DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4
مقاله پژوهشی

# غربالگری و شناسایی مولکولی نوکاردیاهای با توانایی زیست پالایی هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه ای و فنل از اکوسیستمهای مختلف ایران

**شیوا حسینی[۱]، داود آزادی[۲]* و عبدالرحیم آب سالان[۲]**

[۱] ایران، مرو دشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرو دشت، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

[۲] ایران، خمین، دانشگاه علوم پزشکی خمین، دانشکده پرستاری و پیراپزشکی، گروه علوم پایه و آزمایشگاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

## چکیده

آلاینده‌های شیمیایی مختلف اثرات جبران‌ناپذیر بر سلامت انسان، حیوانات و اکوسیستم دارند. زیست پالایی یکی از روشهایی می‌باشد، که به طور گسترده برای از بین بردن آلودگی‌های محیطی و کاهش خطر این مواد خطرناک مورد استفاده قرار گرفته است. میکروارگانیسم های مختلف می توانند برای استفاده در فرآیندهای احیای زیستی، غربالگری و شناسایی شوند. اکتینومایست‌ها به ویژه نوکاردیاها،گروهی از باکتریها با پتانسیل بالا برای تولید متابولیت های ثانویه و فعال از نظر زیستی هستند که توانایی فعالیت زیست پالایی را دارند. این مطالعه با هدف غربالگری و شناسایی گونه های نوکاردیا با پتانسیل تخریب زیستی از اکوسیستم های متنوع ایران انجام شده است. ایزوله ها از ۹۰ نمونه محیطی ازجمله رسوبات دریا و رودخانه ها و دیگرمنابع آب، فاضلاب کارخانه ها و بیمارستان ها، خاک کشاورزی و بیابان ها، جنگل ها، چاه های نفت و معادن جدا شده و با استفاده از روش‌های میکروبیولوژیکی متداول و مولکولی از جمله تجزیه و تحلیل توالی 16SrRNA و *rpoB* جداسازی شناسایی شدند .از آنالیز میزان رشد در حضور آلاینده‌ها، کروماتوگرافی، و روش گیبس برای تعیین توانایی زیست پالایی ایزوله‌ها استفاده شد. در مجموع ۱۹ ایزوله نوکاردیا از نمونه ها (۲۱/۱٪) که متعلق به ۱۰ گونه مختلف بودند، بازیابی شدند. شایعترین گونه های نوکاردیا جدا شده شامل *ن. فارسسینیکا*، ۴ ایزوله (۲۱٪)؛ *ن. سیریاسی جرجیکا* و *ن. کاشی جینسیس*، هر کدام ۳ ایزوله (۱۵/۷٪)؛ *ن. آستروئیدس* و *ن. کراپنستدتی*، هر کدام ۲ ایزوله (۱۰/۵٪) بودند. نتایج مطالعه ما نشان داد که ایزوله های *ن. فارسینیکا*، ن. *آستروئیدس*، *ن. کوبلیا* و *ن. اوتیتیدیس کاویاروم* قابلیت تخریب موم پارافین، نفت خام و فنل، *ن. سیریاسی جرجیکا* توانایی تخریب PAHها و تیمول *ن. کارنه‌آ* توانایی تخریب لوئیسیت را دارند. نتایج ما نشان داد که اکوسیستمهای مختلف ایران واجد تنوع بالایی از گونه های نوکاردیا می باشند، که با توجه به پتانسیل زیستی بالای آنها میتوان از گونه های نوکاردیا در فعالیتهای در فرآیندهای مختلفی زیستی از جمله زیست پالایی آلاینده‌های شیمیایی در محیط و در آزمایشگاه استفاده کرد، اگرچه برای چنین کاربرد مهمی مورد توجه محققان قرار نگرفته اند.

واژه‌های کلیدی: 16SrRNA، نوکاردیا، فیلوژنی، زیست پالایی، HPLC، تعیین توالی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۶۲۲۱۵۳۱-۰۸۶ ، پست الکترونیکی: Davood.azadi@gmail.com

## مقدمه

آلاینده‌های شیمیایی مختلف در طول ساخت و مصرف انواع مواد و ترکیبات مختلف از جمله محصولات دارویی و بهداشتی، نرم کننده ها، رنگ های مصنوعی، مواد بازدارنده آتش، سموم دفع آفات و انواع وسایل پلاستیکی و پلیمری، به طور مکرر در محیط زندگی ما وارد می‌شوند. در کشورهای با درآمد کم و یا متوسط، برخی از مشاغل و فعالیت های انسانی در خط مقدم مواجهه با آلودگی‌های محیط زیستی هستند. همچنین انسان تغییراتی مانند افزایش

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4
مقاله پژوهشی

بیش از حد جمعیت، آلودگی، سوزاندن سوخت های فسیلی و جنگل زدایی ایجاد کرده است که باعث تغییرات آب و هوایی، فرسایش خاک، کیفیت پایین هوا و آب شده است. این تأثیرات منفی می تواند بر رفتار انسان تأثیر بگذارد و می تواند مهاجرت های گسترده یا جنگ بر سر آب و محیط تمیز و عاری از آلودگی را برانگیزد (۱۷).

حذف آلاینده های نوظهور که با پیشرفت تکنولوژی روز به روز در حال افزایش است، توسط فرآیند زیست پالایی که شامل جذب بیولوژیکی، جذب زیستی و تغییر بیولوژیکی توسط گیاهان و میکروارگانیسم ها است، مزایای بی شماری از جمله هزینه کم و بازده بالایی نسبت به سایر روش های پاکسازی را ارائه می دهد. مهمترین عنصر در زیست پالایی میکروارگانیسم هایی هستند که در همه جا وجود دارند و به طور ایده آل در کار تخریب و تجزیه آلاینده‌ها و تولید آنزیم های هیدرولیتیک خارج سلولی هستند که به آنها امکان می‌دهد از آلاینده‌های محیطی برای رشد و فرآیندهای حیاتی استفاده کنند (۱).

