid fatty acid
4- in situ
5- Gene probe
6- phenotypic

است و بر اساس فزونسازی[48]، انگشت نگاری[49]، سکانس بندی[50] و آنالیزهای rRNA ، rDNA یعنی نوکلئوتیدهای ریبوزومال[51] پایه گذاری شده‌اند(Widada et al., 2002).

روشهای ارزیابی میکروبی با تبیین کارکرد ژنهای هدف جوامع میکروبی که با کدگذاری[52] آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، مسؤلیت تغییر شکل‌های بیوژئوشیمیایی شاخص را بر عهده گرفته وارد فاز عملیاتی می‌شوند و این روشها به طور خلاصه شامل بررسی‌های حضور[53] (بر اساس DNA) و حالت[54] (بر اساس RNA) ژنهای عملکردی ویژه می‌باشد، از ژنهای عملکردی[55] ویژه، می‌توان به ژنهای مسئول اکسیداسیون، کاهش و مقاومت فلزی سولفور و آهن اشاره کرد(Widada et al., 2002). روشهای ملکولی را به طور کلی می توان به دو شکل زیر خلاصه کرد(Widada et al., 2002; Ehrlich and Newman,2009):

1- روشهای ملکولی شکل گرفته بر پایه‌ی DNA : این روشها با بررسی حضور یا عدم حضور ژنهای بخصوصی در نمونه‌ی خاک، جامعه‌ی میکروبی قادر به تسریع در روند آزمایشات مشخص را معرفی می کنند.

2- روشهای ملکولی برپا شده بر اساس RNA : این روش‌ها بمنظور مطالعه‌ی حالت فیزیکی ژنهای میکروبیوتاهای نمونه‌ی خاک استفاده می‌شوند و فعالیت اتخاذ شده توسط جوامع میکروبی را در زمان نمونه برداری بررسی می کنند.

اگرچه روش‌های ردیاب DNA، ۲۰ سالی در آزمایشگاه‌ها مورد مطالعه بوده‌اند؛ امّا گسترش کاربردی آن در ۵ سال اخیر، به خوبی صورت گرفته است. اولین آماده سازی ردیاب ژن مقاومت فلزی، برای ارزیابی مقاومت Hg^{2+} ، در مطالعات زیست محیطی توسط بارکی[56] در سال ۱۹۸۵ آزمایش شد، بعدها رشته‌های ردیاب، برای تعیین Co^{2+} , Zn^{2+}, Cd^{2+} و برای تعیین خصوصیت مقاومت این فلزات در جمعیت های باکتریال خاکهای آلوده‌ی فلزی، در بلژیک مورد آزمایش قرارگرفت(Parduhn, 1995)؛ نظیر چنین آزمایشات فوق تکنولوژیک ژئوشیمیایی امروزه عملی و از حیطه‌ی پژوهش وارد فاز عملیاتی شده است (Reith and Rogers, 2007) و در قرن ۲۱ با پیشرفت تکنولوژی و کمبود زمان و هزینه، ژئومیکروبیولوژی اکتشافی نیازش را به چنین تستهای ملکولی آشکار نموده است(Ehrlich and Newman,2009)

7- Amplification
49- fingerprinting
50- Sequencing
51- Ribosomal nucleotides
52- Encode
53- presence
54- Expression
55- Functional genes
1- Barkey

۱-۲-٤ مروری بر کارهای قبلی انجام شده

چنین طرحی کاملاً نو محسوب شده و در دانشگاههای کشور پروژه‌ای با این هدف تا به امروز صورت نگرفته است، البته دو مورد مقاله‌ی فارسی را می‌توان برشمرد که تنها به معرفی(۲) و بکارگیری گوشه‌ای از روشهای سنتی کشت(۱) اکتفا نموده که در ادامه ذکر می‌گردد؛

۱- مهرنیا، سید رضا. « نقش عوامل میکروبیولوژی در شناسایی مناطق امید بخش معدنی- مطالعه‌ی موردی اندیس طلای تکمه داش در آذربایجان شرقی » ۱۳۸۶.

۲- کمالی، مهدی و مجتهدزاده، سید حسین « معرفی روش ژئومیکروبیولوژی اکتشافی جهت یافتن کانسارهای فلزی و پیشنهاد استفاده از آن در ایران » ۱۳۸۸.

در مورد کار اولی نیز به کشت یک نمونه از خاک اندیس طلای تکمه داش اکتفا شده است و بدون شک تبیین واضحی از ژئومیکروبیولوژی به دست نمیدهد.

۱-۳ تعریف موضوع مورد تحقیق و ضرورت انجام آن

اشتیاق جهانی به سمت فلزاتی نظیر طلا، نقره، مس، مولیبدن و اورانیوم روز بروز در حال افزایش می‌باشد؛ این در حالیست که بسیاری از کانسارهای بزرگ دنیا بیش از یک قرن است که مورد اکتشاف قرار گرفته‌اند و با وجود اینکه امروزه بودجه‌های اکتشافی افزایش چشمگیری داشته است امّا سرعت اکتشاف ذخایر در حال کم‌شدن است. در حقیقت این مسئله به خاطر این است که کانسارهای دارای رخنمون و کم‌عمق کشف شده‌اند چنانچه اغلب شرکتهای اکتشافی با ذخایری که صدها متر سنگ روباره‌ی عقیم یا خاک روی آنها قرار گرفته است روبرو هستند. لذا رشته‌ی اکتشاف با این چالش روبرو است که حال چگونه می‌توان کانسارهایی با روباره‌ی بیش از ۱۰۰ متر را کشف نمود؟ آیا می‌توان با روشهای ژئوفیزیکی و ژئوشیمیای موجود چنین ذخایری را شناسایی نمود و محل دقیق آنها را پیشگویی کرد؟ پاسخ شاید مثبت باشد، اما با چه هزینه‌ای؟ آیا روشهای گرانقیمتی چون لرزه‌نگاری و حفاری جوابگوی نیاز صنعت اکتشاف معادن خواهد بود؟ شاید استفاده از این روشها در اکتشافات تفصیلی یک کانسار مقرون به صرفه و اقتصادی باشد؛ اما در مرحله‌ی شناسایی هرگز چنین روشهای هزینه‌بری کاربردی ندارد. از روشهای ژئوشیمیایی سنتی نیز نمی‌توان در مناطقی که تفاوت آشکاری در ژئوشیمی روباره وجود ندارد بهره برد. بنابراین باید دنبال روش اکتشافی‌ای بود که اهداف مذکور؛ یعنی شناسایی و حتی اکتشاف ذخایری با عمق بیش از صد متر را برآورده کرد. در ژئومیکروبیولوژی اکتشافی تا حد بسیار زیادی این مشکلات مرتفع می‌گردد. در این طرح همه‌ی سعی محققین بر آن خواهد بود که بتوان با ساده‌ترین حالات به بهترین جواب ممکن در راستای اکتشافات

ژئومیکروبیولوژیکال در اکتشاف ذخایر مس رسید و دریچه‌ای از این شاخه‌ی نوپای علمی را در کشور باز نمود. بدیهی است که در این فرصت کوتاه امکان بررسی تمامی ابعاد ژئومیکروبیولوژی اکتشافی نبوده است، امّا با توجه به تمامی موارد و مضایق موجود در نهایت این طرح تا این مرحله منجر به معرفی یک روش اکتشافی ساده در شناسایی ذخایر مس و همچنین معرفی بیومعرف احتمالی مس گردید؛ که اگر بتوان در مراحل بعدی حضور این باکتریها را در خاکهای دیگر تصدیق نمود، برای نخستین بار در دنیا چنین کاری صورت می‌گیرد.

۱-۴ روش انجام تحقیق

مراحل کلی طرح بصورت ذیل پی گرفته شد:

۱- پروسه‌ی نمونه‌گیری ژئومیکروبیولوژیکال از ۴ معدن مس طلادار هر معدن ۳ نمونه، یک نمونه از منطقه‌ای بعنوان شاهد

۲- کشت نمونه‌ها در محیط کشت انتخابی بمنظور استخراج و خالص سازی باکتریهای مقاوم به مس

۳- تزریق آنتی بیوتیک به محیط کشت

۴- استخراج و خالص سازی دئوکسی ریبونوکلئیک اسید از باکتری

۵- کپی سازی ژن های معرف هدف از DNAی استخراج شده (Amplification of target gene from extracted DNA) با استفاده از طراحی پرایمرها و دستگاه ترموسایکلر (PCR).

۶- ژل الکتروفورز (Gel electrophoresis)

۷- تعیین باکتری معرف کانی‌سازی مس

۱-۵ سازماندهی پایان نامه

این مجموعه با پنج فصل، ژئومیکروبیولوژی اکتشافی را بعنوان روشی کاربردی معرفی می‌کند؛ در فصلی که از نظر گذرانده شد به شرح مختصری از اساس و تاریخچه‌ی روشهای اکتشاف میکروبی و توجیه بکارگیری این روشها در ایران و طرح مسئله اکتفا شد.

در فصل دوم با عنوان موقعیت جغرافیایی و زمین شناسی مناطق مورد مطالعه، به معرفی نواحی‌ای که از آنها نمونه‌گیری صورت گرفت، پرداخته شده؛ این در حالی است که وضعیت زیست محیطی، موقعیت جغرافیایی و وضعیت زمین شناسی این نواحی نیز آورده شده است.

فصل سوم به پروسه‌ی نمونه‌برداری ژئومیکروبیولوژیکال اختصاص داده شده است. در این فصل اصول نمونه‌برداری میکروبی و تمامی موارد وابسته به ان مورد بررسی قرار گرفته است. مندرجات این فصل از منابع متعددی آورده شده است و طبقه‌بندی آنها تحت عناوین مختلف، صرفاً دید نگارنده می‌باشد. با در نظر گرفتن نمونه‌گیری صورت گرفته، بنظر می‌رسد، روند نمونه‌گیری ژئومیکروبیولوژیکال مذکور در این فصل، بتواند پروسه‌ی عملی نسبتاً کاملی از این دست نمونه‌گیری باشد.

در فصل چهارم به مطالعات میکروبی صورت گرفته بر روی نمونه‌های خاک پرداخته می‌شود. در این فصل کارهای بیوانفورماتیک، تستهای آزمایشگاهی و همچنین آنالیزهای ملکولی صورت گرفته آورده شده است.

در نهایت در فصل آخر این مجموعه، تکنولوژی‌های آتی و در حال توسعه‌ی ژئومیکروبیولوژی اکتشافی تشریح شده و در ادامه به نتایج حاصل از این پایان نامه و پیشنهادات حاصله پرداخته می‌شود.

فصل۲ موقعیت جغرافیایی و زمین شناسی مناطق مورد مطالعه

۲-۱ مقدمه

از آنجائیکه در این طرح هدف ارزیابی و شناسایی باکتریهای مقاوم به مس بوده است، لذا چهار منطقه بعنوان معدن مس و دو منطقه بعنوان شاهد برای نمونه‌گیری انتخاب شدند، در ادامه به شرح خصوصیات این مناطق پرداخته می‌شود.

۲-۲ معدن مس سونگون

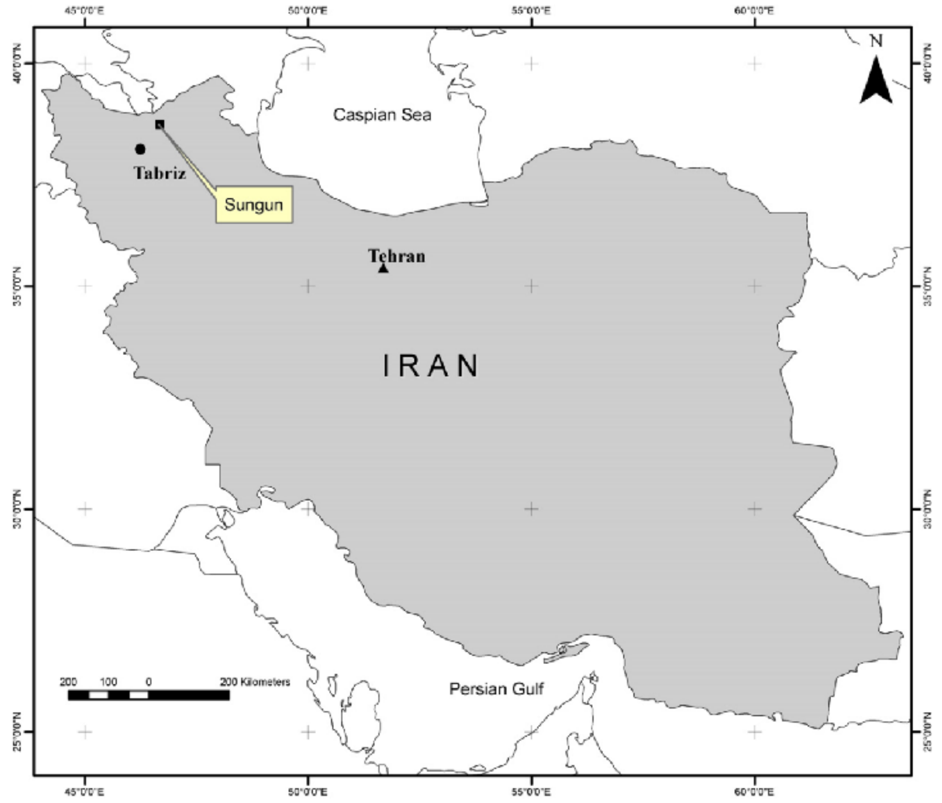
طرح مس سونگون با هدف استخراج معدن به روش نوین، تولید کنسانتره با عیار بالا جهت تامین مواد اولیه مورد نیاز صنایع مولد کشور، دستیابی به ارزش افزوده بیشتر، انتقال دانش فنی به کشور و نیز اشتغال زایی انجام گرفته است(رشیدی نژاد؛ ۱۳۸۱). طراحی معدن برای دو فاز انجام گرفته است؛ فاز اول که تا سال ۷ به طول خواهد انجامید، سالانه ۷ میلیون تن سنگ معدن و از سال ۷ تا پایان عمر معدن- عمر معدن ۳۱ سال برآورد شده است- ۱۴ میلیون تن استخراج خواهد شد. ظرفیت اسمی کارخانه پرعیار سازی در فاز اول ۹۰۰ تن بر ساعت و میزان تولید کنسانتره ۱۹ تن بر ساعت خواهد بود. برای فاز دوم کارخانه‌ای متشابه فاز اول احداث خواهد گردید و از سال ۷ ظرفیت تولید معدن و به تبع آن کانسنگ استخراجی دو برابر خواهد شد(شرکت ایتوک ایران؛ ۱۳۸۱). بطور کلی طرح مس سونگون از چهار بخش عمده شامل؛ پروژه معدن، طرح کارخانه، پروژه تامین آب و دفع پسآب و پروژههای زیربنایی تشکیل شده است(رشیدی نژاد؛ ۱۳۸۱). لازم به ذکر است که طرح مس سونگون فعالیت خود را از سال ۱۳۸۵ بصورت آزمایشی آغاز نموده است که هم اکنون در حال تجهیز و استخراج معدن می باشد(سمیعی و همکاران؛ ۱۳۸۶).

۲-۲-۱ موقعیت جغرافیایی معدن

معدن سونگون در ۳۱ کیلومتری شهرستان تبریز و ۷۵ کیلومتری شمال غرب اهر واقع شده، موقعیت جغرافیایی ۴۶ درجه و ۴۳ دقیقه طول و ۳۸ درجه و ۴۳ دقیقه عرض جغرافیایی واقع شده است(شرکت ایتوک ایران؛ ۱۳۸۱)و در همسایگی جمهوری آذربایجان و ارمنستان قرار دارد(شکل۲-۱). در واقع فاصله‌ی معدن تا رود ارس که مرز ایران و کشورهای مذکور است، تنها ۲۵ کیلومتر است(سمیعی و همکاران؛ ۱۳۸۶)؛ بنابراین از موقعیت استراتژیک مهمی در مقایسه با دیگر کانسارهای مس ایران برقرار است. فعالیتهای معدنکاری در روستای سونگون دارای پیشینه‌ی طولانی بوده و اولین فعالیت ثبت شده مربوط به دوره قاجار می‌باشد(سمیعی و همکاران؛ ۱۳۸۶). اولین فعالیت معدنکاری در امتداد رودخانه سونگون و در ضلع شرقی کانسار به منظور یافتن ماده معدنی پرعیار صورت گرفته است. در نیمه قرن گذشته رفته رفته عملیات معدنکاری سازمان یافته و از

سال ۱۳۳۷ تا ۱۳۵۰ استخراج کانسنگ پرعیار بطور نیمه پیوسته ادامه داشته است(سمیعی و همکاران؛ ۱۳۸۶، Ziaii et al., 2009)

راه اصلی دسترسی به معدن از طریق جاده‌ی اهر- ورزقان- سونگون می‌باشد(شکل۲-۲)، در واقع سونگون در ۳۲ کیلومتری شهر ورزقان واقع شده است(سمیعی و همکاران؛ ۱۳۸۶،شرکت ایتوک ایران؛ ۱۳۸۱).

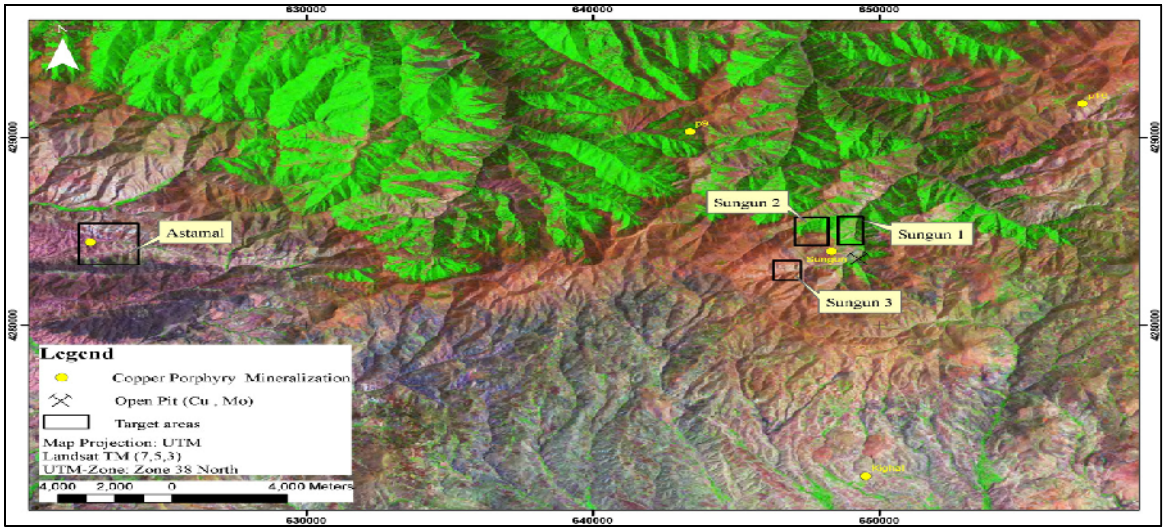


شکل۲-۱: موقعیت معدن سونگون در شمال غرب ایران(Ziaii et al., 2009)

۴ ۴ ۲ وضعیت آب و هوایی و زیست محیطی منطقه سونگون

ناحیه‌ی سونگون واقع در استان آذربایجان شرقی در منطقه‌ی کوهستانی قره داغ (ارسباران) و رشته کوههای میشو و علمدار قرار دارد(شکل۴ ۳)، بجز بخشهای حاشیه جنوبی اطراف معدن، بقیه مناطق دارای قلل متعدد و با ارتفاع متوسط بیش از ۲۰۰۰ متر می‌باشند(رشیدی نژاد؛ ۱۳۸۱، سمیعی و همکاران؛ ۱۳۸۶). رود پرآب ارس در شمال منطقه معدنی قرار دارد؛ لذا محدوده معدن پوشیده از جنگل و دارای چراهگاهای طبیعی مرغوبی می‌باشد(شکل۴ ۳).

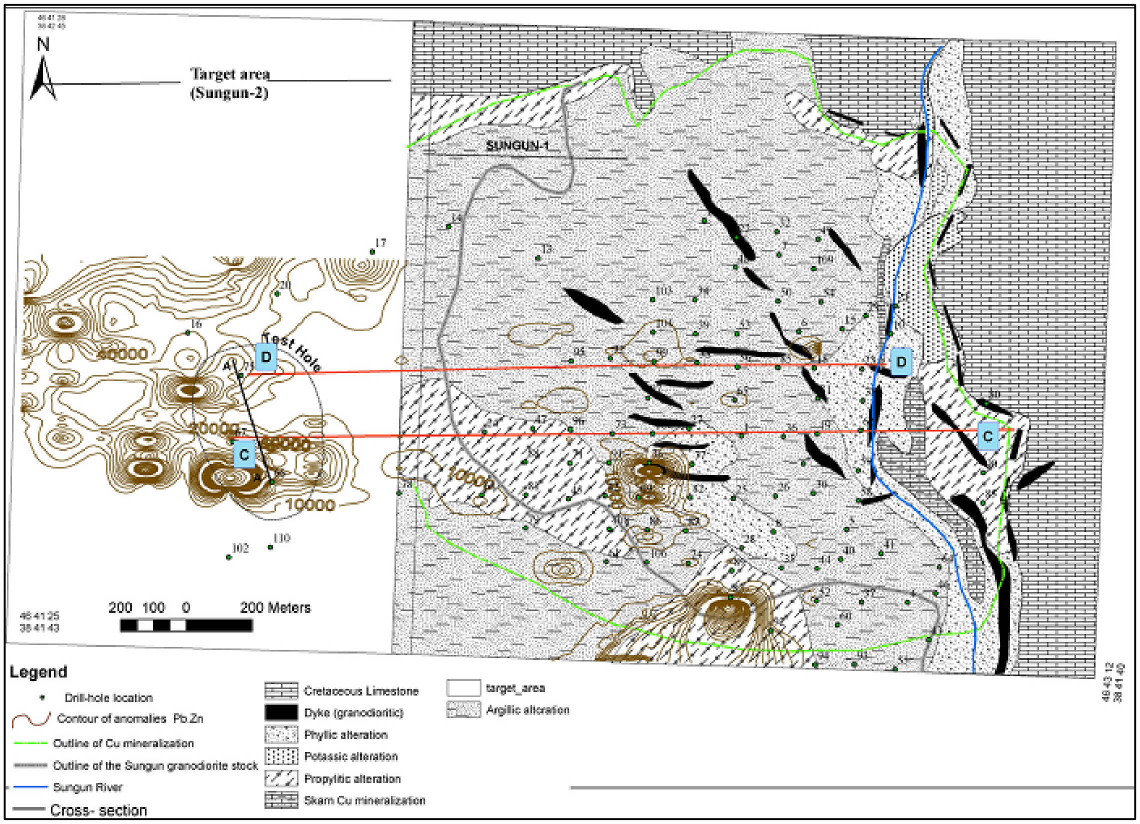
شکل۴ ۲: راه دسترسی به معدن(Google map)



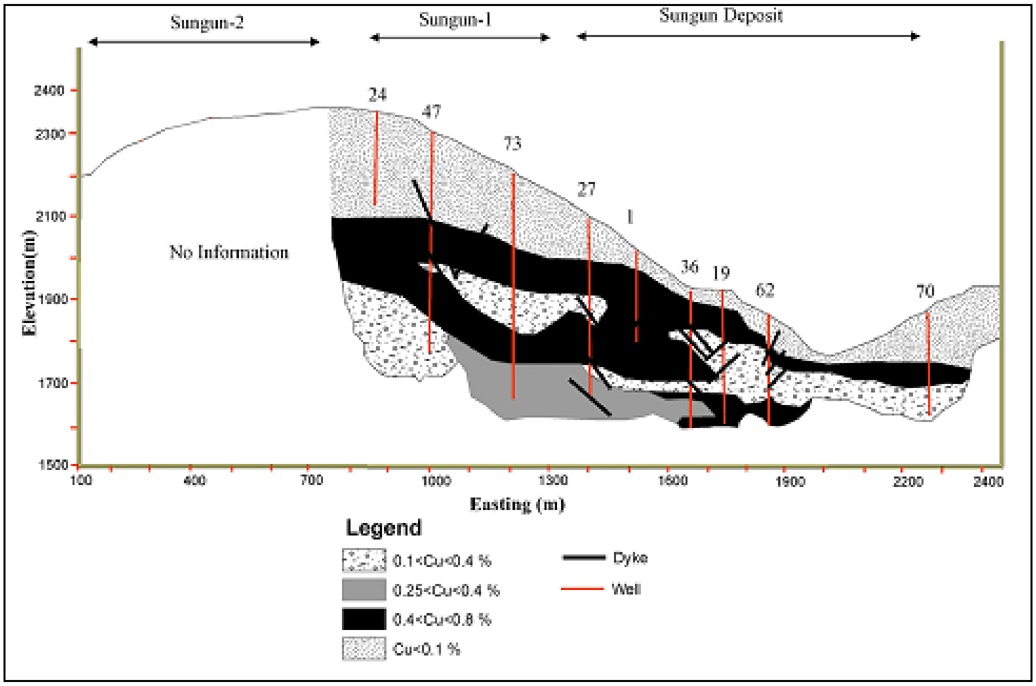
شکل۴ ۳: ژئومورفولوژی و وضعیت پوشش گیاهی اطراف معدن(Ziaii et al., 2009)

۲ ۴ ۳ زمین‌شناسی منطقه

با مطالعه‌ی نقشه‌های ۱/۱۰۰۰۰۰ و ۱/۲۵۰۰۰۰ ناحیه‌ی معدنی سونگون، می‌توان دریافت که در محدوده اهر سنگهای دوران دوم و به ویژه سنگهای دوران سوم گسترش چشمگیری دارند؛ در واقع قدیمی‌ترین سنگهای این محدوده را احتمالاً سنگهای ژوراسیک و کرتاسه آغازین که متشکل از فیلیت، میکاشیست و سنگهای آتشفشانی با ترکیب حد واسط می‌باشد را تشکیل می‌دهند(شرکت پارس اولنگ؛ ۱۳۸۴، Ziaii; 1996). توده معدنی سونگون قسمتی از یک نوار ولکانو- پلوتونیک بزرگ است که در اثر ماگماتیسم کالک آلکالن ترشیری نواحی کوهستانی محدوده سونگون را تشکیل داده است(شرکت پارس اولنگ؛ ۱۳۸۴). کارهای اکتشافی صورت گرفته(شکل ۲ ۴ و ۲ ۵) در محل، ذخیره‌ی معدن را ۹۹۵ میلیون تن مس با عیار ۰/۶۶۱٪ و مولیبدن با عیار (ppm) ۲۴۰ برآورد کرده است(Ziaii et al., 2009).



شکل ۲ ۴: نقشه‌ی زمین شناسی سونگون(Ziaii et al., 2009)



شکل ۴ ۵: میزان عیار مس با توجه به مقطع C-C (Ziaii et al., 2009)

۴ ۴ معدن مس دره زرشک و علی آباد

به منظور اکتشاف ذخایر مس دره زرشک و علی آباد یزد در اوایل سال ۱۳۴۹ قراردادی بین سازمان گسترش و نوسازی صنایع ایران و شرکت فرانسوی کوفیمین منعقد گردید. عملیات اکتشافی این شرکت از سپتامبر ۱۹۷۰ تا جولای ۱۹۷۱ میلادی صورت پذیرفت. مطالعات شرکت کوفیمین منجر به اکتشاف و برآورد ذخیره‌ای در حدود ۲۳ میلیون تن با عیار متوسط ۰/۹ درصد (عیار حد ۰/۴ درصد) تا عمق حداکثر ۱۵۵ متری گردید. پس از آن شرکت ایرانی کانی‌فرآوران عملیات اکتشافی تفضیلی را با حفر گمانه و چاهک تکمیل و اقدام به تعیین ذخیره نمود. ذخیره به دست آمده توسط شرکت کانی‌فرآوران بین ۲۶ تا ۳۰ میلیون تن با عیار مس ۰/۶۸ درصد میباشد. در سال ۱۳۸۱ کانسار دره‌زرشک به شرکت ملی صنایع مس ایران واگذار و از اوایل سال ۱۳۸۲ عملیات حفاری سیستماتیک در منطقه شروع و هم اکنون به پایان رسیده و مطالعات فنی و اقتصادی معدن انجام گرفته شده است.

۲ ۳ ۱ موقعیت جغرافیایی منطقه

برای دستیابی به منطقه علی آباد- دره‌زرشک، از سمت یزد به سوی شهرستان تفت حرکت نموده و پس از گذراندن تفت به سوی شیراز، با طی ۳۵ کیلومتر به معدن مس علی آباد و پس از طی ۱۰ کیلومتر دیگر به منطقه معدنی دره‌زرشک می‌رسیم (شکل۲ ۶).

منطقه‌ی مذکور در فاصله ۵۰ ۶۰ کیلومتری جنوب غربی شهرستان یزد و ۳۰ ۴۵ کیلومتری جنوب غربی شهرستان تفت در مسیر جاده یزد – شیراز واقع شده است.کانسار مس دره‌زرشک در غرب روستای دره زرشک و منطقه مورد مطالعه در کنار جاده اصلی تفت به ابرکوه درکیلومتر ۲۸ و ۳۶ واقع شده است. این کانسارها در مجاورت روستای علی آباد و دره زرشک و در محدوده‌ی طولهای جغرافیایی شرقی َ۴۸ °۵۳ تا َ۵۴ °۵۳ و عرضهای شمالی َ۳۰ °۳۱ تا َ۳۷ °۳۱ قرار دارد(سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد).

این ناحیه، در حاشیه غربی ارتفاعات شیرکوه در حد فاصل فلات مرکزی ایران و رشته‌کوه‌های زاگرس در

بین دو ستیغ آهکی به ارتفاع حدود ۲۶۰۰ متر واقع است. قسمت اعظم منطقه تقریبا به شکل تپه ماهور و قله های متعدد دیده می شود. دو کانسار علی‌آباد و دره زرشک بر روی نقشه زمین‌شناسی ۱:۱۰۰۰۰۰ خضرآباد و برگه توپوگرافی ۱:۲۵۰۰۰۰ علی آباد قرار گرفته است(سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد).

شکل ۲ ۶: راه دسترسی به منطقه(اطلس راههای ایران ۱:۱۰۰۰۰۰۰)

۴ ۳ ۲ وضعیت آب و هوایی و زیست محیطی ناحیه‌ی علی‌آباد دره زرشک

این منطقه از نظر آب و هوایی جزو مناطق گرم و خشک می‌باشد و به دلیل قرار گرفتن در ناحیه کویری دارای آب و هوای بیابانی و خشک است. درجه حرارت منطقه بسیار متغیر بوده و به طور کلی دو تناوب فصلی گرم و خشک و نیمه مرطوب و سرد قابل شناسایی است. اختلاف دمای روز و شب به خصوص در زمستان زیاد است(یزدی؛ ۱۳۸۷).

در این مناطق رود یا نهر دائمی وجود ندارد و منابع آبی موجود شامل جویبارهای فصلی و چشمه‌ها هستند که آب مصرفی را تامین می‌کنند. چند قنات محلی و چند چشمه کوچک تامین کننده آب مورد نیاز عملیات معدن‌کاری است. سنگهای آهکی که بهترین جایگاه تجمع آب زیرزمینی است، در منطقه زیاد دیده می‌شود. یک رودخانه نسبتا کوچک دایمی از سمت شمال به جنوب در جریان است که از کنار روستای دره‌زرشک عبور می‌کند. سیستم آبراهه‌ها نیز در منطقه گسترش کمی داشته است و فقط چندین آبراهه کوچک از شمال به جنوب منطقه در جریان است(سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد).

در منطقه دره‌زرشک یک رودخانه اصلی در شرق کانسار وجود دارد که از سمت شمال به جنوب در جریان است و تقریبا حالت دایمی دارد. تعدادی از این آبراهه‌ها که از کوه کله کفترو سرچشمه می‌گیرند و پس از طی تمامی منطقه مورد مطالعه در کنار روستای دره‌زرشک به رودخانه اصلی متصل می‌شوند و تعدادی آبراهه نیز از کوه‌های گارو سرچشمه می‌گیرند که روند عمومی آنها نیز شرق به غرب است و به رودخانه اصلی در اطراف روستای دره‌زرشک ملحق می‌شوند(سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد).

این منطقه به طور کلی به دلیل کمبود بارندگی از نظر پوشش گیاهی فقیر است به جز چند دهستان در اطراف کانسار منطقه که زمین‌های کشاورزی دارند فعالیت مشخص کشاورزی انجام نمی‌گیرد. همچنین گیاهان خودرو نظیر یوشم، شور، خارشتر، خارچوبه، اسپند، گون، بادام‌کوهی و... در منطقه یافت می‌شوند(یزدی؛ ۱۳۸۷).

۴ ۳ ۲ برخی از نتایج پژوهش‌های قبلی درباره زمین‌شناسی نواحی غرب و جنوب غربی یزد (مناطق علی آباد و دره‌زرشک)

در جنوب‌غربی یزد علاوه بر توده نفوذی گرانیتوئیدی شیرکوه، دو توده کافی‌آباد و آدربلندان نیز رخنمون دارند. به نظر می‌رسد اولین و مهمترین مرحله ماگماتیسم منطقه در ژوراسیک میانی (سیمیرین پسین) در منطقه اتفاق افتاده باشد(زارعی؛ ۱۳۷۰). از طرفی دگرگونی سنگهای آهکی کرتاسه در اطراف توده‌های نفوذی کافی‌آباد و آدربلندان در اثر نفوذگرانیت‌ها، دایک‌های دیوریتی و نیز تشکیل اسکارن‌های متعدد در آن‌ها نشان می‌دهد (شکل۲- ۷) که توده‌های نفوذی مذکور طی فازهای کوه‌زایی بعدی جایگزین شده‌اند و بنابراین باتولیت گرانیتوئیدی شیرکوه دارای محدوده وسیع پلوتونیسم طی زمان ژوراسیک بوده است که مهمترین مرحله در ژوراسیک میانی اتفاق افتاده است(زارعی؛ ۱۳۷۰).

به احتمال زیاد دو توده نفوذی کافی‌آباد و آدربلندان که در جنوب‌غرب یزد و به فاصله ۲۲ کیلومتری از هم قرار دارند به دلیل دگرگونی آهک‌های اربیتولین‌دار کرتاسه اطراف خود حداقل از کرتاسه زیرین جوانترند، قسمت اعظم حجم توده‌ها را گرانودیوریت، گرانیت و با مقدار کمتر تونالیت، کوارتزسینیت و سینیت تشکیل می‌دهند که گرانیتوئیدهای کافی‌آباد و آدربلندان در مجموعه گرانیتوئیدهای همزمان و پس از کوه‌زایی قرار می‌گیرد (یزدی؛ ۱۳۸۷). تمام نمونه‌های سنگ شیرکوه پرآلومین و اکثر نمونه‌های سنگی کافی-آباد و آدربلندان متاآلومین هستند. این موضوع نشان می‌دهد که احتمالا آنها از یک ماگمای مادر غنی از آلومینیوم مشتق شده‌اند. توده‌های گرانیتوئیدی منطقه بیشتر ماهیت کالکوآلکالن دارند(زارعی؛ ۱۳۷۰).

به لحاظ اقتصادی پهنه‌های وسیع تراورتن، مرمر و اسکارن و کانسارهای فلزی نظیر آهن، مس، سرب، روی و کانیهای غیر فلزی مانند کائولینیت و فلدسپات مشاهده می‌شود. پگماتیت‌های در ارتباط با توده‌های نفوذی، خیلی کم بوده و فاقد ارزش اقتصادی هستند. به لحاظ ژنتیکی گرانیتوئیدهای کافی‌آباد و آدربلندان از نوع I هستند، تعداد کمی از نمونه‌ها گرایش به نوع S نشان می‌دهند و بر طبق تقسیم‌بندی ژنتیکی از نوع هیبرید هستند. (سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد). مقایسه سنگ‌های نفوذی به لحاظ ژئوشیمیایی و کانی‌شناسی با سنگ‌های نفوذی مشابه در سایر نقاط جهان نشان می‌دهد که سنگ‌های نفوذی مورد مطالعه با سری کوه‌زایی نوع آند شباهت دارند و این امر می‌تواند نشانه ارتباط این سنگ‌ها با مناطق فرورانش باشد. شواهد بافتی و ترکیب کانی‌شناسی توده‌های نفوذی نشانگر جایگزینی این توده‌ها از اعماق متوسط تا کم است(زارعی؛ ۱۳۷۰). از طرفی دلایل کانی‌شناسی، ژئوشیمیایی و نمودارهای تشخیص محیط تکتونیکی تعلق سنگهای گرانیتوئیدی به مناطق تکتونیکی نوع کوه‌زایی و کمانهای ماگمایی نوع قاره‌ای را نشان می‌دهد. منشا گوشته فوقانی و یا پوسته اقیانوسی فرورونده شامل آلودگی با مواد پوسته‌ای برای سنگهای نفوذی مورد نظر پیشنهاد می‌شود(زارعی؛ ۱۳۷۰).

سنگهای آتشفشانی در سه مقطع زمانی ائوسن، نئوژن و کواترنری دیده می‌شوند؛ این سنگها، دارای ترمهای مختلف بازالت، آندزیت، تراکی‌آندزیت، داسیت و ریولیت می‌باشند(زارعی؛ ۱۳۷۰). سنگهای فوق به دو صورت گدازه و توف ظاهر شده‌اند که ماگمای سازنده سنگهای آتشفشانی از ائوسن تا کواترنری از نوع

کالکوآلکالن متوسط تا غنی از پتاسیم می‌باشد(زارعی؛ ۱۳۷۰). نمودارهای مختلف تکتونوماگمایی نشان می‌دهد که بازالتها و آندزیت‌ها از ائوسن تا کواترنری از نوع کوه‌زایی و مربوط به حواشی مخرب قاره‌ای و حاشیه فعال قاره هستند. مقایسه نمودارهای عنکبوتی مربوط به سنگهای آتشفشانی با الگوی مربوط به مناطق فرورانش شباهت بین آن‌ها را نشان داده و تطابق آنها با ولکانیسم حاصل از مناطق فرورانش را تایید می‌نماید که این موضوع توسط خصوصیات شیمیایی و محیط تکتونیکی سنگها نیز تایید می‌شود(یزدی؛ ۱۳۸۷).

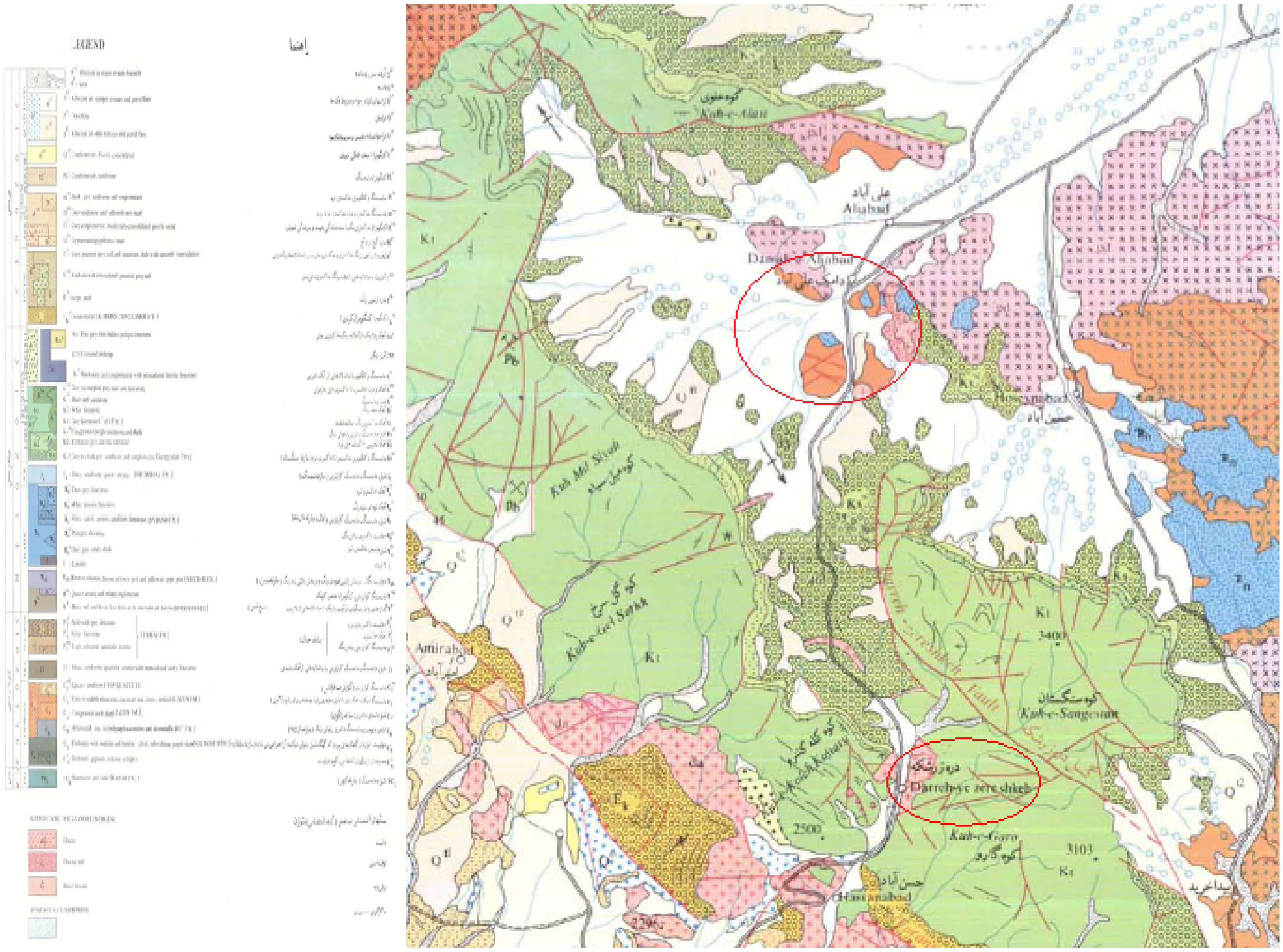
وجود فواصل زمانی طولانی بین فورانهای هر دوره مانع از آن است که منشا همه آنها را از یک مخزن مشترک بدانیم ولی نحوه قرارگیری سنگها در طبیعت نشان‌دهنده این است که به احتمال زیاد سنگهای اسیدی از ذوب بخشی قشر گرانیتی حاصل شده‌اند. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که ماگمای سازنده سنگهای آتشفشانی مورد نظر یک ماگمای اولیه نبوده است و به نظر می‌رسد که منشا ولکانیسم ائوسن تا کواترنری در منطقه مورد مطالعه از بخشی پوسته اقیانوسی فرورونده نئوتتیس به زیر پوسته ایران مرکزی و احتمالا ذوب بخشی سنگهای پوسته تحتانی باشد(زارعی؛ ۱۳۷۰، یزدی؛ ۱۳۸۷).

