

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

شیوا حسینی<sup>۱</sup>، داود آزادی<sup>۲\*</sup> و عبدالرحیم آب سالان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، مرو دشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرو دشت، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

<sup>۲</sup> 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. میکروارگانیسم‌های مختلف می‌توانند برای استفاده در فرآیندهای احیای زیستی، غربالگری و شناسایی شوند. اکتینومیست‌ها به ویژه نوکاردیاهای، گروهی از باکتریها با پتانسیل بالا برای تولید متابولیت‌های ثانویه و فعال از نظر زیستی هستند که توانایی فعالیت زیست پالایی را دارند. این مطالعه با هدف غربالگری و شناسایی گونه‌های نوکاردیا با پتانسیل تخریب زیستی از اکوسیستم‌های متنوع ایران انجام شده است. ایزوله‌ها از ۹۰ نمونه محیطی از جمله رسوبات دریا و رودخانه‌ها و دیگر منابع آب، فاضلاب کارخانه‌ها و بیمارستان‌ها، خاک کشاورزی و بیابان‌ها، جنگل‌ها، چاه‌های 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 گیس برای تعیین توانایی زیست پالایی ایزوله‌ها استفاده شد. در مجموع ۱۹ ایزوله نوکاردیا از نمونه‌ها (۲۱/۱٪) که متعلق به ۱۰ گونه مختلف بودند، بازیابی شدند. شایعترین گونه‌های نوکاردیا جدا شده شامل *N. فارسینیکا*، ۴ ایزوله (۲۱٪)؛ *N. سیریسی جرجیکا* و *N. کاشی جینسیس*، هر کدام ۳ ایزوله (۱۵/۷٪)؛ *N. آستروئیدس* و *N. کرانستدتی*، هر کدام ۲ ایزوله (۱۰/۵٪) بودند. نتایج مطالعه ما نشان داد که ایزوله‌های *N. فارسینیکا*، *N. آستروئیدس*، *N. کوبلیا* و *N. اوتیتیدیس کایاروم* قابلیت تخریب موم پارافین، نفت خام و فنل، *N. سیریسی جرجیکا* توانایی تخریب PAHها و تیمول *N. کارنه* توانایی تخریب لوئیسیت را دارند. نتایج ما نشان داد که اکوسیستم‌های مختلف ایران واجد تنوع بالایی از گونه‌های نوکاردیا می‌باشند، که با توجه به پتانسیل زیستی بالای آنها میتوان از گونه‌های 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: ۰۸۶-۴۶۲۲۱۵۳۱، پست الکترونیکی: Davood.azadi@gmail.com

### مقدمه

و پلیمری، به طور مکرر در محیط زندگی ما وارد می‌شوند. در کشورهای با درآمد کم و یا متوسط، برخی از مشاغل و فعالیت‌های انسانی در خط مقدم مواجهه با آلودگی‌های محیط زیستی هستند. همچنین انسان تغییراتی مانند افزایش

آلاینده‌های شیمیایی مختلف در طول ساخت و مصرف انواع مواد و ترکیبات مختلف از جمله محصولات دارویی و بهداشتی، نرم کننده‌ها، رنگ‌های مصنوعی، مواد بازدارنده آتش، سموم دفع آفات و انواع وسایل پلاستیکی

میکروارگانسیم‌هایی 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 میکوباکتریوم 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 پلی‌کلرینه و رنگ‌های آزو سولفوناته را انجام می‌دهند (۶). میکوباکتریوم‌ها توانایی تجزیه پلی‌کلروفنول‌ها، فلزات سنگین و هیدروکربن‌های معطر چند حلقه‌ای متنوع (PAH) را دارند (۱)؛ نوکاردیایا توانایی تجزیه هیدروکربن‌های معطر چند حلقه‌ای (PAH)، بی‌فنیل‌های با کلرید آلی، کلروفنول‌ها، رنگ‌های آزو سولفون‌ها شده را دارند (۲ و ۸). گوردوناها می‌توانند آلکان‌ها را بشکنند. اگرچه برخی از گونه‌های این خانواده مانند میکوباکتریوم و نوکاردیا سرعت رشد کندتری نسبت به سایر گونه‌ها دارند، اما مقاومت بسیار خوبی در برابر شرایط نامساعد در محیط آلوده نشان می‌دهند. از این رو، آنها می‌توانند با موفقیت با سویه‌های سریع رشد مانند سودوموناس و باکتری‌های 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 حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی، ۵۳۵ گونه پرنده، ۱۹۷ گونه پستاندار و ۸۷۰ گونه ماهی است که این غنی بودن تنوع زیستی را نشان می‌دهد. این تنوع زیاد اکوسیستم‌ها منجر به تنوع میکروارگانسیم‌ها با قابلیت‌های آزریمی مشخص می‌شود. با این وجود، به دلایل مختلفی، ایران در معرض فرآیندهای سریع تخریب محیط زیست و تنوع زیستی