به طور کلی زیست پالایی یک رویکرد مورد توجه و بارز با هزینه کم است، که برای تصفیه محیط زیست، از ظرفیت تجزیه کنندگی میکروارگانیسم‌ها، به ویژه باکتری ها، به عنوان یک عامل زیست محیطی و اقتصادی در طی فرآیندهای فیزیکوشیمیایی استفاده می کند، تا آلودگی منتشر شده از آلاینده‌های آلی پایدار (POPs) را در محیط های مختلف از جمله خاک، رسوبات و فاضلاب از بین ببرند (۱). غلظت زیاد این مواد شیمیایی به عنوان یک عامل استرس زای محیطی، موجب ایجاد ناسازگاری و تغییر جمعیت میکروبی متابولیزه کننده این آلاینده‌ها در محیط‌های زیست مختلف می گردند. از این جهت شناسایی جمعیت میکروبی و فرایندهایی که در سایت های آلوده رخ می دهد، نکته مفیدی برای انتخاب و بکارگیری موثرترین روش زیست پالایی می باشد. بنابراین، مهمترین مرحله در فرآیند زیست پالایی، جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم هایی است که قادر به آلودگی زدایی و تجزیه آلاینده‌ها هستند (۲).

از میان جمعیت گسترده باکتری‌ها، خانواده اکتینومایست‌ها که شامل یک گروه منسجم فیلوژنتیکی متشکل کورینه باکتریوم، رودوکوکوس، نوکاردیا، گوردونا و مایکوباکتریوم هستند، نه تنها از مقاومت ذاتی بالایی در برابر شرایط استرس‌زا برخوردارند بلکه دارای پتانسیل تخریب آلاینده‌های زیست محیطی نیز هستند (۱-۲). اعضای رودوکوکوس تخریب هیدروکربن‌ها، کلروفنل‌ها، بی‌فنیل‌های پلی کلرینه و رنگ‌های آزو سولفوناته را انجام می‌دهند (۶). مایکوباکتریوم‌ها توانایی تجزیه پلی کلروفنول‌ها، فلزات سنگین و هیدروکربن‌های معطر چند حلقه‌ای متنوع (PAH) را دارند (۱)؛ نوکاردیاها توانایی تجزیه هیدروکربن های معطر چند حلقه ای (PAH)، بی‌فنیل‌های با کلرید آلی، کلروفنول‌ها، رنگ‌های آزو سولفونه شده را دارند (۲ و ۸). گوردوناها می توانند آلکان‌ها را بشکنند. اگرچه برخی از گونه‌های این خانواده مانند مایکوباکتریوم و نوکاردیا سرعت رشد کندتری نسبت به سایر گونه ها دارند، اما مقاومت بسیار خوبی در برابر شرایط نامساعد در محیط آلوده نشان می دهند. از این رو، آنها می توانند با موفقیت با سویه های سریع رشد مانند سودوموناس و باکتری های مرتبط که به دلیل توانایی در تخریب آلاینده‌های خطرناک مانند ترکیبات معطر مشهور هستند، رقابت کنند (۹).

ایران کشوری پهناور در جنوب غربی آسیا است و مساحت آن بیش از ۱,۶۴ میلیون کیلومتر مربع است. این کشور شامل حدود۸۰۰۰ گونه گیاهی، ۵۳۵ گونه پرنده، ۱۹۷ گونه پستاندار و ۸۷۰ گونه ماهی است که این غنی بودن تنوع زیستی را نشان می دهد. این تنوع زیاد اکوسیستم ها منجر به تنوع میکروارگانیسم‌ها با قابلیت آنزیمی مشخص می‌شود . با این وجود، به دلایل مختلفی، ایران در معرض فرآیندهای سریع تخریب محیط زیست و تنوع زیستی

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4
مقاله پژوهشی

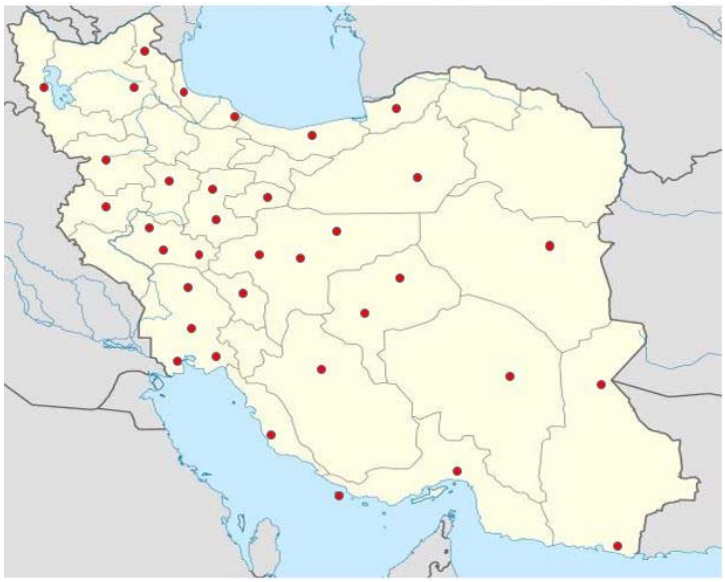
می‌باشد. استرس شدید و آلودگی منابع کمیاب محیطی وجود دارد

بنابراین با توجه به گستردگی اکوسیستمها و منابع محیطی کشور که خود منجر به ظهور گونه های میکروبی مختلف با توانایی های بالای زیست محیطی از جمله تجزیه و مصرف انواع آلاینده و همچنین بکر و ناشناخته بودن گونه های موجود در این منابع و همچنین توانایی زیست محیطی آنها. هدف از مطالعه حاضر، غربالگری، شناسایی و توصیف قابلیت زیست پالایی گونه های مختلف نوکاردیا موجود در اکوسیستمهای مختلف ایران به عنوان یکی از متنوع ترین گونه های اکتینومایست ها با ظرفیت کاتابولیک بالا از منابع محیطی ایران بود که می تواند به به توسعه و پیشرفت فناوری پالایش زیستی کمک کند.

## مواد و روشها

**نمونه گیری و جداسازی**: از دی ماه ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۶، در یک مطالعه مقطعی، تعداد ۹۰ نمونه زیست محیطی، از محیط ها و اکوسیستم‌های طبیعی و مرتبط با انسان مانند رسوبات دریا، دریاچه نمک و رودخانه ها، آب آشامیدنی و غیر آشامیدنی، فاضلاب کارخانه ها و بیمارستان ها، خاک کشاورزی و بیابان ها، جنگل ها، چاه های نفت و معادن به منظور دست یابی به تنوع بیشتری از گونه های میکروبی از جمله گونه های مختلف نوکاردیا و همچنین تنوع در نوع محیط و آلاینده‌های موجود در آن که منجر به شکل گیری نیچه اختصاصی همان محیط می‌شود جمع آوری شد. (محل و جزئیات مکان‌های نمونه برداری در شکل ۱ نشان داده شده است).