شرکت مهندسی کانی‌فرآوران به نقل از شرکت کوفی‌ماین و نیز برخی از کارشناسان شرکت کانی‌فرآوران در گزارشات منتشره خود به زمین‌شناسی و کانی‌زایی مس در مناطق علی آباد و دره‌زرشک پرداخته‌اند که خلاصه و اهم آن به شرح ادامه است(قمیان؛ ۱۳۷۸):

منطقه دره‌زرشک و علی آباد، بین فلات ایران مرکزی در شمال‌شرق و رشته‌کوههای چین‌خورده زاگرس در جنوب‌غرب واقع شده است. معادن مس میدوک و سرچشمه نیز در همین موقعیت زمین‌ساختی به ترتیب در فواصل ۱۹۰ و ۲۸۰ کیلومتری جنوب‌شرق یزد قرار دارند، بیشترین چشم‌انداز موجود در منطقه را سنگهای رسوبی مزوزوئیک تشکیل می‌دهد که از پایین تا بالا شامل توالی‌های زیر است:

- کنگلومرا
- ماسه‌سنگ و شیلهای تیره
- شیلهای قرمز و سیلت
- آهکهای ماسیو (آپتین- سنومانین[57]) که دارای مقادیر زیادی فسیل عمدتا از نوع اربیتولوئید[58] با ضخامت حدود ۴۰۰ متر سنگهای آتشفشانی – رسوبی متعلق به ائوسن بر روی تشکیلات مزوزوئیک قرار گرفته و به صورت ناودیس در بخشهای غربی و جنوب‌غربی ناحیه، با گسترش محدود دیده می‌شود(زارعی؛ ۱۳۷۰).

1- Aptian-Cenmanian
2- Orbitoloids



شکل۴ ۷: بخشی از نقشه ۱:۱۰۰۰۰۰ خضرآباد(سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد)

۴ ٤ معدن متروکه مس جارو

معدن مس جارو از معادن متروکه مس و نقره کشور محسوب می‌شود؛ فعالیتهای استخراجی در منطقه را برخی مربوط به دوران شدادی و حتی قبل از آن می‌دانند، امّا هم اکنون معدن بصورت متروکه رها شده است و گویا دوباره مرحله‌ی اکتشاف را تجربه می کند؛ بطوریکه در سالهای اخیر گمانه‌های اکتشافی متعددی در محدوده‌ی معدن حفر گردیده و مغزه‌های حاصل از حفاری در حال مطالعه هستند(سازمان زمین‌شناسی کشور؛ ۱۳۷۰).

۴ ٤ ۱ موقعیت جغرافیایی معدن

معدن جارو در حوالی یکی از روستاهای استان البرز با همین نام، با فاصله ۵۹ کیلومتری از شهرستان کرج(شکل۴ ۸)، در ۱۵ کیلومتری شهر اشتهارد واقع گردیده است(**سازمان زمین‌شناسی کشور؛ ۱۳۷۰**). این معدن در محدوده شهرستان کرج در طول شرقی ۵۰ درجه و ۳۳ درجه و ۲۵ ثانیه و عرض شمالی ۳۵ درجه و ۴۱ دقیقه جای دارد(خوئی و همکاران؛ ۱۳۷۸).

شکل۴ ۸: موقعیت جغرافیای معدن جارو(Google map)

۴ ٤ ۲ وضعیت زیست محیطی و آب و هوایی روستای جارو

روستای جارو دارای آب و هوای سرد و خشک کوهستانی می‌باشد که میزان بارش معمولاً در زمستانها زیاد است(دانشفر؛ ۱۳۷۱). فصل سرد از ماه آبان شروع می‌شود، در اسفند ماه از سرمای هوا رفته‌رفته کاسته می‌شود و در اواخر فروردین هوا با سرعت بیشتری گرم می‌شود و در اوایل خرداد هوا نسبتاً گرم است؛ گرم‌ترین ماه‌های سال در مرداد و شهریور با دمای متوسط ۳۰ تا ۴۰ درجه و سردترین ماه سال دی ماه با دمای یک درجه سانتی گراد گزارش شده است(دانشفر؛ ۱۳۷۱).

میزان بارندگی عمدتاً کم بوده و به مقدار ۳۰۰ ۵۰۰ میلیمتر در طی سال اندازه‌گیری شده است، به دلیل کمبود بارندگی روستای جارو از نظر پوشش گیاهی فقیر است و فعالیت کشاورزی در منطقه صورت نمی‌گیرد(دانشفر؛ ۱۳۷۱).

۴ ٤ ۳ زمین شناسی جارو

معدن جارو در دامنه شمالی ارتفاعات کوه جارو واقع گردیده است؛ این منطقه از نظر تقسیمات ساختمانی رسوبی کشور، بخش کوچکی از پهنه‌ی ارومیه- دختر و از لحاظ متالورژی در بخش غربی زون مس- طلادار ساوه- کاشان- نایین قرار دارد که در آن نفوذ توده های گرانیتی و دیوریتی منجر به ایجاد زون های کانه دار شده است(دانشفر؛ ۱۳۷۱). با توجه به بررسیهای انجام گرفته در منطقه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کانی سازی در این منطقه عمدتاً به صورت رگه‌ای بوده و به روش پر کردن فضاهای خالی انجام گرفته و به طور مستقیم با گسلهای موجود در منطقه مرتبط است(سازمان زمین‌شناسی کشور؛ ۱۳۷۰، دانشفر؛ ۱۳۷۱). روند اصلی کانی سازی در امتداد شرقی- غربی در طول کمتر از ۱۲۰۰ متر و عرض کمتر از ۲۰۰ متر است که ضخامت کانی سازی (ضخامت رگه ها) ۱ تا ۲ متر می باشد(دانشفر؛ ۱۳۷۱).

سنگهای ناحیه معدنی جارو شامل ولکانیکهای ائوسن، داسیت پورفیری، آندزیت و توف بوده و شکل ماده معدنی رگه‌ای و همایند کانه ای آن کالکوسیت، کالکوپیریت، گالن، مالاکیت، آزوریت کریزوکولا است(خوئی و همکاران؛ ۱۳۷۸). از لحاظ کانی شناسی، کانی های مالاکیت و آزوریت در قسمت سطحی و کانیهای کالکوپیریت،کالکوسیت، بورنیت، کوولیت در بخش های عمیق‌تر منطقه اکتشافی دیده می شود؛ آنالیز نمونه های گرفته شده از حفریات، وجود فلزات مس، نقره، سرب، روی و به مقدار کم طلا را نشان داده است. عیار متوسط نقره ppm ۹۸۵ و عیار متوسط مس ۵ درصد است(دانشفر؛ ۱۳۷۱). با توجه به مطالب فوق می توان گفت که محدوده معدنی جارو یک معدن کوچک مس و نقره می باشد.

فصل۴ پروسه‌ی نمونه برداری ژئومیکروبیولوژیکال

۳ ۱ کلیات

پروسه‌ی نمونه برداری در ژئومیکروبیولوژی اکتشافی عاملی فوق العاده مهم و تأثیر گذار می باشد، به طوریکه روشهای ملکولی براساس RNA تا حدودی فعالیت باکتریال نمونه‌های زیست محیطی را تحت نظر دارند(Reith and Rogers, 2007; Parduhn, 1995). یکی از موارد تعیین کننده در نتیجه‌ی تستهای ژئومیکروبیولوژیکال، نحوه‌ی صحیح نمونه برداری است که این پروسه شامل تمام مواردی که شرایط تطابق با محیط زیست طبیعی را فراهم می آورد، می باشد(Parduhn, 1995; Glazer and Nikaido, 2007). پروسه‌ی نمونه برداری ژئومیکروبیولوژیکال مجموعه عملیاتی را شامل می‌شود که در طی مراحل مختلف، نمونه‌گیری تحت شرایط استریل صورت گرفته و منجر به افزایش یا کاهش جمعیت میکروبیال نمونه‌ی خاک نگردد و به طور کلی نمونه‌ای حقیقی از محیط زندگی ارگانیسم‌ها و بویژه میکروارگانیسم‌ها باشد. پروسه‌ی نمونه برداری، برای تمام روشهای ژئومیکروبیولوژی اکتشافی تقریباً یکسان بوده و بسته به شرایط محیطی صورت می‌گیرد. (Parduhn, 1991; 1995; Reith and Rogers, 2007; Glazer and Nikaido, 2007)آنچه در این پروسه، دارای اهمیت وافری می باشد، معرف واقعی بودن نمونه‌ی برداشتی و درصد حقیقی بودن نمونه نسبت به جامعه‌ی میکروبی و محیط زیست آن می‌باشد(Parduhn, 1991; 1995)

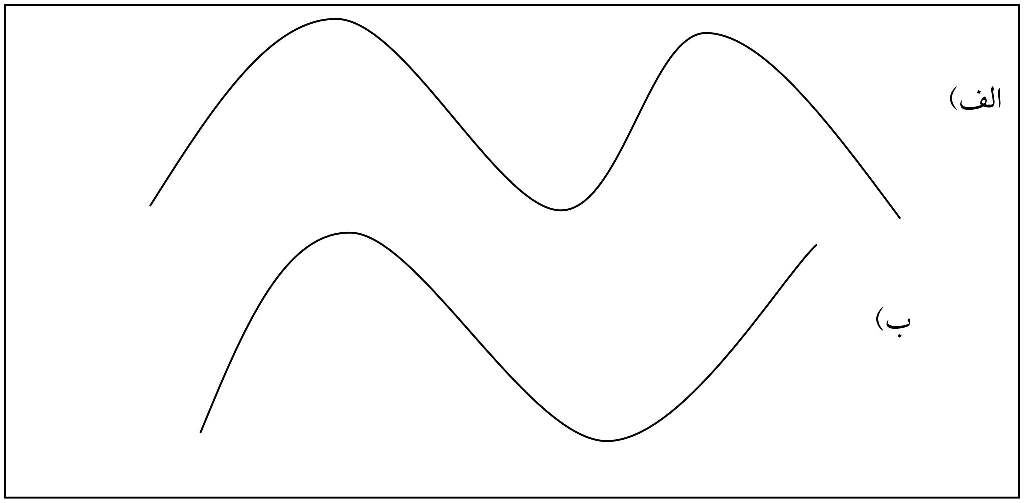
همان گونه که ذکر شد، موفقیت ژئومیکروبیولوژی اکتشافی مستلزم روند صحیح برداشت نمونه و تفسیر نتایج و فهم مقاومت فلزی و آنتی بیوتیکی، در جمعیتهای باکتریال است. به طور قطع، سهم نمونه برداری در این مهم، بسیار بیشتر بوده و الزاماً اتخاذ روش نمونه برداری، منجر به ابطال تمامی نتایج و شکست ژئومیکروبیولوژی اکتشافی می گردد. مواردی که در ادامه می‌آید، از مراجع متعددی گرفته شده است؛ که توسط گردآورنده‌ی پروژه تیتر شده است. به نظر می رسد ارائه جامع و نزدیک به واقعیتی از پروسه‌ی نمونه برداری باشد که اهداف ژئومیکروبیولوژی اکتشافی را تا حد بسیار زیادی برآورده می کند؛ در ادامه این اصول به ترتیب تشریح خواهد شد.

۳ ۲ اصول نمونه برداری

به طورکلی جمعیتهای میکروبیال نامنظم و به صورت غیر اپیدمیک در خاک پراکنده شده‌اند. که این معظل پروسه‌ی نمونه برداری را دچار مشکل نموده و طالب دقت زیادی در این زمینه است (Parduhn et al., 1985). ولی با تمام ظرافت خاص نمونه برداری ژئومیکروبیولوژیکال، این پروسه، ساده و فاقد اثرات مخرب زیست محیطی می باشد(کمالی و مجتهدزاده؛ ۱۳۸۸). اصول نمونه برداری را بطور کلی می‌توان به صورت زیر برشمرد:

۳ ۲ ۱ طرح شبکه‌ی نمونه برداری

در ژئومیکروبیولوژی خیلی شبکه‌ی نمونه‌گیری مهم نمی‌باشد چرا که هدف ژئومیکروبیولوژی اغلب اکتشاف ذخیره‌ی معدنی نمی‌باشد و بیشتر به بررسیهای زمین‌شناسی و فرآیندهای ژئومیکروبیولوژیک می‌پردازد؛ لذا در طول حروف M یا Z (شکل۳ ۱) نمونه به صورت تصادفی برداشته می‌شود (Hao et al., 2010). امّا در حوزه‌ی اکتشاف معدن نمونه‌گیری به روش منظم (سیستماتیک) و در امتداد چند پروفیل، عموماً عمود بر روند فرضی کانسار است صورت می‌گیرد(Dong, 2010)؛ برای همین شبکه‌ی نمونه‌برداری معمولاً منظم و ترجیحاً مربعی طراحی می‌شود (Parduhn, 1995; Reith and Rogers, 2007).



شکل۳ ۱: خطوط نمونه گیری تصادفی M (الف) و Z (ب)

۳ ۲ ۲ فواصل نمونه گیری

به دلیل مشکل نمونه‌گیری در رابطه با جمعیت‌هایی که نامنظم درخاک متمرکز شده‌اند و غیر واقعی نمودن این مهم به محل زندگی میکروارگانیسم‌ها، برنامه‌های نمونه برداری در مقیاس محلی (فواصل ۴۵-۲۰۰متر) کمتر مستعد پیچیده شدن توسط پارامترهای غیرمعدنی بوده (Parduhn, 1995; Ehrlich and Newman, 2009) و برای تعیین محل دقیقتر حفاری مناسبتر است(Parduhn, 1991; 1995; Reith and Rogers, 2007; 2008) درحالیکه پیچیده شدن نتایج در مقیاس ناحیه‌ای بیشتر می‌باشد (Watterson te al., 1986; Watterson, 1985)،

ولی فاصله‌ی محل‌های نمونه برداری، بسته به ابعاد ساختمان کانسار پیش‌بینی شده، متغیر بوده و در مراحل اولیه عموماً بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ متر در نظر گرفته میشود(Reith et al., 2006; 2007; 2009; کمالی و مجتهدزاده؛ ۱۳۸۸).

۳ ۴ ۳ محل نمونه‌گیری

نمونه‌ها از خاک رویی کانسار احتمالی و از زون ریزوسفر گرفته می‌شوند؛ امّا نمونه‌گیری از رسوبات، بیوفیلمهای رویی سنگها و آب نیز بکار گرفته شده است (Robe et al., 2003; Schmidt and Reith; 2007). شدت جمعیت های باکتریال در افقهای مختلف خاک (C,B,A) متفاوت می باشد، پرادهن[59] در سال ۱۹۸۵ دریافت که جمعیتهای باسیروس سروس در افق‌های مختلف خاک آمار متفاوتی دارند (Parduhn, 1985). او نتایج کارش را در جدولی خلاصه کرد(جدول ۳ ۱)؛ جدول مذکور، توزیع جمعیت باکتریال را در افق A (سطح آلی) و B (میانه) خاک در نواحی متفاوت محیطی نشان می‌دهد.

جدول ۳ ۱، نشانگر شدت پراکندگی باسیلوس سروس و بطورکلی باکتریها نه تنها درمیان افق های خاک، بلکه درمیان خاک و هوای منطقه‌ی گوناگون می‌باشد. خاکهای غنی از مواد ارگانیکی در محیط‌های جنگلی مرطوب محتوی بالاتری میزان باسیلوس سروس می باشند. اگرچه خاکهای فقیر و خالی از مواد ارگانیکی و آب و هوای خشک و نیمه خشک دارای پایین ترین درصد این باکتری است؛ نتایج مطالعات پرداهن نشان می‌دهد که بمنظور مقاصد اکتشافی، جمع آوری خاک باید با دقت و مراقبت ویژه‌ای صورت گیرد. چرا که قسمت‌های خاک هر کدام جهت سازگاری و مقاومت باسیلوس سروس در آنها متفاوت می‌باشند(Parduhn, 1985).

۳ ۴ ۳ ۱ تذکّرات

الف) در طول پروسه‌ی نمونه برداری، افق اتخاذ شده‌ی خاک باید یکسان باشد و درصورت تغیر حتماً ذکر گردد(Parduhn, 1991; 1995; Reith and Rogers, 2007; 2008).

ب) علاوه بر دقت، اطمینان در نمونه‌گیری از افق یکسان خاک در طول پروسه‌ی نمونه برداری منطقه، چگونگی برخورد با هر بخش بعنوان یک واحدآماری جداگانه، فوق العاده با اهمیت می‌باشد (به سرزمینهای سبز و خشک و کویری جدول۳ ۱ نگاه کنید).

1- parduhn

جدول۳ ۱: مقایسه جمعیت های باسیلوس سروس (CFU/g) در افق B و A نواحی مختلف زیست محیطی(Parduhn, 1995)

وضعیت زیست محیطی		افق A	افق B
(۱)- جنگلهای سوزنی برگ شمالی[61]	کاج غوشه/سپیدار[60]	۵۷۹۰۰ ۶۵۹۰۰	۷۱۰ ۶۴۰
تالاب	زمینهای پوشیده با خزه‌ی خشک (۷نمونه) لجن زار	۲۰۰۰۰ ۶۴۰۰	ـــــــ
(۲)- جنگلهای آلپی	کاج(۴نمونه)	۷۸۰	۱۷۰۰
(۳)- جنگلهای گرم	مانزانیت[62]	۲۱۰۰	۲۷۷۰
کویری	(۴)- نیمه خشک (۵)- ریزوسفر(سروکوهی)	ـــــــ	۱۴۱۲ ۲۹۵۶۴
(۶)- بیابانهای کم آب	کرئوزوت[63] (ریزوسفر) مسکوئیت[64] (ریزوسفر)	ـــــــ	۵۷۰ ۴۷۰
جاده‌ی شنی	ـــــــ	ـــــــ	۰/۵

نکته‌ها: مقادیر درج شده‌ی جدول میانگین ۱۰نمونه هستند، مگر مواردی که ذکر شود.

(-)افق خاک مد نظرآشکار نبوده یا امکان نمونه گیری نبوده است.

۱- خاکهای ناحیه شمالی گلدن اسکپتر، اونتاریو، کانادا (Golden sceptre north zone,ontario,canad)

۲- خاکهای امیپر، کلرادو (Emipre,Colorado)

۳- خاکهای ردینگ، کالیفرنیا (Redding,California)

۴- خاکهای شهرستان وشو، نوادا (Washoe county , Nevada)

۵- خاکهای آریزونای شمالی، منطقه ی اختصاصی هالپای (Northern Arizona Hualpai Reservation)

۶- خاکهای ایالت اسپریال، کالیفرنیا (Imperid county,colifornia)

1- Poplay/ brich
2- Boreal forest
3- Manzanita
4-Creosote
5- Mesquite

ج) اشتباه نمودن در تعیین نوع هر منطقه، منجر به ایجاد جمعیتهای غیر مرتبط به محل کانی سازی و آنومالی‌های کاذب می‌شود (Parduhn, 1991; 1995; Reith et al., 2006; 2007; 2009, Reith and Rogers; 2007). استفاده‌ی موفقیت‌آمیز از روش‌های ژئومیکروبیولوژی اکتشافی، تا حد بسیار زیادی به حذف متغیرهای غیرمرتبط و جبران متغیرهای مرتبط با زون مینرالیزه بستگی دارد(Parduhn, 1991; 1995).

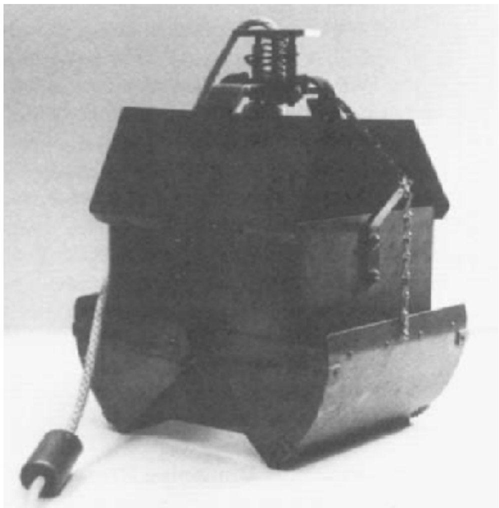
د) شرایط آب و هوایی و وضعیت پوشش گیاهی منطقه ذکرشود. چرا که همانطور که در جدول نشان داده شد؛ رشد جمعیتهای باکتریال خاک در شرایط مختلف محیطی و آب و هوایی متفاوت می باشد. بدیهی است در صورت تغییر وضعیت پوشش گیاهی منطقه و احیاناً شرایط آب و هوایی، لازم به خاطرنشان کردن آن می باشد.

۳ ۲ ٤ عمق نمونه گیری

عمق نمونه‌گیری بسته به انتخاب افق خاک، پوشش گیاهی و وضعیت آب و هوایی منطقه‌ی مورد مطالعه می‌تواند متغیر باشد؛ ولی به طور کلی نمونه‌ها از ناحیه‌ی زیر پوشش گیاهی و یا از عمق ۱۰- ۱۵ سانتیمتری برداشته می‌شود(Schmidt and Reith, 2007: Reith and Rogers, 2008; Parduhn, 1991; 1995). در نواحی بایر و خشک فاقد پوشش گیاهی نمونه‌ی خاک از عمق ۱۵۰سانتیمتری تا ۵ متری زمین، توسط وسیله‌ی مناسب، مانند مته‌ی اوگر دستی که دارای یک پایپ PVC ، ۳۲ میلی‌متری است، گرفته می‌شود؛ در پایپ نمونه‌ها با اتانول شسته می‌شوند و در شرایط استریل نمونه‌گیری صورت می‌پذیرد (Reith et al., 2009) برای مناطق پوشیده از آب نیز، نمونه‌گیری از رسوبات سخت نشده‌ی کف دریا، در عمقی حدود ۳۰ سانتی متر از کف دریا نتایج رضایت بخشی داده است(Ehrlich and Newman,2009). در شکل ۳ ۲، نمونه‌ای از وسیله‌ی مورد استفاده در این تیپ نمونه‌گیری نشان داده شده است.

۳ ۲ ۵ مقدارنمونه

مقدار نمونه‌ی مصرفی در فرآیند روشهای ملکولی و کشت در روشهای کلاسیک، ۰/۱ تا ۱۰گرم می‌باشد(Reith and Rogers, 2008) . امّا برای نمونه‌گیری از هر نقطه ۱۰۰گرم(Parduhn, 1991; 1995) تا ۵۰۰ گرم(Reith et al., 2005) نیز برداشته می‌شود.



شکل ۴ ۲: لایروب اکمان(Ehrlich and Newman, 2009)

۳ ۴ ۶ مدت زمان نمونه گیری

طول زمان نمونه برداری نباید خیلی زیاد باشد؛ یعنی نمونه برداری نباید پرسه‌ای زمان‌بر باشد. چرا که تعداد باکتریهای نمونه گرفته شده، با طول کشیدن زمان ذخیره‌ی آنها در ظرف نمونه‌گیری، کاهش می‌یابد (Melchior et al., 1994). از طرفی روشهای ملکولی RNA یکی از وظایفشان، کنترل حالت میکروبها در طول زمان نمونه‌گیری می‌باشد(Reith and Rogers, 2007)؛ که همه‌ی این موارد اهمیت زمان نمونه‌گیری را نشان می‌دهد.

۳ ۴ ۷ محل نگهداری نمونه‌های برداشتی

نمونه‌ها درکیسه‌های نمونه برداری استریل شده جمع آوری می‌شود و کلاً مراحل جمع آوری نمونه‌ها، باید تحت شرایط استریلیزه صورت گیرد(Reith and Rogers, 2008; Reith et al., 2009). کیسه‌های نمونه گیری پلاستیکی(Schmidt and Reith, 2007; Marrufo et al., 2002)، کتانی و فاقد هرگونه مواد اثرگذار و رنگی ذکر شده‌اند(Schmidt and Reith, 2007; Parduhn, 1991). در نهایت ترکیب کیسه‌ی نمونه‌گیری باید به گونه‌ای باشد که بعنوان ناترینت برای ارگانیسم‌ها محسوب نشود.

۳ ۴ ۸ دمای محل نگهداری نمونه

مقاومت جوامع میکروبی مختلف در برابر دماهای گوناگون، متفاوت است و آنها تحت هر دمایی قادر به فعالیت هستند و لازم است نمونه‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه، در دمایی بین ۴ ۸ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شوند تا از فعالیت آنها جلوگیری شود(Schmidt and Reith, 2007; Parduhn, 1991; 1995).

۳ ۴ ۹ موارد دیگر

- خاک مورد نظر در مطالعات میکروبی باید از رطوبت لازم برخوردار باشند، چرا که اگر خاک خشک باشد و باصطلاح moisture capacity آن پایین باشد، باکتریها غیر فعال و در حالت اسپورینگ[65] می‌باشند و لذا تعدادشان کم است(Hongmei et al., 2003).
- ابزار نمونه‌گیری باید بخوبی شسته شده و بعداً با الکل و شعله استریل شوند. اگر از رخنمون سنگی نمونه گرفته می‌شود باید با چکش استریل نمونه برداشته شود(Ehrlich and Newman, 2009).
- سطحی که در تماس با نمونه خواهد بود با استفاده از اسپری متانول ویوله دوژانسیون[66] استریل شود(Ehrlich and Newman, 2009).
- در تمام مراحل نمونه‌گیری از دستکش استریل استفاده شود(Marrufo et al., 2002).
- نمونه‌ها با سایزهای زیر ۸۰ میکرون(Melchior et al., 1994)، ۱۲۵، ۲۰۰ میکرون مورد استفاده می‌باشند که با الکهای استریل به سایز مذکور می‌رسند(Reith et al. , 2007).
- نمونه‌های سطحی باید از عمقی گرفته شوند که از آلودگی‌های سطحی عاری بوده و نماینده‌ی مواد ارگانیکی باشند(Melchior et al., 1994).
- عموماً کیسه‌های نمونه‌گیری با چسبهای پلاستیکی مهر و موم می‌شوند(Reith et al. , 2005).
- بهتر است نمونه‌گیری پس از فصل بارش منطقه انجام شود؛ چرا که رشدمیکروبها بیشتر بوده و آشکارسازی آنها راحتتر است(Reith and Rogers, 2008; Reith et al., 2009).
- در اغلب مطالعات ژئومیکروبیولوژیکال(Reith and Rogers, 2008; Parduhn, 1991; 1995) پارامترهایی چون دما، شوری، pH, Eh و دیگر موارد اندازه‌گیری می‌شود و مواردی از این دست در توسعه‌ی جوامع میکروبی موثر هستند.
- در مورد نمونه گیری از آب یا هوا همان مراحل نمونه گیری اتموژئوشیمیایی[67] و هیدروژئوشیمیایی[68] پی گرفته می‌شود(Ehrlich and Newman, 2009)؛ با این تفاوت که برخی

1- Sporing
2- Carbol-gentian violet methanol spray
67 Atmogeochemical
68 Hydrogeochemical

مراحل خاص نمونه برداری ژئومیکروبیولوژیکال مانند وسیله نگهداری نمونه در آن رعایت می شود.

۳ ۳ فعالیت‌های آزمایشگاهی پس از نمونه‌برداری

بسته به نوع تکنیکهای اکتشاف ژئومیکروبیولوژیکال آماده‌سازی نمونه نیز متفاوت می‌باشد در روشهای سنتی نیاز به کشت میکروبها در آزمایشگاه است، در حالیکه روشهای ملکولی نیازی به آماده‌سازی اولیه‌ی نمونه به آن شکل ندارند.

در روشهای کشت آزمایشگاهی برای جداسازی باکتری خاص خاک و بررسی وضعیت آن، نیاز به محیط کشتهای انتخابی می‌باشد. با یکسری مواد شیمیایی خاص تحت استرسهای دما و فشاری می‌توان محیط کشت انتخابی را تهیه نمود(Reith et al., 2005). بعنوان نمونه برای جداسازی باسیلوس سروس در نواحی زرخیز اغلب دستورالعمل وترسون(Watterson, 1985) مورد استفاده است.

در روشهای ملکولی پس از نمونه‌گیری باید ناکلئیک اسیدها از خاک استخراج شوند که برای اینکار از کیتهای استخراج DNA استفاده می‌شود. از پرکاربردترین کیتها که در مطالعات مورد استفاده بوده است، می‌توان موارد زیر را برشمرد(Robe et al., 2003; Kauffmann et al., 2004; Smalla et al., 1993):

MoBio Laboratories Inc., USA; PowerSoil®DNA Isolation Kit; UltraClean-Soil DNA Isolation Kit.

Cinna pure cell, Soil sample DNA extraction kit.

۳ ٤ نمونه‌گیری از محلهای تعیین شده

با توجه به اینکه در این طرح بیشتر تمرکز بر روی شناسایی باکتری معرف احتمالی کانی سازی مس بوده و هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی اطراف خاکهای آلوده به مس بوده است، لذا با در نظر گرفتن ملاحضات بخش ۳ ۲ ۳ در نهایت چهار محل که خصوصیات و ویژگیهای آنها در فصل دوم آمده است برای نمونه‌گیری انتخاب شدند.

نمونه‌های شاهد نیز از کنار جاده‌ی یزد- شیراز[۶۹] و کرج اشتهارد[۷۰]، بطوریکه قطعاً دستخوش آلودگی نباشند برداشته شدند. از هر محل ۳ نمونه برداشته شد. در معادن علی‌آباد، دره زرشک و جارو، نمونه‌ها از اطراف گمانه‌های اکتشافی برداشته شدند و در معدن مس سونگون یک نمونه از دپوی انبار، کارخانه و

1- witness 1
2- witness 2

دیواره‌ی معدن برداشته شدند(جدول ۳ ۲، ۳ ۳ و ۳ ۴ و ۳ ۵). با توجه به کم بودن تعداد نمونه‌ها (هر معدن سه نمونه)، شبکه‌ی نمونه‌گیری طراحی نشد و نمونه‌گیری از اطراف گمانه‌های اکتشافی موجود در محل بصورت تصادفی از خاک رویی کانسار صورت پذیرفت. همچنین فواصل نمونه‌گیری خیلی مد نظر نبود امّا همه‌ی نمونه‌ها با توجه به آشنایی قبلی با منطقه از نواحی کانساری گرفته شدند. نمونه گیری از عمق ۱۰، ۲۰ و ۳۰ سانتی‌متری صورت گرفت. مقدار نمونه‌ای که از هر محل برداشته شد حدود ۱۰۰ گرم بود که از هر محل ۳ نقطه برداشته شد و در نهایت روی هم ریخته شدند و بعنوان معرف آن نقطه در نظر گرفته شد. نمونه‌ها با بیل آتش خورده و آغشته به الکل با دستکشهای استریل در کیسه‌های پلاستیکی زیب‌دار که قبلا در اتوکلاو بمدت نیم ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱ بار استریل شدند، ذخیره شدند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا آزمایشگاه برده شدند؛ برای این کار از یونولیت پرشده با یخ استفاده شد.

لازم به ذکر است که نمونه‌گیری بدلیل شرایط محدود کننده کار، در فصل تابستان انجام شد، لذا باکتریها در حالت منفعل و احتمالاً در فاز اسپورینگ قرار داشتند، برای همین نمی‌توانستند جواب واضحی برای ما داشته باشند؛ لذا ابتدا نقاط نمونه‌گیری را مشخص نموده و با حاضر شدن سر زمین، آن نقاط آبیاری شدند؛ این کار چند روز تکرار شد، آنگاه یک هفته به حال خود رها شدند؛ پس از یک هفته بعد نمونه‌گیری اصلی انجام گرفت.

جدول ۳ ۲: نمونه‌برداری از معدن علی آباد

نمونه‌گیری از معدن علی آباد (یزد تفت علی‌آباد)		
Name		توضیحات
A	Am 1	نمونه از نزدیک گمانه E-38 با عمق ۱۰۲متر و از عمق ۱۰ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است ساعت ۵ بعدازظهر هشتم مرداد ۱۳۹۰
	Am 2	نمونه از محل فوق و از عمق ۱۵ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است.
	Am 3	نمونه از محل فوق و از عمق ۲۰ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است
	AX	نمونه از محل فوق و عمق ۱۰ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است بمنظور تست برای سنجش مقدار اکسید مس و دیگر عناصر فلزی در خاک
A	Bm 1	نمونه از گمانه E-30 و از عمق ۵ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است ساعت ۵:۳۰ ظهر هشتم مرداد ۱۳۹۰
	Bm 2	نمونه از گمانه E-30 از عمق ۱۵ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است
	Bm 3	نمونه از محل فوق عمق ۲۵ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است
	BX	نمونه از همان عمق ۲۵ سانتی‌متری از زون ریزوسفر گرفته شده است برای آنالیز عناصر
CA	Cm 1	نمونه از گمانه E-25 با عمق ۱۰۱/۲ از عمق ۲۵ سانتیمتری در زون ریزوسفرگرفته شده است . کانیهای آزوریت و مالاکیت بوفور در محل موجود بوده و کنده های اکتشافی نیز دیده شد. ساعت ۶ عصر هشت مرداد ۱۳۹۰
	Cm 2	نمونه کنار گونه گون و از زون ریزوسفر در همان محل نمونه بالا با عمق ۳۰سانتیمتری گرفته شده است.
	Cm 3	نمونه از عمق ۵ سانتیمتری با مشسخصات بالا برداشته شد.
	CX	نمونه مانند فوق از عمق ۲۵ سانتیمتری جهت انالیز عناصر برداشته شد.
Cm_i: نمونه iام نقطه C جهت تستهای میکروبی، CX: نمونه نقطه C بمنظور تست میکروبی		

جدول ۴-۳: نمونه گیری از معدن دره زرشک

نمونه‌گیری از معدن دره‌زرشک(تفت- یزد)		
Name		توضیحات
D	Am_1	نمونه از عمق ۱۰ سانتیمتری و از زون ریزوسفر از تپه‌ی پایین دست محل باطله برداری کنونی گرفته شده است که مشرف بر کانسار است و مرکز پیت اصلی معدن در آینده می باشد گرفته شده است، ساعت ۱ بعدازظهر هشتم مرداد ۱۳۹۰
	Am_2	نمونه از همان محل مذکور در فوق و از عمق ۵ سانتی متری شرق گرفته شده است.
	Am_3	نمونه از عمق ۲۰سانتیمتری همان محل مذکور در فوق گرفته شده است.
	AX	نمونه از زون ریزوسفر گرفته شده است بمنظور تست برای سنجش مقدار اکسید مس و دیگر عناصر فلزی در خاک
D	Bm_1	نمونه از زون ریزوسفر که بعلت باطله برداری و ایجاد پله توسط بولدوزر مشخص شده بود گرفته شد از عمق۵سانتیمتری دقیقا کنار محل باطله برداری پایینی در سر پیت. ساعت ۱:۱۵ هشت مرداد ۱۳۹۰
	Bm_2	نمونه از عمق ۱۵ سانتیمتری از زون ریزوسفر همان محل مذکور در فوق گرفته شده است.
	Bm_3	نمونه از عمق ۲۵ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است محل فوق.
	BX	نمونه از عمق ۲۵ سانتیمتری زون ریزوسفر گرفته شده است برای آنالیز عناصر
D	Cm_1	نمونه از عمق ۵ سانتیمتری زون ریزوسفر درست نزدیک گمانه با عمق ۳۰ متر گرفته شد، ساعت۳ بعدازظهر هشت مرداد
	Cm_2	نمونه از عمق۲۰ سانتیمتری و از زون ریزوسفر در همان محل نمونه بالا گرفته شده است.
	Cm_3	نمونه از عمق ۳۰ سانتیمتری با مشخصات بالا برداشته شد.
	CX	نمونه مانند فوق از عمق ۲۵ سانتیمتری جهت آنالیز عناصر برداشته شد.
G	-	این نمونه در ساعت ۴ بعداز ظهر نزدیک گمانه با عمق ۵۳۰ متری و از زون ریزوسفر در عمق ۳۰ سانتیمتری برداشته شده است.
H	-	این نمونه از کف رودخانه خشک ۲۰ متری گمانه فوق لب جاده برداشته شده است با همان ساعت نمونه گیری فوق.

Cm_i: نمونه iام نقطه C جهت تستهای میکروبی، CX: نمونه نقطه C بمنظور تست میکروبی

جدول ۳ ۴: نمونه‌های معدن جارو

نمونه‌گیری از معدن جارو(اشتهارد- کرج)		
Name		توضیحات
	m1	نمونه از ۲۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۱۰ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است ساعت ۱ بعدازظهر چهارم مرداد ۱۳۹۰
	Am2	نمونه از ۲۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۱۵ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است.
	Am3	نمونه از ۲۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۲۰ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است
	AX	نمونه از ۲۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۱۰ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است بمنظور تست برای سنجش مقدار اکسید مس و دیگر عناصر فلزی در خاک
J	Bm1	نمونه از ۴۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۵ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است
	Bm2	نمونه از ۴۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۱۵ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است
	Bm3	نمونه از ۵۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۲۵ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است
	X	نمونه از ۵۰ متری شرق گمانه BH و از عمق ۲۵ سانتیمتری از زون ریزوسفر گرفته شده است برای آنالیز عناصر
J	m1	نمونه از ۲۰ متری غرب گمانه BH مشرف بر تپه ماهور محل ترانشه و چاهک های اکتشافی از عمق ۲۵ سانتیمتری در زون ریزوسفرگرفته شده است . کانیهای آزوریت و مالاکیت بوفور در محل موجود بوده و کنده های اکتشافی نیز دیده شد.
	Cm2	نمونه از عمق ۴۰ سانتی متری کنار گونه گون و از زون ریزوسفر در همان محل نمونه بالا گرفته شده است.
	Cm3	نمونه از عمق ۳۰ سانتیمتری با مشخصات بالا برداشته شد.
	CX	نمونه مانند فوق از عمق ۲۵ سانتیمتری جهت انالیز عناصر برداشته شد.

جدول۳ ۵ : سه نمونه گرفته شده از معدن مس سونگون

SA: از روبروی انبار از محل دمپ کنسانتره گرفته شده است.		Sungon
SD: از دیواره اصلی معدن و از زون ریزوسفر برداشته شده است.		Sungon
SK: از خوراک ورودی کارخانه گرفته شده است.		Sungon

فصل۴ مطالعات ژئومیکروبیولوژیکی

۴-۱ مقدمه

ژئومیکروبیولوژی اکتشافی به عنوان شاخه‌ای بین رشته‌ای، زمینه‌ای بسیار جوان و نو محسوب می‌شود. برای همین در طرح مذکور، روشهای گوناگون آزمایش شدند که در نهایت همه‌ی این تلاشها منجر به کشف باکتری منحصر به فردی در این زمینه گشت. به طورکلی تلاشهای صورت گرفته برای شناخت باکتری احتمالی معرف[۷۱] مس را می‌توان در سه دسته طبقه بندی نمود: ۱- کارهای نرم افزاری[۷۲]، ۲- تستهای آزمایشگاهی(شامل کشت در حضور ناترینتها و غیره) و ۳- روشهای ملکولی(شامل استخراج DNA، تعریف سیکل PCR،بهینه سازی PCR و....).