بیش از حد جمعیت، آلودگی، سوزاندن سوخت‌های 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 می‌تواند بر رفتار انسان تأثیر بگذارد و می‌تواند مهاجرت‌های گسترده یا جنگ بر سر آب و محیط تمیز و عاری از آلودگی را برانگیزد (۱۷).

حذف آلاینده‌های 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 میکروارگانسیم‌ها است، مزایای بی‌شماری از جمله هزینه کم و بازده بالایی نسبت به سایر روش‌های پاکسازی را ارائه می‌دهد. مهمترین عنصر در زیست پالایی میکروارگانسیم‌هایی هستند که در همه جا وجود دارند و به طور ایده‌آل در کار تخریب و تجزیه آلاینده‌ها و تولید آنزیم‌های 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 تجزیه‌کنندگی میکروارگانسیم‌ها، به ویژه باکتری‌ها، به عنوان یک عامل زیست محیطی و اقتصادی در طی فرآیندهای فیزیکوشیمیایی استفاده می‌کند، تا آلودگی منتشر شده از آلاینده‌های آلی پایدار (POPs) را در محیط‌های مختلف از جمله خاک، رسوبات و فاضلاب از بین ببرد (۱). غلظت زیاد این مواد شیمیایی به عنوان یک عامل استرس‌زای محیطی، موجب ایجاد ناسازگاری و تغییر جمعیت میکروبی متابولیزه‌کننده این آلاینده‌ها در محیط‌های زیست مختلف می‌گردند. از این جهت شناسایی جمعیت میکروبی و فرآیندهایی که در سایت‌های آلوده رخ می‌دهد، نکته مفیدی برای انتخاب و بکارگیری موثرترین روش زیست پالایی می‌باشد. بنابراین، مهمترین مرحله در فرآیند زیست پالایی، جداسازی و شناسایی

انسان مانند رسوبات دریا، دریاچه نمک و رودخانه‌ها، آب آشامیدنی و غیر آشامیدنی، فاضلاب کارخانه‌ها و بیمارستان‌ها، خاک کشاورزی و بیابان‌ها، جنگل‌ها، چاه‌های نفت و معادن به منظور دست‌یابی به تنوع بیشتری از گونه‌های میکروبی از جمله گونه‌های مختلف نوکاردیا و همچنین تنوع در نوع محیط و آلاینده‌های موجود در آن که منجر به شکل‌گیری نیچه اختصاصی همان محیط می‌شود جمع‌آوری شد. (محل و جزئیات مکان‌های نمونه برداری در شکل ۱ نشان داده شده است).

**جداسازی اولیه نمونه‌ها:** نمونه‌ها بر اساس روش‌های استاندارد پردازش و فرآوری شدند. به طور خلاصه، برای نمونه‌های آب، آنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل و حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های آب به مدت ۱۵ دقیقه با ستیل پیریدینیوم کلراید (CPC) ۰/۰۰۰۵ ضد عفونی شده و توسط طریق فیلترهای نیترات سلولز ( $\mu\text{m}0.45$ , Sartorius, Gottingen, Germany) فیلتر شدند.

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 گونه‌های میکروبی مختلف با توانایی‌های بالای زیست محیطی از جمله تجزیه و مصرف انواع آلاینده و همچنین بکر و ناشناخته بودن گونه‌های موجود در این منابع و همچنین توانایی زیست محیطی آنها. هدف از مطالعه حاضر، غربالگری، شناسایی و توصیف قابلیت زیست‌پالایی گونه‌های مختلف نوکاردیا موجود در اکوسیستم‌های مختلف ایران به عنوان یکی از متنوع‌ترین گونه‌های اکتینومایست‌ها با ظرفیت کاتابولیک بالا از منابع محیطی ایران بود که می‌تواند به به توسعه و پیشرفت فناوری پالایش زیستی کمک کند.