**جداسازی اولیه نمونه ها:** نمونه ها بر اساس روش های استاندارد پردازش و فرآوری شدند. به طور خلاصه، برای نمونه های آب، آنها در دمای ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل و حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های آب به مدت ۱۵ دقیقه با ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC) ۰/۰۰۰۵ ضد عفونی شده و توسط طریق فیلترهای نیترات سلولز ( µm0.45, Sartorius, Gottingen, Germany) فیلتر شدند.



شکل ۱- توزیع جغرافیایی محل های نمونه برداری از اکوسیستم های ایرانی. منبع شکل از نقشه های گوگل به دست آمده و توسط Adobe Photoshop 2017 v18.1.1.252 طراحی شده است

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4

سپس فیلترها شستشو داده شد و در لوله های حاوی ۱۵ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفتند. سپس در دور ۶۰۰ g سانتریفیوژ شد، و تقریباً مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب نمونه های محلول به محیط ساتن دارای مکمل آنتی بیوتیک های ضد قارچی و ضد باکتری از جمله کانامایسین، نیستاتین و اسید نالیدیکسیک (هر یک ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) بود. کشت ها در ۲۵ ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد با ۵٪ $CO_2$ به مدت ۳ هفته انکوبه شدند (۱۰ و ۱۱).

برای نمونه های خاک، ۳۰ –۱۵گرم خاک از عمق ۵–۳ سانتی متری نقاط نمونه برداری در محل آلوده گرفته و مستقیماً به آزمایشگاه منتقل شد. پنج گرم خاک از هر نمونه به لوله استریل ۵۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به لوله اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با ورتکس هم زده شد و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه در g* ۴۳۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوبات و مایع رویی در لوله های جداگانه توسط سدیم لوریل سولفات ۳٪ و ۱٪ NaOH آلودگی زدایی شدند. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ضد عفونی شده برای تلقیح در محیط ساتن استفاده شد سپس کشت ها در ۲۵ ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد با ۵٪ $CO_2$ به مدت ۳ هفته انکوبه شدند (۳).

برای نمونه های رسوبی، حداکثر ۳ گرم نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۵٪ استریل مخلوط شد. رقت های سریالی ده برابر از هر سوسپانسیون همگن تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از رده های $۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$و $۱۰^{-۴}$ تیمار شد و در محیط ساتن که با آنتی بیوتیک های نیستاتین، کانامایسین و نالیدیکسیک اسید (هر کدام با ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) همراه بود، تلقیح شدند. نمونه ها به مدت ۳ هفته در دمای ۲۵، ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ $CO_2$ انکوبه شدند (۱۳ و ۲۲).

جزئیات نمونه های محیطی آزمایش شده در طی این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

**شناسایی میکروبیولوژی نوکاردیا:** در ابتدا آزمون‌های فنوتیپی معمولی شامل رنگ آمیزی اسیدفست نسبی، رشد در ۲۵، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد، تولید رنگدانه و آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی، از جمله تست های مقاومت به لیزوزیم هیدرولیز تیروزین، لیزوزیم، گزانتین و هیپوگزانتین به کار برده شدند. سپس جهت شناسایی بیشتر ایزوله‌ها تا سطح جنس وگونه، از آزمایشات مولکولی به شرح زیر استفاده شد (۱۰).

**شناسایی مولکولی:** DNA کروموزومی ایزوله‌های نوکاردیا با استفاده از روش استاندارد جوشاندن درون بافر فسفات، به شرح زیر استخراج شد. تعداد کمی از کلنی های باکتری به ۲۰۰ میلی لیتر بافر TE (Tris EDTA) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده و در g* ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب استریل منتقل و در g* ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. DNA رسوب داده شده مجدداً در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ذخیره شد (۱۲ و ۱۵).

ایزوله های محیطی با استفاده از پروتکل PCR اختصاصی براساس تولید یک منطقه ۵۹۶ جفت بازی از ژن 16S rRNAکه توسط وانگ معرفی شده است، جهت شناسایی جنس نوکاردیا استفده شد. همچنین برای شناسایی گونه ها، از تکثیر و بررسی مستقیم توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA استفاده گردید (۱۲). تعیین توالی در شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام شد. توالی های به دست آمده در مطالعه فعلی به صورت دستی با تمام توالی های موجود میکروارگانیسم مشابه بازیابی شده از پایگاه داده GenBank مقایسه شدند، و در مقایسه با توالی های مربوطه و با استفاده از برنامه jPhydit بررسی شدند و گونه‌های ایزوله‌ها مشخص گردیدند (۱۴ و ۱۶).

**شماره ثبت توالی نوکلئوتیدی ایزوله های ایرانی در GenBank:** شماره ثبت توالی 16S rRNA نوکاردیای جدا شده در این مطالعه عبارت است از. *ن. اتیتیدیسکاواریوم*

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4

(KX685341)، *ن. کراپنستدی* (KX685348) ، ن. *کاشیجینسیس* (KT372140.2.2)، *ن. سانگورلوئنسیس* (KT372141).

**آنالیز زیست پالایی ایزوله های نوکاردیا:** مکان های جمع آوری نمونه با توجه به نزدیکی به چاه نفت و پالایشگاهها و نشت آن به محیط، به نفت خام و مشتقات آن مانند PAHs (هیدروکربن معطر چند حلقه ای)، فنل آلوده بودند. با توجه به وجود گسترده منابع نفتی در سراسر ایران، آلودگی های پتروشیمی و مشتقات آن متداول ترین وع آلاینده‌های محیطی هستند. آلاینده‌های زیست محیطی در مناطق مختلف ایران وجود دارند و در خاک و آب کشاورزی، فاضلاب بیمارستانی و صنعتی و فاضلاب یافت شده اند. ظرفیت زیست پالایی ایزوله ها برای این آلاینده‌ها با توجه به شرح Kale و همکارانش ارزیابی شد، که به شرح زیراست (۲):

**آماده سازی محیط:** برای ارزیابی رشد باکتری ها در حضور هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه ای PAH (Poly Cyclic Aromatic Hydrocarbon)، فنل و سولفات سدیم، مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت پایه نمکی (MSM)(Mineral Salt Medium ) در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری به عنوان محیط پایه این آزمایش تهیه شد. محیط MSM حاوی ($0.25\text{-}MgSO_4.7H_20$، $0.5\text{-}KH_2PO_4$، $0.5\text{-}K_2HPO_4$، 1-، NaCl، $0.009\text{-}CaCl_2.2H_2O$، $0.5\text{-}KNO_3$، $0.1\text{-}Mn\ Cl_2.4H_2O$، $0.07\text{-}ZnCl_2$، $0.015\text{-}CuCl_2.2H_2O$، $0.025\text{-}Ni\ Cl_2.6H_2O$، $0.12\text{-}\ C_OCl_2.6H_2O$، $0.025\text{-}Na_2MO_4.2H_2O$)(g/l) بود. سپس سوبستراهای مختلف شامل PAH و فنل همانطور که در ادامه توضیح داده شده است به محیط فوق اضافه گردید.