با توجه به اهمیت روز افزون ژئومیکروبیولوژی اکتشافی در صنعت اکتشاف معدن و ژئومیکروبیولوژی در علوم زمین، اینک دیگر میتوان با توجه به طرح صورت گرفته، روشی سیستماتیک را در اکتشاف کانسارها و بطور اخص، ذخایر مس تعریف نمود. در واقع همه‌ی سعی نگارندگان و محققین این پروژه نیز، افزودن یک روش اکتشافی جدید به جعبه ابزار[۷۳] مهندس اکتشاف معدن بوده است که به نظر می رسد تا حد بسیار زیادی این مهّم برآورده شده است، در ادامه روش کار و مراحل صورت گرفته تشریح می‌شود.

۴-۲ کارهای بیوانفورماتیک

در علوم زیستی سایت NCBI [۷۴]، بعنوان یک پایگاه اطلاعاتی[۷۵] مهم و کارا، زمینه‌ای را برای مطالعات ژنتیکی فراهم می‌آورد. برای طراحی پرایمرها و همچنین بررسی هومولوژی ژن 16S rRNA و 16S rDNA باکتریهای مد نظر- مقاوم به مس- لازم بود که ژنهای مذکور این باکتریها، بواسطه‌ی نرم افزارهای موجود در NCBI، مورد بررسی قرار گیرند؛ اصطلاحاً به چنین کارهای ژنتیکی، بیوانفورماتیک(Sainsboury; 2006 Singleton and) اطلاق می‌گردد؛ در ادامه مراحل کار باختصار تشریح می‌شود.

۴-۲-۱ بررسی مطالعات قبلی

برای طراحی پرایمر کلی، بایستی نام باکتریهای مقاوم به مسی که احتمالاً در خاک نیز وجود داشتند را می‌دانستیم؛ برای همین سعی شد تمامی مقالات و نوشته‌هایی که حتی نام باکتری مقاوم مس درآنها آمده

1- bioindicator or biomarker
2- bioinformatic
3- tool box
4- National center for boitechnology information
5- Data base

بود، گردآوری گردد. حدود ۷۰مقاله در مرحله جست و جوی اولیه انتخاب شدند که در واقع این مقاله ها، تمام مقالات موجود در اینترنت و همه‌ی مقالاتی بود که می توانست مورد بررسی قرار گیرند.

در ادامه‌ی مطالعه‌ی مقالات مذکور، تعداد بسیار زیادی از مقالات بی‌ارتباط به موضوع بوده و نمی‌توانستد راهگشای کار ما باشند، بعنوان نمونه می‌توان به مقاله‌هایی اشاره نمود که از اندام گیاه، ژن خاص مقاوم به مسی جدا شده بود(Bender and Cooksdy; 1987) یا ژنهایی بررسی شده بودند که، مسئول کدگذاری پروتئینها در

نظر گرفته می‌شدند(kim et al., 2001). پس از این مرحله روی باکتری مقاوم به مسی ریز شدیم که در خاک وجود داشته باشند، لذا همه‌ی مقالاتی که در خاک و محیط‌های خاکی مطالعه شده بودند، را انتخاب نمودیم(جدول ۴ ۱)؛ البته لازم بذکر است که برخی از باکتریهایی که در مقالات، تحت عنوان باکتری خاک بررسی نشده بودند امّا باکتری‌هایی بودند که در خاک نیز می‌توانستد موجود باشند؛ را نیز بعنوان باکتری مد نظر، انتخاب نمودیم.

٤ ۴ ۴ بررسی ژن 16S rRNA باکتریهای مذکور با استفاده از نرم افزار blast

ژن 16S rRNA، باکتریهای جدول ۴ ۱ در سایت NCBI، در پنل نوکلئوتید جستجو شدند(شکل ۴ ۱)، بعداً توالی 16S rRNA باکتریها توسط نرم افزار blast مورد ارزیابی قرار گرفت، در نهایت با تعیین پارامترهای مطلوب و با انتخاب گزینه‌ی nblast، نرم افزار با اطلاعات ورودی توالی کامل ژن 16S rRNA، ران شد(شکل ۴ ۲). در واقع این نرم فزار تمامی کارهای صورت گرفته بر روی ژن 16S rRNA، باکتری مد نظر که در سایت موجود است را پالایش نموده و چیدمان آرایش الیگونوکلئوتیدها در کارهای مختلفی که بر روی این ژن خاص صورت گرفته است را مشخص می‌کند(۴ ۳). در ادامه توالی‌هایی که در آنها تفاوت مشهود بود انتخاب شدند (شکل ۴ ۳ و ۴ ۴). در آخر نیز، خروجی‌های نرم افزار به فرمت FASTA، تبدیل و در هارد دیسک ذخیره شدند(شکل۴ ۵). در حین انجام کار متوجه شدیم، که توالی کامل ژن 16S rRNA برخی از باکتریها در سایت

جدول ۴ ۱: باکتریهای مقاوم به مس در مقالات

Bacteria name	Authors
Pseudomonas putida	Andreazza., et al (2010)a, Andreazza., et al(2010)b
Pseudomonas syringae	Cooksey (1987), Lim and Cooksey (1993), McLean and Beveridge (2001), Zevenhuizen., et al (1979), Voloudakies., et al (1993)
Escherichia. coli	Konstantinidis., et al (2003), Shakoori and Muneer (2002), Williams., et al (1993), Santo., et al (2010)
Stenotrophomonas maltophilia	Parungao., et al (2007)
Xanthomonas campestris	Basim., et al (2005), Cooksey et al (1990)
Agrobacterium tumefaciens	Yu., et al (2009)
Bacillus cereus, Pseudomonas chlororaphis, Microbacterium lactium, Rahnella aquatilis	Lin Yan He., et al (2010)
Alcaligenes denitrificans	DRESSLER., et al(1991)
Bacillus pumilus, Saphylococcus pasteuri	Andreazza., et al(2011)
Proteus mirabilis	Ojo, et al(2008)
Thiobacillus ferrooxidans	Rawlings and Kusano(1994), Peng., et al (2005)

NCBI، موجود نیست، لذا با استفاده از ژنوم[۷۶] کامل باکتری، ناحیه‌ی CDSای[۷۷] که در آن ژن 16s rRNA وجود داشت را انتخاب نموده و nblast را بر روی این ناحیه ژنی انجام دادیم.(شکل۶ ۴ و ۴ ۷). لازم به ذکر است که این کار زمان زیادی از این پروژه را به خود اختصاص داد که یکی از دلایل آن را می توان سرعت کم تبادل دتیا در نظر گرفت.

شکل ۴ ۱: توالی کامل ژن 16S rRNA، باسیلوس سروس

۴ ۴ ۳ بررسی هومولوژی ناحیه‌ی 16S با نرم افزار clustalw2

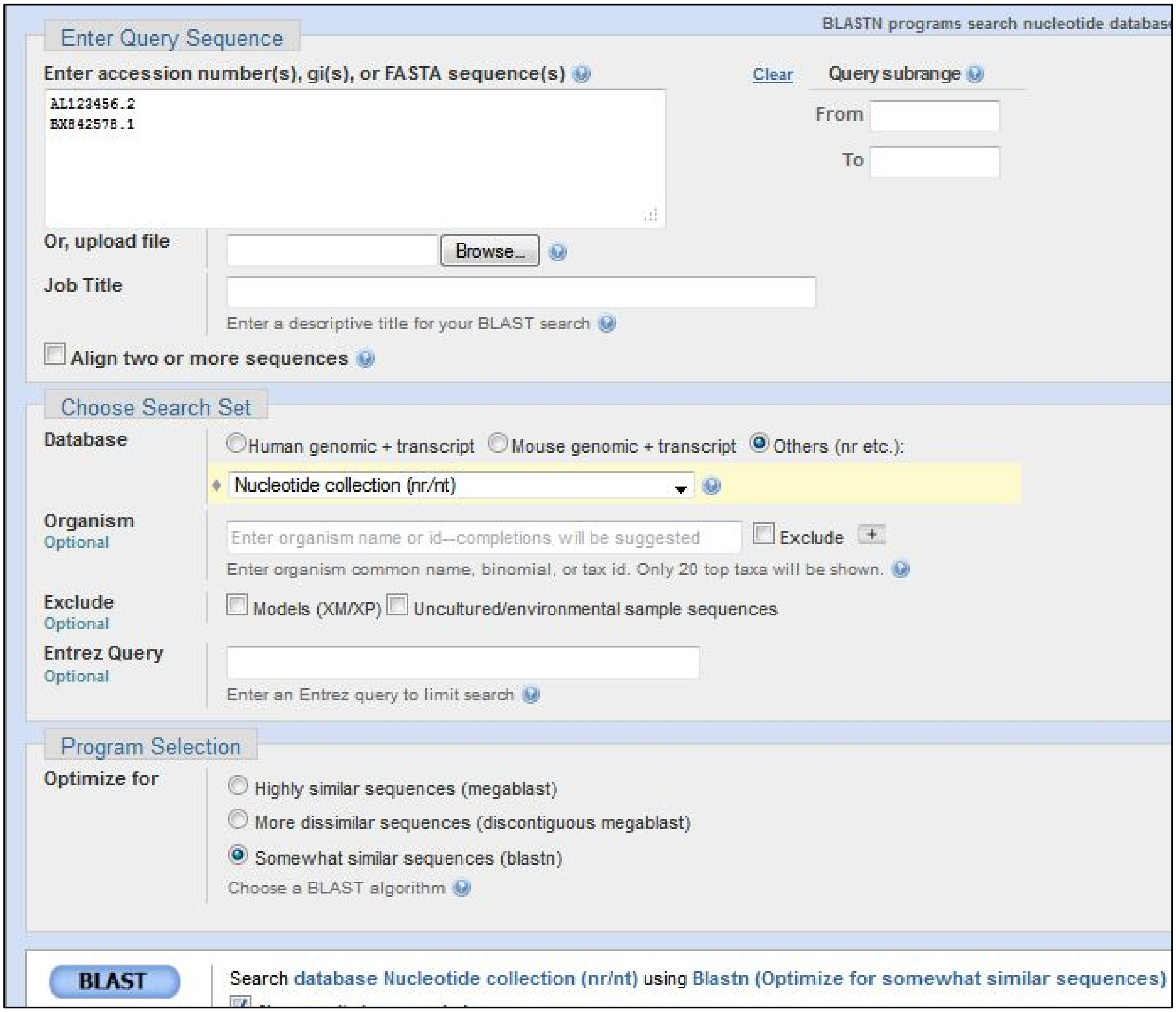
خروجی نرم افزار nblast که با فرمت FASTA ذخیره شده بودند؛ بعنوان ورودی در نرم افزار clustalw2، بکار گرفته شدند(شکل۴ ۸). در نهایت نتایج حاصل از این نرم افزار به صورت شکلهای ۴ ۹ و ۴ ۱۰، به دست آمدند، ستاره‌های بیشتر نشانه‌ی هومولوژی بهتر است؛ در شکل ۹ ۴، هومولوژی وجود ندارد و در واقع ژن 16S rRNA این باکتری برای بررسی یکسان نبوده و مثمر ثمر واقع نخواهد شد. اگر هومولوژی ها مناسب نبودند فایل fastaی ژن 16S rRNA باکتری مذکور، با استفاده از نرم افزار Bioedit version 5.0.6 اصلاح شده و آنقدر دستکاری شدند؛ تا بهترین هومولوژی را به دست دهد(شکل۴ ۱۰).

1- genom
2- coding sequences gene

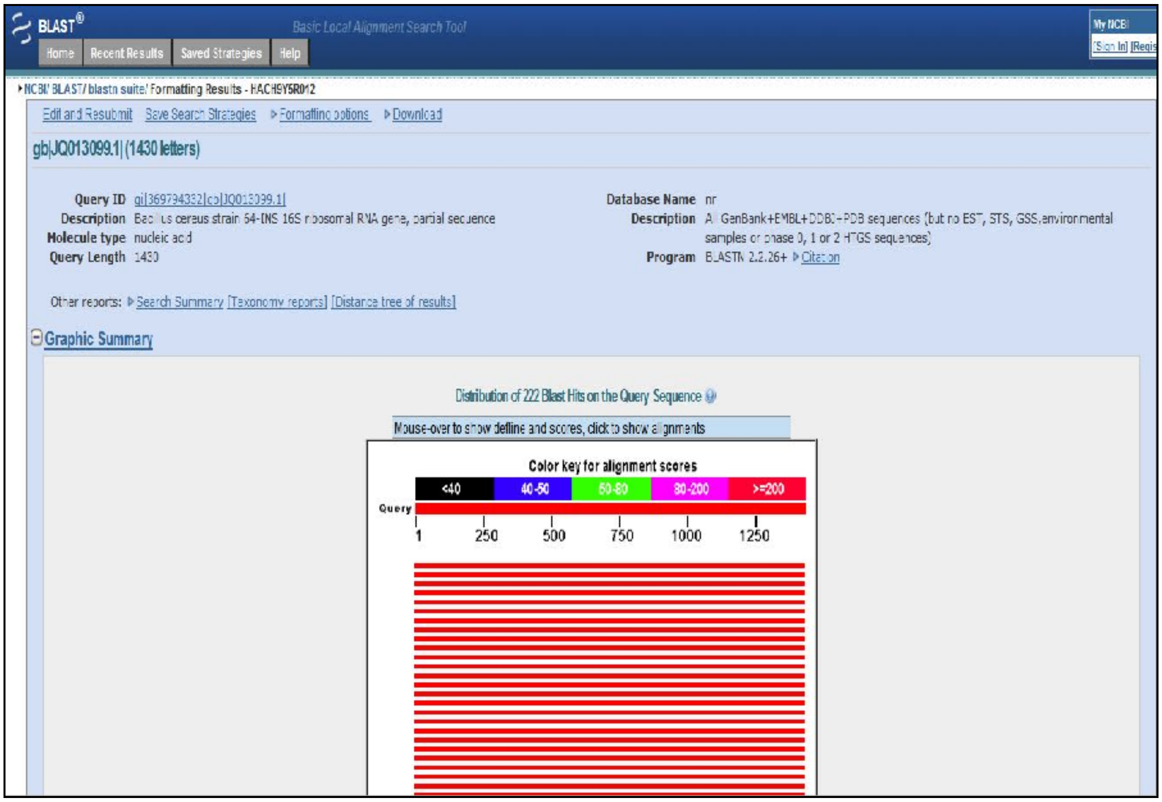
٤ ۴ ٤ طراحی پرایمر

با توجه به باکتریهای جدول ۴ ۱ و با رجوع به اصل مقالات، پرایمرهای 1492R و 27F و پرایمر کلی(جدول ۴ ۲)برای بررسی انتخاب شدند؛ در ادامه فایل Fastaی حاصل از nblast ژن 16S rRNA باکتریها برای بار دیگر با پرایمرهای جدول ۴ ۲ nblast شدند و بررسی های لازمه انجام شد.

در ادامه باختصار به نتیجه‌ی حاصل از کار با نرم افزارهای مذکور، برای هر یک از باکتریها بصورت جداگانه پرداخته خواهد شد.



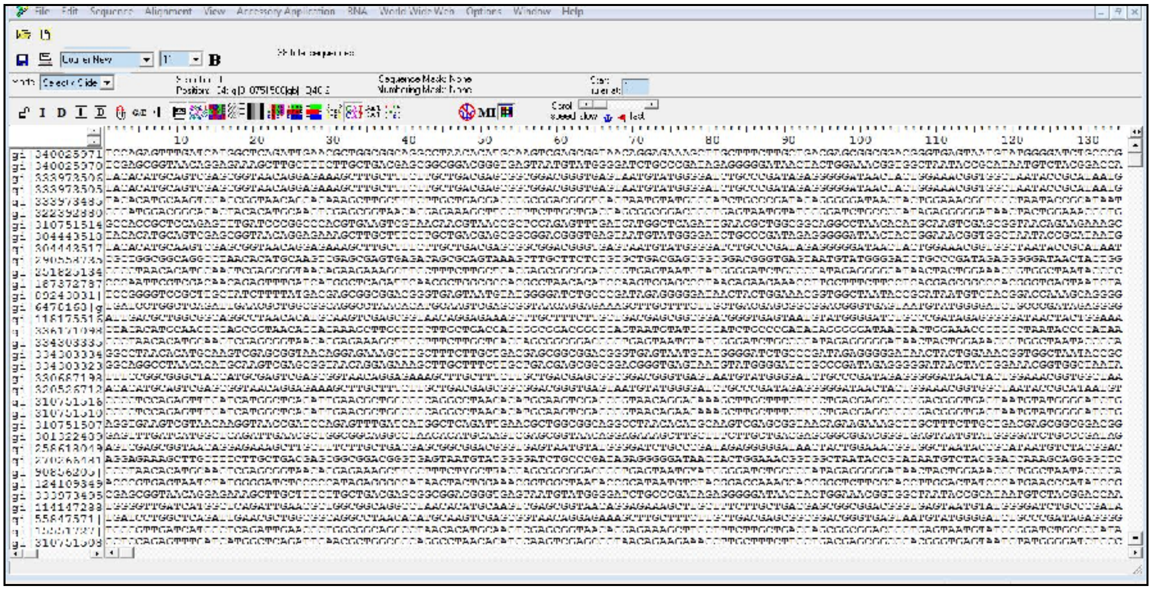
شکل ۴ ۲ صفحه‌ی نرم افزار blast



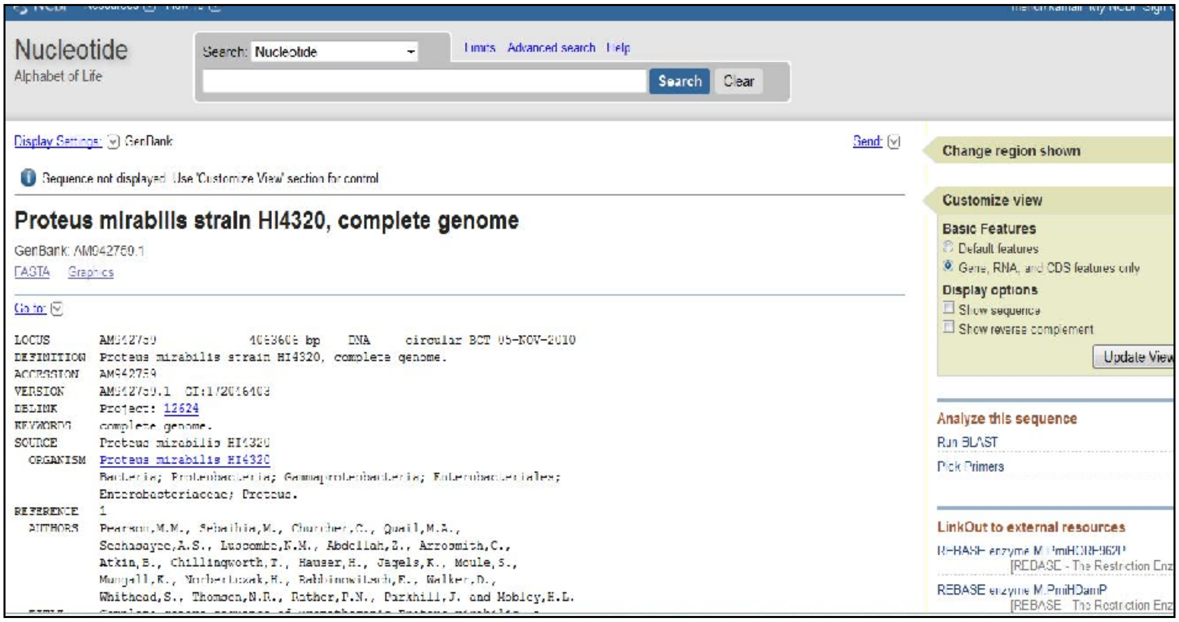
شکل ۴ ۳: خروجی نرم افزار nblast

```
Query  1193   GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTG  1252
              |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1217   GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTAC-AAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTG  1275

Query  1253   GAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA  1312
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1276   GAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA  1335

Query  1313   GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTTG  1372
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  1336   GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC-TTG  1394

Query  1373   TAAAAAACGGCNNTCAGAACAAGGAAGAGTTTGGTAACCACCCGAAGTCCGTGGAGTA  1430
              || |  | || |   ||| | || |  ||||||| |||| |||||||||| |||| |||
Sbjct  1395   TACACACCGCCCGTCACACCACG--AGAGTTT-GTAA-CACCCGAAGTCGGTGGGGTA  1448


>gb|HM771661.1|  Bacillus cereus strain PPB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 gb|JN215517.1|  Bacillus cereus strain VB21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1547

 Score = 2461 bits (2728),  Expect = 0.0
 Identities = 1412/1438 (98%), Gaps = 15/1438 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1      CAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  17     CAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTT  76

Query  61     GCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACT  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  77     GCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACT  136

Query  121    GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAA  180
```

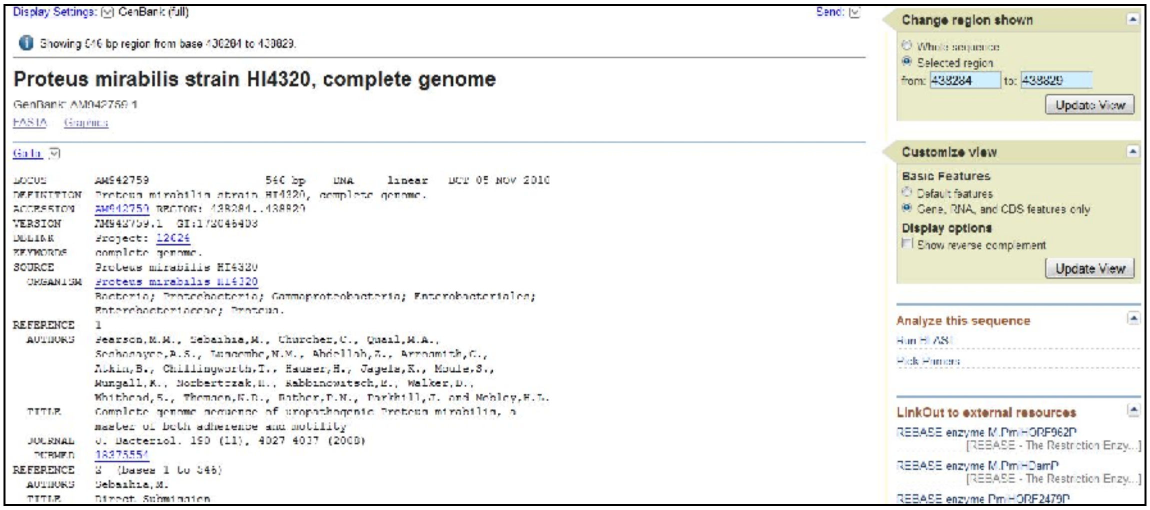
شکل ۴ ۴: انتخاب و بررسی تفاوتهای توالیها



شکل ۴ ۵: فایل فستای خروجی نرم‌افزار nblast در نرم افزار bioedit



شکل ۴ ۶: ژنوم کامل باکتری پروتئوز



شکل ۴ :۷ انتخاب 16S rRNA در ژن cDs با استفاده از ژنوم کامل باکتری(شکل ۴ ۶)

٤-٢-٤-١ باسیلوس سروس[78]

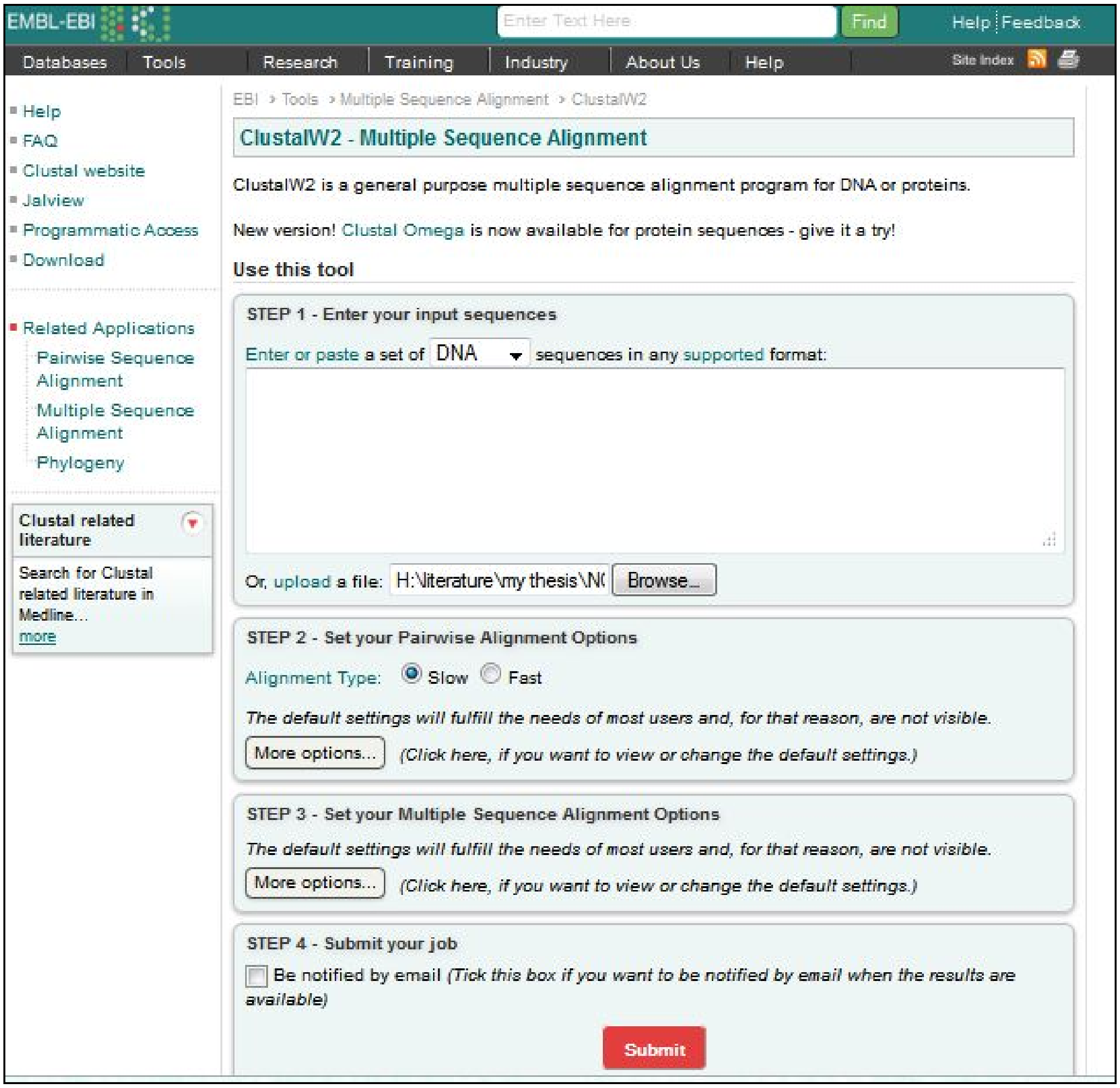
با توجه به اینکه توالی کامل ژن 16S rRNA، باسیلوس سروس در سایت NCBI، موجود بود(شکل۴ ۱)، لذا پس از nblast، فایل آن با فرمت fasta (شکل ۴ ۱۱) ذخیره شد. نتایج حاصل از نرم افزار clustalw، در ابتدا جالب نبود(شکل۴ ۱۲)؛ اما در ادامه با اصلاح فایل fastaی ژن مذکور، در نهایت باعث ایجاد هومولوژی خوب گردید(شکل۴ ۱۳).

در ادامه نیز برای طراحی پرایمرها از nblast، ژن هدف با پرایمرهای 1492R و 27F(Lin et al., 2010)، استفاده شد که نتیجه در شکل ۴ ۱۴، خلاصه شده است. تنها با پرایمر27f ، شباهت ناچیزی مشاهده شد.

جدول ۴ :۲ پرایمرهای فرضی در مرحله‌ی نخست بررسی

E. Coli position 27F: 5′-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3′
E. coli position 1492R: 5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′
AGGGTTTGATCCTGGCTGAG

1- *bacillus cereus*



شکل ۴ ۸: پنل ورودی نرم افزار clustalW

٤ ۲ ٤ ۲ باسیلوس پامیلوس[79]

نتیجه‌ی حاصل از nblast با پرایمر 27F، در شکل۴ ۱۵، آورده شده است، در حالیکه با پرایمر 1492R هیچ شباهتی، مشاهده نشد که این موضوع احیاناً بخاطر بخشی بودن توالی[80] ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلوس در سایت NCBI، می‌باشد(شکل ۴ ۱۶). نتیجه‌ی nblast با پرایمر کلی(جدول۴ ۲)، نیز شباهت بشرح تصویر داشتند(شکل۴ ۱۷).

2- *bacillus pumilus*
3- partial sequence

ردیف‌بندی چندگانه‌ی توالی‌ها[۸۱] یا همان MSA این ژن نیز هومولوژی خوبی را در نرم افزار clustalw نشان دادند(شکل۴ ۱۸)؛ بعداً با توجه به ژنوم کامل این باکتری(شکل۴ ۱۹) و جستجوی 16S rRNA در صفحه مربوطه، تعداد جفتهای پایه[۸۲] مرتبط با cDsای که این ژن در آن موجود است(شکل۴ ۲۰) را با پرایمرهای کلی(Andreazza et al., 2011)، nblast نموده و شباهتهایی بشرح شکل دیده شد(شکل۴ ۲۱، ۴ ۲۲ و ۴ ۲۳).

```
gi|310751514|gb|HQ407312.1|      ACCGCTCCAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT 100
gi|310751521|gb|HQ407319.1|      ------CCAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT 44
gi|310751510|gb|HQ407308.1|      -CCGCTCCAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT 49


gi|340025970|gb|JN092589.1|      ------------TCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 31
gi|124109349|gb|EF194103.1|      --------------------------------------------------
gi|313665952|gb|HM771658.1|      AACACATGCA-AGTCGGCGG------TAACAGGAGAAAGGTTGCTT-TCT 83
gi|304443517|gb|HQ169117.1|      TACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 43
gi|304443516|gb|HQ169116.1|      TACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 43
gi|304443518|gb|HQ169118.1|      TACACATGCA-GTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 42
gi|320526712|gb|HQ694733.1|      -ACACATGCA-GTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 41
gi|333973506|gb|JF784046.1|      TACACATGCA-GTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 42
gi|330687198|gb|JF775415.1|      TAC-CATGCGAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 54
gi|333973495|gb|JF784035.1|      -------------CGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 30
gi|333973505|gb|JF784045.1|      TACACATGC-AGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 42
gi|336171098|gb|JF947362.1|      TACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 44
gi|270266481|gb|GU186838.1|      ------------------------------AGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 19
gi|333973485|gb|JF784025.1|      TACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 43
gi|301322489|gb|HM585375.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 84
gi|90856205|gb|DQ449631.1|       AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 47
gi|6478168|gb|AF008582.1|        AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 79
gi|55847571|gb|AY820623.1|       AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 79
gi|114147288|gb|DQ885256.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 85
gi|15551727|emb|AJ301682.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 85
gi|258618049|gb|FJ711760.1|      ----------AGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 33
gi|322392883|gb|HQ259935.1|      A-C-CATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 61
gi|322392880|gb|HQ259932.1|      A-CACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 59
gi|251825134|gb|GQ259884.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGAAGAAAGCTTGCTT-TCT 48
gi|187372787|gb|EU643833.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGAAGAAAGCTTGCTT-TCT 102
gi|334303334|gb|JF799896.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 48
gi|334303323|gb|JF799885.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 52
gi|310751516|gb|HQ407314.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 92
gi|334303335|gb|JF799897.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 47
gi|118175516|gb|EF091150.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGGAGAAAGCTTGCTT-TCT 64
gi|290558735|gb|GU477712.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGAGTGAGACAGCGCAGTAAAGCTTGCTTCTCT 66
gi|89243031|gb|DQ403812.1|       ------------------------------------GCTTGCTA-TCT 21
gi|310751508|gb|HQ407306.1|      AACACATGCAAGTCGAGCGG------TAACAGAAGAAAGCTTGCTT-TCT 90
```

شکل ۴ ۹: خروجی نرم افزار clustalW2، هومولوژی بد

4- Multiple Sequence Alignmen
5- base paire(bp)

```
gi|295388258|gb|GU947817.1|       CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC 193
gi|343205610|ref|NR_043935.1|     CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC 194
gi|29373958|emb|AJ550465.1|       CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC 174
gi|343206382|ref|NR_044974.1|     CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC 173
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM    CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGAC 197
                                  **************************************************

gi|343202581|ref|NR_042939.1|     CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 242
gi|295388258|gb|GU947817.1|       CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 243
gi|343205610|ref|NR_043935.1|     CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 244
gi|29373958|emb|AJ550465.1|       CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 224
gi|343206382|ref|NR_044974.1|     CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 223
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM    CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 247
                                  **************************************************

gi|343202581|ref|NR_042939.1|     GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 292
gi|295388258|gb|GU947817.1|       GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 293
gi|343205610|ref|NR_043935.1|     GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 294
gi|29373958|emb|AJ550465.1|       GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 274
gi|343206382|ref|NR_044974.1|     GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 273
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM    GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 297
                                  **************************************************

gi|343202581|ref|NR_042939.1|     TCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 342
gi|295388258|gb|GU947817.1|       TCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 343
gi|343205610|ref|NR_043935.1|     TCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 344
gi|29373958|emb|AJ550465.1|       TCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 324
gi|343206382|ref|NR_044974.1|     TCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 323
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM    TCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA 347
                                  **************************************************

gi|343202581|ref|NR_042939.1|     GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG 392
gi|295388258|gb|GU947817.1|       GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG 393
gi|343205610|ref|NR_043935.1|     GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG 394
gi|29373958|emb|AJ550465.1|       GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG 374
gi|343206382|ref|NR_044974.1|     GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG 373
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM    GTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG 397
                                  **************************************************
```

شکل ۴ ۱۰: هومولوژی خوب

٤ ٢ ٤ ٣ تیو باسیلوس فرواکسیدان[۸۳]

ژن مد نظر این باکتری نیز با پرایمرهای جدول ۴ ۳ شباهتهایی به شرح شکل ۴ ۲۴داشتند، ژن 16S rRNA تیوباسیلوس فرواکسیدان نیز هومولوژی بسیار خوبی را نشان داد(شکل ۴ ۲۵).

جدول۴ ۳: پرایمرهای مورد استفاده در PCR، برای شناسایی تیوباسیلوس(ارس و همکاران؛ ۱۳۸۹)

Amplifies	Name	Sequence(5′→3′)	Product size(bp)
At.thiooxidans	F1 RAF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CATTGCTTCGTCAGGGTTG	384

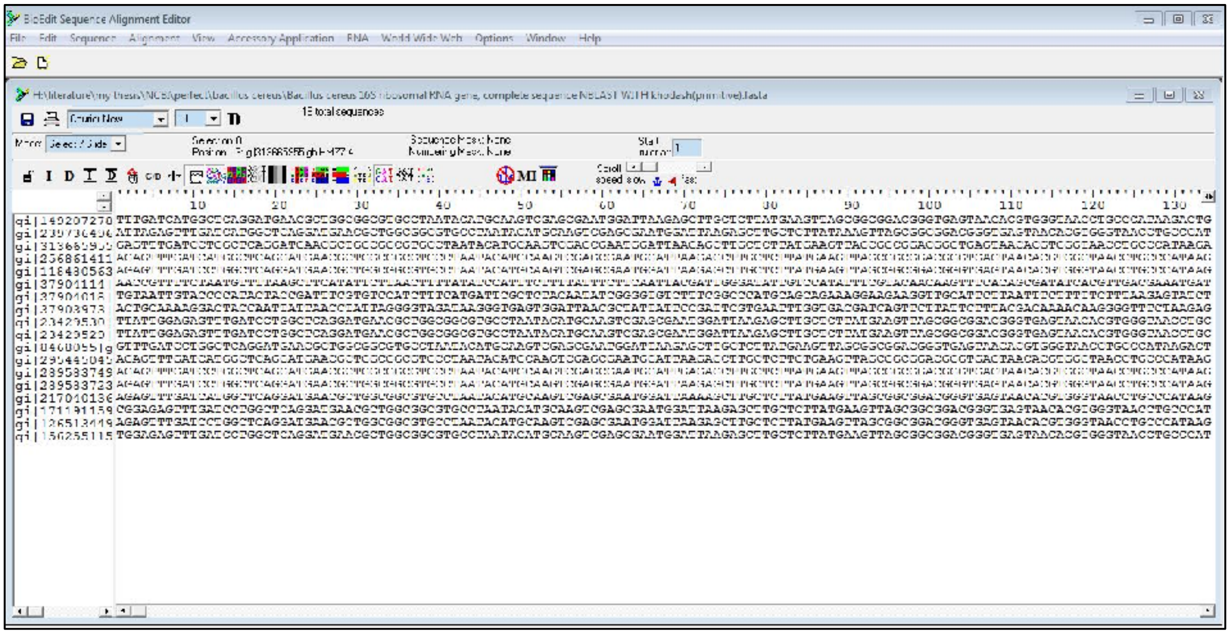
6- Acidithiobacillus ferrooxidans

۴-۲-۴-۴ *Staphylococcus pasteuri*

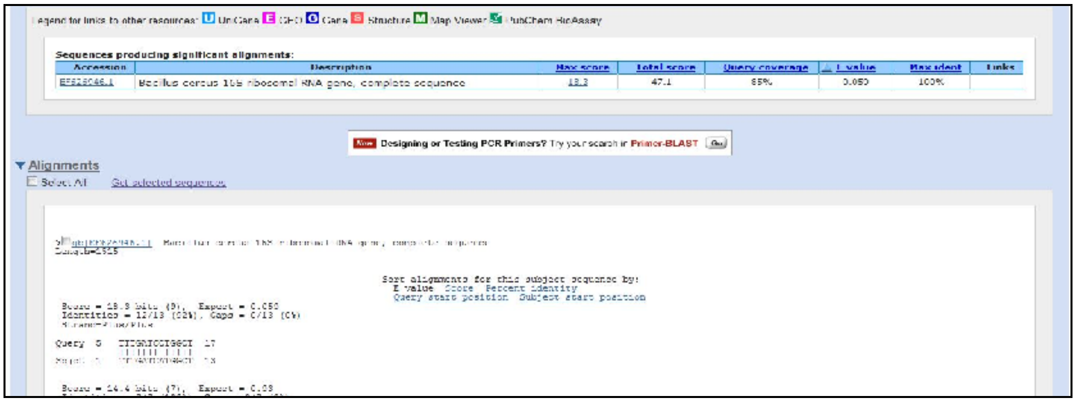
MSA ژن 16S rRNA این باکتری هومولوژی خوبی را در نرم افزار clustalw2 نشان داد(شکل۴ ۲۶)؛ این باکتری از خاک و باطله‌های معدنی جدا شده است(Andreazza et al., 2011)، nblast ژن 16S rRNA این باکتری(شکل۴ ۲۷) با پرایمرهای کلی و 27F و 1492R ، نتایجی را به شرح شکل در برداشت(شکل۴ ۲۸، ۴ ۲۹ و ۴ ۳۰).

```
gi|313665955|gb|HM771661.1|        --------------------------------------------------
gi|37903973|gb|AY224379.1|         TTGTAACGAAAAATGGTTACGGAAAGCGTACACCGATTGATGAATACCGT 450
gi|118480563|gb|DQ207729.2|        --------------------------------------------------
gi|256861411|gb|GQ360073.1|        --------------------------------------------------
gi|149207278|gb|EF626946.1|        --------------------------------------------------
gi|295445045|gb|HM015630.1|        --------------------------------------------------
gi|217040136|gb|FJ455077.1|        --------------------------------------------------
gi|239736496|gb|GQ149481.1|        --------------------------------------------------
gi|37904114|gb|AY224388.1|         AGTTATAAGCTGCTTTAATAGAAACAATCGTTAGGAGGCAACTAATAATA 449
gi|156255115|dbj|AB355699.1|       --------------------------------------------------
gi|171191159|gb|EU373359.1|        --------------------------------------------------
gi|126513449|gb|EF100616.1|        --------------------------------------------------
gi|289583749|gb|GU451189.1|        --------------------------------------------------
gi|289583723|gb|GU451163.1|        --------------------------------------------------
gi|23429529|gb|AY138274.1|         --------------------------------------------------
gi|23429530|gb|AY138275.1|         --------------------------------------------------
gi|8468055|gb|AF176322.1|AF176     --------------------------------------------------
gi|37904018|gb|AY224382.1|         CCTTTGTCCAATCCTTTTCAGTTACATATATGCTGGAAATATAAAAAAGA 422
```