## مواد و روشها

**نمونه‌گیری و جداسازی:** از دی ماه ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۶، در یک مطالعه مقطعی، تعداد ۹۰ نمونه زیست محیطی، از محیط‌ها و اکوسیستم‌های طبیعی و مرتبط با



شکل ۱- توزیع جغرافیایی محل‌های نمونه برداری از اکوسیستم‌های ایرانی. منبع شکل از نقشه‌های گوگل به دست آمده و توسط Adobe

Photoshop 2017 v18.1.1.252 طراحی شده است

شناسایی میکروبیولوژی نوکاردیا: در ابتدا آزمون‌های فنوتیپی معمولی شامل رنگ آمیزی اسیدفست نسبی، رشد در ۲۵، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، تولید رنگدانه و آزمایش‌های استاندارد بیوشیمیایی، از جمله تست‌های مقاومت به لیزوزیم، هیدرولیز تیروزین، لیزوزیم، گزانتین و هیپوگزانتین به کار برده شدند. سپس جهت شناسایی بیشتر ایزوله‌ها تا سطح جنس و گونه، 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 کلنی‌های باکتری به ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر TE (Tris EDTA) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده و در  $g * 8000$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب استریل منتقل و در  $g * 13000$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. DNA رسوب داده شده مجدداً در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۱۲ و ۱۵).

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

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

سپس فیلترها شستشو داده شد و در لوله‌های حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند. سپس در دور ۶۰۰ g سانتریفیوژ شد، و تقریباً مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب نمونه‌های محلول به محیط ساتن دارای مکمل آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی و ضد باکتری از جمله کانامایسین، نیستاتین و اسید نالیدیکسیک (هر یک ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. کشت‌ها در ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد با  $CO_2$  ۵٪ به مدت ۳ هفته انکوبه شدند (۱۰ و ۱۱).

برای نمونه‌های خاک، ۳۰-۱۵ گرم خاک از عمق ۵-۳ سانتی‌متری نقاط نمونه برداری در محل آلوده گرفته و مستقیماً به آزمایشگاه منتقل شد. پنج گرم خاک از هر نمونه به لوله استریل ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس، ۲۰ میلی‌لیتر 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  $g * 2300$  سانتریفیوژ شد. رسوبات و مایع رویی در لوله‌های 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 کشت‌ها در ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد با  $CO_2$  ۵٪ به مدت ۳ هفته انکوبه شدند (۳).

برای نمونه‌های رسوبی، حداکثر ۳ گرم نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۵٪ استریل مخلوط شد. رقت‌های سریالی ده برابر از هر سوسپانسیون همگن تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از رده‌های  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$  تیمار شد و در محیط ساتن که با آنتی‌بیوتیک‌های نیستاتین، کانامایسین و نالیدیکسیک اسید (هر کدام با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) همراه بود، تلقیح شدند. نمونه‌ها به مدت ۳ هفته در دمای ۲۵، ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با  $CO_2$  ۵٪ انکوبه شدند (۱۳ و ۲۲).

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

دی بنز (h,a) آنتراسین، فلورانتین، فلورن، ایندنو (1,2,3-cd) پیرن، فنانترن، نفتالن، پیرن است که با غلظت  $0.2 \text{ mg/ml}$  به صورت م در دی کلرومتان و متانول حل گردیدند. محیط MSM دیگر با اضافه کردن فنول ۱٪ (مرک، آلمان) محلول در آب جهت بررسی توانایی زیست پالایی فنل توسط ایزوله‌ها تهیه گردید.

در آخر مقدار ۱ میلی لیتر از کدورت  $0.5 \text{ mg}$  مک فارلند ( $1 \times 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ ) از ایزوله‌های 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  $90 \text{ rpm}$  انکوبه گردیدند. سپس برای ارزیابی رشد باکتریایی در حضور PAH و فنل، نمونه‌ها در فواصل ۲۴ ساعته جمع‌آوری شدند و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج  $560 \text{ nm}$  توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شدند.