در ابتدا جهت ساخت محیط مناسب برای بررسی توانایی زیست پالایی PAH، این محیط با ۱٪ محلول PAH (1–1) خریداری شده از AccuStandard ترکیب گردید. محلول خریداری شده PAH حاوی ترکیبات.: آسنافتن، آسنافتیلن، آنتراسین، بنزو (b) فلورانتن، بنزو (i، h،g ) پریلن، کریزن، دی بنز (h،a ) آنتراسین، فلورانتین، فلورن، ایندنو (1,2,3-cd) پیرن، فنانترن، نفتالن، پیرن است که با غلظت ۰/۲ mg/ml به صورت م در دی کلرومتان و متانول حل گردیدند. محیط MSM دیگربا اضافه کردن فنول ۱٪ (مرک، آلمان) محلول در آب جهت بررسی توانایی زیست پالایی فنل توسط ایزوله ها تهیه گردید.

در آخر مقدار ۱ میلی لیتر از کدورت ۰/۵ مک فارلند ( $1 \times 108\ CFU\ ml^{-1}$) از ایزوله های انتخاب شده در سرم فیزیولوژی تهیه و در محیط کشت تلقیح شد، سپس به مدت ۱۴۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در یک انکوباتور شیکر با دور g* ۹۰ انکوبه' گردیدند. سپس برای ارزیابی رشد باکتریایی در حضور PAH و فنل، نمونه ها در فواصل ۲۴ ساعته جمع آوری شدند و جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شدند.

هرگونه نشانه ای از رشد ایزوله‌ها در محیط ها، نشانگر تجزیه و یا مصرف مواد اضافه شده به محیط توسط ایزوله های مورد مطالعه بود.سپس جهت تأیید نهایی تجزیه مواد مورد بررسی، مقدار ۵ میلی لیتر محیط از ارلن برداشته شد و از نظر عملکرد تخریب PAH و فنل مطابق روش های استاندارد مورد بررسی قرار گرفت (۲، ۴، ۱۸ و ۱۹).

**تعیین تخریب PAHs و فنل:** پس از رشد، ۵ میلی لیتر از محیط MSM همراه با PAH به لوله شیشه ای درپیچدارمنتقل و با ۰/۶ میلی لیتر محلول تتراکلرو اتیلن و متانول (۱: ۱۰۰) به عنوان حلال استخراج، به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط شد، سپس در g*۳۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز آلی جمع آوری شد و برای تجزیه و تحلیل بیشتر توسط HPLC به یک لوله تمیز منتقل شد. مقدارنهایی PAH با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر از فاز آلی جمع آوری شده به دستگاه HPLC (MAager5000, Knauer, Germany)، مجهز به ستون C18 ultra-sep ES PAH QC specia 6o × 2 mm ID ، با آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک با نسبت ۵:۹۵ و با

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4


سرعت ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه، اندازه گیری شد. جذب محلول در ۲۵۴ نانومتر اندازه گیری و محتوای PAH نمونه با استفاده از منحنی استاندارد و عملکرد قبلی محاسبه شده با استفاده از استانداردهای PAH استریل محاسبه شد.

برای تعیین ترکیب فنلی از روش گیبس استفاده شد. به طور خلاصه، ۵ میلی لیتر محیط MSM حاوی فنل که رشد باکتری را نشان می دهد به یک لوله استریل منتقل و در ۸ pH تنظیم شد،سپس در ۳۰۰۰*g به مدت ۲۰ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفت. ۱۵۰ میکرولیتر از مایع اضافی جمع شده با ۳۰ میکرولیتر $NaHCO_3$ مخلوط شد و ۲۰ میکرولیتر معرف گیبس (۲ ، ۶-دی کلروکینون ۴-کلروئیدید) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تکان داده شد. جذب در ۶۲۰ نانومتر ثبت شد و محتوای فنل با استفاده از منحنی استاندارد که قبلاً با استفاده از استانداردهای استریل حاوی مقدار مشخص فنل که در طول موجهای فوق جذب نوری آنها اندازه گیری شده و منحنی رسم گردیده بود. محاسبه و تعیین گردید.

آزمایشات در دو نسخه انجام و مقادیر متوسط محاسبه شدند. از معادله Michaelis-Menten برای محاسبه بازده جذب بیولوژیکی مواد آزمایش شده در محلول برای هر ماده توسط هر ایزوله استفاده شد. نتایج به صورت درصد بیان شدند.

## نتایج

**جداسازی و شناسایی سویه های نوکاردیا.** دما و pH نمونه های خاک به ترتیب در محدوده ۴ تا ۴۲ درجه سانتی گراد و ۶/۵ تا ۸/۴ بود. برای نمونه های فاضلاب و رسوبات، این مقدار به ترتیب در محدوده ۵ تا ۲۲ درجه سانتی گراد و ۶/۵ تا ۸/۲ بود. ارقام مربوطه برای نمونه های آب به ترتیب ۴ تا ۲۹ درجه سانتی گراد و ۶/۴ تا ۸ بود و کل مواد جامد محلول (TDS) برای نمونه های آب بین ۵۶۰ تا ۱۳۴۰ میلی گرم در لیتر بودند. جزئیات نمونه های خاک، آب، فاضلاب و رسوبات و خصوصیات اصلی ایزوله ها در جدول ۱ ارائه شده اند.

از ۹۰ نمونه فاضلاب، رسوبات، خاک و آب، ۱۹ ایزوله به عنوان نوکاردیا براساس خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی، از جمله رنگ آمیزی نسبی اسید فست، رنگدانه ها، مقاومت در برابر لیزوزیم و تجزیه گزانتین و تیروزین و تولیدقطعه اختصاصی جنس نوکاردیا با طول ۵۹۶ جفت باز از ژن 16SrRNA شناسایی شدند (جدول ۱).

توالی یابی ژن های 16SrRNA از ایزوله ها نشان داد که همه ایزوله ها دارای نوکلئوتید نشانه نوکاردیا در موقعیت های ۷۰-۹۸ (AT)، ۲۹۳-۳۰۴ (GT)، ۳۰۷ (C)، ۳۲۸ (T)، ۶۱۴-۶۲۶ (AT)، ۶۳۱ (G)، ۶۶۱-۷۴۴ (GC) ، ۸۲۴e۸۷۶ (TA)، ۸۲۵-۸۷۵ (AT) ، ۸۴۳ (C) و ۱۱۲۲-۱۱۵۱ (AT) بودند (۲ و ۲۰).