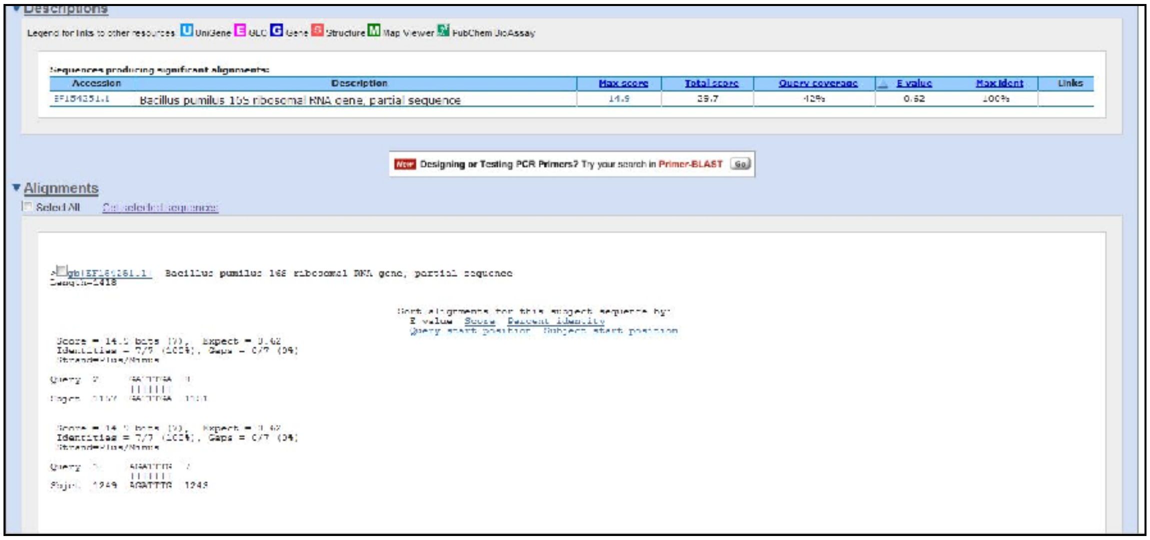
شکل ۴ ۱۲: هومولوژی بد ژن 16S rRNA باسیلوس سروس



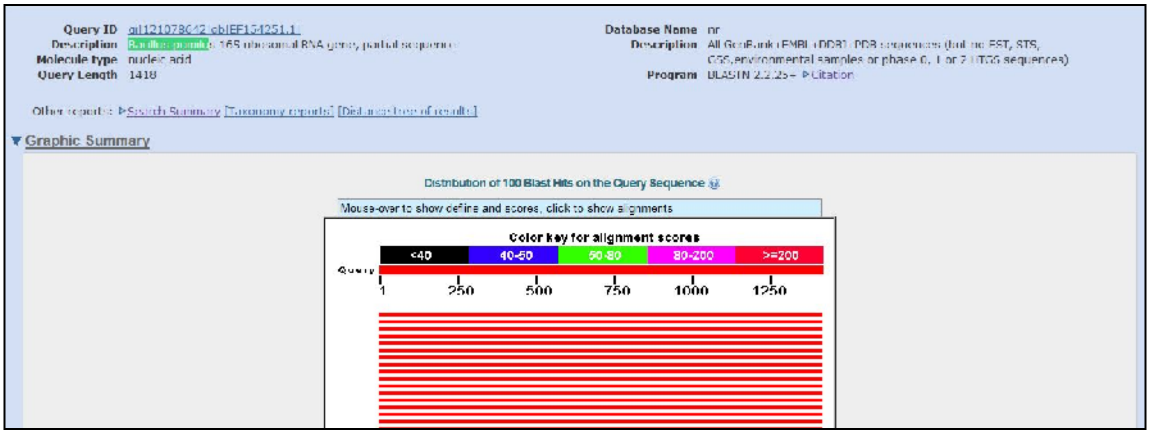
شکل ۴ ۱۳: هومولوژی بسیار خوب پس از اصلاح فایل فستای ژن 16S rRNA باسیلوس سروس



شکل ۴ :۱۴ nblast ژن 16S rRNA باسیلوس سروس با پرایمر27F



شکل ۴ :۱۵ nblast بخشی از ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس با پرایمر27F

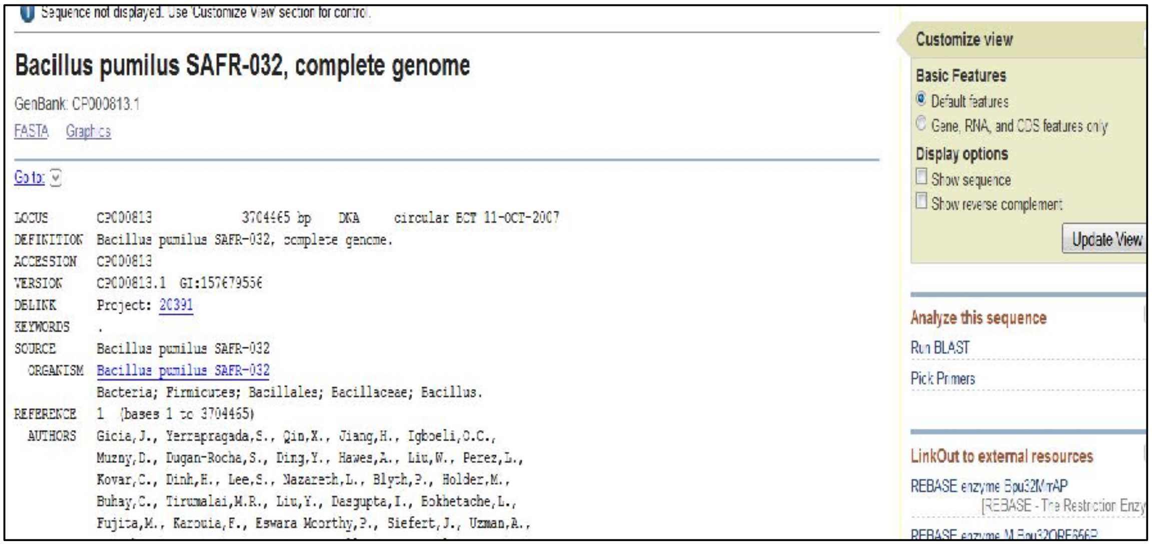


شکل ۴ :۱۶ قسمتی از ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس

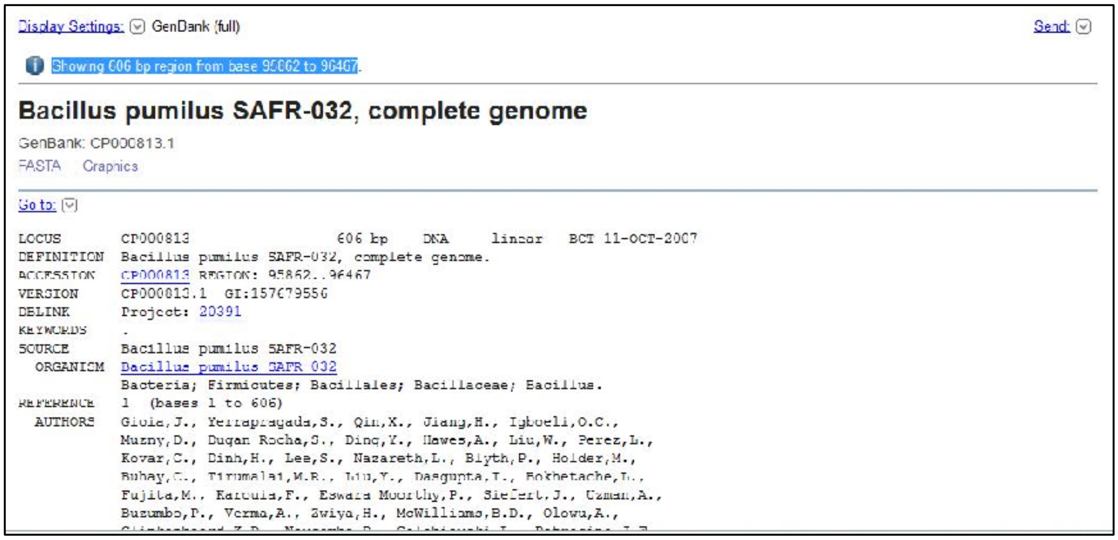
شکل ۴ ۱۷: nblast بخشی از ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس با پرایمر عمومی جدول ۴ ۲

```
gi|305644302|gb|HQ124006.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 168
gi|301153598|gb|HM543166.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 151
gi|239840191|gb|GQ169785.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 168
gi|300393885|emb|FN997624.1|     AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 152
gi|305644303|gb|HQ164542.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 150
gi|320119957|gb|HQ143570.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 171
gi|320119943|gb|HQ143667.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 150
gi|83972605|gb|DQ289996.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 151
gi|309260002|gb|HQ236021.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 161
gi|100222930|gb|DQ523500.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 193
gi|323700990|gb|HQ858062.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 200
gi|339282408|gb|JF932295.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 146
gi|313292119|gb|HQ317176.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 156
gi|320119867|gb|HQ143591.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 146
gi|323700988|gb|HQ858060.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 195
gi|313292139|gb|HQ317196.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 157
gi|313292138|gb|HQ317195.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 158
gi|309260056|gb|HQ236075.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 150
gi|319431022|gb|HQ704707.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 172
gi|338225411|gb|JF496534.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 182
gi|338225414|gb|JF496537.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 182
gi|300393871|emb|FN997610.1|     AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 157
gi|309260003|gb|HQ236022.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 147
gi|121078642|gb|EF154251.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 146
                                 **************************************************
```

شکل ۴ ۱۸: هومولوژی خوب بخشی ژن 16S rRNA باسیلوس پامیلس



شکل ۴ ۱۹: ژنوم کامل باسیلوس پامیلوس


Display Settings: GenBank (full)
Send:
Showing 606 bp region from base 95862 to 96467.

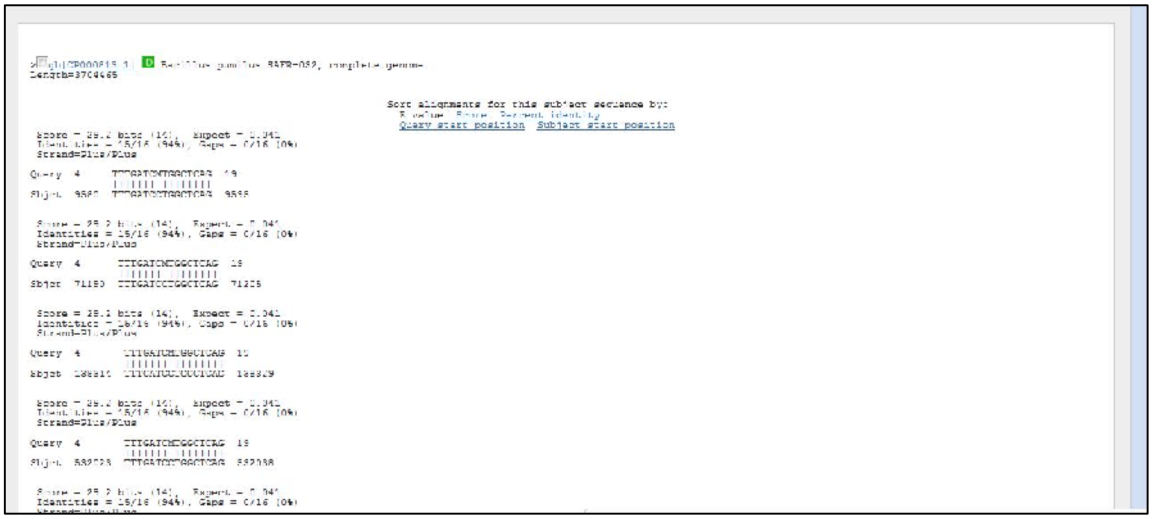
Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome

GenBank: CP000813.1
FASTA Graphics

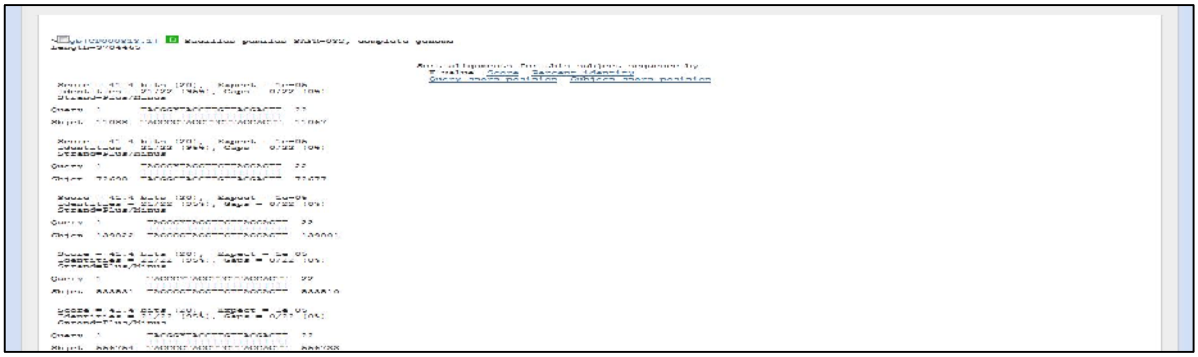
Go to:

```
LOCUS       CP000813                 606 bp    DNA     linear   BCT 11-OCT-2007
DEFINITION  Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome.
ACCESSION   CP000813 REGION: 95862..96467
VERSION     CP000813.1  GI:157679556
DBLINK      Project: 20391
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus pumilus SAFR-032
  ORGANISM  Bacillus pumilus SAFR 032
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 606)
  AUTHORS   Gioia,J., Yerrapragada,S., Qin,X., Jiang,H., Igboeli,O.C.,
            Muzny,D., Dugan Rocha,S., Ding,Y., Hawes,A., Liu,W., Perez,L.,
            Kovar,C., Dinh,H., Lee,S., Nazareth,L., Blyth,P., Holder,M.,
            Buhay,C., Tirumalai,M.R., Liu,Y., Dasgupta,I., Bokhetache,L.,
            Fujita,M., Karouia,F., Eswara Moorthy,P., Siefert,J., Uzman,A.,
            Buzumbo,P., Verma,A., Zwiya,H., McWilliams,B.D., Olowu,A.,
```

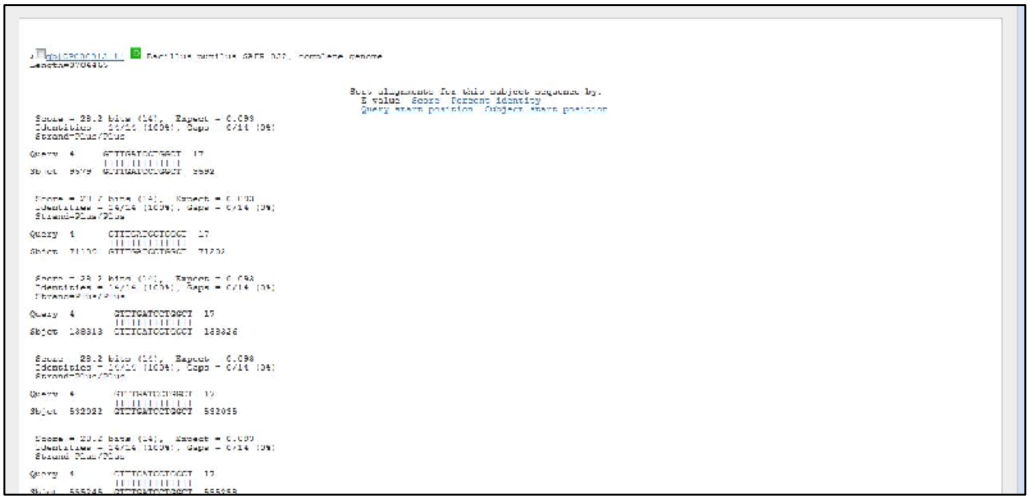
شکل ۴ ۲۰: انتخاب 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس دارای ۶۰۶ جفت مبنا



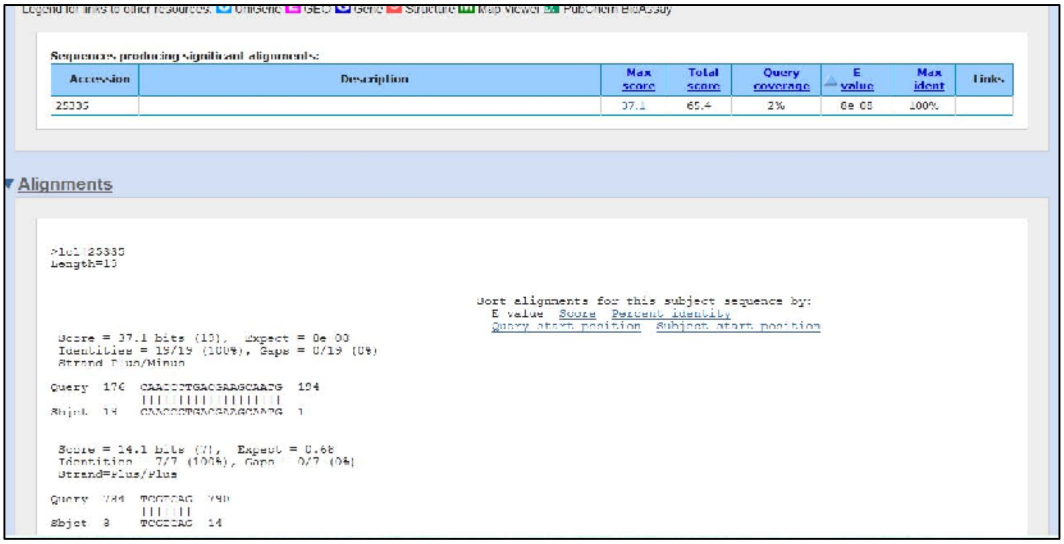
شکل ۴ ۲۱: nblast ژن 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس با پرایمر 27F



شکل ۴ ۲۲: nblast ژن 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس با پرایمر 1492R



شکل ۴ ‌۲۳: nblast ژن 16S rRNA در ژن cDs باسیلوس پامیلس با پرایمر عمومی



شکل ۴ ‌۲۴: nblast ژن 16S rRNA تیوباسیلوس فرواکسیدان با پرایمر F1 جدول ۴ ۳

```
gi|320119867|gb|HQ143591.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 146
gi|323700988|gb|HQ858060.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 195
gi|313292139|gb|HQ317196.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 157
gi|313292138|gb|HQ317195.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 158
gi|309260056|gb|HQ236075.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 150
gi|319431022|gb|HQ704707.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 172
gi|338225411|gb|JF496534.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 182
gi|338225414|gb|JF496537.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 182
gi|300393871|emb|FN997610.1|      AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 157
gi|309260003|gb|HQ236022.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 147
gi|121078642|gb|EF154251.1|       AAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATG 146
                                  **************************************************
```

شکل ۴ ‌۲۵: هومولوژی خوب ژن 16S rRNA تیوباسیلوس

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment


gi|171191123|gb|EU373323.1|        CGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 50
gi|220046411|gb|FJ189773.1|        -GGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 49
gi|56542025|emb|AJ717376.1|        ---------TGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 41
gi|309387115|gb|HQ259721.1|        ----------------------GGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 28
gi|306999894|gb|HM218325.1|        --------------------------GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 24
gi|171191131|gb|EU373331.1|        CGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 50
gi|219856850|ref|NR_024669.1|      ---AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 47
gi|309387117|gb|HQ259723.1|        -------------TCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC 37
                                                             *************************

gi|171191123|gb|EU373323.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 100
gi|220046411|gb|FJ189773.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 99
gi|56542025|emb|AJ717376.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 91
gi|309387115|gb|HQ259721.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 78
gi|306999894|gb|HM218325.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 74
gi|171191131|gb|EU373331.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 100
gi|219856850|ref|NR_024669.1|      ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 97
gi|309387117|gb|HQ259723.1|        ATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGC 87
                                   **************************************************
```

شکل ۴ ۲۶: هومولوژی ژن *Staphylococcus pasteuri* 16S rRNA

Display Settings: GenBank   Send:

Staphylococcus pasteuri gene for 16S ribosomal RNA

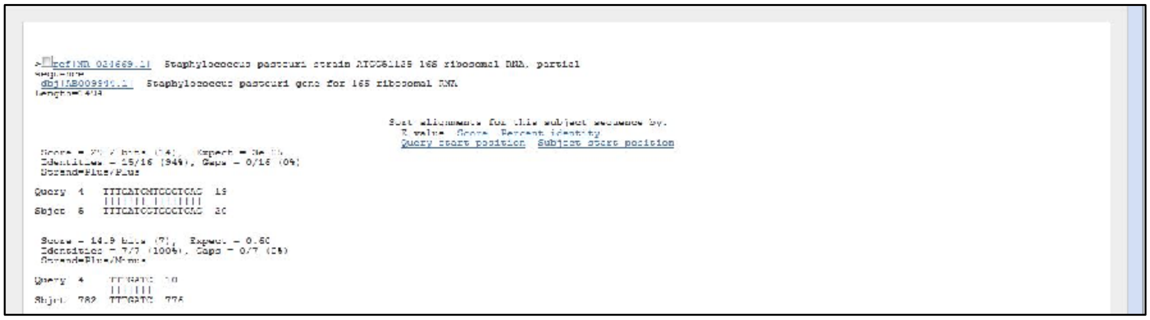
GenBank: AB009944.1

FASTA Graphics

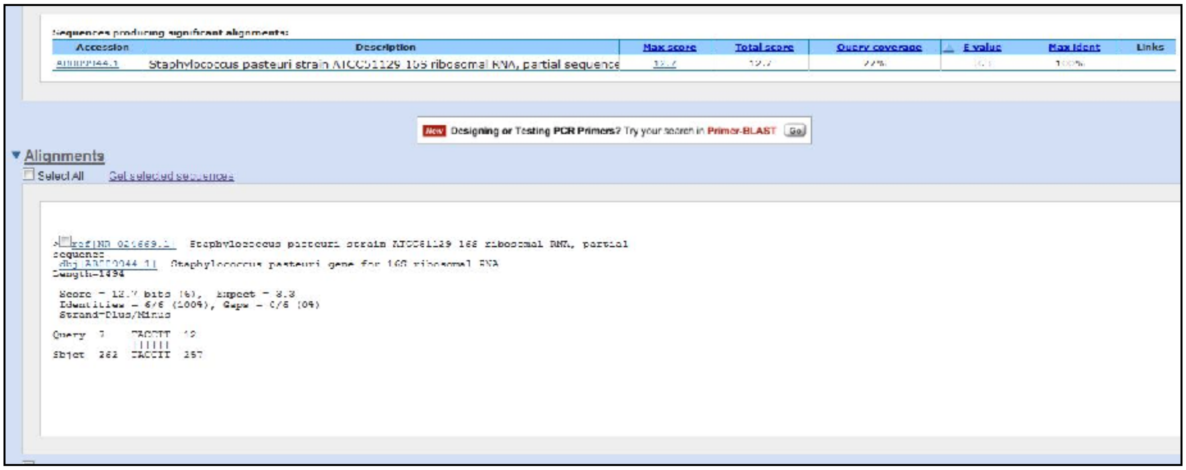
Go to:

```
LOCUS       AB009944               1494 bp    DNA     linear   BCT 09-JAN-1998
DEFINITION  Staphylococcus pasteuri gene for 16S ribosomal RNA.
ACCESSION   AB009944
VERSION     AB009944.1  GI:2760736
KEYWORDS    16S rRNA; rrn.
SOURCE      Staphylococcus pasteuri
  ORGANISM  Staphylococcus pasteuri
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Takahashi,T., Satoh,I. and Kikuchi,N.
  TITLE     Phylogenetic relationships of Staphylococcus based on 16S rDNA
            sequence analyses
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1494)
  AUTHORS   Takahashi,T.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-DEC-1997) Tatsufumi Takahashi, Rakuno Gakuen
            University, School of Veterinary Medicine, Epizootiology; 582-1
            Bunkyodai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan
            (E-mail:ttaka@rakuno.ac.jp, Tel:011-386-1112, Fax:011-387-5890)
```

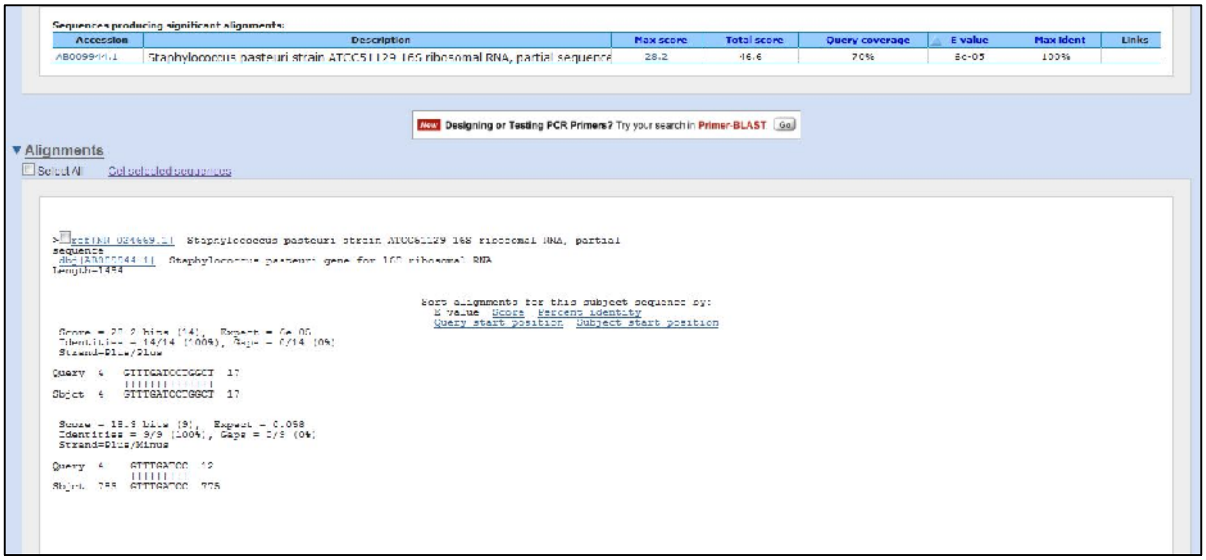
شکل ۴ ۲۷: *Staphylococcus pasteuri* 16S ribosomal RNA gene



شکل ۴ :۲۸ Staphylococcus pasteuri 16S ribosomal RNA gene nblast با پرایمر 27F



شکل ۴ :۲۹ Staphylococcus pasteuri 16S ribosomal RNA gene nblast با پرایمر 1492R



شکل ۴ :۳۰ *Staphylococcus pasteuri* 16S ribosomal RNA gene nblast با پرایمر عمومی

۴ ۲ ۴ ۵ *Proteus mirabilis*

این باکتری نیز از آن باکتریهایی بود که توالی کامل ژن 16S rRNA آن در NCBI، موجود نبود برای همین با بخشی از توالی ژن و همچنین ژنوم کامل باکتری کار شد. برای nblast از پرایمرهای جدول ۴ ۴، استفاده شد.

جدول۴ ۴: پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن pcoA (Ojo et al., 2008)

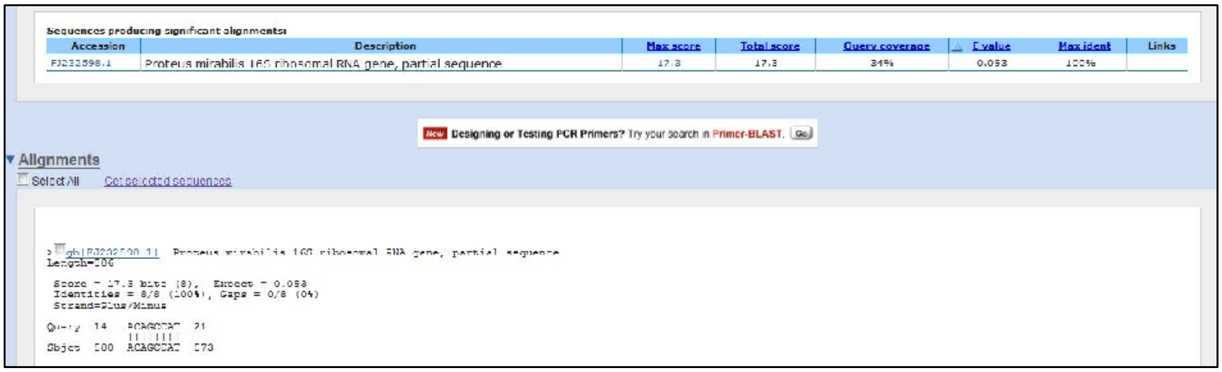
Amplifies	Sequence(5′→3′)
copper resistance (pcoA) gene in *P.mirabilis*	ACYTACTGGTAYCACAGCCATTC CCACATVCCRTGCAGGTG

ژن 16S rRNA، هومولوژی خوبی را در نرم‌افزار نشان داد(شکل۴ ۳۱) و همچنین nBlast ژن ، 16S rRNA این باکتری با پرایمر کلی(جدول۴ ۲) شباهت نداشته و با پرایمرهای جدول ۴ ۴، به شرح شکل شباهت داشت(شکل۴ ۳۲، ۴ ۳۳).

```
gi|304443517|gb|HQ169117.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 142
gi|304443516|gb|HQ169116.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 142
gi|304443518|gb|HQ169118.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 141
gi|320526712|gb|HQ694733.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 140
gi|333973506|gb|JF784046.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 141
gi|330687198|gb|JF775415.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 153
gi|333973495|gb|JF784035.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 129
gi|333973505|gb|JF784045.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 141
gi|336171098|gb|JF947362.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 143
gi|270266401|gb|GU106030.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 110
gi|333973485|gb|JF784025.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 142
gi|301322489|gb|HM585375.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 183
gi|90856205|gb|DQ449631.1|       GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 146
gi|6478168|gb|AF008582.1|        GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 178
gi|55847571|gb|AY820623.1|       GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 178
gi|114147288|gb|DQ885256.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 184
gi|15551727|emb|AJ301682.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 184
gi|258618049|gb|FJ711760.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 132
gi|322392883|gb|HQ259935.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 160
gi|322392880|gb|HQ259932.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 158
gi|251825134|gb|GQ259884.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 147
gi|107372707|gb|EU643033.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 201
gi|334303334|gb|JF799896.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 147
gi|334303323|gb|JF799885.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 151
gi|310751516|gb|HQ407314.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 191
gi|334303335|gb|JF799897.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 146
gi|118175516|gb|EF091150.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 163
gi|290558735|gb|GU477712.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 166
gi|89243031|gb|DQ403812.1|       GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 121
gi|310751508|gb|HQ407306.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 189
gi|310751507|gb|HQ407305.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 213
gi|340025971|gb|JN092590.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 187
gi|310751514|gb|HQ407312.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 242
gi|310751521|gb|HQ407319.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 106
gi|310751510|gb|HQ407308.1|      GAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGG 191
                                 **************************************************
```

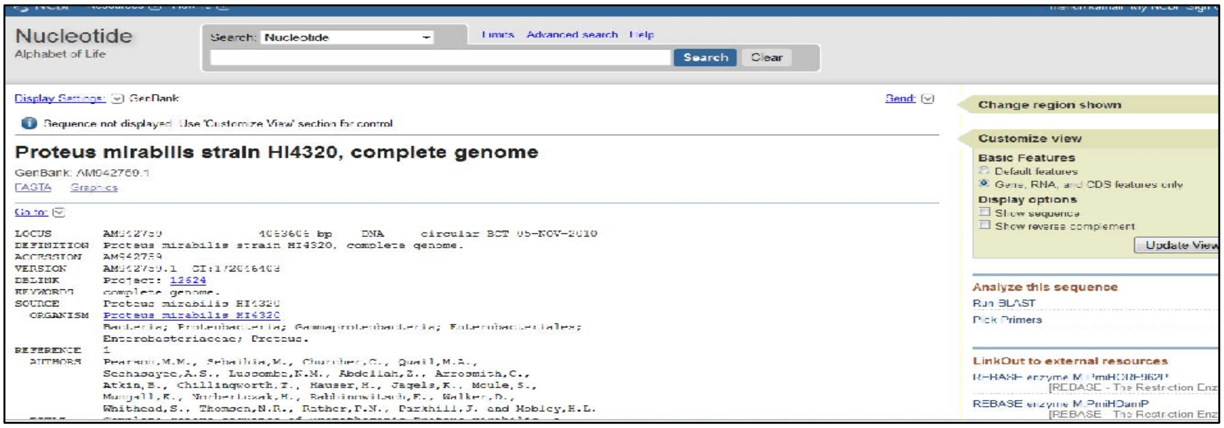
شکل ۴ ۳۱: هومولوژی ژن 16S rRNA Proteus mirabilis

با توجه به *Proteus mirabilis* strain HI4320, complete genom (شکل۴ ۳۴) و پیدا نمودن ژن 16S rRNA، در cds مرتبط(شکل۴ ۳۵) و همچنین بلاست با پرایمر کلی(جدول ۴ ۲) و پرایمر سطر اوّل جدول ۴ ۴ نتایج بشرح شکل داد(شکل۴ ۳۶ و ۴ ۳۷) ولی با پرایمر دومی جدول ۴ ۴ شباهتی نشان نداد.

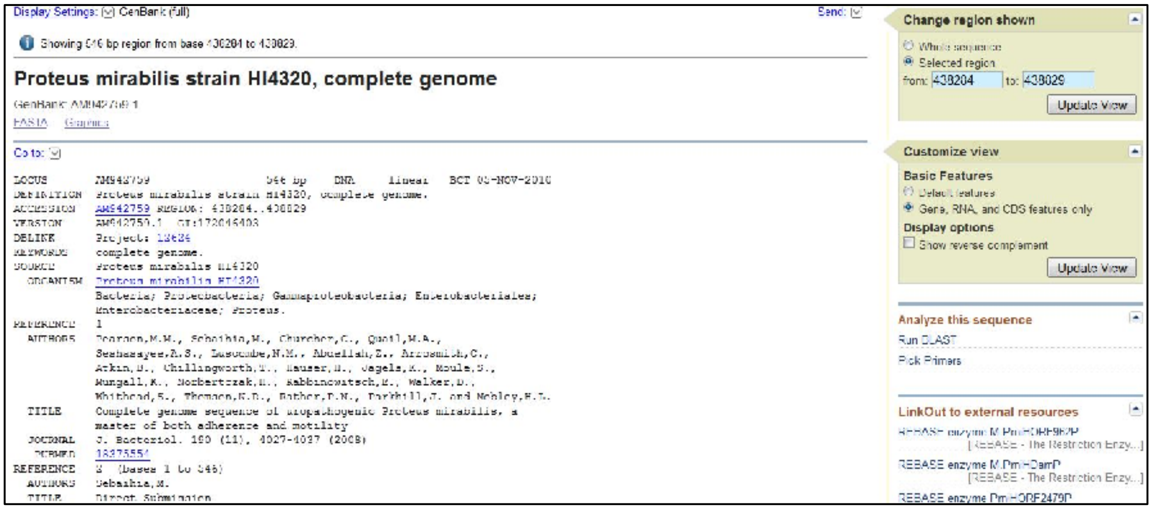


شکل ۴ ۳۲: nblast Proteus mirabilis 16S ribosomal RNA gene با پرایمر اول جدول ۴ ۴

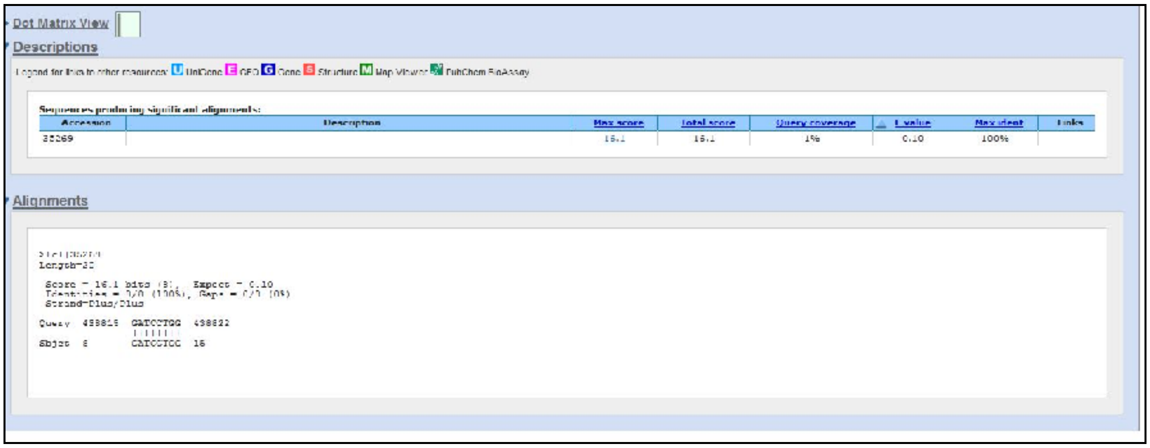
شکل ۴ ۳۳: nblast *Proteus mirabilis* 16S ribosomal RNA gene با پرایمر دوم جدول ۴ ۴



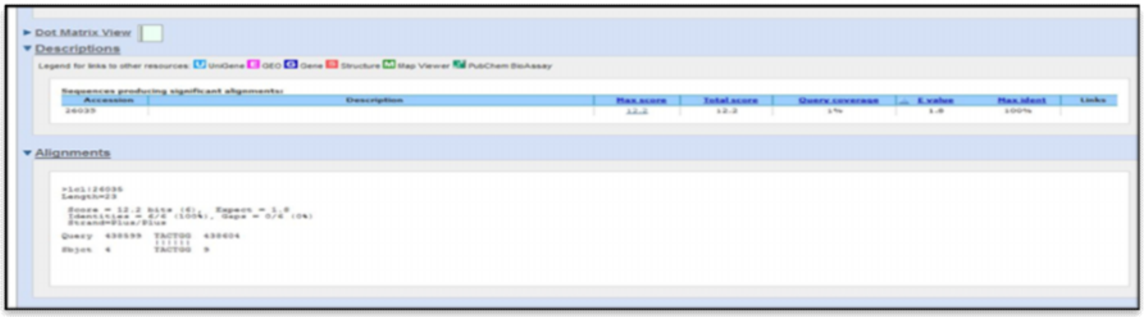
شکل ۴ ۳۴: *Proteus mirabilis* strain HI4320, complete genom



شکل ۴ ۳۵: انتخاب 16S rRNA در ژن cDs *Proteus mirabilis* دارای ۵۴۶ جفت مبنا



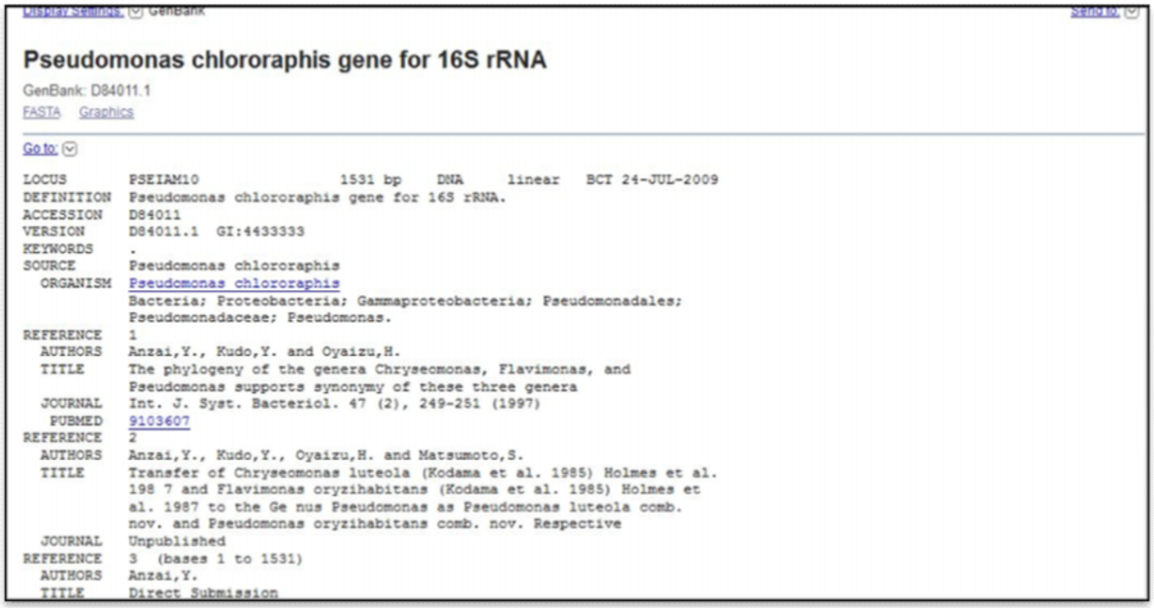
شکل ۴ ۳۶: nblast، ناحیه ژنی شکل ۴ ۳۵ با پرایمر عمومی جدول ۴ ۴



شکل ۴ ۳۷: nblast، ناحیه ژنی شکل ۴ ۳۵ با پرایمر اول جدول ۴ ۴

۴ ۲ ۴ ۶ *Pseudomonas chlororaphis*

ژن 16S rRNA این باکتری(شکل۴ ۳۸)، هومولوژی بسیار خوبی را در نرم افزار clustalw، نشان داد(شکل۴ ۳۹). با استفاده از پرایمرهای جدول ۴ ۲، nblast صورت گرفت(شکل ۴ ۴۰، ۴ ۴۱، ۴ ۴۲)؛ از پرایمرهای 27F و 1492R برای تکثیر ژن ریبوزومال این باکتری بوفور استفاده شده است (Lin et al., 2010).


Display Settings: GenBank Send to:

Pseudomonas chlororaphis gene for 16S rRNA

GenBank: D84011.1

FASTA Graphics

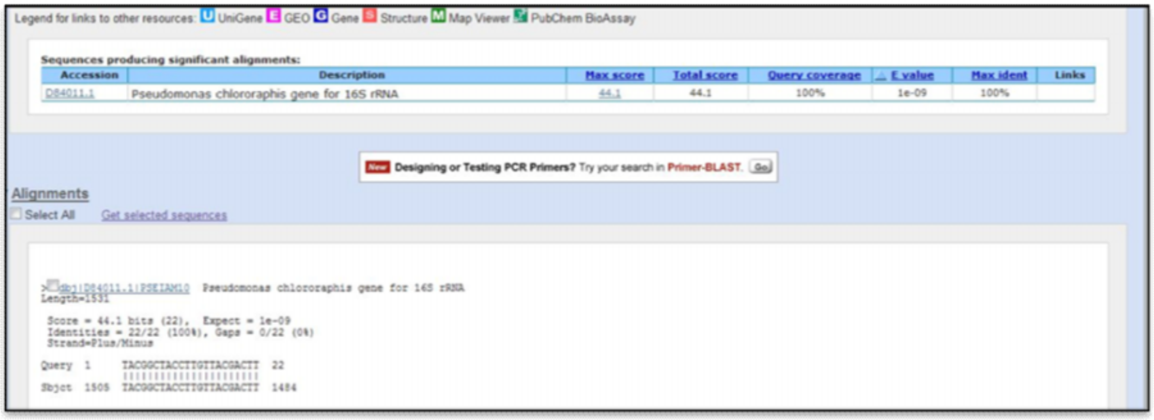
Go to:

```
LOCUS       PSEIAM10                1531 bp    DNA     linear   BCT 24-JUL-2009
DEFINITION  Pseudomonas chlororaphis gene for 16S rRNA.
ACCESSION   D84011
VERSION     D84011.1  GI:4433333
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas chlororaphis
  ORGANISM  Pseudomonas chlororaphis
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Anzai,Y., Kudo,Y. and Oyaizu,H.
  TITLE     The phylogeny of the genera Chryseomonas, Flavimonas, and
            Pseudomonas supports synonymy of these three genera
  JOURNAL   Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (2), 249-251 (1997)
   PUBMED   9103607
REFERENCE   2
  AUTHORS   Anzai,Y., Kudo,Y., Oyaizu,H. and Matsumoto,S.
  TITLE     Transfer of Chryseomonas luteola (Kodama et al. 1985) Holmes et al.
            198 7 and Flavimonas oryzihabitans (Kodama et al. 1985) Holmes et
            al. 1987 to the Ge nus Pseudomonas as Pseudomonas luteola comb.
            nov. and Pseudomonas oryzihabitans comb. nov. Respective
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   3  (bases 1 to 1531)
  AUTHORS   Anzai,Y.
  TITLE     Direct Submission
```

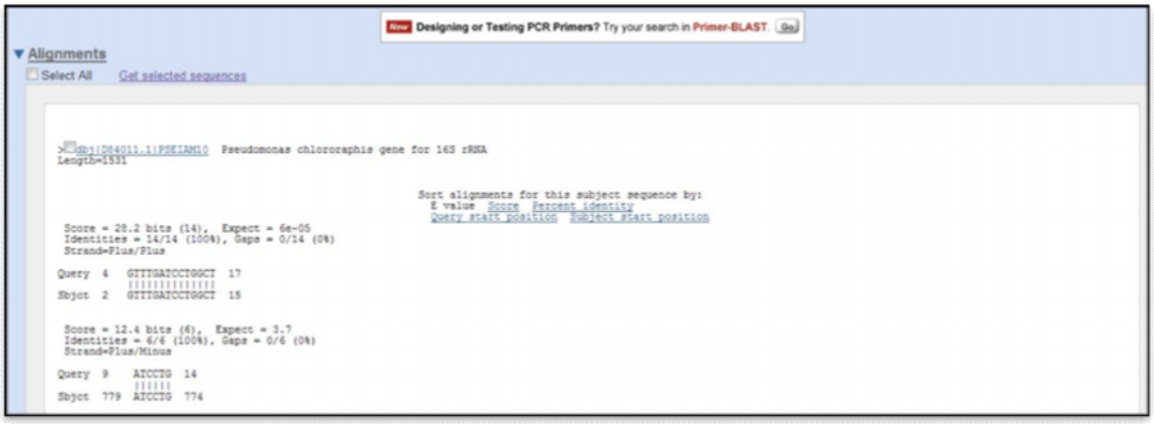
شکل۴ ۳۸: توالی ژن *Pseudomonas chlororaphis* 16S rRNA

```
gi|343202581|ref|NR_042939.1|      CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 242
gi|295388258|gb|GU947817.1|        CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 243
gi|343205610|ref|NR_043935.1|      CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 244
gi|29373958|emb|AJ550465.1|        CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 224
gi|343206382|ref|NR_044974.1|      CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 223
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM     CTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT 247
                                   **************************************************

gi|343202581|ref|NR_042939.1|      GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 292
gi|295388258|gb|GU947817.1|        GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 293
gi|343205610|ref|NR_043935.1|      GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 294
gi|29373958|emb|AJ550465.1|        GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 274
gi|343206382|ref|NR_044974.1|      GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 273
gi|4433333|dbj|D84011.1|PSEIAM     GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGA 297
                                   **************************************************
```

شکل ۴ ۳۹: هومولوژی ژن *Pseudomonas chlororaphis* 16S rRNA



شکل ۴ -۴۰: nblast ژن *Pseudomonas chlororaphis* 16S rRNA با پرایمر 27F

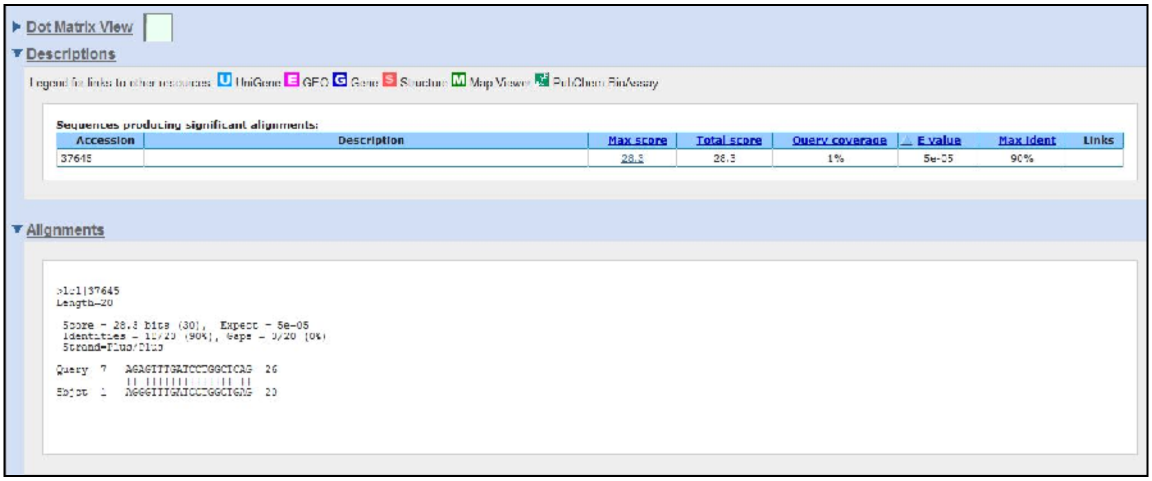


شکل ۴ -۴۱: nblast ژن *Pseudomonas chlororaphis* 16S rRNA با پرایمر 1492R

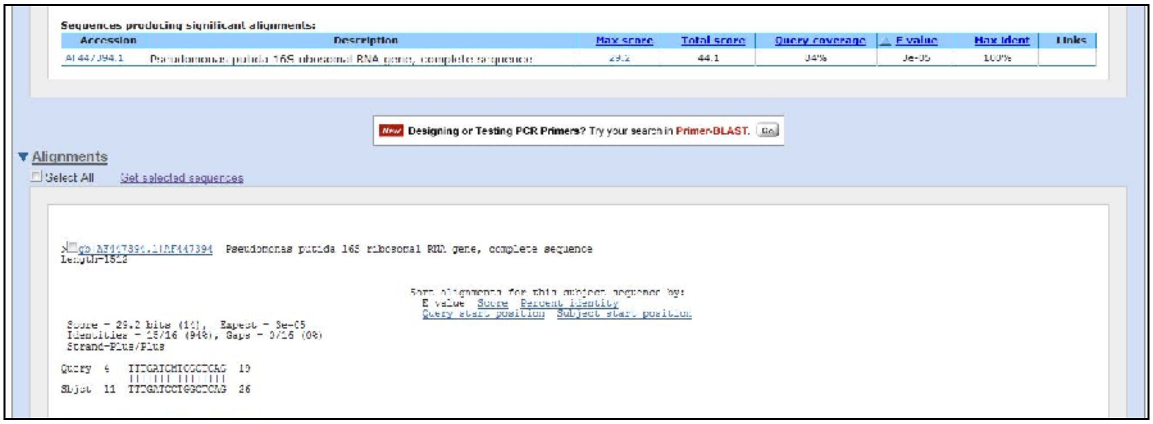
شکل ۴ -۴۲: nblast ژن *Pseudomonas chlororaphis* 16S rRNA با پرایمر عمومی

٤ ۴ ٤ ۷ *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida در حقیقت بعنوان باکتری خاک شناخته می‌شود که این باکتری توان بکارگیری در بیولیچینگ را نیز دارا می‌باشد(Andreazza et al., 2010a; b). استفاده شده است. آمپلیفای ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای 27f و 1492R صورت گرفته است. با ساتفاده از پرایمرهای مذکور نتایج حاصل از nblast، به شرح شکل می‌باشد(شکل ۴ ۴۳ و ۴ ۴۴). توالی کامل ژن 16S rRNA، نیز موجود بوده و هومولوژی خوبی را نشان داد(شکل ۴ ۴۵ و ۴ ۴۶).



شکل ۴ ۴۳: nblast ژن 16S rRNA *Pseudomonas putida* با پرایمر 27F



شکل ۴ ۴۴: nblast ژن 16S rRNA *Pseudomonas putida* با پرایمر 1492R

```
Display Settings: GenBank                                                    Send to:

Pseudomonas putida 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: EU348741.1
FASTA   Graphics

Go to:

LOCUS       EU348741               1443 bp    DNA     linear   BCT 19-JAN-2008
DEFINITION  Pseudomonas putida 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   EU348741
VERSION     EU348741.1  GI:164664978
KEYWORDS    .
SOURCE      Pseudomonas putida
  ORGANISM  Pseudomonas putida
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
            Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1443)
  AUTHORS   Cao,H., Wang,Y. and Yang,X.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (17-DEC-2007) Shanghai Fisheries University, Aquatic
            Pathogen Collection Center, 334 Jungong Road, Shanghai 200090,
            China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1443
                     /organism="Pseudomonas putida"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="soil"
                     /db_xref="taxon:303"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: 27f, rev_name: 1492r"
     rRNA            <1..>1443
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gaacggtggg gaggatcaag tgagtgtaga gaggtgaagg gagattgata attgattaag
       61 cggcggacgg gtgagtaatg cctaggaatc tgcctggtag tgggggacaa cgtttcgaaa
      121 ggaacgctaa taccgcatac gtcctacggg agaaagcagg ggaccttcgg gccttgcgct
      181 atcagatgag cctaggtcgg attagctagt tggtggggta atggctcacc aaggcgacga
```

شکل ۴ ۴۵: ژن 16S rRNA *Pseudomonas putida*