هرگونه نشانه‌ای از رشد ایزوله‌ها در محیط‌ها، نشانگر تجزیه و یا مصرف مواد اضافه شده به محیط توسط ایزوله‌های 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 روش‌های 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 شیشه‌ای در پیچدار منتقل و با  $0.6 \text{ ml}$  میلی لیتر محلول تراکلرو اتیلن و متانول (۱:۱۰۰) به عنوان حلال استخراج، به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط شد، سپس در  $3000 \text{ rpm}$  برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز آلی جمع‌آوری شد و برای تجزیه و تحلیل بیشتر توسط HPLC به یک لوله تمیز منتقل شد. مقدارنهایی PAH با تزریق  $100 \text{ } \mu\text{l}$  میکرولیتر از فاز آلی جمع‌آوری شده به دستگاه HPLC (MAager5000, Knauer, Germany)، مجهز به ستون C18 ultra-sep ES PAH QC specia  $60 \times 2 \text{ mm ID}$ ، با آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک با نسبت ۵:۹۵ و با

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

**آنالیز زیست پالایی ایزوله‌های نوکاردیا:** مکان‌های جمع‌آوری نمونه با توجه به نزدیکی به چاه نفت و پالایشگاهها و نشأت آن به محیط، به نفت خام و مشتقات آن مانند PAHs (هیدروکربن معطر چند حلقه‌ای)، فنل آلوده بودند. با توجه به وجود گسترده منابع نفتی در سراسر ایران، آلودگی‌های پتروشیمی و مشتقات آن متداول‌ترین و 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 شده‌اند. ظرفیت زیست پالایی ایزوله‌ها برای این آلاینده‌ها با توجه به شرح Kale و همکارانش ارزیابی شد، که به شرح زیر است (۲):

**آماده‌سازی محیط:** برای ارزیابی رشد باکتری‌ها در حضور هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه‌ای PAH (Poly Cyclic Aromatic Hydrocarbon)، فنل و سولفات سدیم، مقدار  $100 \text{ ml}$  میلی لیتر محیط کشت پایه نمکی (MSM) (Mineral Salt Medium) در ارلن  $250 \text{ ml}$  میلی لیتری به عنوان محیط پایه این آزمایش تهیه شد. محیط MSM حاوی  $0.5\text{-K}_2\text{HPO}_4$ ،  $0.5\text{-KH}_2\text{PO}_4$ ،  $7\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.25\text{-MgSO}_4$ ،  $1\text{-NaCl}$ ،  $0.1\text{-Mn Cl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.5\text{-KNO}_3$ ،  $0.009\text{-CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.025\text{-Ni Cl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.015\text{-CuCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.07\text{-ZnCl}_2$ ،  $0.12\text{-CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ ،  $0.025\text{-Na}_2\text{MO}_4.2\text{H}_2\text{O}$  (g/l) بود. سپس سویستراهای 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) پرین، کریزن،

های خاک، آب، فاضلاب و رسوبات و خصوصیات اصلی ایزوله‌ها در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

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، رنگدانه‌ها، 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 ژن‌های 16SrRNA از ایزوله‌ها نشان داد که همه ایزوله‌ها دارای نوکلئوتید نشانه نوکاردیا در موقعیت‌های ۷۰-۹۸ (AT)، ۳۰۴-۲۹۳ (GT)، ۳۰۷ (C)، ۳۲۸ (T)، ۶۲۶-۶۱۴ (AT)، ۶۳۱ (G)، ۶۶۱-۷۴۴ (GC)، ۸۷۶e۸۲۴ (TA)، ۸۲۵-۸۷۵ (AT)، ۸۴۳ (C) و ۱۱۲۲-۱۱۵۱ (AT) بودند (۲ و ۲۰).

بر اساس داده‌های فنوتیپی و مولکولی، ایزوله‌های نوکاردیا در این مطالعه متعلق به ۱۰ گونه مختلف بودند. گونه‌های شایع نوکاردیا در مطالعه ما ن. فارسینیکا، ۴ ایزوله (۲۱٪)، ن. سیریاسی جرجیکا و ن. کاشینسیس، هر کدام ۳ ایزوله (۱۵٪)، ن. آستروئیدس و ن. کرانپستیدی، هر کدام ۲ ایزوله (۱۰٪) بودند. پنج ایزوله منفرد متعلق به چهار گونه شامل ن. کوبلیا، ن. کارنه آ، ن. فلومینا، ن. اتیدیدیسکاواروم، و ن. سانکورلونسپس بودند.