بر اساس داده های فنوتیپی و مولکولی، ایزوله های نوکاردیا در این مطالعه متعلق به ۱۰ گونه مختلف بودند.گونه های شایع نوکاردیا در مطالعه ما *ن. فارسینیکا*، ۴ ایزوله (۲۱٪)، ن. *سیریاسی جرجیکا* و *ن. کاشینسیس*، هر کدام ۳ ایزوله (۱۵/۷ ٪)، *ن. آستروئیدس* و *ن. کراپنستیدی*، هرکدام ۲ ایزوله (۱۰/۵٪) بودند. پنج ایزوله منفرد متعلق به چهار گونه شامل ن. *کوبلیا*، *ن. کارنه آ*، *ن. فلومینا*، *ن. اتیدیدیسکاواروم*، و ن. سانکورلوئنسیس بودند.

رابطه بین ایزوله های مورد مطالعه و گونه های استاندارد تثبیت شده نوکاردیا توسط یک مقدار بوت استرپ بالا در درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن 16SrRNA با بالاترین میزان شباهت،توسط نرم افزار MEGA8 رسم گردید. (شکل ۲).

**تجزیه و تحلیل زیست پالایی:** براساس مطالعات گذشته و نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که ایزوله های مورد بررسی به ترتیب زیر واجد توانایی زیست پالایی آلاینده‌های مختلف می باشند. ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4

عنوان *ن. فارسینیکا* شناسایی شدند، قابلیت تخریب موم پارافین، نفت خام و فنل را دارند (۳). ایزوله های A18، A37 و A47 که به عنوان *ن. سیریاسی جرجیکا* شناسایی شدند، توانایی زیست پالایی PAH ها و تیمول را دارند.

شکل ۲- درخت فیلوژنتیک مبتنی بر توالی 16SrRNA برای ایزوله های نوکاردیا با توانایی زیست پالایی و نزدیکترین گونه های معتبر نوکاردیا که با استفاده از نرم افزار MEGA8 با استفاده از روش neighbor- joining با مقادیر ۱۰۰۰ bootstrapping به تصویر کشیده شده اند. ارقام موجود در هر گره نشان دهنده مقادیر bootstrapping است

ایزوله های A31 و A32 که براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به عنوان *ن. آستروئیدس* شناسایی شدند توانایی تخریب زیستی و استفاده از نفت خام، لاستیک، پلی اتیلن، بنزوات سدیم را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را دارند (۳). ایزوله A7که به عنوان *ن. کوبلیا* شناسایی شد واجد توانایی زیست پالایی PAH ها و نفت خام می باشد؛ ایزوله A35 که به عنوان *ن. کارنهآ* شناسایی شد ظرفیت زیست پالایی لوئیسیت که ماده مورد استفاده در مواد منفجره می باشد را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را دارد (۱-۳)، ایزوله A5 که به عنوان *ن. اوتیتیدیس کاویاروم* شناسایی شد ظرفیت تخریب PAH ها و نفت خام را دارد.

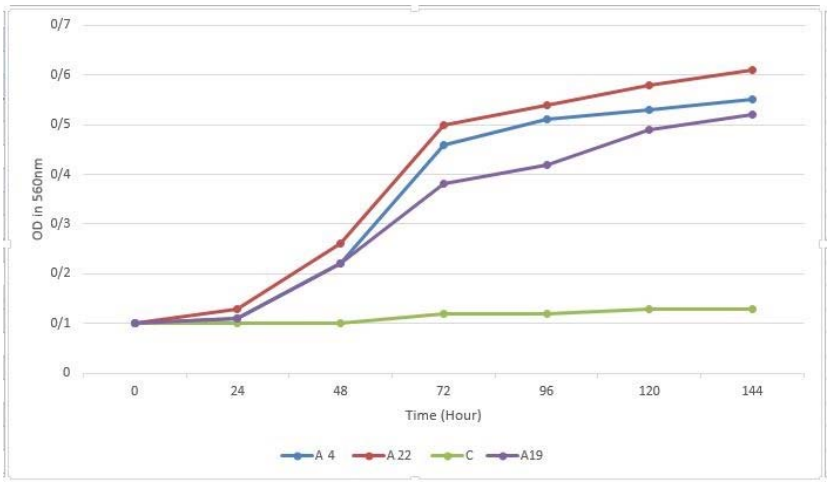
DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4

نتایج بررسی توانایی زیست پالایی سویه های مورد بررسی در این مطالعه برای اولین بار نشان داد که (جدول ۲): ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به عنوان *ن. فارسینیکا*، ایزوله هایA3 ، A19 براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به عنوان *ن. کراپستدی* و ایزوله A22 به عنوان *ن. فلومینا* شناسایی شدند، قادر به زیست پالایی و مصرف ترکیب PAHبه عنوان منبع انرژی و کربن بودند. این سویه ها قادر به تخریب یک یا چند ترکیب از ترکیبات PAH بودند. نتایج همچنین نشان دادند که ایزوله A22 که به عنوان *ن. فلومینا* شناخته شده است دارای بالاترین میزان تخریب PAH با تخریب بیش از ۹۰٪ PAHها در محیط کشت است و به دنبال آن ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که به عنوان *ن. فارسینیکا* شناخته می شوند، و ایزوله های A3، A19 که به عنوان *ن. کراپستدی* شناسایی شدند به ترتیب با ۸۰٪ و ۷۰٪ PAHs تخریب قرار دارند (شکل ۳). برای تأیید نهایی، عملکرد تجزیه زیستی و نوع ترکیبات PAH مصرف شده توسط ایزوله های مورد مطالعه، توسط دستگاه HPLC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتیجه نشان داد که ایزوله های فوق می توانند انواع مختلف ترکیبات PAH را تخریب کرده و ترکیبات را به سایر مواد کم خطر تبدیل کنند (شکل ۴).