```
gi|78059559|gb|DQ229315.1|        GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|237652199|gb|FJ932760.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|300433170|gb|HM152748.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|300433155|gb|HM152733.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|300433148|gb|HM152726.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|300433113|gb|HM152691.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|300433108|gb|HM152686.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|300432999|gb|HM152577.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|202072085|gb|EU747694.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 149
gi|110826444|gb|DQ836052.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|92110525|gb|DQ458961.1|        GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|254682123|gb|GQ284471.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 135
gi|291603258|gb|GU731675.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|66735137|gb|DQ060242.1|        GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 136
gi|76152279|gb|DQ192174.1|        GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 149
gi|220967087|gb|FJ600357.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 135
gi|220967091|gb|FJ600361.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 135
gi|68159404|gb|DQ079062.1|        GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 135
gi|217932331|gb|FJ463406.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 136
gi|219958080|gb|FJ545651.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 135
gi|220900825|gb|FJ032013.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|217932330|gb|FJ463405.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 134
gi|212725321|gb|FJ405889.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|118585324|gb|EF107048.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|207559773|gb|FJ211165.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 147
gi|118026510|emb|AM411058.1|      GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|251831332|gb|GQ246949.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 135
gi|209976886|dbj|AB436915.1|      GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 136
gi|118420515|emb|AM411620.1|      GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|183585698|gb|EU439421.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 133
gi|30038534|dbj|AB108691.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|83583855|gb|DQ301785.1|        GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
gi|281192860|gb|GU191925.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 124
gi|183585697|gb|EU439420.1|       GATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG 132
                                  **************************************************
```

شکل ۴ ۴۶: هومولوژی ژن 16S rRNA *Pseudomonas putida*

۴ ۲ ۴ ۸ سنتز پرایمر

کارهای صورت گرفته با استفاده از نرم افزارهای فوق‌الذکر، برای طراحی پرایمر و همچنین بررسی هومولوژی ژن 16s rRNA در باکتریها صورت گرفت، چرا که هومولوژی خوبی اگر در این ژن وجود نداشته باشد، در طراحی پرایمر و مراحل PCR، اشکالات عدیده‌ای بوجود می‌آید که طرح آنها خارج از حوصله ی این بحث است.

در نهایت با توجه به شباهتها و تفاوتهای پرایمرها با ناحیه‌ی ژنی و بررسی‌هایی از این دست، نتیجه بر آن شد که پرایمرهای 1492R و 24F، بعنوان پرایمرهای عمومی در طراحی واکنشPCR مورد استفاده باشند. لذا برای سنتز و ساخت آنها به شرکت سیناژن[۸۴] سفارش داده شد.

۴ ۳ تست‌های آزمایشگاهی

در کنار کارهای بیوانفورماتیک، تست های آزمایشگاهی نیز شروع شدند، با نمونه گیری مناسب از اطراف رگه های کانساری، اقدام به شناسایی باکتریهای موجود در این خاکها و ارزیابی تنوع ژنتیکی[۸۵] اطراف نواحی کانساری شد، در ادامه مراحل کار آزمایشگاهی تا نقطه‌ی شروع روشهای ملکولی تشریح خواهد شد.

۴ ۳ ۱ جداسازی و خاص‌سازی باکتری مقاوم به مس

برای اینکه بتوانیم یک وجه تمایزی، بین خاکهای آلوده به مس- در علوم زمین‌شناسی اقتصادی به چنین نواحی‌ای، کانسار یا ذخیره اطلاق می‌شود- و دیگر خاکها –نواحی دارای مقدار زمینه مس [۸۶]- قائل شویم، نیاز بود تا شرایطی همچون خاک نواحی کانساری بوجود بیاید؛ به عبارتی میبایستی محیط کشتی تهیه شود که منعکس کننده محل زندگی باکتریها باشد؛ لذا از محیط کشت انتخابی مس‌دار، استفاده شد؛ آندرزا و همکاران از این محیط کشت برای بررسی قدرت جذب بیولوژیکی مس توسط باکتریها استفاده نموده‌اند[۸۷] ؛

1- CinnaGen Co., Head Office: 5th floor, no. 56, Azimi St., Phase 1, Shahrak Ekbatan, Tehran, Iran
2- Assessing genetic diversity
3- background
4- Andreazza, R., S. Pieniz, B.C. Okeke and F.A.O. Camargo (2011), Evalution of copper resistant bacteria from Vineyard soils and mining waste for copper biosorption, Brazilian Journal of Microbiology, 42: 66-74.

در ادامه به تشریح نحوه‌ی ساخت چنین محیط کشتی اشاره می‌شود و نحوه‌ی جداسازی باکتریهای مقاوم به مس باختصار تشریح می گردد.

۴ ۳ ۲ تهیه‌ی محیط کشت NB

۴ گرم از محیط کشت آماده‌ی NB[88] ، را با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و بصورت محلول در میاوریم (Andreazza et al., 2011)، برای این کار از همزن اجاق‌دار[89] (شکل ۴ ۴۷)، باضافه یک مگنت برای چرخش استفاده شد، دمای مورد نظر همان دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) در نظر گرفته شد. برای انجام این کار از، فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری درب آبی استفاده شد. آنگاه ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سولفات مس($CuSO_4.5H_2O$)، به محلول اضافه نموده(Andreazza et al., 2011) و pH محلول را در حالی که مایع در فلاسک در حال چرخش بود به ۷ رسانده شد. این کار با استفاده از سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر و NaOH غلیظ، صورت گرفت هر ۱۰۰ میکرومتر NaOH، حدود ۲./، pH را تغییر و به عبارتی بالا می‌برد. حال دیگر محلول یا همان محیط کشت NB مس‌دار، آماده است. بعداً محیط کشت مذکور را به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو(شکل ۴ ۴۸) در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتیگراد و فشار ۱بار قرار داده تا استریل گردد؛ اکنون محیط کشت مذکور، برای اضافه نمودن نمونه‌های خاک آماده است. می‌توان محیط کشت را در یخچال قرار داده و بعداً استفاده نمود؛ امّا پس از هر بار استفاده ، لازم است تا دوباره استریل شود.

۴ ۳ ۳ اضافه کردن نمونه‌های خاک

به تعداد نمونه‌ها – ۱۴ نمونه(جدول۴ ۵) فالکون برداشته و در اتوکلاو قرار داده شدند، برای اینکار از فالکونهای ۵۰ میلیمتری استفاده شد. پس از اینکه فالکونها در اتوکلاو استریل شد، آنها را در رک چیده و با محیط کشت NB استریل شده داخل هود لامینار(شکل۴ ۴۹) برده تا زیر هود کار شود.

قبل از استفاده‌ی هود، بمدت نیم ساعت لامپ UV روشن بوده و تمامی وسایل بجز نمونه‌های خاک را داخل هود قرار داده شد. قبل از شروع کار، لامپ UV را خاموش نموده و نمونه‌ها در هود قرار گرفتند. آنگاه ۱درصد وزنی/ حجمی خاک(Andreazza et al., 2011)، به فالکونها با محیط کشت استریل اضافه شد، در واقع ۱گرم خاک، باید به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده می‌شد؛ که در این کار، ۰/۱ گرم خاک به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد؛ برای این کار از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ استفاده شد. سر فالکونها

1- nutrient broth
2-Hot plate Stirrer

با پارافیلم بسته شده و با برچسب، نام هر کدام معین شد. در ادامه فالکونها جداگانه، داخل انکوباتور شیکر[۹۰](شکل۴ ۵۰) قرار داده شدند.

شکل۴ ۴۷: همزن برقی اجاق‌دار

3- incubator shaker

شکل ۴ ۴۸: اتوکلاو

دما و دور انکوباتور به ترتیب روی ۳۰ درجه‌ی سانتیکراد و ۱۵۰ دور در دقیقه تنظیم شدند؛ انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در این وضعیت قرار داده شد.

٤ ۳ ٤ خالص‌سازی

پس از طی ۲۴ ساعت، ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت غنی شده به حجم ۵ میلیلیتر با استفاده از محیط کشت استریل شده‌ی NB، رسانده و باز داخل انکوباتور شیکر با همان شرایط قرار داده شدند، این کار دو مرتبه تکرار شد. تمامی این مراحل نیز زیر هود لامینار کار شدند. در مرحله‌ی آخر، هنگامیکه قرار بود نمونه‌ها از محیط کشت مایع، داخل پلتهای جامد کشت داده شوند، متوجه شدیم که یکی از فالکون‌های حاوی محیط کشت NB، دارای ابر باکتریال نیست؛ این مهّم باین معنا بود که هیچ باکتری‌ای در آن رشد نکرده است(شکل ۴ ۵۱). این موضوع، نکته‌ی بسیار مهمی در اکتشاف معدن می‌تواند باشد که در فصل بعدی، تحت عنوان نتایج راجع به آن بحث می‌شود.

٤ ۳ ۵ تهیه‌ی محیط کشت جامد NA

محیط کشت NA مورد استفاده در این آزمایش، شامل ۱/۵٪ آگار[91] ، ۰/۵٪ پپتون[92] ، ۰/۳٪ مخمر[93] ، ۰/۵٪ نمک طعام[94] (Wikipedia) و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر $CuSO_4.5H_2O$ می‌باشد (Andreazza et al., 2011). pH محلول ۶/۸ در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد یا همان دمای اتاق تنظیم شد(Wikipedia).

جدول۴ ۵: نمونه‌ها در مرحله‌ی اول

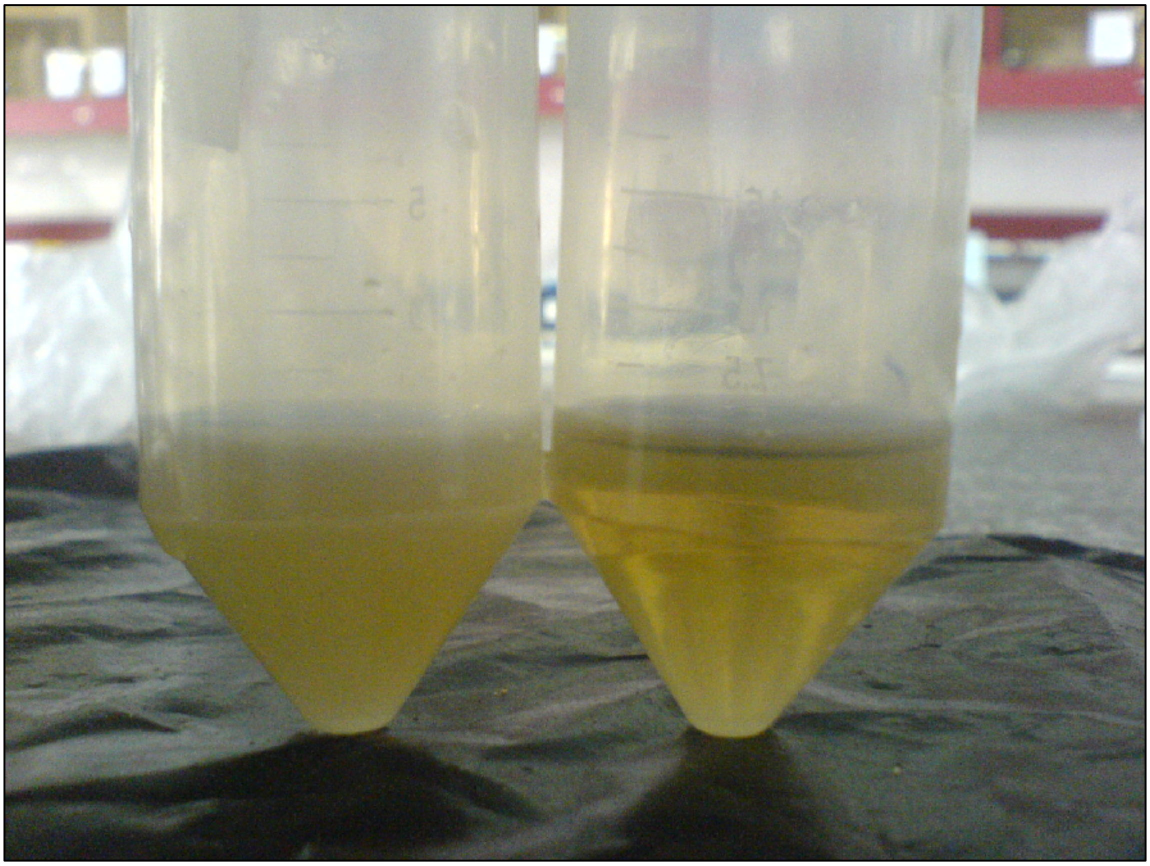
Witness1 Witness2	G	ACM	JBM	SA	SD	H	ABM	JCM	AAM	SK	JAM	DBM

٤ ٣ ٦ کشت جامد

پس از مرحله‌ی خالص‌سازی، اینک دیگر فالکون‌های حاوی نمونه می‌بایستی دارای باکتریهای مقاوم به مس باشند، لذا نیاز بود روی محیط کشت جامد کشت داده شوند، تا بتوان آنالیزهای بعدی را صورت داد؛ برای اینکار محیط کشت جامد NA [95] انتخاب شد(Andreazza et al., 2011)، در ادامه با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرولیتر، ۲۰۰-۱۵۰ میکرولیتر از نمونه های داخل فالکون را به محیط کشت NA، تزریق نموده و توسط لوپهای کفشی به چند صورت کشت داده شد. در طول مرحله‌ی خالص سازی دو نمونه، بدون خالص سازی در شرایط قرار گرفتند؛ در واقع اینک ۱۶ نمونه وجود داشتند. نمونه‌های G1 و JAM1 رقیق نشده و به همین نام، با همان شرایط ۱۴ نمونه روی محیط کشت جامد، کشت داده شدند.

همانگونه که ذکر شد؛ کشت بصورت کشیدن لوپ کفشی، با تزریق ۲۰۰-۱۵۰ میکرولیتر محلول به آگار انجام شد. بعداً پتری دیشها با پارافیلم ایزوله شدند. در ادامه، ۱۶ پتری دیش حاوی نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد.

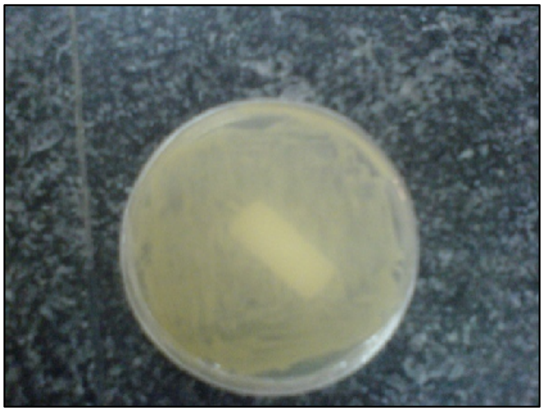
2- agar
3- pepton
4- yeast extract
5- NaCl
1- nutrient agar



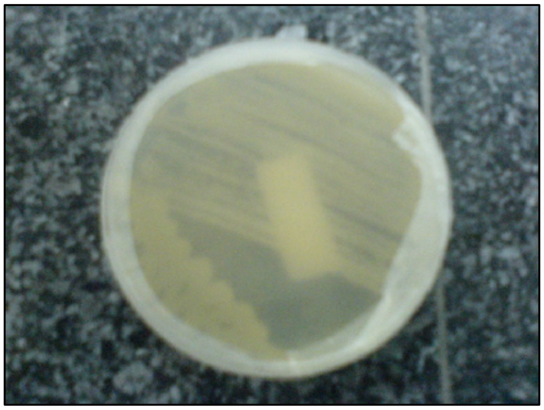
شکل ۴ ۵۱: فالکونها ، سمت راستی شامل خاک شاهد(W1) و سمت چپی شامل خاک معدن علی‌آباد (ACM)

پس از ۲۴ ساعت بدلیل رشد زیاد باکتریها، پلتها قابل شناسایی نبودند(شکل۴ ۵۲) که برای دیگر بار، محیط کشت NA، تهیه و داخل پلتها توزیع گردید؛ در ادامه از هر دو روش کشت خطی با لوپ دایره‌ای و کشت با لوپ کفشی استفاده شد؛ در حقیقت، با ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت NB و تزریق به محیط کشت جامد NA و همچنین کشت خطی، آزمایشات پی گرفته شدند. پس از رشد ۲۴ ساعتی نمونه‌ها داخل انکوباتور تحت دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد، باز رشد باکتریها بیش از حد مطلوب بود(شکل۴ ۵۳). در واقع باید روشی اتخاذ می‌شد تا بتوان تک کلون گرفت.

از آنجایی که هدف گرفتن تک کلون بود، از محیطهای جامد قبلی با استفاده از لوپ دایره‌ای نمونه برداشته و در یک پتری دیش جدید کشت انجام شد؛ یعنی یک ذره از محیط کشت جامد قبلی را برداشته و در پلت نوکشت با استفاده از کشت خطی کشت صورت گرفت. نمونه‌های گرفته شده از جامد با اندیس p مشخص شدند؛ نمونه‌های خاک دوباره در محیط کشت مایع کشت داده شدند و این دفعه با لوپ دایره‌ای، به داخل فالکو



شکل۴ ۵۲: کشت با لوپ پاشکل که زیادی رشد را نشان می‌دهد.

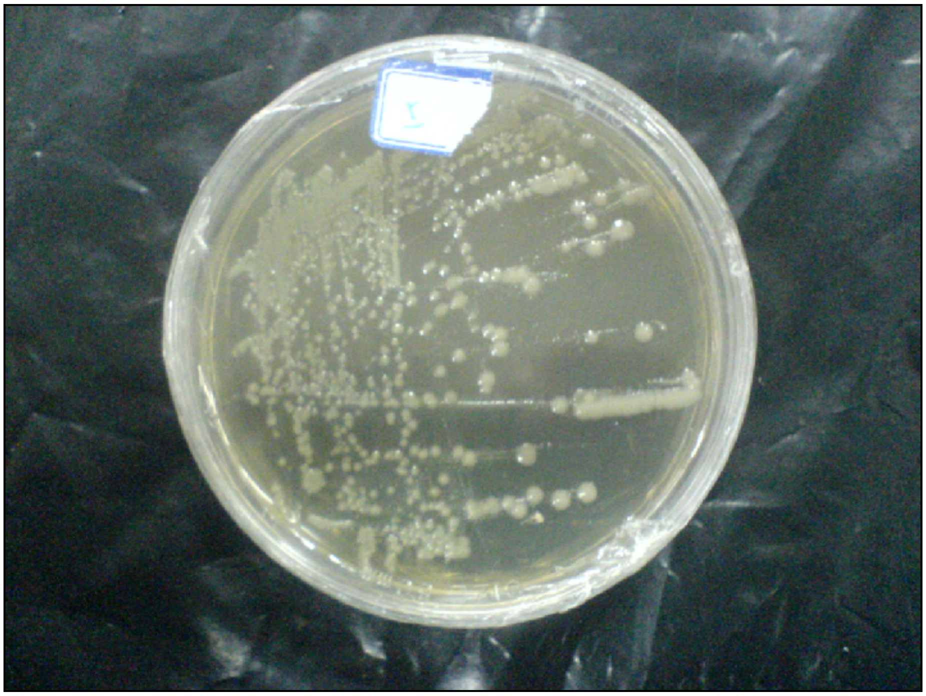


شکل۴ ۵۳: نمونه کشت خطی در محیط کشت جامد شامل رشد زیاد باکتری

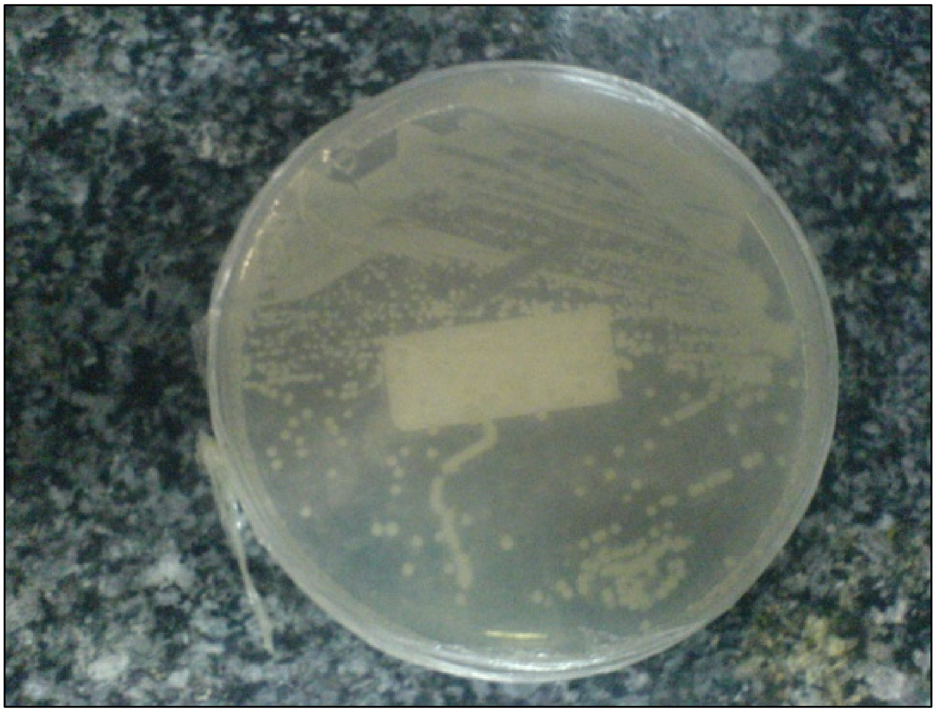
زده و روی محیط کشت جامد پخش شدند. این پتری دیش‌ها، با اندیس L از یکدیگر متمایز گشتند. مانند SK_L یا SA_P.

در ادامه با کشتهای خطی‌ای که صورت گرفت تک کلون در پتری دیش‌ها مشاهده شد(شکل ۴ ۵۴ و ۴ ۵۵). با مشخص شدن تک کلونیها، پتری دیش به چندین قسمت تقسیم(شکل ۴ ۵۶) و گرفتن یک کلون از هر قسمت و کشت آن بصورت خطی در نقطه ی متناظر آن در پتری دیش جدید سعی در تک کلونی کردن کامل آنها شد.

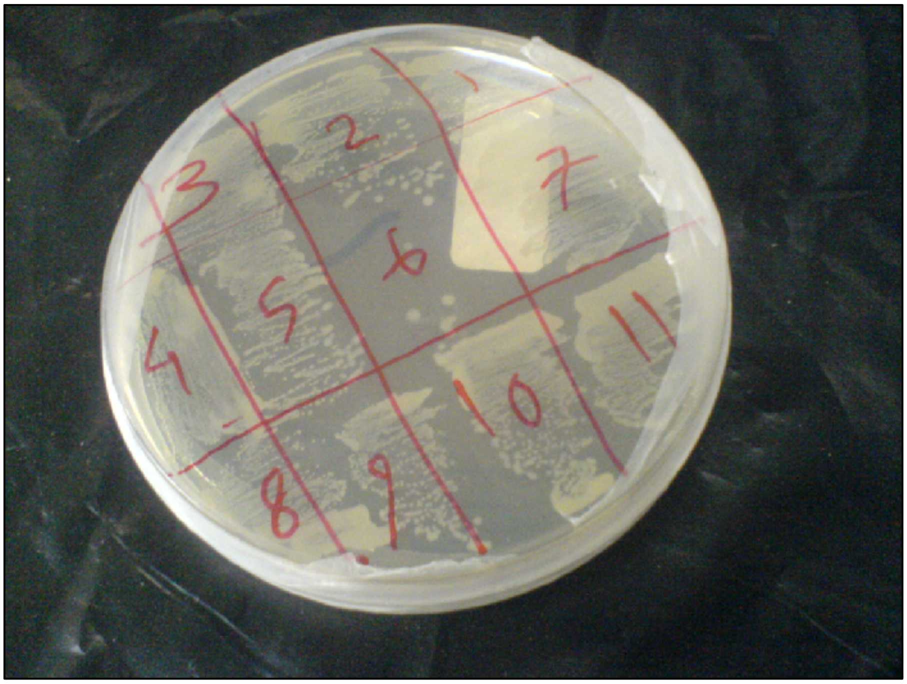
لازم بذکر است که در پتری دیش نمونه‌های شاهد، کلونهای باکتریها کم یا اصلاً اثری از باکتری نبود(شکل۴ ۵۷ و ۴ ۵۸)



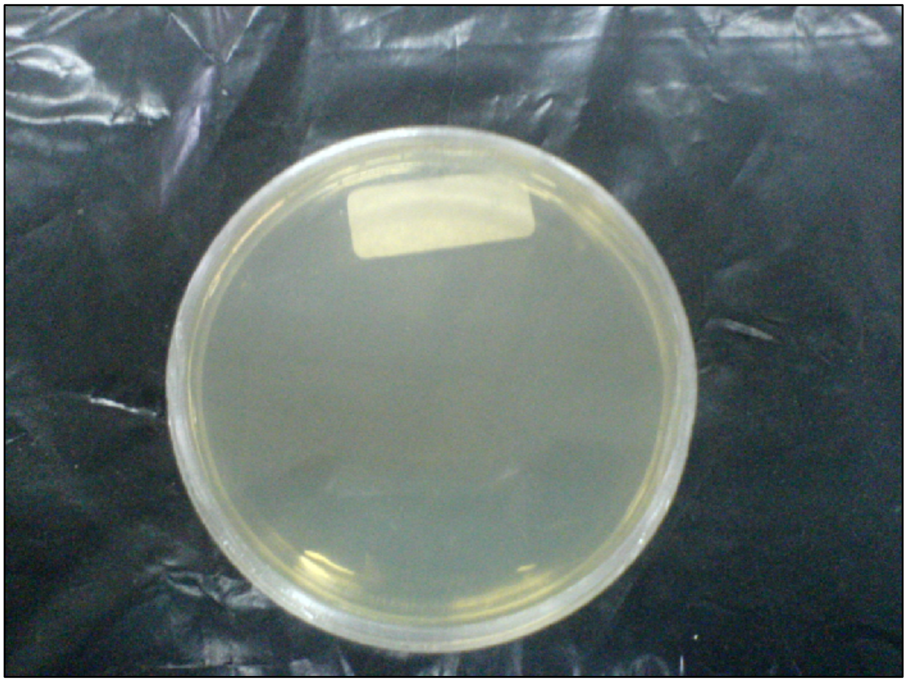
شکل ۴ ۵۵: تک کلون‌ها در پتری‌دیش



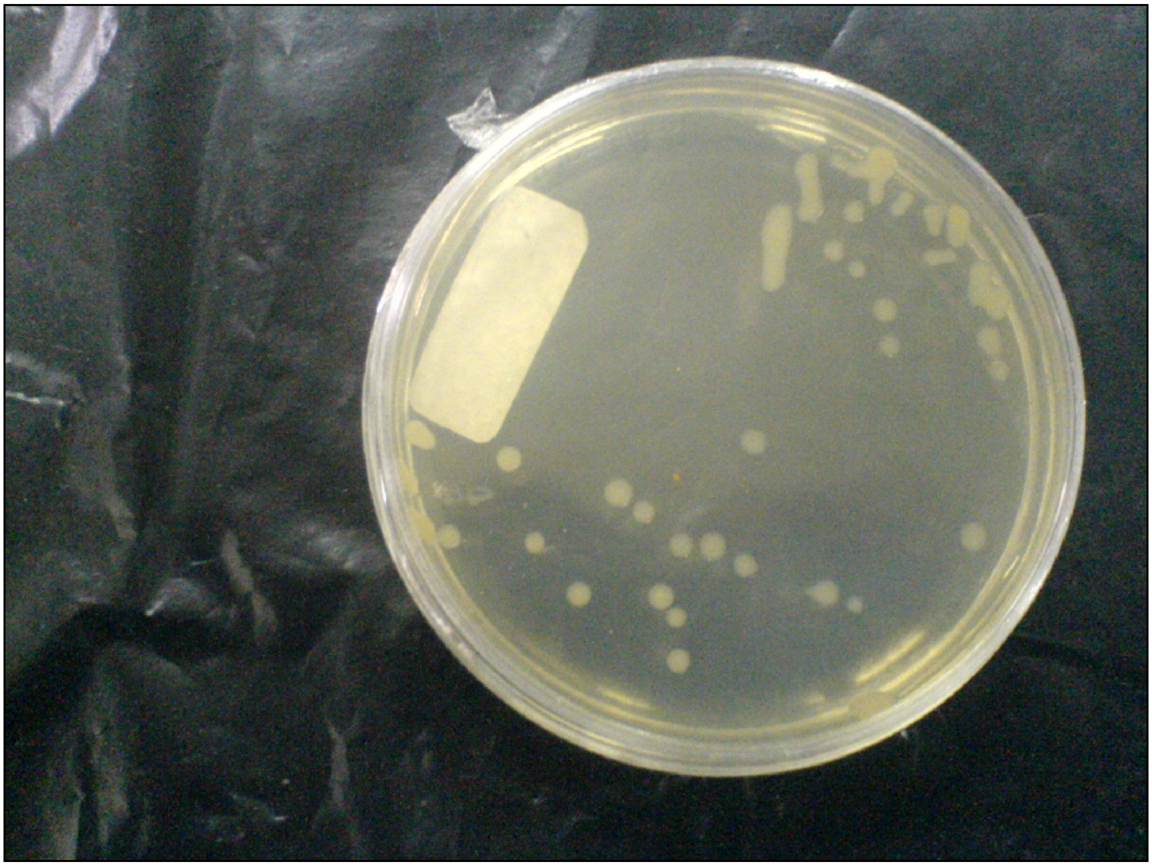
شکل ۴ ۵۴: تک کلون‌ها در پلت



شکل ۴ ۵۶: نمونه‌ای از تقسیم پتری دیش



شکل ۴ ۵۷: نمونه‌ی شاهد(W2)



شکل ۴ ۵۸: کلونهای بسیار کم باکتریها در نمونه شاهد (W1)

٤ ۳ ۷ تزریق آنتی‌بیوتیک به محیط کشت جامد

اولین مطالعات مربوط به چگونگی ارتباط بین جمعیت های باکتریال مقاوم فلزسنگین، آنتی بیوتیک و نواحی کانی‌سازی توسط میشل[۹۶] در سال ۱۹۸۶ انجام شد، نتایج این تحقیقات که در طول زهکشی در بخشی از معدن تومیچی[۹۷] صورت پذیرفت، چنین گزارش داده شد: ارتباطی به صورت تصادفی ما بین مقاومت کلرم‌آنفلیکول و کاناماسین وجود دارد که باکتریهای هتروتروفیک و حضور فلزات سنگین نیز به آنها مرتبط و وابسته می باشد. رابینسون[۹۸] نیز، در سال ۱۹۹۰ ، از لومینمتری[۹۹]، به منظور تخمین درصد باکتریهای مقاوم فلز در آبهای گرم و بخارآب استفاده کرد، او گزارش داد که در نواحی اشباع از بخار سطح رویی یک کانسار سولفیدی شاخصه‌ها عددی بیشتری توسط استفاده از لومینمتری مشخص شده است؛ که در مقایسه با آنالیزهای معمول ژئوشیمیایی برای آن عنصر روی نمونه‌های رسوبات تبخیری بهتر جواب داده اند(Parduhn, 1995).

1- Michaels
2-Tomichy mine
3-Robinson

۴ لومینومتری یک روش تخمین سلولی براساس عکس العمل دربرابرنشرنوری ATP-luci ferase می باشد.

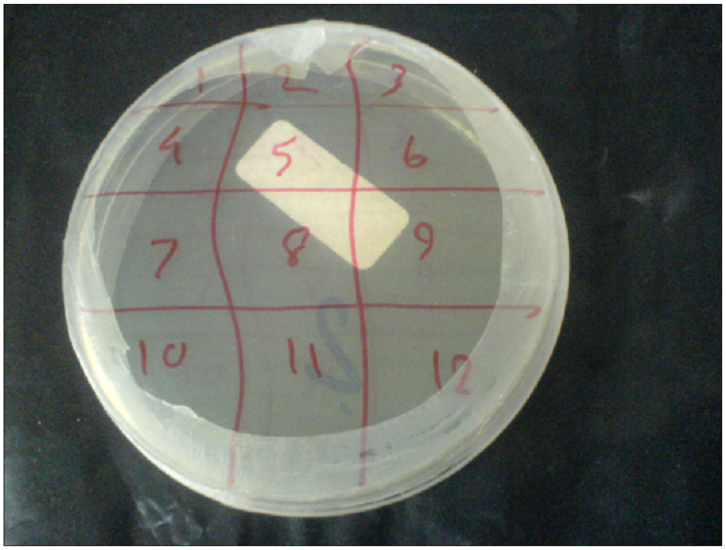
تیمونی[1] در سال ۱۹۷۸، کشف کرده بود که توزیع فلزات در ساحل لجنی نیویورک با مقاومت چندین فلز سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه های باسیلوس سروس منطبق شده است(Parduhn, 1995)، همین کشف او باعث شد چند سال بعد وترسون به این موضوع علاقمند بشود که آیا مقاومت پنیسیلین در باسیلوس سروس با آنومالی‌های طبیعی فلزات سنگین در خاکهای دست نخورده‌ی همجوارکانسار مطابقت دارد یا چنین چیزی نیست(Watterson et al., 1986). وترسون خاکهایی رویی چند کانسار فلزی مشهور را جمع آوری کرده و مورد آزمایش قرار داد؛ او مشاهده کرد که مقاومت پنیسیلین در باسیلوس سروس عمدتاً با محتوای فلزی خاک ارتباط دارد(Watterson et al., 1986).

با توجه به کارهای صورت گرفته پیشین، تصمیم بر آن شد که به محیط کشت آنتیبیوتیک تزریق شود، لذا به محیط کشت NA، هنگامیکه از اتوکلاو برداشته شده بود و آماده‌ی توزیع در پتری‌دیشها بود به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت یک میکرون آنتی‌بیوتیک اضافه گردید. به ازای هر نمونه‌ی حاوی تک کلون سه پتری دیش تهیه شد؛ به این صورت که به یک پتری‌دیش آمپی سیلین، به دیگری کانامایسن و به پتری دیش آخر، هر دوی آمپی‌سیلین[2] و کانامایسین[3] اضافه گردید. برای تهیه‌ی استوک آنتی‌بیوتیک، ۱گرم از پنی‌سیلین یا کانامایسین در ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد و به ازای هر ۱ سی‌سی از محیط کشت یک میکرون از استوک اضافه شد.

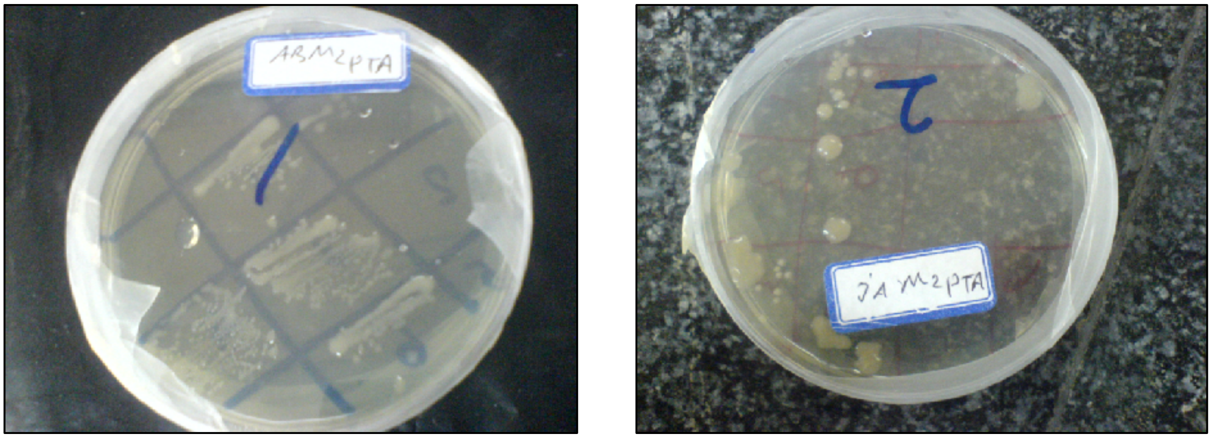
در ادامه هنگامیکه پتری‌دیش‌ها سفت شدند، عمل کشت صورت گرفت. نام نمونه‌ها بعنوان نمونه، بصورت SK_{PTA} تغییر یافت. مفهوم این یعنی این که، نمونه‌ی SK یکدفعه داخل محیط کشت جامد قرار گرفته است، باز از آن پتری‌دیش مقدار کمی برداشته شده و در محیط کشت جامد دیگری کشت داده شده است (نمونه SK_P)، بعداً این نمونه به چند قسمت تقسیم و از هر قسمت در پتری‌دیش دیگر کشت داده شد. در ادامه از تک کلونها برداشته و در پلت جدید قرار داده شده (نمونه SK_{PT}) پس از رشد گونه‌ها در پتری دیش، باز پلتی با محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک تهیه شده و در آن رشد با تکه‌برداری از پلت قبلی صورت گرفته است (SK_{PTA})؛ نام آنتی‌بیوتیک و تعداد آنها نیز با حروف(a, c, 1, 2) مشخص شدند.

در نهایت مشاهده شد که نمونه‌های خاکی گرفته شده از نواحی کانساری در پتری دیش‌ها شامل باکتری بوده و در نمونه‌های شاهد اثری از حتی یک تک کلون نیست(شکل ۴ ۵۹ و ۴ ۶۰). این موضوع دریافت بسیار مهمی می‌توانست باشد که در فصل بعدی تشریح می‌گردد.

1- Timoney
2- ampicillin
3- canamycin



شکل ۴ ۵۹: نمونه‌ی شاهد، شامل هر دو آنتی‌بیوتیک (W2)



شکل ۴ ۶۰: پتری دیش سمت راست مربوط به نمونه‌ی معدن جاروشامل محیط کشت با دو آنتی‌بیوتیک و تصویر سمت چپ مربوط به نمونه‌ی خاک معدن علی‌آباد در پتری دیش شامل آمپی سیلین

۴ ۳ ۸ تست UV

بمنظور تعیین عدم حضور *E.coli*، در مرحله‌ی کشت و همچنین تصدیق نبود آلودگی در محیط کشت این کار صورت گرفت. در آزمایشگاه احتمال حضور *E. Coli* بود و از طرفی هم این باکتری می‌توانست در محیط کشت اختصاصی ما رشد کند و حتی وجود داشته باشد؛ چرا که در کارهای قبلی حضور این باکتری در نواحی مس‌دار ثابت شده بود (Konstantinidis et al., 2003; Shakoori and Muneer 2002; Santo et al., 2010)

لذا برای اطمینان از این موضوع قبل از بررسی‌های ملکولی و استخراج DNA، برآن شدیم تا تست UV، بر روی نمونه‌ها صورت بگیرد؛ بنابراین تعدادی از نمونه‌ها – پتری دیش حاوی باکتریها – را در معرض اشعه‌ی ماوراء بنفش قرار داده شد؛ از آنجائیکه باکتری E. Coli، هنگامی که در این وضعیت قرار می‌گیرد باید از خود نور سبز مغز پسته‌ای ساطع کند، اگر در نمونه‌ها این باکتری وجود داشت، میبایستی پلت حاوی نمونه رنگ مذکور را از خود ساطع کند؛ که چنین چیزی در نمونه‌های ما مضهود نبود و این یعنی اینکه گونه‌ی E. Coli، در خاکهای معادن مورد مطالعه وجود نداشت.

٤-٤ پروسه‌ی ملکولی (شامل هر دو روش RNA و DNA)

٤-٤-١ استخراج و خالص سازی ناکلئیک اسیدها

اولین و مهم‌ترین گام در تکنیک‌های ملکولی RNA و DNA جداسازی و تصفیه و خالص‌سازی ناکلئیک اسیدها (RNA یا DNA) از نمونه‌های خاک می‌باشد؛ چرا که گام‌های بعدی بر لزوم کیفیت و کمیّت همین ناکلئیک اسیدهای استخراجی تأکید دارند(Reith and Rogers, 2007).

روال منطقی برداشت ناکلئیک اسیدها از نمونه‌های خاکی به شرح ادامه می‌باشد(Hurt et al., 2001):

- درجه‌ی تأثیر ناکلئیک اسیدها، باید خیلی بالا باشد و ستمگیری آن به معرف نبودن ناکلئیک اسیدهای استخراجی جوامع میکروبی طبیعی، نباید جدی باشد.
- رشته‌های RNA و DNA استخراج شده، باید به اندازه‌ای بزرگ باشند؛ که بتوان از آنها در مطالعات ملکولی‌ای همچون؛ اطلاعات‌یابی ژنتیکی جوامع، یا آنالیزهای بیان حالت ژنی، بهره برد.
- RNA و DNA بدست آمده، باید به اندازه‌ی کافی خالص باشند؛ تا بمنظور هضم آنزیمی[۱۰۳]، هیبریداسیون، فزونسازی ساخت معکوس RNA با استفاده از واکنش رشته‌ی پلی مراز (ترنسکریپتاز معکوس PCR)، قابل اعتبار باشند.
- RNA و DNA باید به طور همزمان، از نمونه های خاک جدا شوند؛ تا بتوان آنالیزهای جامع و مستقیمی را روی آنها صورت داد.
- مقدمات استخراج و خالص‌سازی، باید تا اندازه‌ی ممکن، ساده و قابل فهم باشد؛ تا عمل استخراج سریع و کم خرج صورت گیرد.
- مراحل استخراج و مقدمات آن باید قوی، مطمئن و قابل تعمیم به نمونه‌های مختلف خاکی باشد.

1- Enzyme digestion

اغلب وسایل و اسباب کار اقتصادی موجود استخراج RNA وDNA به منظور برآوردن معیارهای فوق تهیه و طراحی شده‌اند؛ بنابراین آزمایشات اولیه زیادی جهت تعیین کارآرایی و فراگیر بودن تست‌های استخراج ناکلئیک اسیدها در حال انجام هستند. که هدفشان یافتن چگونگی استفاده‌ی اقتصادی از ابزارهای موجود و پیشنهادی بمنظور استخراج ناکلئیک اسیدها از گروه‌های مختلف خاکی هست، چرا که خاکهای رسی و مواد ارگانیکی تأثیر مهم کارآیی‌شان را نشان داده‌اند(Reith and Rogers, 2007).

٤ ٤ ٢ فزونسازی ژن های معرف هدفRNA یا DNA استخراجی

تمرکز ژن‌های هدف[١٠٤] در نمونه‌های خاک بمنظور استفاده و نمودارگیری با ژل الکتروفورز[١٠٥] اغلب خیلی کم است؛ علی الخصوص که فزونسازی ابتدایی هم روی آنها صورت نگرفته باشد، بنابراین ژنهای هدف باید تقویت و افزایش یابند(Widada et al., 2002). در روش‌های DNA، ژن هدف با استفاده از روش PCR گسترش و تقویت می‌شود، در روش فزونسازی PCR، ژن DNA در طول هر ۶۰ ۲۰ سیکل دو برابر می‌شود(شکل ۴ ۶۱). بطوریکه در پایان یک سلسله PCR، چندین میلیون کپی از پهنک‌های ویژه‌ی DNA تولید شده است(Singleton and Sainsboury, 2006; Reith and Rogers, 2007).

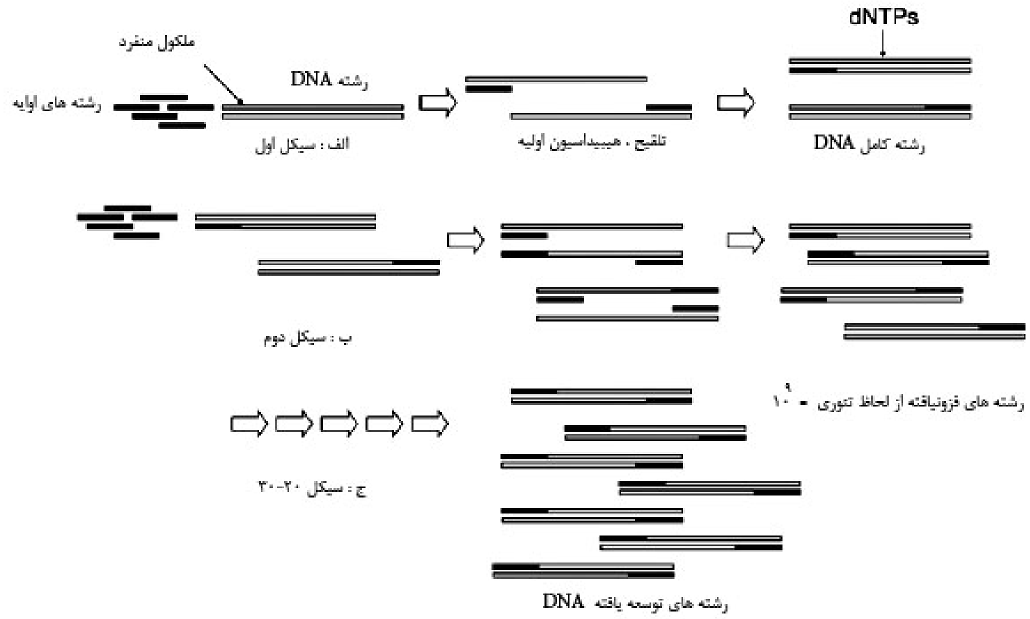
بمنظور تعیین موفقیت روش فزونسازی PCR روی نتیجه‌ی نهایی که توسط ژل الکتروفورز آگاروس[١٠٦] دست آمده اعمال نظر می شود (شکل۴ ۶۲)؛ بواسطه‌ی استفاده از ژل الکتروفورز آگاروس امکان جداسازی قطعات DNA بر پایه‌ی سایزهای ملکولی (یعنی تعداد پرایمرها) فراهم می‌شود شیوه‌های متفاوتی برای روشهای ملکولی RNA مورد استفاده است (Widada et al., 2002)؛ چرا که RNA ساختار ملکولی متفاوتی با DNA دارد، لذا اولین قدم برای اغلب تکنیکهای ملکولی بر اساسRNA تبدیل ملکول RNA به DNA مشابه بمنظور استفاده در واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز RNA سازی معکوس (RT-PCR) می‌باشد(Widada et al., 2002). بمنظور فزونسازی ویژه برای DNA یا RNA هدف مورد توجه، پرایمرهای مخصوصی برای ژنها در واکنش PCR مورد استفاده هستند(Widada et al., 2002).

پرایمرها رشته‌های مختصر و کوچکی از DNA هستند که به انتهای DNA استخراج شده از خاک، متصل شده و بعنوان ژنهای آغاز کننده، نقطه‌ی شروعی از فزونسازی PCR محسوب می‌گردند؛ این پرایمر بمنظور ارزیابی ژنهای عملکردی یا ریبوزومال نمونه‌های منحصر بفرد، گروه‌های فیلوژنتیک و همه‌ی زیرگروه‌های آنها توسعه و افزایش می‌یابند(Widada et al., 2002). بنابراین امکان ارزیابی فعالیت و حضور

1- Target genes
2- Electrophoresis gel
3- Agarose electrophoresis gel

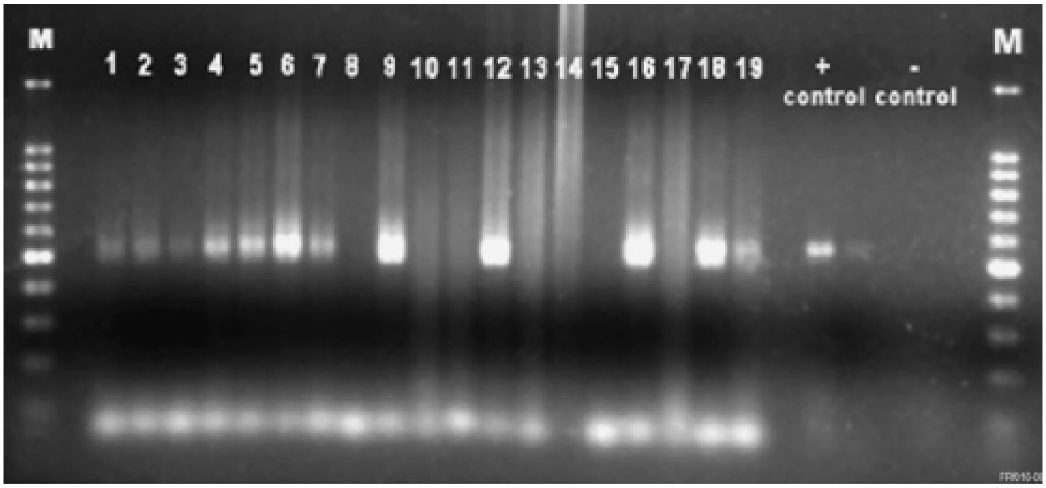
نمونه‌های منفرد و منحصر بفرد، گروه‌هایی چون باکتریها در نمونه‌های خاکی داده می‌شود (Reith and Rogers, 2007).

امروزه آنالیزهای کمّی دقیقی برای توسعه‌ی DNA هدف جوامع DNA و RNA (PCR زمان حقیقی) توسعه یافته است؛ با این تکنیکها می‌توان تعداد کپی‌های[۱۰۷] ژنهای مخصوصی که در خاک حضور دارند را تعیین کرد(Widada et al., 2002). این نتایج به تعیین مقدار نهایی ارگانیسم‌هایی که تولید چنین ژنهایی در خاک می‌کنند و نرخ فرآیندهای بیوژئوشیمیایی در خاک منجر می‌شوند. روش PCR زمان حقیقی، روش قدرتمندی بعنوان ارتباط دهنده ماشینی بین اجزای ژنتیکی جوامع میکروبی و فرآیندهای ژئوشیمیایی اداره شده توسط میکروبها در مواد خاکی که اتفاقاً در رابطه با ژئوشیمی اکتشافی است می‌باشد (Widada et al., 2002).



شکل ۴ ۶۱ : نمای شماتیک فزونسازی DNAهدف با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلی مراز(PCR) (Singleton and Sainsboury, 2006)

1- copies



شکل۴ ۶۲: ژل الکتروفورز آگارز ۵۱۰ جفت اولیه (510 P6) ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از جفتهای اولیه 534R ,Z7-G توسعه دهنده‌ی 16S rDNA ذرات طلای بدست آمده از معدن طلای هیت یامیس[108]، ستون M، شامل ۱۰۰ جفت پایه، تعداد قطعات (100,200,300,400,500,600,700,800,900M1000,1500)می‌باشد. مسیرهای ۱ تا ۱۹ هم محصول PCR، از فزونسازی DNA باکتریال مجاور ذرات طلا هستند. E.Goli DNA ، بعنوان بررسی مثبت (+) درطول فزونسازی و آب استریل MilliQ بعنوان بررسی منفی (-) مورد استفاده بوده است(Reith and Rogers, 2007)

۴ ٤ ۳ ارزیابی تنوع ژنتیکی[109]

بمنظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین گونه‌های کلیدی جوامع میکروبی در نمونه‌های زیست محیطی، کتابخانه‌های DNA از نمونه‌های ناشناخته خلق شده‌اند؛ در این کتابخانه رشته‌های DNA، با دیگر رشته‌های DNA خاکهای کانساری در پایگاه اطلاعات جهانی رشته‌ها مقایسه می‌شوند که این کار راهی سریع و دقیق، جهت شناسایی و تشخیص DNAهای مرتبط با زون میزالیزه است؛ درست از همین روش برای نمونه‌ی DNA انسان در پزشکی قانونی و دیگر امور، جهت شناسایی افراد و ... استفاده می‌شود (Widada et al., 2002).

٤ ٤ ٤ تستهای ملکولی

پس از تزریق آنتی‌بیوتیک و دیگر آزمایشات مذکور، اکنون دیگر زمان تستهای ملکولی رسیده بود، چرا که تک کلون‌های مطلوبی از باکتریها وجود داشت و بایستی کار استخراج نوکلئیک اسید مد نظر یعنی دئوکسی نوکلئیک اسید ضورت گیرد. در ادامه مراحل کار ملکولی صورت گرفته بیان می‌شود.

1- Hit or miss Gold
2- Assessing genetic diversity

٤ ٤ ٤ ٠ استخراج DNA، با استفاده از روش فیزیکی

پس از اینکه تک کلونها داخل پتری دیش مشخص شدند، تعدادی از آنها، با لوپ از روی پلت برداشته و داخل فالکون شناور شدند؛ برای هر تک کلون یک فالکون در نظر گرفته شد؛ فالکونها حاوی ۱۰ سی‌سی محیط کشت NB، استریل بودند. پس از اتمام این کار، فالکونها در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر قرار داده شدند.

پس از یک شبانه‌روز، فالکونهای داخل انکوباتور بررسی شدند؛ رشد باکتریها به واسطه‌ی ابر باکتریال موجود در ظرف مشهود بود. اکنون دیگر باکتریها برای استخراج DNA، آماده بودند. در ابتدا، برای استخراجDNA از سلول باکتریال، روش معمولی که در ادامه می‌آید، پی گرفته شد (DNA extraction , University of Toledo) ۱۵۰۰ میکرولیتر (1.5 mL) از محیط کشت شامل باکتری که در فالکونها موجود بود، برداشته و داخل تیوبهای 1.5 mL ریخته و نام هرکدام جداگانه مشخص شد، این کار زیر هود لامینار صورت گرفت، آنگاه محلولی با ترکیبات جدول ۴ ۶، تهیه و در ادامه به تیوبها اضافه شد.

جدول۴ ۶: ترکیب محلول مورد استفاده در استخراج DNA

10 mM Tris	pH=8
1mM EDTA	pH=8
5% tween 20	--------
1% Triton	X- 100

پس از محاسبه‌ی مقدار گرم مواد مصرفی با توجه به وزن مولی اقدام به ساخت محلول شد. با ترازوی دیجیتالی EDTA و Tris به مقدار لازم برداشته شدند. ابتدا Tris را داخل فلاسک درب آبی یک لیتری حاوی آب مقطر، حل نموده و PH محلول را با استفاده از HCl غلیظ به هشت رساندیم، چرا که PH محلول حدود ۱۵ بود. آنگاه EDTA به محلول اضافه گردیده و صبر شد تا خوب حل شود. لازم به ذکر است که تمام این مراحل در صورتی امکان‌پذیر است که فلاسک بر روی همزن بوده و محلول داخل آن بواسطه‌ی مگنت در حال چرخش باشددر ادامه Ph روی ۸ تنظیم شد که این کار با استفاده از NaOH، صورت گرفت.

EDTA تنها، در PH=8 حل می‌شود. موقع تقسیم محیط کشت داخل تیوبها، ۵۰۰ میکرولیتر از آن را با ٪۲۰ گلیسرول(٪۱۰۰) مخلوط نموده و در تیوبهای جداگانه جمع‌آوری شدند؛ در ادامه با استفاده از ازت مایع، نمونه‌ها فریز شده و در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتیگراد ذخیره شدند. این کار برای اطمینان از دست نرفتن باکتریها صورت گرفت، چرا که سلول باکتریال دست نخورده باقی بماند.

تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری حاوی محیط کشت به مدت ۵ دقیقه داخل سانتریفوژ، با دور ۵۰۰۰g قرار داده شدند، پس از اتمام کار دستگاه، تیوبها برداشته و محلول رویی[۱۱۰] داخل آنها دور ریخته و جامد ته نشین شده[۱۱۱] نگه داشته شد.

در ادامه 1cc، از محلول تهیه‌شده در فوق(جدول ۴ ۶)، به هر تیوپ اضافه شده و با ورتکس[۱۱۲] بصورت محلول درآمدند. آنگاه تیوبها در ازت مایع فریز شدند. پس از این تیوبها در رک مربوطه چیده شدند و به مدت سه دقیقه درآب جوش گذاشته شدند. در ادامه بلافاصله داخل سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰g به مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند.

اکنون دیگرDNA باکتری استخراج شده است و محلول رویی هر تیوب در واقع، همان DNA باکتری مد نظر است. در ادامه محلول مذکور با سمپلر کشیده شده و داخل تیوبهای جدید ذخیره شدند. بعداً در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰g به مدت ۱ دقیقه گذاشته شدند؛ پس از این، دوباره محلول رویی با سمپلر کشیده شده و به تیوب جدید منتقل شدند.

نمونه‌های DNA، در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد برای استفاده‌های بعدی ذخیره شدند.

٤ ٤ ٤ ۲ تست نمونه‌های DNA با نانودراپ

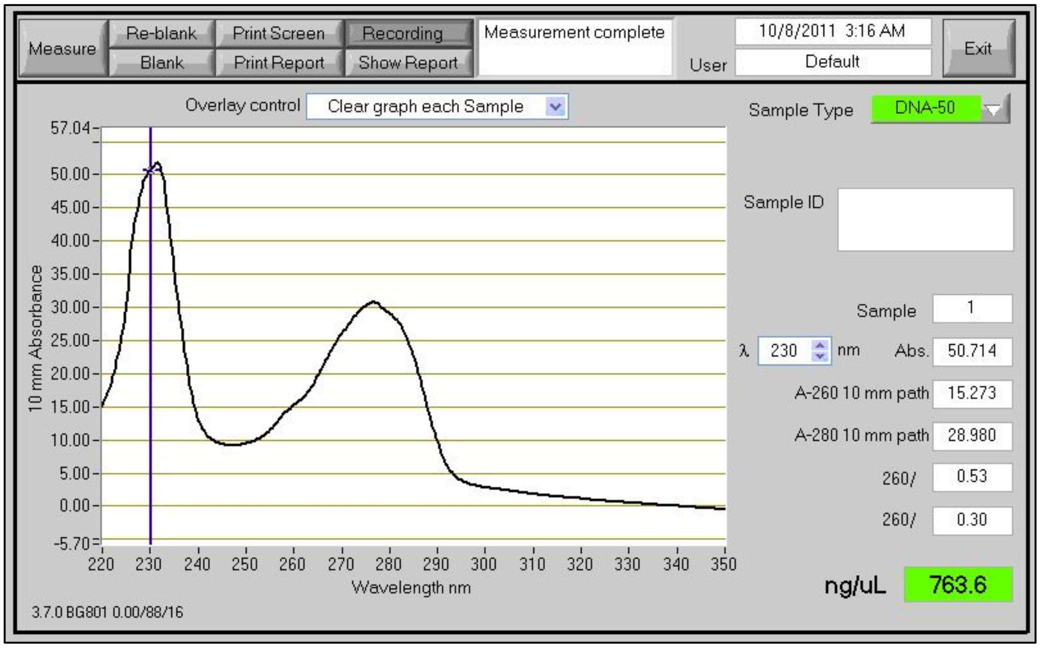
برای بررسی نمونه‌های DNA بدست آمده، چند نمونه برداشته شد تا با استفاده از دستگاه نانودراپ[۱۱۳] (شکل۴ ۶۳)، غلظت DNA استخراجی تعیین گردد. ۲ میکرولیتر از هر تیوب، به سنسور دستگاه آغشته نموده شد. در ادامه با استفاده از نرم افزار غلظت DNA اندازه‌گیری شد. در واقع دستگاه نانودراپ، میزان غلظت بر حسب نانوگرم و درجه‌ی خلوص DNA، را در یک مایکرولیتر نمونه محاسبه می کند(شکل ۴ ۶۴، ۴ ۶۵).

1- supernutant
2- plate
3- vortex
4- nano drop

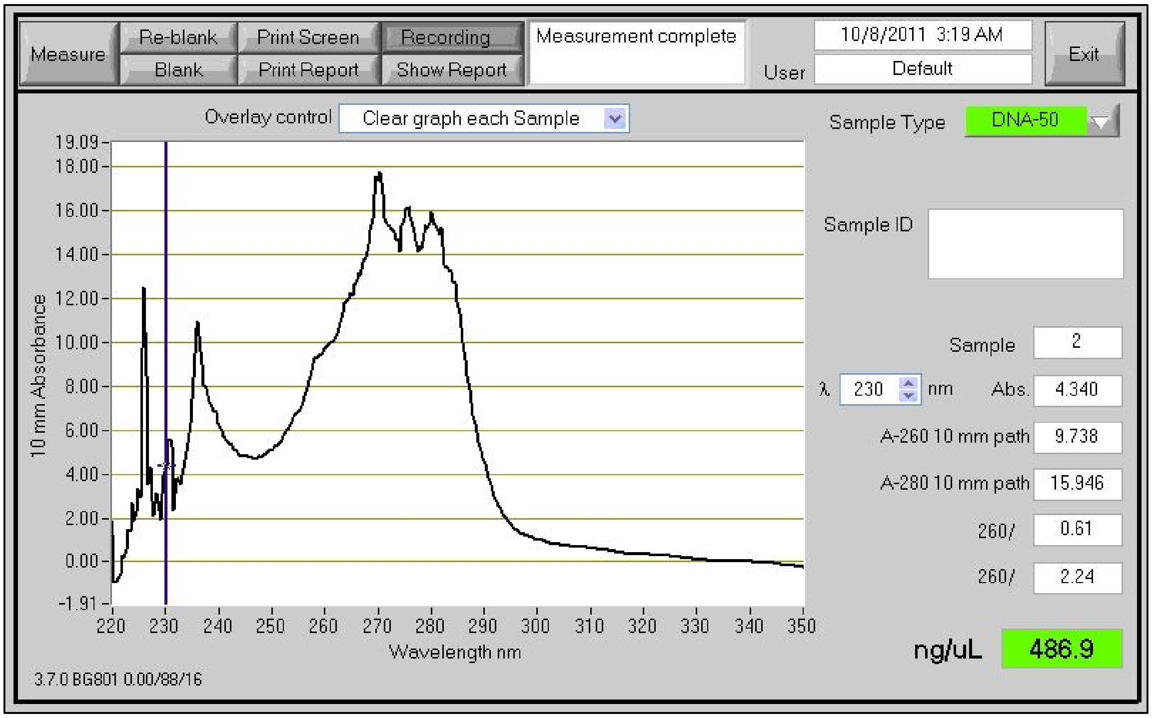
همانگونه که در شکلهای ۴ ۶۴، و ۴ ۶۵ مشاهده می‌شود، پیکهای خیلی خوبی در طول موج ۲۳۰ نانومتر مشاهده نمی‌شود و در طول موج ۲۶۰ که مربوط به جذب پروتئین هست نیز پیک مشهود است؛ که یکی از دلایلش می‌تواند ناخالص بودن DNA استخراجی باشد. امّا غلظتهای نمونه‌ها (۷۸۰ و ۴۶۰) جهت واکنشهای PCR، بسیار مناسب است.

میزان غلظت DNA، می‌تواند در طراحی سیکل PCR، واکنشهای آن و غیره مهم باشد. چرا که بعنوان مثال، میزان غلظت بالا تبعاتی را در باند خروجی خواهد داشت و باید رقیق گردد.

شکل ۴ ۶۳: دستگاه نانودراپ



شکل ۴ ۶۴: نتیجه‌ی تست نمونه‌ی DNA استخراجی با استفاده از نانو دراپ



شکل ۴ ۶۵: نتیجه‌ی تست نمونه‌ی DNA استخراجی با استفاده از نانو دراپ

۴ ۴ ۴ ۳ بهینه‌سازی PCR

بمنظور تکثیر قطعات DNA، نیاز است تا از دستگاه ترموسایکلر یا همان ماشین PCR، استفاده شود. برای اینکار، نمونه‌ها با اضافه شدن موادی به آنها در دستگاه قرار می‌گیرند و در نهایت دستگاه با تولید سیکلهای دمایی متفاوت و فرآیندهایی که صورت می‌دهد موجب تکثیر قطعه‌ی DNA می‌گردد. در ادامه نحوه‌ی آماده‌سازی نمونه‌ها و همچنین طرز کار با دستگاه تشریح می‌شود.

مسترمیکس[۱۱۴] مورد نیاز جهت واکنش PCR، برای ۱۵ نمونه تدارک دیده شد، چرا که تعداد نمونه‌ها ۱۴عدد بود و به خاطر خطاهای دستی و دستگاهی احتمالی مقدار نمونه‌ی بیشتری در نظر گرفته شد. ۱۴ تیوب PCR و یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری برداشته؛ آنها داخل رک چیده شدند و در ظرف یخ نگهداری شدند. تمامی مراحل تهیه و اضافه نمودن مسترمیکس به تیوبها، زیر هود و تحت شرایط استریل صورت گرفت. برای تهیه‌ی یک واکنش ۲۰ میکرولیتری PCR، مقدار مواد لازم به شرح ادامه اضافه گردید. آب(۱۱/۲)، بافر 10-x (۲)، $MgCl_2$- 1.5mM (۰/۸)، dNTP (۱)، پرایمر Forward-0.5mM (۱/۵)، پرایمر Reverse-0.5mM (۱/۵) و Taq(۰/۲) میکرولیتر به ۲ میکرولیتر DNA اضافه شد.

1- master mix

چون تدارک ۱۵ نمونه دیده شده بود، اقدام به تهیه‌ی مستر میکس شد. باین منظور هر کدام از مواد- قطعاً بجز نمونه- در ۱۵ ضرب شده و در تیوب ۱/۵ جمع‌آوری شد. تمام مواد مذکور در سطور فوق بجز آنزیم (Taq)اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها هرکدام دو میکرولیتر به تیوبهای PCR، اضافه شدند. بعداً تیوب مسترمیکس نزدیک یخچال برده و آنزیم به آن اضافه گردید. در ادامه به هر تیوب ۱۸ میکرولیتر از مسترمیکس اضافه شد. اکنون خوراک دستگاه ترموسایکلر آماده است. اسم هر نمونه نیز، روی تیوبها نوشته شد. نمونه‌ها در چاهکهای میانی ماشین PCR، چیده شدند و دستگاه ران شد. ۳۵ سیکل PCR، به ترتیب دمای واسرشته سازی اولیه[۱۱۵] ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی بعدی[۱۱۶] ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنلینگ[۱۱۷] ۵۴ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر[۱۱۸] ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، بکار گرفته شد(شکل ۴ ۶۶ و جدول ۴ ۷).

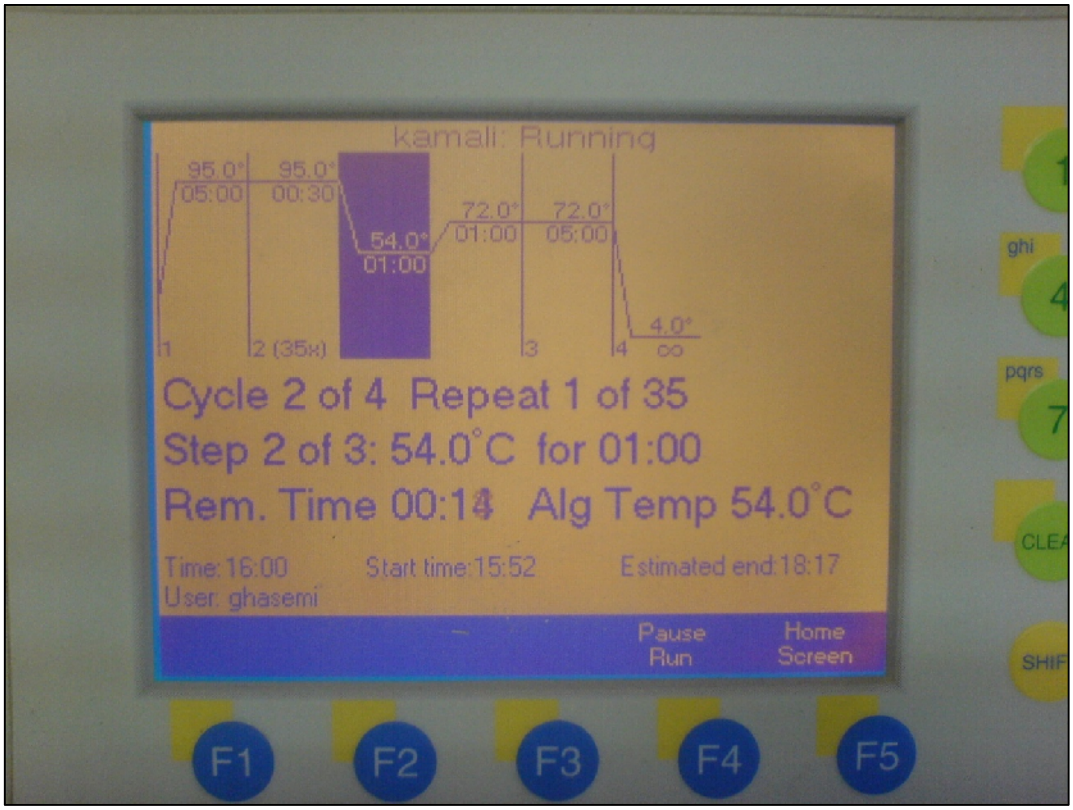
لازم به ذکر است که ابتدا با ۳ نمونه، سیکل PCR، بصورت گرادیان[۱۱۹] با دمای آنلینگ ۵۰ ۵۴ درجه‌ی سانتیگراد تعریف شد(شکل۴ ۶۷). در نهایت با روی ژل بردن محصول PCR، تنها نمونه‌های قرار گرفته در چاهکهای دمایی ۵۴ و ۵۲/۵ درجه‌ی سانتیگراد، باند مطلوب را نمایش داد(شکل۴ ۶۸). لذا برای تمام نمونه ها دمای آنلینگ ۵۴ درجه‌ی سانتیگراد در نظر گرفته شد.

پس از اتمام کار ترموسایکلر، نمونه‌ها را با استفاده از دای [۱۲۰] و لدر[۱۲۱] روی ژل آگارز ۲٪ آورده شدند و الکتروفورز ران شد، ولتاژ دستگاه روی 90V، تنظیم شد و برای ۴۵ دقیقه به حال خود رها شد. پس از اتمام کار دستگاه هنگامی که باند زیر UV، گذاشته شد، هیچ باندی روی ژل وجود نداشت.

جدول ۴ ۷: سیکل PCR

95^{0C} $5^{/}$ (95 30 $^{//}$, 54^{0C} $60^{//}$, 72^{0C} $60^{//}$)^{35} 72^{0C} $5^{/}$

2-initial denaturation
3- subsequent denaturation
4- annealing
1- extension
2- gradient
3- dye
4- ladder; Gene Ruler TM DNA Ladder Mix

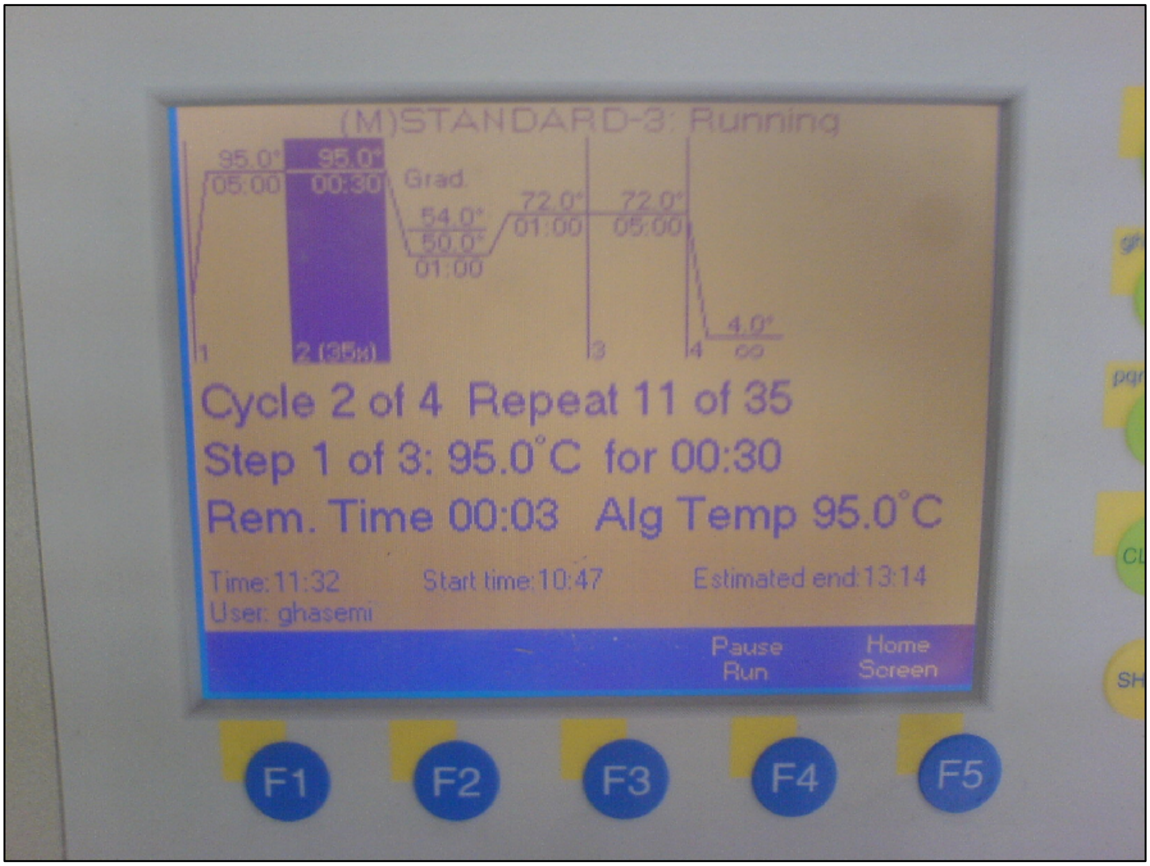


شکل ۴ ۶۶: تصویر سیکل PCR، با دمای آنلینگ ۵۴ درجه سانتی‌گراد

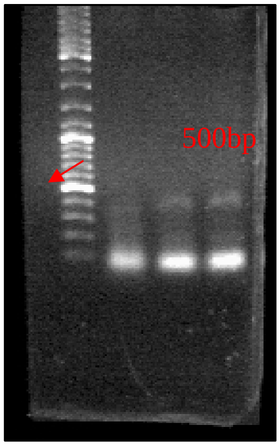
با استفاده از دستگاه ژل‌لاگ، تصویر ۴ ۶۹، حاصل گشت. برای بارگذاری[۱۲۲] نمونه‌ها داخل چاهکهای ژل آگارز، ۷میکرولیتر از نمونه با ۲ میکرولیتر دای، مخلوط شدند. برای گرفتن باند مطلوب، به ناچار دوباره اقدام به تهیه مسترمیکس و همچنین تعریف سیکل PCR، شد. تمامی موارد مانند حالت قبل در نظر گرفته شد، بجز دمای آنلینگ که ۵۲/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تعریف شد. متاسفانه باز هم باندی از ژل به دست نیامد(شکل۴ ۷۰). دفعه‌ی دیگر دمای آنلینگ ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، در نظر گرفته شد؛ باز هم باندی زیر UV، مشاهده نشد. در ادامه‌ی کار از $MgCl_2$ با غلظتهای (mM) ۳، ۲ و ۱/۵ برای واکنشهای ۲۰ میکرولیتری با سیکل متناظر با جدول ۴ ۷ و همچنین دمای آنلینگ ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، استفاده شد که در نهایت هیچ یک از موارد فوق منجر به باند بر روی ژل آگارز، نشد.

در ادامه‌ی کار باز تمامی مراحل مذکور در بند ۴ ۴ ۴ ۱، از پی گرفته شد؛ پس از استخراج دوباره‌ی DNA، برای دیگر بار اقدام به تعریف واکنشهای PCR و سیکل آن شد. این‌بار با توجه به تازه بودن نمونه‌ها از

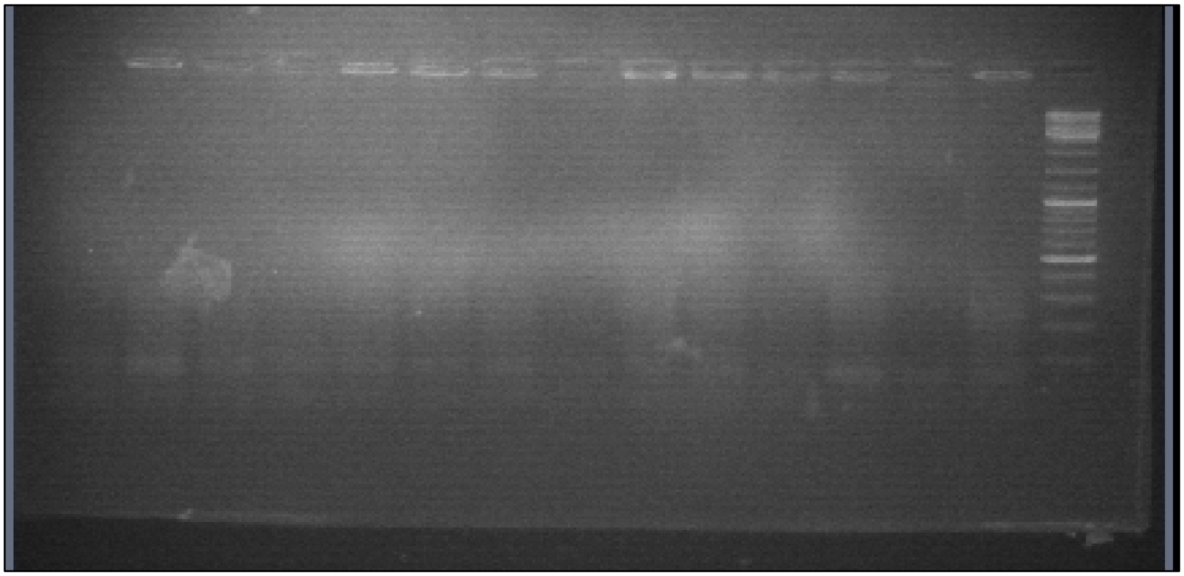
5- loading



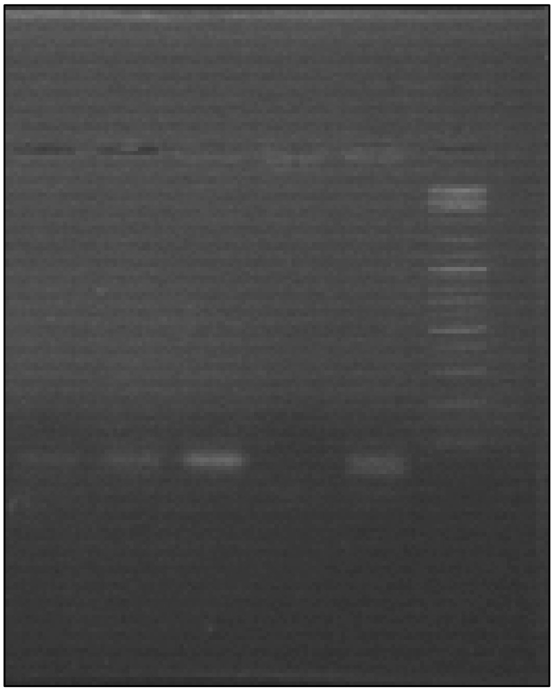
شکل ۴ ۶۷: تصویر سیکل PCR، با دمای آنلینگ ۵۴ ۵۰ درجه سانتی گراد گرادیان



شکل۴ ۶۸ : تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگوی اولیه با استفاده از سیکل PCR شکل ۴ ۶۷ که توسعه دهنده‌ی ژن 16S rDNA باکتریال خاک معادن- به ترتیب از چپ به راست- لدر، دره زرشک(DBM_1)، سونگون(SA_{a1}) و علی آباد(ABM_1) شامل ۵۰۰ جفت مبنا ، از چپ به راست دمای آنلینگ ۵۰، ۵۲/۵ و ۵۴ درجه سانتی گراد



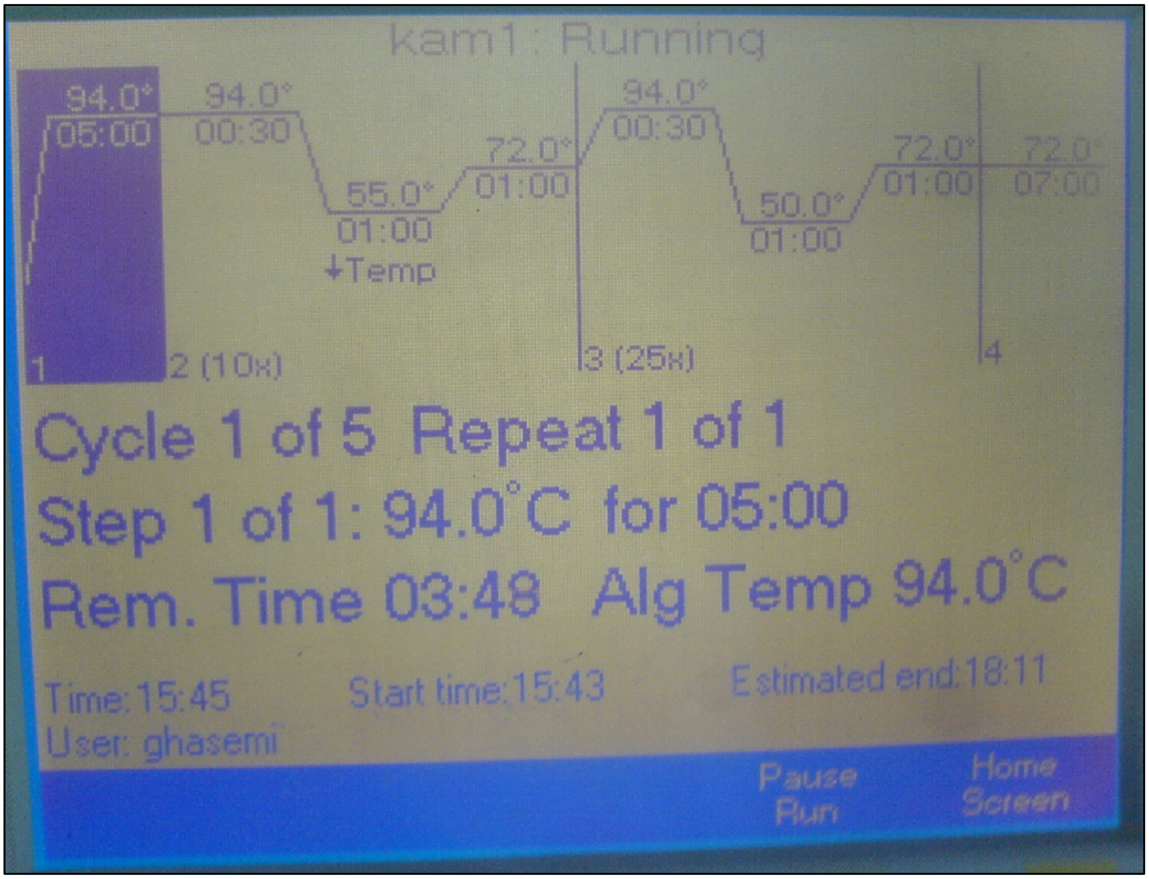
شکل۴ ۶۹: تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگو با استفاده از سیکل PCR شکل ۴ ۶۶ ، فاقد باند



شکل۴ ۷۰: تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگو با استفاده از سیکل PCR شامل دمای آنلینگ ۵۲/۵ درجه‌ی سانتی گراد، فاقد باند

سیکل toch down، استفاده شد؛ باین صورت که دمای آنلینگ ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در نظر گرفته شد که در طی ۱۰ سیکل به ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌رسد(شکل ۴ ۷۱)، مقدار مواد مصرفی نیز مانند حالات قبل برای $MgCl_2$ ۳میلی مولار تعریف شدند. پس از اتمام کار ماشین PCR و بارگذاری نمونه‌ها در چاهکهای ژل آگارز باز هم باندی مشاهده نشد.

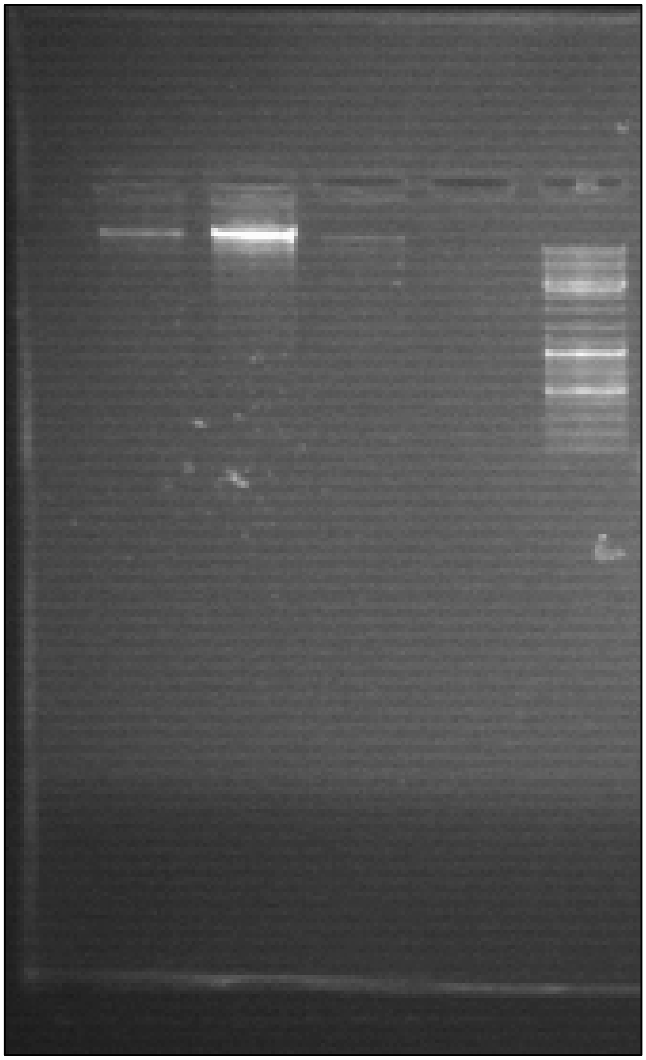
لذا دیگر اقدام به تعویض روش استخراج DNA، شد که در نهایت تصمیم به استفاده از کیتهای تجاری ویژه‌ی این کار شد.



شکل ۴ ۷۱: تصویر سیکل PCR، با طرح دمایی touch down

٤ ٤ ٤ ٤ استخراج DNA، با استفاده از کیت

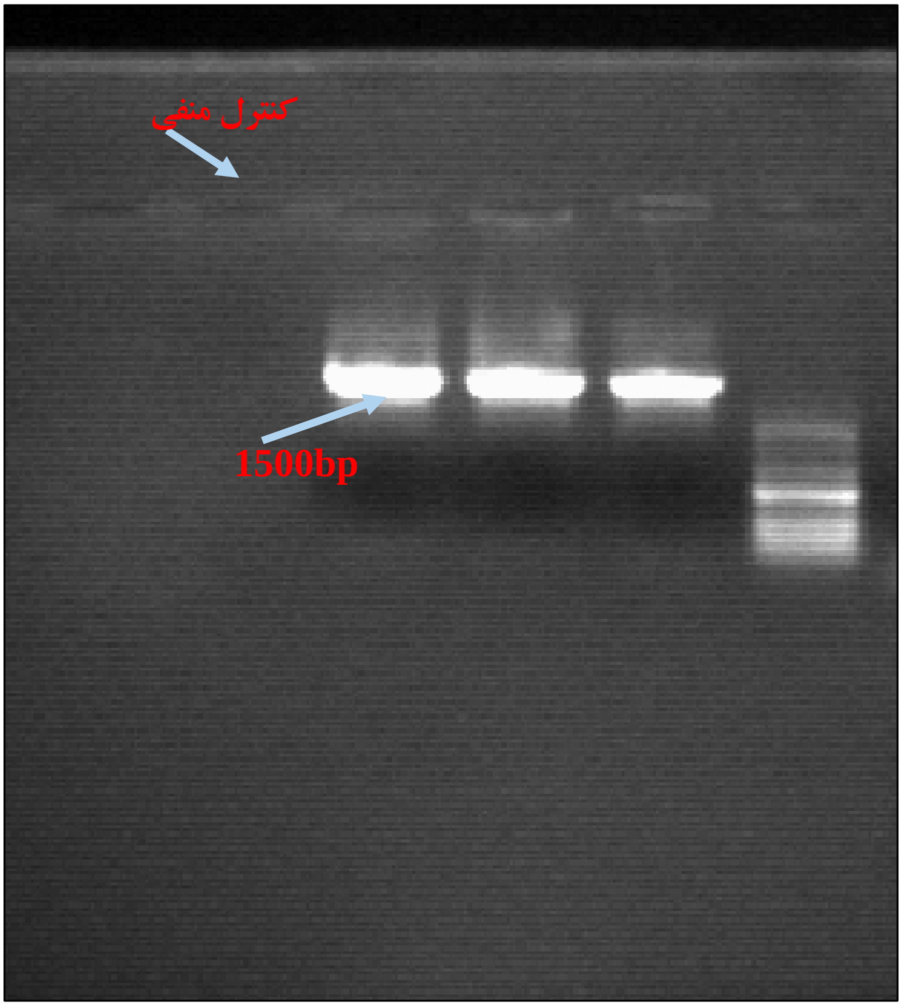
با تهیه‌ی کیت استخراج DNA از سلولهای باکتریال شرکت سینا ژن[123]، با استفاده از پروتکل مخصوص شرکت و همچنین مواد مصرفی موجود در کیت اقدام به استخراج DNA، شد. پس از این سه عدد از نمونه‌ها بدون واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز روی ژل آگارز برده شدند(شکل۴ ۷۲).



شکل۴ ۷۲: تصویر ژل الکتروفورز آگارز DNA الگو

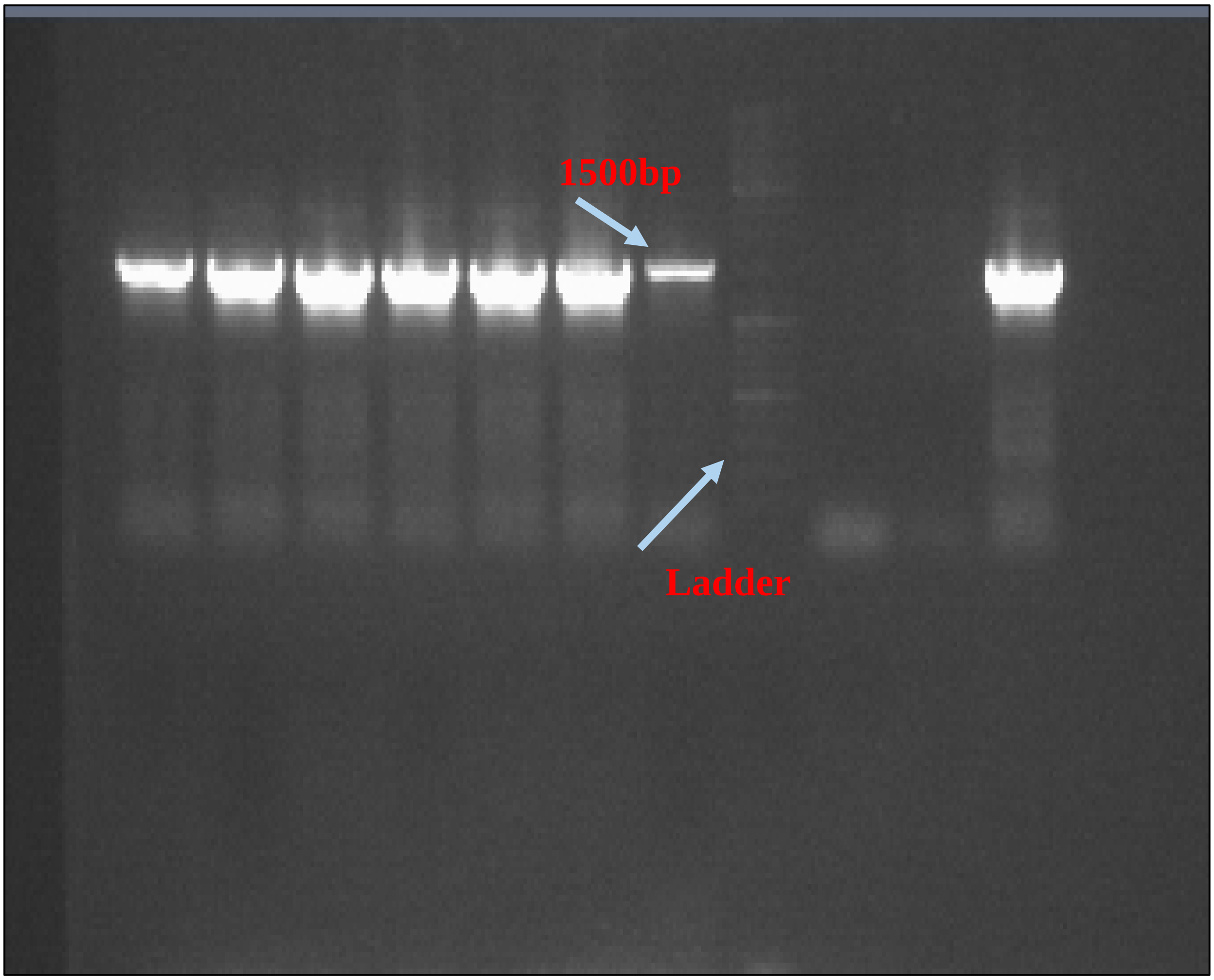
1- Cinna Pure DNA kit for the isolotion of DNA from gram positive bacteria

باندهای مشهود در شکل ۴ ۷۲، نشان دهنده‌ی روال منطقی و صحیح استخراج DNA، می‌باشد. در ادامه سیکل PCR، همانند جدول ۴ ۷ تعریف و از مسترمیکس شرکت سیناژن برای تهیه‌ی تیوبهای PCR، استفاده شد. دستگاه ترموسایکلر با سه نمونه‌ی ۲۰ میکرولیتری ران شد که پس از اتمام کار دستگاه و لود نمونه‌ها بر روی ژل باندهایی به شرح شکل مشاهده شدند(شکل۴ ۷۳)، با استفاده از لدر می‌شد تعداد جفتهای مبنا را ۱۵۰۰ جفت در نظر گرفت که با رجوع به ژن 16S rRNA باکتریهای مذکور در سطور فوق مشاهده گردید که باند مطلوب بالاخره حاصل شده است.



شکل۴ ۷۳: تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگوی اولیه با استفاده از سیکل PCR جدول ۴ ۷ که توسعه دهنده‌ی ژن 16S rDNA باکتریال خاک معادن- به ترتیب از چپ به راست- جارو(JAM_a)، سونگون(SK_{PTA1}) و علی آباد(AAM_{1P}) شامل ۱۵۰۰ جفت مبنا بوده، نمونه‌ی کنترل منفی آب دو بار تقطیر و لدر Gene Ruler ™ DNA Ladder Mix.

در ادامه با استفاده از شرایط فوق، همه‌ی نمونه‌ها در ماشین PCR، گذاشته شدند و باندهای دلخواه بر روی ژل نمایان شدند(شکل۴ ۷۴).



شکل۴ ۷۴: تصویر ژل الکتروفورز آگارز ؛ نتیجه‌ی PCR حاصل از DNA الگوی اولیه با استفاده از سیکل PCR جدول ۴ ۷ که توسعه دهنده‌ی ژن 16S rDNA باکتریال خاک معادن- به ترتیب از چپ به راست علی آباد (AAM_{1PT},)، دره زرشک (G)، سونگون(SK_{PTA})، دره زرشک (DBM_{PTA2}, G_{TA1})، جارو(JAM_{2PTA1})، علی آباد(ABM_{2PTA}, AAM_1)، سونگون(SA_{PT}) و علی آباد(ABM_{2P})شامل ۱۵۰۰ جفت مبنا بوده، نمونه‌ی کنترل منفی آب دو بار تقطیر و لدر Gene Ruler ™ DNA Ladder Mix.

٤-٤-٤-۲- بازیابی DNA، با استفاده از روش glassmilk

برای عمل توالی‌یابی[۱۲۴] لازم بود تا DNA استخراجی بازیابی[۱۲۵] شود، لذا از روش glassmilk باین منظور استفاده شد(Yang et al., 1979):

۱- ابتدا باند موردنظر زیر اشعه‌ی UV، با تیغ اسکالپل از روی ژل جدا شد.

۲- قطعات ژل درون تیوبهای ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شدند و با در نظر گرفتن وزن تیوب خالی، وزن قطعات ژل محاسبه و یادداشت شدند.

۳- به میزان ۲/۵ برابر وزن ژل، از محلول تازه تهیه شده‌ی یدید پتاسیم ۶ مولار به هر تیوب اضافه شد.

۴- قطعات ژل در حمام بن ماری و تحت دمای ۶۸ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۳-۲ دقیقه ذوب شدند.

۵- برای اطمینان از ذوب شدن کامل قطعه‌ی ژل، تیوبها ورتکس شدند.

۶- تیوبها به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ نگه داشته شدند.

۷- به هر تیوپ به میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول ذخیره glassmilk اضافه گردید. برای تهیه محلول مذکور، ۵۰ میلی‌گرم از پودر تجاری آن، در ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل ۴-۳ بار شستشو داده شدند؛ یعنی آب اضافه شد؛ بعداً ورتکس، در ادامه سانتریفوژ در دور ۱۴۰۰۰، به مدت ۱ دقیقه و در آخر محلول رویی دور ریخته شد. دوباره آب، ورتکس و سانتریفوژ ۴-۳ بار، که در نهایت برای بار آخر محلول آماده است.

۸- تیوبها ورتکس شده و به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفتند؛ این کار برای اتصال DNA به ماتریکس صورت می‌گیرد؛ این مرحله نباید بیش از ۵ دقیقه طول بکشد.

۹- تیوبها به مدت ۶۰ ثانیه در سانتریفوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند، پس از حذف فاز فوقانی عمل سانتریفوژ آنقدر تکرار شد تا محلول یدید پتاسیم کاملاً حذف شود.

۱۰- در این مرحله ۳ بار به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو اضافه و ورتکس شد و در همان شرایط بالا سانتریفوژ صورت گرفت .(۳ بار شستشو). برای تهیه‌ی ۱۰۰ سی‌سی از بافر شستشو، Tris ۲۰ ماکرومولار ۰/۲۸۴ گرم، EDTA ۱ ماکرومولار، ۰/۰۳۷ گرم و NaCl ۵۰ ماکرومولار، ۰/۲۹۲ گرم و اتانول ۵۰٪، ۵۰

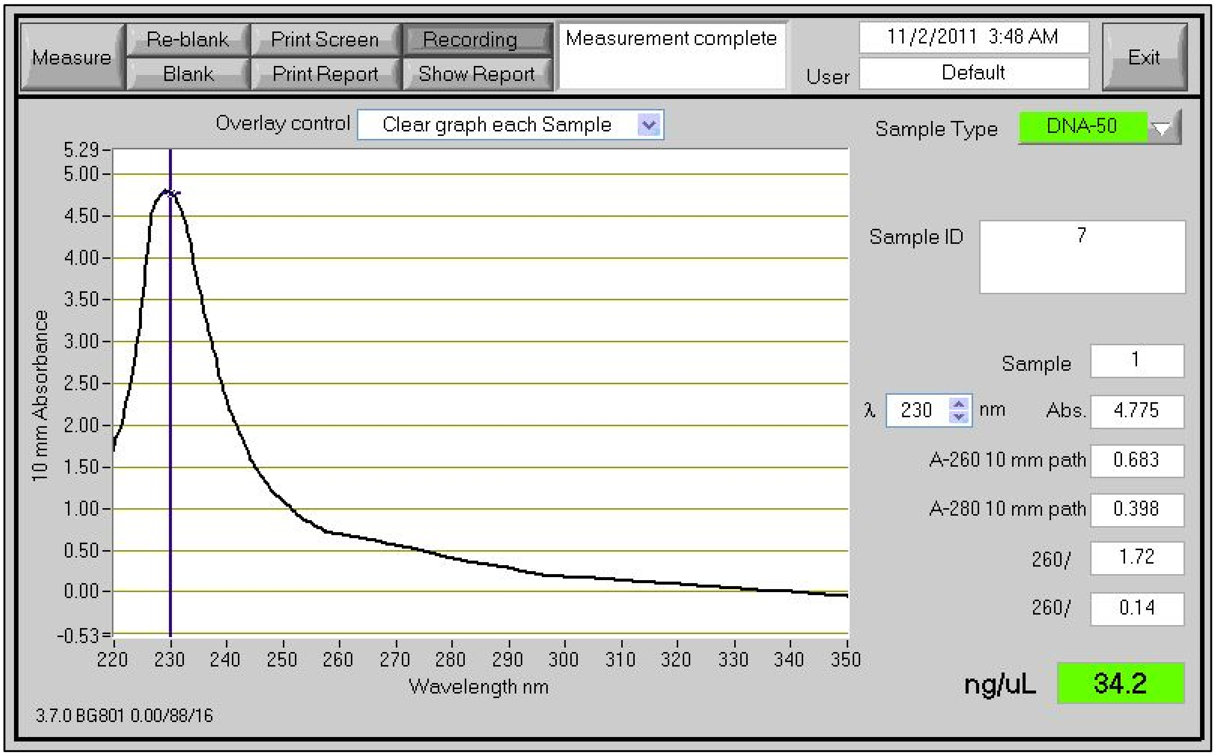
1- sequencing
2- recovery

سی‌سی اضافه گردید و به حجم ۱۰۰ سی‌سی با آب مقطر رسانده شد، در حالیکه pH، روی ۷/۴ با HCl غلیظ تنظیم شد.

۴۱- سپس به تعداد سه بار به میزان ۱۰میکرو لیتر آب دوبار تقطیر استریل به رسوب اضافه و ورتکس شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس سانتریفوژ شد. در این مرحله فاز فوقانی حاوی DNA جدا شده از ژل است که در یک تیوب جدید ذخیره شد.

۴۲- در نهایت با سانتریفوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و انتقال محلول رویی به تیوبهای جدید، DNA بازیابی شده بدست آمده و در دمای ۴۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شدند.

برای تعیین کیفیت و غلظت DNA بازیابی شده، چند نمونه با استفاده از نانودراپ تست شدند که همانگونه که در شکل ۴-۷۵ و ۴-۷۶ مشاهده می‌شود غلظت و درجه‌ی خلوص بالایی نشان دادند.



شکل ۴-۷۵: تست نمونه‌ی DNA بازیابی شده باکتریال معدن علی آباد(AAM_1)

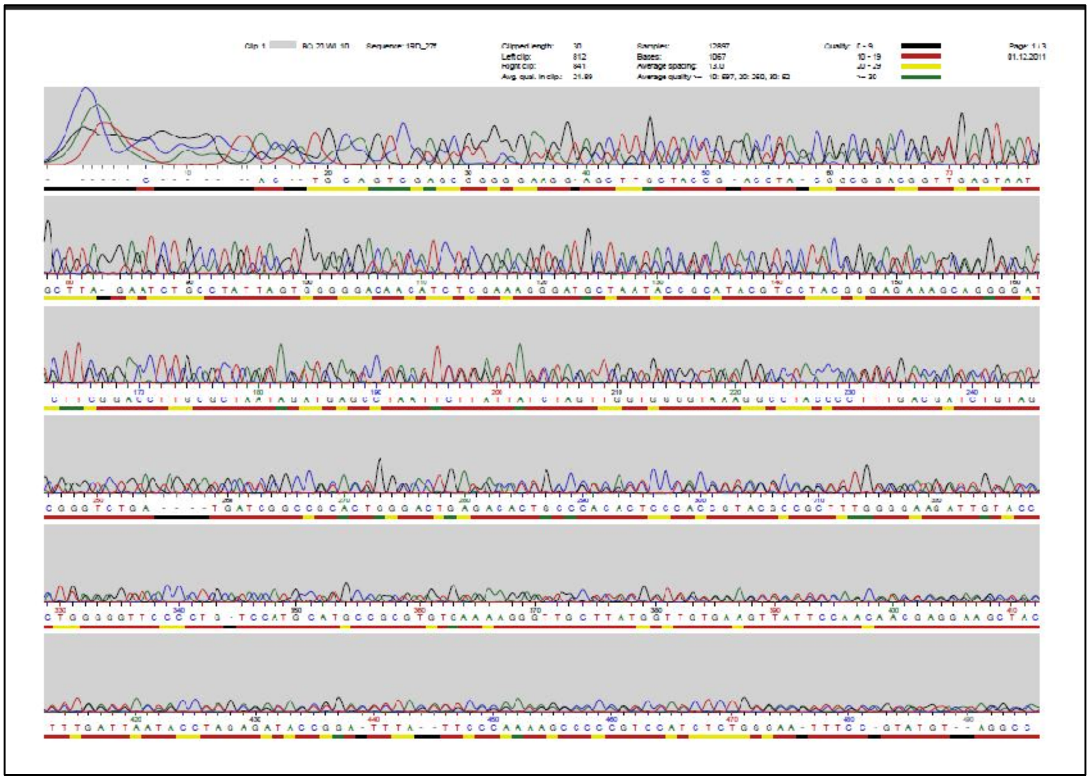
شکل ۴ ۷۶: تست نمونه‌ی DNA بازیابی شده باکتریال معدن علی آباد(ABM_{2PT})

٤ ٤ ٥ توالی‌یابی

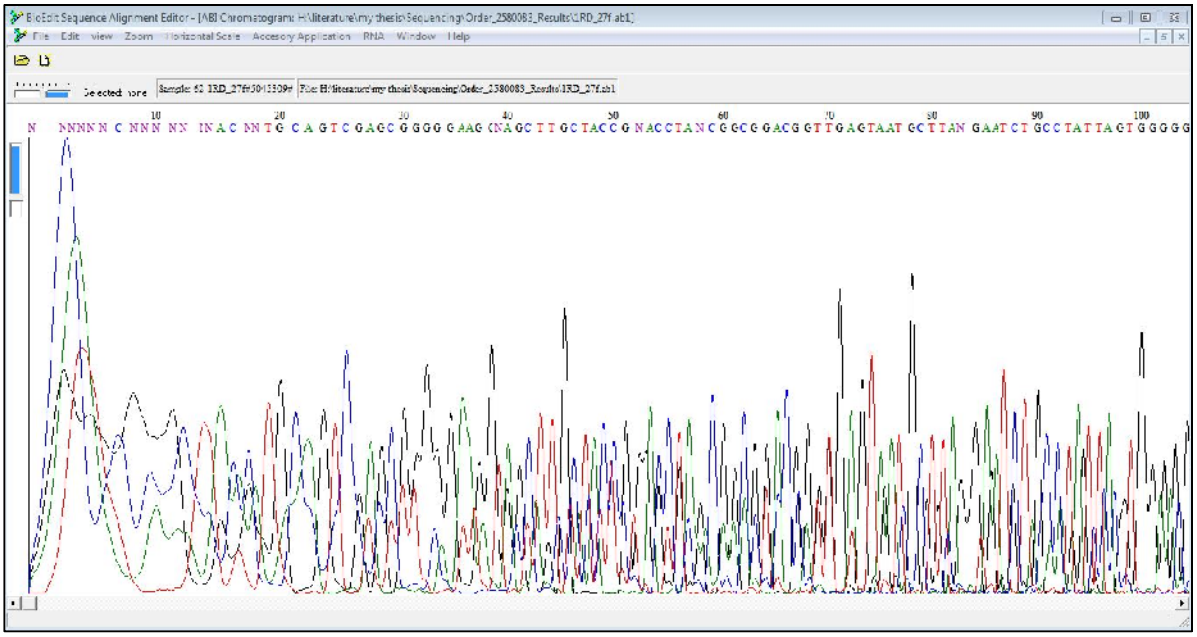
نمونه‌ها که در ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد ذخیره شده بودند؛ به همراه پرایمرهای Forward و Reverse، به شرکت آلمانی Eurofins MWG Operon بمنظور توالی‌یابی ارسال شدند. پس از حدود سه هفته نتیجه‌ی توالی یابی به شرح شکل تعیین شد(شکل ۴ ۷۷ و ۴ ۷۸).

پس از اتمام کار با نرم‌افزار Bioedit، توالی‌ها در سایت NCBI، بواسطه‌ی نرم‌افزار nblast، مورد ارزیابی قرار گرفتند که در نهایت مشخص شد که در نمونه‌های ارسالی تنها یک باکتری از خانواده‌ی استنوباکترها، بنام *Acinetobacter baumannii* موجود بوده است.

بدست آوردن نام این باکتری و شناسایی آن موفقیت بزرگی در این طرح محسوب می‌شود که در فصل پنجم بتفصیل تشریح می‌گردد.



شکل۴-۷۷: نتیجه‌ی ارسالی شرکت، توالی مشهود حاصل سنتز نمونه‌ی DNA باکتری خاک معدن علی‌آباد(AAM$_{1PT}$) با پرایمر 27F



شکل۴-۸۷: توالی سنتز نمونه‌ی DNA بازیابی شده‌ی باکتری خاک معدن علی‌آباد(AAM$_{1PT}$) با پرایمر 27F در نرم افزار Bioedit

فصل5 نتایج و پیشنهادات

۵-۱ تکنولوژی‌های آتی و در حال توسعه‌ی ژئومیکروبیولوژی اکتشافی

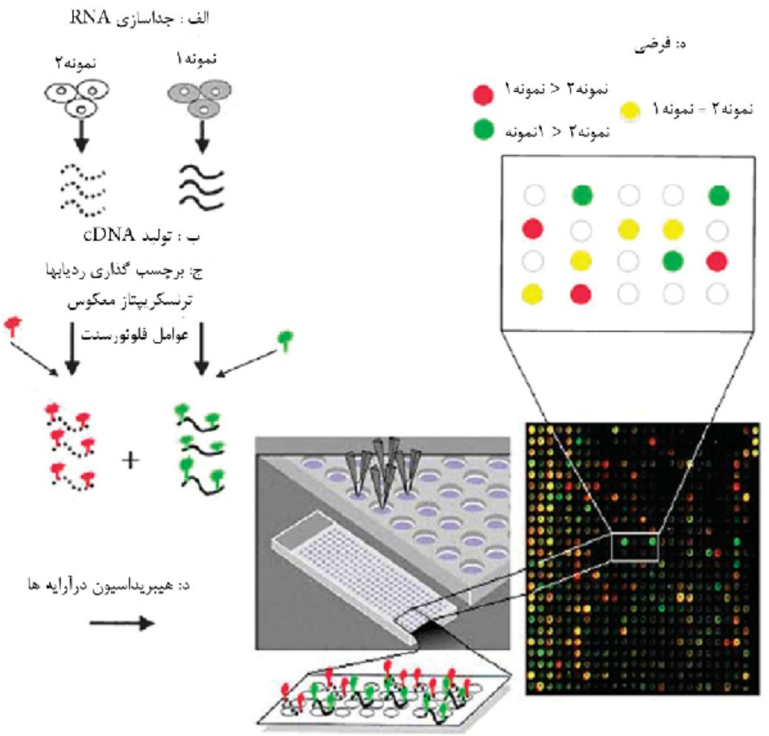
چندین تکنیک ملکولی معین وجود دارد که پتانسیل اساس تکنولوژی آینده‌ی بیوپی‌جویی شدن را دارد. این تکنیکها شامل ردیابهای ناکلئیک اسیدی، میکروآرایه‌های ملکولی، بیوسنسورها و سنجشهای ایمونو[۱۲۶] می‌باشد. تعیین ارگانیسم‌های بیومعرف یا ژنهای متعدد حاضر در نمونه‌های خاکی با تمرکز آنومال فلزات کمیاب احتمالاً در آینده، منجر به توسعه‌ی ردیابهای مخصوص ناکلئیک اسیدها برای بیومعرفهایی که می‌تواند مستقیماً در بیوپی‌جویی مورد استفاده باشند، بیانجامد(Reith and Rogers, 2007). ردیابهای ناکلئیک اسیدی بمنظور نشان دادن رشته‌ی ریبوزومال یا عملکردی RNA یا DNA گونه‌ها یا گروه‌های مخصوص ارگانیسم‌ها کامل می باشند، این ردیابها همچنین برچسبهای ایزوتپیک[۱۲۷] و فلوئورسنتی[۱۲۸] مجاز، برای آشکارسازی آنها در تمرکز کم ارگانیسم‌ها در نمونه‌های زیست محیطی هستند؛ ردیاب‌های ناکلئیک اسیدی همچنین می‌توانند، با اتصال توده‌های جوامع RNA یا DNA ، محدود در فیلتر امکان تعیین فعالیت و مقدار ارگانیسم‌های بیومعرف ویژه‌ای را فراهم کنند(Widada et al., 2002)

بیش از چند صد هزار ردیاب ناکلئیک اسیدی می‌تواند در میکروآرایه‌های ملکولی[۱۲۹] جمع شده و مورد مطالعه قرارگیرد(Gentry et al., 2008) ؛ میکروآرایه‌های ملکولی به محقق توان مطالعه‌ی جوامع و کمپلکسهای میکروبی را می‌دهد(شکل۵-۱). این روش شامل ابزارهای جدید میکروبیولوژی ملکولی می‌باشد؛ میکروآرایه ابزار قدرتمندی برای آشکارسازی ژنهای متعدد نمونه های خاک هستند، آنها حجم زیادی از اطلاعات را در رابطه با اساس ساختارهای فیلوژنتیک و کارکردی اکوسیستمهای میکروبی در اختیار محقق قرار می‌دهند (Gentry et al., 2008).

میکروآرایه‌های حالت به منظور ارزیابی حالت فیزیکی ژنهای کشت میکروبی یا نمونه‌های زیست محیطی استفاده می‌شوند؛ این نوع از میکروآرایه‌ها اطلاعات مرتبط با فعالیت میکروبها را فراهم می‌آورند؛ در حقیقت امکان شنود داخلی [۱۳۰] در پیامهای فراهم آمده‌ی میکروبی داده می‌شود(Gentry et al., 2008). بنابراین ژنهای کلیدی همجوار با مشخصه‌های زیست محیطی می‌تواند تعیین گردد؛ بعنوان نمونه، با کارکرد میکروآرایه‌ها ژنهایی که در هنگام قرارگرفتن نمونه در غلظت‌های زیاد فلزات سنگین با اهمیت هستند، مشخص می‌شوند(Reith and Rogers, 2007). به عبارتی تعیین ژنهایی که تغییر شکل و جابجایی فلزات سنگین را تسهیل کرده و سپس منجر به توسعه‌ی میکروآرایه‌ها با ردیابهای مخصوص برای این ژنها می‌شود، صورت می‌گیرد(Gentry et al., 2008). این امکانات بعنوان ابزار اکتشافی پس از استخراج RNA از نمونه

1- Immuno-assays
2- Isotopically
3- Fluorescently
4- Molecular micro arrays
5- Listening-in

های خاک مورد استفاده می‌باشد، در حقیقت سنسورهای باکتریالی که مخصوص فلزات سنگین ساخته شده اند، ابزارهای بیوپی‌جویی امیدبخش دیگری را فراهم می کند که توان اندازه‌گیری فلزات سنگین متحرک در خاک را تا سطح ppb خواهد داشت(Reith and Rogers, 2007).



شکل۵ ۱: میکروآرایه‌های DNA در آنالیزهای بیان حالت ژنی متفاوت را نشان می‌دهد، آزمایشات هیبریداسیون mRNA از دو نمونه‌ی متفاوت(یعنی باکتریهای رشد یافته در محیط‌های اصلاح شده با چند غلظت متفاوت فلزات سنگین) می‌باشد. mRNA هر نمونه تحت ترنسکریپتاز معکوس قرارگرفته و با عامل فلوئورسنت معینی، برچسب گذاری شده است. دو محل نگهداری RNA برچسب گذاری شده و با هم مخلوط شده و میکروآرایه‌های DNA هیبریدیز شده و شامل دسته‌ی زیادی از هزاران رشته‌ی DNA براساس ژنوم، یا رشته‌ی cDNA می‌باشد. میکروآرایه‌ها اسکن شده و از آنها تصویربرداری مخصوصی می‌شود؛ بدین وسیله رنگ هر منطقه تعیین می‌شود. در این مثال حالت فیزیکی اغلب ژنهای نمونه‌ی۱، قرمز و نمونه‌ی۲، سبز رنگ شده است و حالت ژنهای یکسان نمونه‌ها با رنگ زرد مشخص است(Albelda and Sheppard, 2000)

این سنسورها، به منظور تعیین تعدادی از عناصر فلزی و شبه فلزی همچون Co,Hg,Pb,Zn,Co,Na,Cu,As توسعه یافته و می‌توانند بعنوان ابزارهای اکتشافی در بیوپی‌جویی آزمایش شوند(Reith and Rogers, 2007). بیوسنسورها بسیار بهتر از روش های شیمی تر[۱۳۱] قادرند تا غلظت‌های

1- Wet chemical methods

مقدار زمینه‌ی محلی[۱۳۲] را تعیین کنند و سنجش‌های ایمونو یا براساس آنتی بادی[۱۳۳](پادتن) پروسه‌ای برای آشکارسازی یون‌های فلزی در نمونه‌های طبیعی پیشنهاد می‌کند. سنجنده‌های ایمانو با استفاده از پیوندهای سفت شده بین آنتی ژن[۱۳٤](پادگون) و آنتی بادی هومولوژس آن، به منظور تعیین آنتی‌ژنها یا آنتی بادی‌های مخصوص یک نمونه‌ی منحصر بفرد کار می‌کنند(Reith and Rogers, 2007). تعدادی از آنتی بادی‌ها، بمنظور مقابله با کمپلکس‌های فلزات سنگین توسعه یافته‌اند. روشهای تست عناصری چون U, Pb, Co, Cd, Hg بصورت موفقیت آمیزی در مطالعات اکوتاکسیولوژیکال[۱۳۵] بکار گرفته شده است و شاید قابلیت استفاده جهت مقاصد اکتشافی در آینده را نیز داشته باشد(Reith and Rogers, 2007) .

پتانسیل استفاده‌ی انسان از باکتریها راجع به فلزات سنگین، محدودیت کمتری بدلیل تنوع و همه جا حاضربودن باکتریها خواهد داشت؛ این کوچکترین موجودات زنده عالم در قرن۲۱ تصورات و مجاهدات آدمیان را دوچندان متوجه خودکرده است. این فرآیندها، کمی معجزه‌آسا به نظر می‌رسند، چرا که میکروارگانیسم‌ها نامرئی بوده و جز با الکتروسکوپ‌های قوی، نمی‌توان به حضورشان پی برد، استخدام و به کارگیری باکتریها بمنظور اکتشاف میکروبیولوژیک و لیچینگ کانه‌های فلزی، تنها مالرویی از شاهراه کاربرد باکتریها در عالم صنعت می باشد(Parduhn, 1995).

روشهای اکتشاف ژئومیکروبیوژیکال در اکتشاف کانسارها، بمنظور صنعتی کردن و عملیاتی شدن کمی سخت شده بودند، دلیلش هم می‌تواند هر دوی طبیعت محیط آزمایشگاهی و پا را فراتر گذاشتن از تکنیکهای معمول (فراتکنولوژی بودن) باشد. امّا امروزه استفاده‌ی بیشتر از این روشهای اکتشافی در دوره‌ی زمانی بیشتر این قابلیت را فراهم آورده است که برخی روشهای ژئومیکروبیولوژی اکتشافی، اقتصادی و مورد استفاده باشد. پرداهن ژئومیکروبیولوژی اکتشافی را با چالش‌های زیادی روبرو می‌بیند و امید دارد که در قرن بعدی بسیاری از این کاستی‌ها رفع شود که امروزه نیز همین اتفاق افتاده است. انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۱۷ تجهیزات تستهای اکتشاف ژئومیکروبیولوژیکال بیشتر توسعه پیدا کرده و قابلیت آنالیز چند صد نمونه در روز را فراهم کند. امّا علی‌رغم تعداد موارد کار اکتشافی ژئومیکروبیولوژیکال، ژئومیکروبیولوژی اکتشافی، به راحتی نمی تواند، جایگزین روشهای ژئوشیمیایی سنتی شود و بدیهی است که کارهای زیادتر و تلاش‌های بیشتری در این زمینه لازم است(Reith and Rogers, 2007) .

2- in-situ
3- Antibody
4- Antigen
5- Ecotoxicological

۵-۴ نتایج

۵-۴-۱ نتایج کلی

۱- ژئومیکروبیولوژی اکتشافی با فرآیندهای اداره شده توسط میکروبها سروکار دارد که پراکندگی و تمرکز ثانویه عناصر اصلی و کمیاب مهم اقتصادی را کنترل می‌کند.

۲- تعدادی از ابزارهای ملکولی، صرف مطالعه‌ی کمپلکس‌های میکروبی ساخته شده است و زمینه‌ی مطالعه‌ی مواد خاکی و عامل تغییر شکل بیوژئوشیمیایی کانی‌ها توسط میکروبیوتاها- مانند انحلال یا رسوب عناصر کمیاب- را فراهم می‌کنند.

۳- ژئومیکروبیولوژی اکتشافی بواسطه‌ی تعیین فرآیندهای بیوژئوشیمیایی که منجر به پراکندگی و اندوختن عناصرکمیاب در خاک می‌گردد و تعیین کمّی سینتیک واکنش این فرآیندها در مواد مختلف ابزارهای مدلسازی پیش گویی‌های بیوژئوشیمیایی را توسعه می‌بخشد. حال می‌توان اطلاعات و داده‌های ضبط شده را به مدلهای ژئوشیمیایی عددی تبدیل کرد و پراکندگی، حمل و نقل و تمرکز عناصر کمیاب را در زون مینرالیزه پیش گویی نمود(Reith and Rogers, 2007).

۴- تعیین و شناخت میکروبیاتا و فرآیندهای میکروبیالی که انحلال، حمل و نقل و رسوب‌گذاری فلزات کمیاب را در خاک کنترل می‌کنند؛ منجر به کشف میکروارگانیسم‌های معرف و توسعه بیوسنسورهای میکروبی، بمنظور آشکار نمودن کانی‌سازی پنهان می‌گردد.

۵- برای اینکه بیوسنسورهای میکروبی حقیقی و عملی شوند، باید هزینه‌های عملیاتی و سود روشهای موجود در این حیطه بررسی شده و با صرفه اقتصادی همراه باشد.

۶- شاخه‌هایی از ژئومیکروبیولوژی اکتشافی ارزان، مفید و دارای قابلیت‌های فراوان می‌باشند.

۷- تکنیکهای ملکولی خط مشئی را فراهم می‌کند که تجهیزات کار آزمایشهای بیوپی‌جویی را بمنظور آنالیز همزمان نمونه‌های بیشتر خاک توسعه می‌بخشد.

۸- استفاده از این روشها، در مقایسه با دیگر روشهای شیمی سنتی تکمیلی[۱۳۶] سودهای بیشتری برای اکتشاف کانسارها دارد.

۹- این روشها علاوه بر فراهم آوردن لایه ای ازاطلاعات سریع، ارزان، ساده، انعطاف‌پذیر و قابل انتقال و دارای دقت و صحت زیادی می‌باشد. لذا ژئومیکروبیولوژی اکتشافی یک ارزیابی سریع، بمنظور تعیین پتانسیل کانی‌سازی زمین را فراهم می‌آورد.

1- Supplement traditional chemical methods