همچنین نتایج حاصل از این نشان دادند که ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که به عنوان *ن. فارسینیکا* ، ایزوله های A3 و A19 که به عنوان *ن. کراپستدی*، ایزوله های A20، A21 و A30 که به عنوان ن.*کاشیجنسیس* وایزوله A8 که به عنوان *ن. سانگورلئونسیس* شناسایی شدند، توانایی رشد در حضور فنل و زیست پالایی این ترکیبات را دارد (شکل ۵). نتایج مصرف فنل ایزوله های مورد مطالعه، توسط روش گیبس نشان داد که ایزوله های A3 و A19 که به عنوان *ن. کراپستدی* شناسایی شدند دارای بالاترین نرخ تخریب فنل هستند (۹۵٪ تخریب فنل در محیط پس از ۱۴۴ ساعت) و به دنبال آن ایزوله A8 ، ( *ن. سانگورلوئنسیس) و ایزوله های* A4 ، A26، A27 و (A73*ن. فارسینیکا)* و ایزوله های A20، A21 وA30 . (ن.*کاشیجینسیس*) با نرخ تخریب فنل به ترتیب ۸۵، ۸۰ و ۷۰٪ قرار داشتند.

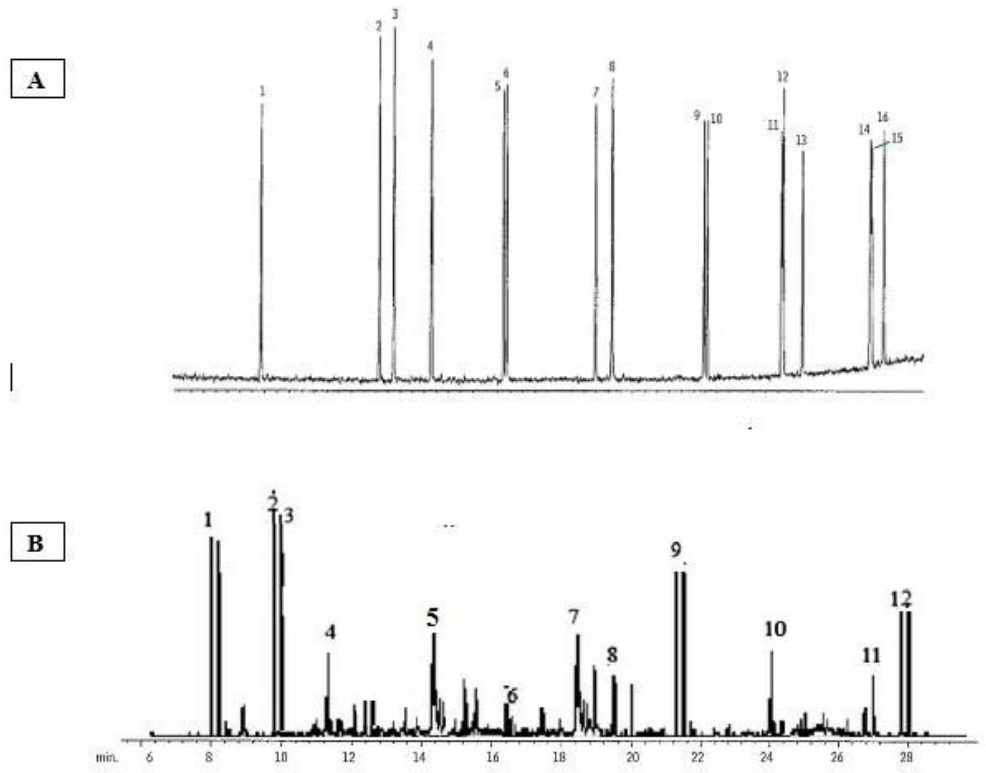
## بحث و نتیجه گیری

آگاهی از پتانسیل زیست پالایی سویه های باکتریایی جدا شده از مکان‌های های آلوده، در انتخاب و طراحی بهترین روش زیست‌پالایی نقش اساسی را ایفا می کند(۱و۳).

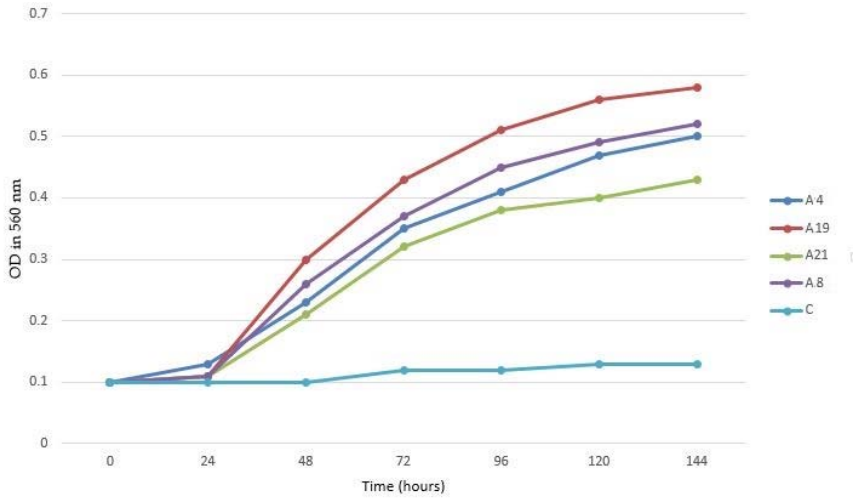



شکل ۳- منحنی های رشد ایزوله های نوکاردیای ایرانی طی ۱۴۴ ساعت دوره انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در حضور PAH . C نمونه کنترل

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4


شکل ۴- کروماتوگرام های HPLC محلول مخلوط PAH توسط ایزوله A22 نوکاردیا، A؛ نمونه های کنترل، B؛ بعد از ۱۴۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد. 1. نفتالین ۲. استنافتیلن ۳. استنافتن ۴. فلورن ۵. فننترن ۶. آنتراسن ۷. فلورانتن ۸. پیرن ۹. بنزو [a] آنتراسن ۱۰. کریسن ۱۱. بنزو [b] فلورانتن ۱۲. بنزو [k] فلورانتن ۱۳. بنزو [a] پیرن ۱۴ .ایندو [۱، ۲، ۳-cd] پیرن ۱۵. دی بنزو [a ، h] آنتراسن




شکل ۵- منحنی رشد ایزوله های نوکاردیای ایرانی در طول ۱۴۴ ساعت دوره انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در حضور فنل. C نمونه کنترل

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4
مقاله پژوهشی

بیشتر مطالعات قبلی بر روی جداسازی اکتینومایست ها، از محیط های طبیعی که به راحتی قابل دسترسی هستند متمرکز بوده است، به طوری که، اکتینومایست ها از این محیطها به راحتی جدا و توانای زیست پالایی آنها در ارتباط با آلاینده‌های موجود در آن محیطهای معمولی بررسی می‌شود (۵و۲۱). با این حال مطالعه‌ای در مورد محیطهای خاص و اکتینومایست هایی که در محیط های خاص ساکن هستند وجود ندارد .این محیط های خاص به دلیل شرایط شدید، منحصر به فرد هستند که از دسترسی آسان به آنها جلوگیری می کند و متعاقباً اکتینومایست ها و دیگر گونه های باکتریایی واجد توانای زیستی از این محیط تا حد زیادی کشف نمی شوند (۵و۲۱). از اینرو در این مطالعه برای اولین بار انواع منابع محیطی موجود در اکوسیستمهای مختلف ایران از نظر وجود گونه های مختلف نوکاردیا به عنوان یکی از مهمترین باکتریهای واجد پتاسیل زیستی بالا، غربالگری گردید و مشخص گردید که این منابع و نوکاردیاهای موجود در آن واجد توانایی های زیستی مختلف از جمله زیست پالایی آلاینده‌هایی مانند PAH+، فنل و دیگر ترکیبات مشابه می باشند، که از این اطلاعات می توان در ردیابی امحا و خنثی کردن انواع آلاینده‌ها در کشور استفاده نمود.

جداسازی گونه های مختلف نوکاردیا که از اکتینومایستهای با پتانسیل کاتابولیک بالا هستند، برای استفاده در فرایندهای زیست پالایی از منابع محیطی موضوع تحقیق در سرتاسر جهان بوده است (۴، ۵، ۶ و ۷). در مطالعه حاضر، با توجه به ظرفیت کاتابولیکی بالا و همچنین دوام بالای گونه های نوکاردیا موجود در محیط های با شرایط سخت زیستی، مانند اکوسیستم های دارای آلودگی صنعتی، خانگی و بیمارستانی، گونه های نوکاردیا جداشده از اکوسیستم های بکر و دست نخورده ایران مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت و توانایی زیست پالایی آنها بررسی گردید..

در مطالعه حاضر، ۱۹ سویه نوکاردیا از ۹۰ نمونه جمع آوری شده از منابع محیطی جداسازی و شناسایی شد. ایزوله ها بر اساس تعیین توالی های نوکلئوتیدی ژن 16SrRNA به ۱۰ گونه معتبر تعلق داشتند. *ن. فارسینیکا* بیشترین ایزوله جدا شده بود. براساس نتیجه مطالعه حاضر و مطالعات قبلی مشخص شد که *ن.فارسینیکا* واجد تو توانایی زیست پالایی موم پارافین، روغن خام و فنل می‌باشد(۳). *ن. سیریاسی جرجیکا* در رده دوم قرار گرفت که ۱۶٪ از ایزوله ها را شامل می شد. این ارگانیسم که اولین بار در سال ۲۰۰۱ از نمونه های بالینی جدا شد، گزارش شده است که می تواند PAH ها و تیمول را تخریب کند (۳). *ن. آستروئیدس و ن. کراپنستدی* سومین گونه پرتعداد جداسازی شده بودند. گزارش شده است که *ن. آستروئیدس* توانایی تخریب نفت خام، لاستیک، پلی اتیلن و بنزوات سدیم را دارد (۴). *ن. کراپنستدی* یک پاتوژن فرصت طلب است که اولین بار در سال ۲۰۱۴ از یک بیمار مبتلا به عفونت ریوی جدا و شناسایی شد (۳). با این حال هیچ گزارشی در مورد توانایی زیست پالایی آن گزارش نشده است. مطالعه حاضر نشان داد که *ن. کراپنستدی* توانایی تخریب فنل و PAH ها را دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که، ۶ گونه، *ن. کوبلیا، ن. کارنه‌ا، ن. اتیدیدیسکاواریوم، ن. فلومینا و نN. سانگورالوئنسیس*، که به ترتیب از اکوسیستم های خاص ایران از جمله دریاچه نمک سدیم سولفات، ساحل خلیج فارس، کارخانه پتروشیمی و زمین های کشاورزی در اطراف چاه نفت جدا شدند واجد خصوصیات زیست پالایی زیر بودند.

*ن. کوبلیا* اولین بار در سال ۲۰۰۷ از خاک آلوده به نفت جداسازی و شناسایی شد، و مشخص گردید قابلیت تجزیه PAH ها و نفت خام را دارد (۲۲). *ن. کارنیا* اولین بار در سال ۱۹۱۳ از طریق نمونه های بالینی شناسایی شد و در مطالعات بعد، مشخص شد که این گونه نوکاردیا توانایی

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4

تخریب لوئیسیت را دارد (۱-۳). *ن. اتیتیدیسکاواریوم* از نظر منابع محیطی در همه جا وجود دارد و اغلب از نمونه های بالینی و محیطی جدا شده است. در مطالعات بعدی مشخص شد که *ن. اتیتیدیسکاواریوم* توانایی تخریب PAH ها و نفت خام را دارد (۲ و ۲۲).

با مرور تاریخچه گونه‌های *ن. فلومینیا*، *ن. کیشیجنسیس* و *ن. سانگورلوئنسیس*، مشخص گردید که هیچگونه گزارشی در مورد توانایی زیست پالایی وجود ندارد. اما نتایج مطالعه ما برای اولین بار نشان داد که *ن. فلومینیا*، *ن. کیشیجنسیس* و *ن. سانگورلوئنسیس*، توانایی تخریب فنل و PAHها را در محیط های آماده شده دارند، و می توانند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غربالگری مناطق بکر ودست نخورده‌ای که دارای اکتینومایست های ناشناخته هستند، شانس کشف و جداسازی گونه های میکروبی جدید که توانایی زیست پالایی ترکیبات شیمیایی متفاوت را دارند بالا برده، که در نتیجه میتوان از این گونه ها در فرآیندهای مختلف تصفیه بیولوژیکی استفاده کرد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اکوسیستم های متنوع ایرانی و به ویژه محیط های غیر متعارف، زیستگاه انواع مختلف گونه‌های آکتینومایست و به ویژه گونه های نوکاردیاهای با ظرفیت زیست پالایی انواع مختلف آلاینده‌های آلی می باشد. در پایان به این نتیجه میرسیم که، علی رغم وجود زیستگاه‌ها و اکوسیستم‌های متنوع در ایران، انواع مختلف گونه‌های آکتینومایست و به ویژه گونه‌های نوکاردیا و همچنین پتانسیل بالای کتابولیکی آنها موجود در آنها ناشناخته مانده مورد بررسی قرار نگرفته اند، که پیشنهاد می شود در مطالعات آینده بر روی این امر تاکید ویژه گردد.