۱۰- این رشته‌ی علمی خصوصاً روشهای ملکولی این تکنیک، ارزش دو چندانی در زمینهای سبز[۱۳۷]، داشته و می‌تواند محل حفاری‌های نهایی را ارزانتر و سریعتر تعیین کند(Parduhn, 1995).

۱۱- این رشته به عنوان مکمل روشهای ژئوشیمی اکتشافی، در بسیاری از موارد جواب داده و سطح جدیدی از اطلاعات را در رابطه با کانی‌سازی زیر سطحی در اختیار صنعت اکتشاف کانیها قرار و ابزارهای جدیدی را به جعبه ابزار مکتشف کانیها[۱۳۸] افزوده است(Reith and Rogers, 2007).

۵-۴-۴- نتایج حاصله از این طرح

۱- نمونه‌ی مصرفی در آزمایشات میکروبی کم (حدود ۰/۱ گرم) بوده و همچنین نمونه‌برداری ژئومیکروبیولوژیکال آسیبی به محیط زیست نمی‌زند؛ چرا که ۱۰۰ گرم خاک سطحی از زون ریزوسفر، بدون هیچ کنده‌کاری و حفاری آنچنانی برداشته می‌شود.

۲- در طول مرحله‌ی خالص‌سازی و جداسازی باکتری مقاوم به مس مشاهده شد که خاکهای غیر مرتبط به کانی‌سازی هیچ‌گونه باکتری‌ای را در خود جا نداده‌اند(شکل۴-۵۳)؛ در حالیکه در خاکهایی مرتبط با کانی‌سازی ابر باکتریال مشهود بود. این مهّم در اکتشاف معدن خیلی با اهمیت تلقی می‌شود؛ چرا که محیط کشت انتخابی به راحتی می‌تواند وجه تمایزی بین خاکهای مرتبط با کانی‌سازی و خاکهای دارای حد زمینه باشد.

۳- تزریق آنتی‌بیوتیک به محیط کشت، در رشد باکتریال خاک نمونه‌های شاهد وقفه ایجاد نموده و در رشد گونه‌های باکتریال نمونه‌های خاک معادن تاثیری نداشت.

۴- از موارد مذکور در بند ۲ و۳، می‌توان روش اکتشافی نو، مهم، ارزان و سریعی را استخراج نمود. باین شرح که با نمونه‌برداری صحیح از ناحیه‌ی محتمل کانی‌سازی مس و کشت نمونه‌ها در محیط کشت NB مس‌دار و کشت در محیط کشت NA آنتی‌بیوتیک- مس‌دار، ناحیه‌ی کانی‌سازی شده را از مناطق دارای حد زمینه ی مس و کمتر از آن مشخص نمود(شکل ۴-۶۲ و ۴-۶۳).[۱۳۹] با مراجعه به فصل ۳ و مشاهده‌ی اطلاعات معادنی که نمونه‌گیری از آنها صورت گرفته است پرواضح است که خاکهای گرفته شده از این

2- Green field
3- The mineral explorer tool box

۱- لازم بذکر است که پروسه‌ی ثبت اختراع این روش اکتشافی توسط نگارندگان، بواسطه‌ی شرکت ملی صنایع مس – سرچشمه، در حال پیگیری است.

نواحی، آنومالی معدنی می‌باشد در حالیکه ذخایر سونگون، علی‌آباد و دره‌زرشک در حال آماده‌سازی و استخراج می‌باشند.

۵ تست UV نمونه‌ها، در مراحل ابتدایی شناسایی باکتری می‌تواند در تعیین حضور و یا عدم حضور باکتریE. Coli ، بکار گرفته شود.

۶ با آنالیزهای ملکولی صورت گرفته، می‌توان ادعا نمود که در انجام PCR و فزونسازی ژن 16S rRNA باکتریهای مقاوم به مس، بهترین محصول PCR، با در نظر گرفتن پرایمرهای 1492R و 27F، سیکل مذکور در جدول ۴ ۷ و مسترمیکس استاندارد شرکت سیناژن قابل حصول است.

۷ ژئومیکروبیولوژی اکتشافی برای نخستین بار در کشور و حتی در دنیا در اکتشاف ذخایر مس بکار گرفته شد و اینک دیگر می توان مراحل اکتشاف ژئومیکروبیولوژیکال را بوضوح تصویر نمود؛ با توجه به اینکه همه‌ی سعی نگارندگان بر سیستماتیک نمودن روشهای اکتشاف ژئومیکروبیولوژیکال در اکتشاف ذخایر مس و حتی کلیه‌ی ذخایر بوده است، به نظر این مهم، تا حد بسیار زیادی برآورده شده است و اینک می‌توان مراحل کار اکتشاف ژئومیکربیولوژیکال را برای شناسایی باکتریهای مقاوم به فلزات، اطراف اغلب نواحی کانساری بکار گرفته شود.

۵ ۴ ۳ پیشنهادات

۱ *Acinetobacter baumannii*، باکتری‌ای بود که در نهایت آنالیزها و تستهای میکروبی تعیین شد. با بررسی ژن 16S rRNA این باکتری و تعریف پرایمر اختصاصی برای باکتری مذکور می‌توان حضور این باکتری را بسیار سریع در خاک با استفاده از ماشین PCR، مشخص نمود و باید بررسی‌های بیشتری صورت گیرد تا مشخص شود؛ آیا هر کجا که آنومالی مس باشد الزاماً این باکتری وجود دارد، که اگر اینگونه بود و در خاکهای شاهد وجود نداشت – تعداد واحدهای سلولی کمتری از آن وجود داشت بعنوان بیومعرف مس معرفی شود.

۲ با استفاده از RT-PCR[۱۴۰]، که در حقیقت زمان حقیقی است، تعداد ژنهای 16S rRNA، این باکتری اطراف نواحی کانساری و نواحی دارای مقدار زمینه‌ی مس، بررسی شده و به نوعی ارتباط کمی‌تر و دقیقتری بین کانی‌سازی مس و تعداد کپی‌های این ژن خاص باکتری *Acinetobacter baumannii* در خاک رسید.

1- real time

۳ با استفاده از ژن 16S rRNA، مقایسه‌ای بین تعداد پهنکهای *Acinetobacter baumannii*، و دیگر باکتریهای خاک صورت گرفته و به نوعی بین مقدار مس محیط و تعداد پهنکهای این باکتری فرمولی تعریف شود.

۴ با توجه به مقاوم بودن *Acinetobacter baumannii* نسبت به مس، امکان استفاده از این باکتری در مبحث بیولیچینگ با استفاده از محیط کشت 9K، بررسی شود.

۵ مقدار جذب بیولوژیکی یون مس توسط *Acinetobacter baumannii* تعیین شده و در بحث bioremediation، بمنظور حذف کاتیونهای سمّی مس در پسابهای صنعتی و معدنی امکان سنجی بکارگیری این باکتری بررسی شود.

منابع و مآخذ

الف : مراجع فارسی

ارس، زهرا؛ شفیعی، مهین؛ منصوری، مهدی؛ منافی، زهرا؛ حسینی‌پور، اکبر و محمد رنجبر؛ " شناسایي باکتری Acidithiobacillus ferrooxidans به روش PCR به منظور ارزیـابی کمّـی میکروارکانیســمها در بیولیچینگ کانی های سولفیدی، همایش صنایع معدنی، کرمان، ۱۳۸۹.

اطلس راههای ایران ۱:۱۰۰۰۰۰، چاپ گیتا شناسی.

خوئی، ناصر؛ قربانی منصور و پیمان تاجبخش، کانسارهای مـس در ایـران، سـازمان زمـین شناسـی و اکتشافات معدنی کشور، چاپ اول، ۱۳۷۸.

دانشفر، بهرام؛ اکتشاف نیمه تفضیلی مس جارو، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۱۳۷۱.

دورلند، ویلیام الگزاندر نیومن؛ فرهنگ پزشکی دورلند، ترجمه نام آور، حمید و ضرابی، محمـد جـواد، تهران، انتشارات سیاوش، چاپ پنجم، ۱۳۸۴.

رشیدی نژاد، فرشاد؛ ارزیابی اثرات زیست محیطی طرح مس سونگون، اندیشـه گـزارش فصـلی امـور تحقیق و توسعه مجتمع مس سرچشمه، شماره ۲۴، ۱۳۸۱.

زارعـی سـهامیه، رضـا؛ ویژگـی‌هـای کـانی‌شناسـی و ژئوشـیمیایی تـوده‌هـای نفـوذی کـافی‌آبـاد و آدربلندان،۱۳۷۰, به نقل از؛ یزدی، آذین؛ تخمین ذخیره کانسار مس دره‌زرشک یزد، پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد، دانشگاه یزد، ۱۳۸۷.

سازمان زمین شناسی کشور، بررسی های زمین شناسـی معـدنی و اکتشـافات نیمـه تفصـیلی ذخـائر معدنی جنوب شرقی اشتهارد(جارو), ۱۳۷۰.

سازمان زمین شناسی کشور، نقشه زمین شناسی خضرآباد مقیاس ۱:۱۰۰۰۰۰ .

سمیعی، عبدالله؛ آقازاده، والح و احمد خدادی؛ "ارزیابی اثرات زیست محیطی معـدن مـس سـونگون"، بیست و ششمین گرهمایی علوم زمین، ۱۳۸۶.

شرکت ایتوک ایران، مطالعه امکان پذیری نهایی کانسار مـس سـونگون، ۱۳۸۱ بـه نقـل از؛ سـمیعی، عبدالله؛ آقازاده، والح و احمد خدادی؛ "ارزیابی اثرات زیسـت محیطـی معـدن مـس سـونگون"، بیسـت و ششمین گرهمایی علوم زمین، ۱۳۸۶.

شرکت پارس اولنگ، بررسی داده‌ها, تخمین ذخیره زمین شناسی و بلوک بندی کانسار مس سونگون، ۱۳۸۴به نقل از؛ امیری، رضا؛ عطایی، محمد؛ کاکایی، رضا و رضا میکائیل "تخمین ذخیـره کانسـار مـس سونگون با استفاده از نرم افزار DATAMINE و روش شبکه عصبی مصنوعی، بیست و ششمین گرهمایی علوم زمین، ۱۳۸۶.

قمیان؛ یوسف، گزارش زمین‌شناسی و کانی‌زایی مس در مناطق علی‌آباد و دره‌زرشک، سازمان زمـین شناسی و اکتشافات معدنی کشور، ۱۳۷۸.

کمالی، مهدی و سید حسین مجتهـدزاده؛ "معرفـی روش ژئومیکروبیولـوژی اکتشـافی جهـت یـافتن کانسارهای فلزی و پیشنهاد استفاده از آن در ایران"، سومین کنفرانس مهندسی معدن ایران، یزد، بافق، ۱۳۸۸.

منجزی، مسعود؛ حیدری، مهرداد؛ رضاخواه، مجتبی و امیر ترابـی معصـومی؛ "طراحـی شـیب نهـایی بهینه معدن مس سونگون'، کنفرانس مهندسی معدن ایران، تهران، ۱۳۸۳.
مهرنیا، رضا؛ " نقش عوامـل میکروبیولـوژیکی در شناسـایی منـاطق امیـد بخـش معـدني " ، بیسـت و ششمین گردهمایی علوم زمین، ۱۳۸۶
یزدی، آذین؛ تخمین ذخیره کانسار مس دره‌زرشک یزد، پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد، دانشگاه یزد، ۱۳۸۷.

ب : مراجع انگلیسی

Albelda, S.M. and D. Sheppard (2000), Functional genomics and expression profiling: Be there or be square, American Journal of Research into Cellular Molecular Biology 23: 265–269., In: Reith, F. and S.L. Rogers , Exploration Gemicrobiology- the new frontier., In: Dunn, C.E., biogeochemistry in mineral exploration (First Edition), (Elsevier Press, Netherlands), pp. 393-415.

Andreazza, R., S. Pieniz, B.C. Okeke, F.A.O. Camargo and F. M. Bento (2010), Characterization of copper biosorption and bioreduction by copper resistant bacteria isolated from a vineyard soil, © 2010 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, 1 – 6 August, Australia.

Andreazza, R., S. Pieniz, B.C. Okeke and F.A.O. Camargo (2011), Evalution of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption, Brazilian Journal of Microbiology, 42: 66-74.

Andreazza, R., S. Pieniz, L. Wolf, M.K. Lee, F.A.O. Camargo and B.C. Okeke (2010), Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistantbacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil, Science of the Total Environment 408; 1501–1507.

Basim, H., G.V. Minsavage, R.E. Stall, J.F. Wang, S. Shanker and J.B. Jones (2005), Characterization of a Unique Chromosomal Copper Resistance Gene Cluster from Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria, Applied and Enviromental Microbiology, p. 8284–8291

Bender, C.L. and D.A. Cooksey (1987), Molecular Cloning of Copper Resistance Genes from Pseudomonas syringae pv. Tomato, Journal of bacteriology, Vol. 169, No. 2, p. 470-474.

Brooks, R.R., C.E. Dunn and G.E.M. Hall (1995), Biological systems in mineral exploration and processing (First Edition), (Ellis Hor Wood Press,Great Britain), pp158-175.

Brown, N.L (1995), Heavy metal resistances in bacteria, biological sciences, university of Birmingham, UK.

Cooksey, D.A (1987), Characterization of a Copper Resistance Plasmid Conserved in Copper-Resistant Strains of Pseudomonas syringae pv. Tomato, Applied and enviromental microbiology journal, p: 454-456.

Cooksey, D.A., H.R. Azad, J.S Cha and C.K. Lim (1990), Copper Resistance Gene Homologs in Pathogenic and Saprophytic Bacterial Species from Tomato, Applied and Enviromental Microbiology, p. 431-435.

Dong, H. (2010), Mineral-microbe interactions: a review, Frontiers of Earth Science in China 4, 127e147. doi:10.1007/s11707-010-0022-8.

Dressler. C., U. Kues, D.H. Nies and B. Feriedrich (1991), Determinants Encoding Resistance to Several Heavy Metals in Newly Isolated Copper-Resistant, Applied and Enviromental Microbiology, p. 3079-3085.

Drewniak, L., A. Styczek, M. Majder-Lopatka and A. Sklodowska (2008), Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution, Environmental Pollution., 156: 1069–1074.

Ehrlich, H.L. and K.L. Newman (2009), Geomicrobiology (Fifth Edition), (CRC Press, USA), 630 pp.

Gentry, T.J., Z. He and J.Zhou (2008), Detection and Characterization of Uncultivated Microorganisms Using Microarrays, Microbiol Monogr, doi:10.1007/7171.6.

Glazer, N.L. and H. Nikaido (2007), Microbial biotechnology fundamentals of applied microbiology (Second Edition), (Cambridge University Press, USA), 577 pp.

Hao, X., L. Kwunlun, W. Rucheng, S. Weidong and L. Yiliang(2010), The geomicrobiology of bauxite deposits, Geoscience Frontiers, doi:10.1016/j.gsf.2010.06.001.

Hongmei,W., Y. Fengqing, Z. Xiugao, Z. Jun and Y. Shuzhen (2003), Evaluation of the potential of microbial exploration for gold ores: Mineralization and non-mineralization Factor, science in China(Series a). Vol. 46 No. 5.

Hurt, R.A., X. Qui, L. Wu, Y. Roh, A.V. Palumbo, J.M. Tiedje and J. Zhou (2001), Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments, Applied Environmental Microbiology 67: 275–283.

Kauffmann, I.M., J. Schmitt and R.D. Schmid (2004), DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts, Appl Microbiol Biotechnol., 64: 665–670

Khan, A.G. (2005), Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology., In: Dunn, C.E., biogeochemistry in mineral exploration (First Edition), (Elsevier Press, Netherlands), pp. 393-415.

Kim, C.W., W. Lorenz, J. T. Hoopes and J. D. Dean (2001), Oxidation of Phenolate Siderophores by the Multicopper Oxidase Encoded by the Escherichia coli *yacK* Gene, Journal of bacteriology, Vol. 183, No. 16, p. 4866–4875

Konstantinidis, K.T., N. Isaacs, J. Fett, S. Simpson, D.T. Long and T.L. Marsh (2003), Microbial diversity and resistance to Cu in metal-contaminated lake sediments, Microbial Ecology 45: 191–202.

Lin, H., J. Shi, B. Wu, J. Yang, Y. Chen, Y. Zhao and T. Hu (2010), Speciation and biochemical transformations of sulfur and copper in rice rhizosphere and bulk soil—XANES evidence of sulfur and copper associations, J. Soils Sediments., 10:907–914.

Lin, Y.H., Y.F. Zhang, H.Y. Ma, L.N. Su, Z.J. Chen, Q.Y. Wang, M. Qian, X.F. Sheng (2010), Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants, Applied Soil Ecology, 44: 49–55.

Lim, C.K and D.A. Cooksey(1993), Characterization of Chromosomal Homologs of the Plasmid-Borne Copper Resistance Operon of Pseudomonas syringae, Journal of bacteriology, p. 4492-4498.

Marrufo, G.V., M.S.V. Garciduenas, B. Gomezluna and V.O. Portugal (2002), DNA Isolation From Forest Soil Suitable for PCR Assays of Fungal and Plant rRNA Genes., Plant Molecular Biology Reporter., 20**:** 379–390.

Mclean, J., and T.J. Beveridge (2001), Chromate Reduction by a Pseudomonad Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate, Applied and Enviromental microbiology, p. 1076–1084.

Melchior, A., J. Cardenas and L. Dejonghe (1994), Geomicrobiology applied to mineral exploration in Mexico, Journal of Geochemical Exploration 51: 193-212.

Michaels, G.B. and W.C. Riese (1986), Microbiological exploration for mineral deposits: a new technique, Applied Geochemistry. Printed in Gteat Britain, Vol. 1, pp. 103-109.

Ojo. A.O., E.V. Heerden and L. A. Piater (2008), Identification and initial characterization of a copper resistant South African mine isolate, African Journal of Microbiology Research Vol.(2) pp. 281-287.

Parduhn, N.L. (1991), A microbial method of mineral exploration: case study at the mesquite deposite, Bacillus cereus Exploration Technologies Inc. Journal of Geochemical, Exploration, 41: (i 991) 137-149.

Parduhn, N.L. (1995), Geomicrobiological prospecting for petroleum and mineral. westc/5250 Neilrd,reno,nevada 89502,USA., In: Brooks, R.R., C.E. Dunn and G.E.M. Hall, Biological systems in mineral exploration and processing (First Edition), (Ellis Hor Wood Press,Great Britain), pp.176-206.

Parduhn, N.L., J.R. Watterson and M.L. Silberman (1985), Distribution of Bacillus cereus spores in soil over four subsurface gold deposits: a progress report. Proc. of the Denver Region Exploration Geologists Society Symposium, April, 1985, Denver, CO, pp. I 15- i 18., In: Parduhn, N.L., A microbial method of mineral exploration: case study at the mesquite deposite, Bacillus cereus Exploration Technologies Inc. Journal of Geochemical, Exploration, 41: (i 991) 137-149.

Parungao, M.M., P.S. Tacata, C.R.G. Tanayan and L.C. Trinidad (2007), Biosorption of Copper, Cadmium and Lead by Copper-Resistant Bacteria Isolated from Mogpog River, Marinduque, Philippine Journal of Science, 136 (2): 155-165.

Peng, H., Y. Yang, X. Li, G. Qiu, X. Liu, J. Huang and Y. Hu(2006), Structure Analysis of 16S rDNA Sequences from Strains of Acidithiobacillus ferrooxidans, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 39, No. 2, pp. 178-182.

Rawlings, D.E. and T. Kusano (1994), Molecular Genetics of Thiobacillus ferrooxidans, Microbiological reviews, p. 39-55.

Reith, F. (2007), Exploration Geomicrobiology -what are the chances? meeting of the division, in Australia. available by : http://www.sa.gsa.org.au

Reith, F. and D.C. McPhail (2006), Effect of resident microbiota on the solubilization of gold in soils from the Tomakin Park Gold Mine, New South Wales, Australia, Geochimica Cosmochimica Acta 70: 1421–1438.

Reith, F. and D.C. McPhail (2007), Mobility and microbially mediated mobilization of gold and arsenic in soils from two gold mines in semi-arid and tropical Australia, Geochimica Cosmochimica Acta.

Reith, F. and S.L. Rogers (2008), Assessment of bacterial communities in auriferous and nonauriferous soils using genetic and functional fingerprinting., Geomicrobiol. J. 25, 203–215.

Reith, F. and S.L. Rogers (2007), Exploration Gemicrobiology- the new frontier., In: Dunn, C.E., biogeochemistry in mineral exploration (First Edition), (Elsevier Press, Netherlands), pp. 393-415.

Reith, F., D.C. McPhail and A.G. Christy (2005), Bacillus cereus, gold and associated elements in soil and regolith samples from Tomakin Park Gold Mine in south-eastern New South Wales, Journal of Geochemical Exploration 85: 81–89.

Reith, F., D. Webb, S.L. Rogers and D.C. McPhail (2006), Biomineralization of Gold: Biofilms on bacterioform gold, Science 313., pp.233-236.

Reith, F., M.F. Lengke, D. Falconer, D. Craw and G. Southam (2007), Winogradski review-the geomicrobiology of gold, ISME J. 1, 567–584.

Reith, F., S.A. Wakelin, A.L. Gregg and A.S. Mumm (2009), A microbial pathway for the formation of gold-anomalous calcrete, Chemical Geology., 258:315–326

Robe, P., R. Nalin, C. Capellano, T.M. Vogel and P. Simonet (2003), Extraction of DNA from soil, European Journal of Soil Biology., 39:183–190.

Santo, C.E., P.V. Morais and G. Grass (2010), Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces, Applied and Enviromental Microbiology, p. 1341–1348.

Schmidt Mumm, A. and F. Reith (2007), Calcrete genesis at the gold anomaly of the Barns prospect, Gawler Craton, South Australia., J. Geochem. Explor. 92, 13–33.

Shakoori, A.R. and B. Muneer (2002), Copper-resistant bacteria from industrial effluents and Their Role in remediation of heavy metals in wastewater, Folia Microbiol 47(1), 43-50.

Singleton, P. and D. Sainsboury (2006), Dictionary of microbiology and molecular biology (Third Edition), (John Wiley & Sons Ltd), 3rd edition 2001, (reprinted 2002), 3rd edition revised 2006.

Smalla, K., N. Cresswell, L.C. Mendonca-Hagler, A. Wolters and J.D.V. Eisas (1993), Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification., Journal of Applied Bacteriology, 74: 78-85.

Voloudakis, A.E., C.L. Bender and D.A. Cooksey (1993), Similarity between Copper Resistance Genes from Xanthomonas campestris and Pseudomonas syringae, Applied and Enviromental Microbiology, p. 1627-1634, American Society for Microbiology.

Watterson, J.R. (1985), A procedure for estimating Bacillus cereus spores in soil and stream-sediment samples; a potential exploration technique., In: Reith, F., D.C. McPhail and A.G. Christy, Bacillus cereus, gold and associated elements in soil and regolith samples from Tomakin Park Gold Mine in south-eastern New South Wales, Journal of Geochemical Exploration 85: 81–89

Watterson, J.R., L.A. Nagy and D.M. Updegraff (1986), Penicillin resistance in soil bacteria is an index of soil metal content near a porphyry copper deposit. Abs. Ann. Mtg. Ann. Soc. Microbial. Las Vegas., In: Brooks, R.R., C.E. Dunn and G.E.M. Hall, Biological systems in mineral exploration and processing (First Edition), (Ellis Hor Wood Press,Great Britain), pp189.

Widada, J., Y. Norjiri and T. Omori (2002), Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genesin bioremediation, Applied Microbiology Technology 60: 45–59.

Williams, J.R., A.G. Morgan, D.A. Roucg, N.L. Brown and T.O.L. Barry (1993), Copper-Resistant Enteric Bacteria from United Kingdom and Australian Piggeries, Applied and Enviromental Microbiology, p. 2531-2537.

Yang, R.C.A., J. Lis and B. Wu (1979), Elution of DNA from agarose gels after electrphoresis. Method Enzymol. 68; 176-182.

Yu. J., L. Fan, S. Yang, M. Tang, W. Yang, H. Li and G. Wei (2009), Characterization of Copper Resistant Agrobacterium Isolated from Legume Nodule in Mining Tailings, Bull Environ Contam Toxicol, 82:354–357.

Zevenhuizen, L.P.T.M., J. Dolfing, E.J. Eshuis and I.J.S. Koerselman (1979), Inhibitory Effects of Copper on Bacteria Related to the Free Ion Concentration, Microbial Ecology 5:139-146, Springer-Verlag New York Inc.

Ziaii, M. (1996) Lithogeochemical exploration methods for porphyry copper deposit in Sungun, NW Iran. Unpublished M.Sc. thesis, Moscow State University (MSU), Moscow 98 pp. (in Russian)., In Ziaii, M., A. A. Pouyan and M. Ziaii., Neuro-fuzzy modelling in mining geochemistry: Identification of geochemical anomalies, Journal of Geochemical Exploration 100: 25–36.

Ziaii, M., A. A. Pouyan and M. Ziaii (2009), Neuro-fuzzy modelling in mining geochemistry: Identification of geochemical anomalies, Journal of Geochemical Exploration 100: 25–36.

ج: سایتهای مورد استفاده

MAFFT Fast Multiple Alignment Tools for Large Batches of Sequences | EBI

iran - Google Maps

Align Sequences using ClustalW2 | EBI

http://www.Wikipedia.org

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

http://www. Google.com; search: DNA extraction form bacterial cell Laboratory for Microbial Ecology Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences University of Toledo.

Abstract:

Nowadays, Mineral deposits characterized by outcropping hard-rock mineralization are well explored and currently being depleted. Consequently, mineral exploration is increasingly focussing on areas where thick layers of overburden conceal potential. Success of explorational techniques in these areas is an understanding of processes that lead to element dispersion and concentration in the surface soils.

Deposit overburdens rich in elements which are mainly used as a micronutrient for microbes. Therefore, Microbes by using these elements can flourish and can be put special biological effects on the soil. These microbial processes, causing the formation of secondary enrichment zone and microbial haloes in deposit overburden. exploration geomicrobiology, with an identification of biogeochemical processes and Recognition of structures of microbial communities of deposit overburden and other geomicrobiological processes, Sets out the concepts such as concentration, distribution, migration and transportion of metallic elements such as, Zn, Au, Cu, Co, Mo, Fe, ... and by molecular tools and laboratory culture traditional techniques, trying to explain the geochemical and geological processes are associated with these elements. The exploration geomicrobiology consists of culture-independent techniques and Culture-dependent techniques.

In this project, samples took of the four copper mine such as, Sungun, Jaru, Aliabad and Darezershk geomicrobiologically. And microbial tests including laboratory techniques and molecular methods were performed On the samples. Simply put, in the current pattern, with the choice of copper-bearing selective medium and antibiotics injection into the medium, the differences between mineralized and non-mineralized areas were identified and consequently, With bioinformatics analysis, primer design and optimization of PCR, copper resistant bacteria and the copper reserves probable bioindicator identified and introduced.

Shahrood University of Technologh
Faculty of Mining Engineering, Petrolum and Geophycsis

Utilization of PCR molecular method as field of exploration geomicrobiology in metalic ore deposits-case study from copper reserve

Submitted by
Mehdi Kamali

Supervisors:
Dr. M. Ziaii
Dr. M. Mamarabadi

Advisors:
Dr. S. H. Mojtahedzade
Dr. H. Alizade

Industrial Advisor:
Z. Manafi

Master Thesis

February 2012