## منابع

1. Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmention: a review. *Intern J Environ Bioremedi & Biodegrad, 3*(1), 28-39.
2. Arifuzzaman, M., Khatun, M., & Rahman, H. (2010). Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African J Biotechnol, 9*(29), 4615-4619.
3. Azadi, D., Shojaei, H., Mobasherizadeh, S., & Naser, A. D. (2017). Screening, isolation and molecular identification of biodegrading mycobacteria from Iranian ecosystems and analysis of their biodegradation activity. *AMB Express, 7*(1), 180.
4. Bosco, F., Antonioli, D., Casale, A., Gianotti, V., Mollea, C., Laus, M., & Malucelli, G. (2018). Biodegradation of unvulcanized natural rubber by microorganisms isolated from soil and rubber surface: A preliminary study. *Bioremed J, 22*(1-2), 43-52.
5. Conville, P. S., & Witebsky, F. G. (2011). Nocardia, rhodococcus, gordonia, actinomadura, streptomyces, and other aerobic actinomycetes. In *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition* (pp. 443-471): American Society of Microbiology.
6. Davie-Martin, C. L., Stratton, K. G., Teeguarden, J. G., Waters, K. M., & Simonich, S. L. M. (2017). Implications of bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils for human health and cancer risk. *Environ scie & technol, 51*(17), 9458-9468.
7. Dilip, C. V., Mulaje, S., & Mohalkar, R. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4*(5), 1730.
8. Farashi A, & M., S. (2017 ). Biodiversity hotspots and conservation gaps in Iran. *J Nat Conserv, 39*, 37-57.
9. Gibbs, H. D. (1927). Phenol tests III. The indophenol test. *Journal of Biological Chemistry, 72*(2), 649-664.
10. Jeon, Y.-S., Chung, H., Park, S., Hur, I., Lee, J.-H., & Chun, J. (2005). jPHYDIT: a JAVA-based integrated environment for molecular phylogeny of ribosomal RNA sequences. *Bioinformatics, 21*(14), 3171-3173.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4

11. Jones, A. L., Fisher, A. J., Mahida, R., Gould, K., Perry, J. D., Hannan, M. M., . . . Goodfellow, M. (2014). *Nocardia kroppenstedtii* sp. nov., an actinomycete isolated from a lung transplant patient with a pulmonary infection. *Inter j system evolut microbiol, 64*(3), 751-754.

12. Kamala, T., Paramasivan, C., Herbert, D., Venkatesan, P., & Prabhakar, R. (1994). Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl environ microbiol, 60*(3), 1021-1024.

13. Kanaly, R. A., & Harayama, S. (2010). Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial biotechnology, 3*(2), 136-164.

14. Manoli, E., Kouras, A., Karagkiozidou, O., Argyropoulos, G., Voutsa, D., & Samara, C. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at traffic and urban background sites of northern Greece: source apportionment of ambient PAH levels and PAH-induced lung cancer risk. *Environ Sci Pollut Res, 23*(4), 3556-3568.

15. McCarthy, A. J., & Williams, S. T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene, 115*(1-2), 189-192.

16. Nakamiya, K., Nakayama, T., Ito, H., Shibata, Y., & Morita, M. (2009). Isolation and properties of a 2-chlorovinylarsonic acid-degrading microorganism. *J Hazard Mater, 165*(1-3), 388-393.

17. Nhi-Cong, L. T., Mikolasch, A., Awe, S., Sheikhany, H., Klenk, H. P., & Schauer, F. (2010). Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by Nocardia cyriacigeorgica isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. *J bas microbiol, 50*(3), 241-253.

18. Okoh, E., Yelebe, Z., Oruabena, B., Nelson, E., & Indiamaowei, O. (2020). Clean-up of crude oil-contaminated soils: bioremediation option. *Intern J Environ Scie and Technol, 17*(2), 1185-1198.

19. Priyadarshanee, M., & Das, S. (2020). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *J Environ Chem Engin*, 104686.

20. Rodríguez-Nava, V., Khan, Z., Pötter, G., Kroppenstedt, R. M., Boiron, P., & Laurent, F. (2007). Nocardia coubleae sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. *Int j syst evolut microbiol, 57*(7), 1482-1486.

21. Santillan, J., Muzlera, A., Molina, M., Lewkowicz, E., & Iribarren, A. (2020). Microbial degradation of organophosphorus pesticides using whole cells and enzyme extracts. *Biodegradation, 31*(4), 423-433.

22. Yang, R.-Q., Zhang, B.-L., Sun, H.-l., Zhang, G.-S., Li, S.-W., Liu, G.-X., . . . An, L.-Z. (2019). *Nocardia mangyaensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from crude-oil-contaminated soil. *Intern j syst evolut microbiol, 69*(2), 397-403.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.2.1.4
مقاله پژوهشی

# Screening and molecular identification of nocardia with ability to biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and phenol from Iranian ecosystems

**Hosseini Sh.[1], Azadi D.[2]* and Absalan A.R.[2]**

[1] **Dept. of Genetics, Islamic Azad University, Marvdasht branch, Marvdasht, I.R. of Iran.**

[2] **Dept. of Basic and Laboratory Sciences, School of Nursing and Paramedical, Khomein University of Medical Sciences, Khomein, I.R. of Iran.**

## Abstract

Anthropogenic pollutants are known to have adverse effect on ecosystem, and human health. Biodegradation is an assay that has been widely used to remediate organic pollutants and reduce the risk of these hazardous materials. Microorganisms are readily available to screen and can be rapidly characterized to be applied in many extreme environmental conditions. Actinomycetes especially *Nocardia* have a great potential for the production of bioactive secondary metabolites which have biodegradation activity. This study aimed to screen and characterize *Nocardia* species with biodegradation potential from diverse Iranian ecosystems. The isolates were screened from 90 collected environmental samples, identified and characterized using conventional and molecular microbiological methods including the PCR amplification and sequencing analysis of 16S rRNA and *rpo*B genetic markers. Growth rate in presence of pollutants, chromatography, Gibbs and turbidometric methods were used to determine bioremediation ability. A total of 19 *Nocardia* isolates were recovered from the cultured samples (21.1%) that belonged to 10 various species. The most prevalent species was *N. farcinica*; 4 isolate (21%), followed by *N. cyriacigeorgica* and *N. cashijiensis*; 3 isolates each (15.7%) and *N. asteroides* 2 isolates (10.5%). In this study isolates showed biodegradation activity against PAHs, phenol and oil derivations. Our results showed that various *Nocardia* species isolated from Iranian ecosystems have great potential for biodegradation of environmental contaminant, therefore we can used this bacteria in bioremediation process, although they have not received much attention for such significant usage.

**Keywords**: *Nocardia*, bioremediation, 16S rRNA, phylogeny.