رابطه بین ایزوله‌های مورد مطالعه و گونه‌های 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 زیست‌پالایی:** براساس مطالعات گذشته و نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید که ایزوله‌های مورد بررسی به ترتیب زیر واجد توانایی زیست‌پالایی آلاینده‌های مختلف می‌باشند. ایزوله‌های A4، A26، A27 و A73 که براساس نتایج تست‌های فنوتیپی و مولکولی به

سرعت ۰/۳ میلی لیتر در دقیقه، اندازه‌گیری شد. جذب محلول در ۲۵۴ نانومتر اندازه‌گیری 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 گیس استفاده شد. به طور خلاصه، ۵ میلی لیتر محیط MSM حاوی فنل که رشد باکتری را نشان می‌دهد 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<sub>3</sub> مخلوط شد و ۲۰ میکرولیتر معرف گیس (۲، ۶-دی کلروکینون ۴-کلروئیدید) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد 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 اندازه‌گیری 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 سویه‌های نوکاردیا.** دما و pH نمونه‌های خاک به ترتیب در محدوده ۴ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۶/۵ تا ۸/۴ بود. برای نمونه‌های فاضلاب و رسوبات، این مقدار به ترتیب در محدوده ۵ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۶/۵ تا ۸/۲ بود. ارقام مربوطه برای نمونه‌های آب به ترتیب ۴ تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد و ۶/۴ تا ۸ بود و کل مواد جامد محلول (TDS) برای نمونه‌های آب بین ۵۶۰ تا ۱۳۴۰ میلی‌گرم در لیتر بودند. جزئیات نمونه

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



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک مبتنی بر توالی 16S rRNA 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

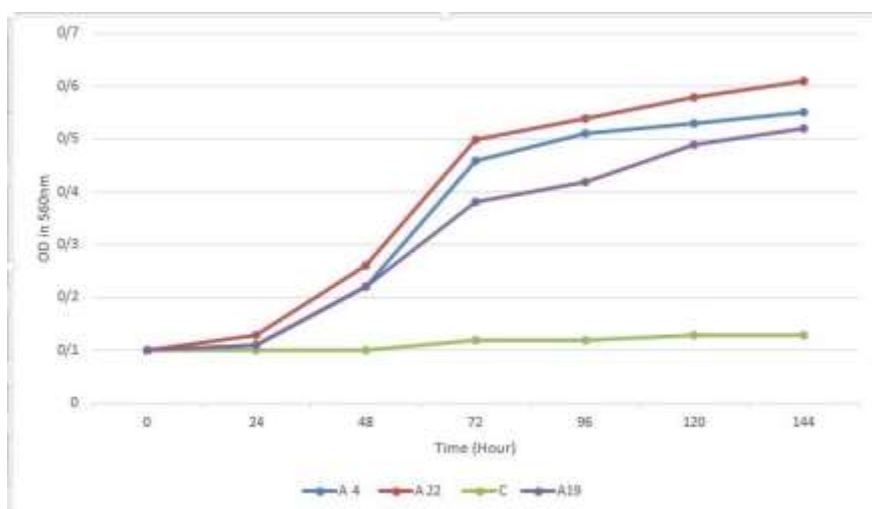
ایزوله های A31 و A32 که براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به عنوان *N. آستروئیدس* شناسایی شدند توانایی تخریب زیستی و استفاده از نفت خام، لاستیک، پلی اتیلن، بنزوات سدیم را به عنوان تنها منبع کربن و انرژی را دارند (۳). ایزوله A7 که به عنوان *N. کوبلیا* شناسایی شد واجد توانایی زیست پالایی PAH ها و نفت خام می باشد؛ ایزوله A35 که به عنوان *N. کارنه* 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 *N. اوتیتیدیس* کاویاروم شناسایی شد ظرفیت تخریب PAH ها و نفت خام را دارد.

همچنین نتایج حاصل از این نشان دادند که ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که به عنوان ن. فارسیینیکا، ایزوله های A3 و A19 که به عنوان ن. کراپستندی، ایزوله های A20، A21 و A30 که به عنوان ن. کاشیجینسیس و ایزوله A8 که به عنوان ن. سانگورلونسسیس 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 گیس نشان داد که ایزوله های A3 و A19 که به عنوان ن. کراپستندی شناسایی شدند دارای بالاترین نرخ تخریب فنل هستند (۹۵٪ تخریب فنل در محیط پس از ۱۴۴ ساعت) و به دنبال آن ایزوله A8، (ن. سانگورلونسسیس) و ایزوله های A4، A26، A27 و A73. فارسیینیکا) و ایزوله های A20، A21 و A30. (ن. کاشیجینسیس) با نرخ تخریب فنل به ترتیب ۸۵، ۸۰ و ۷۰٪ قرار داشتند.

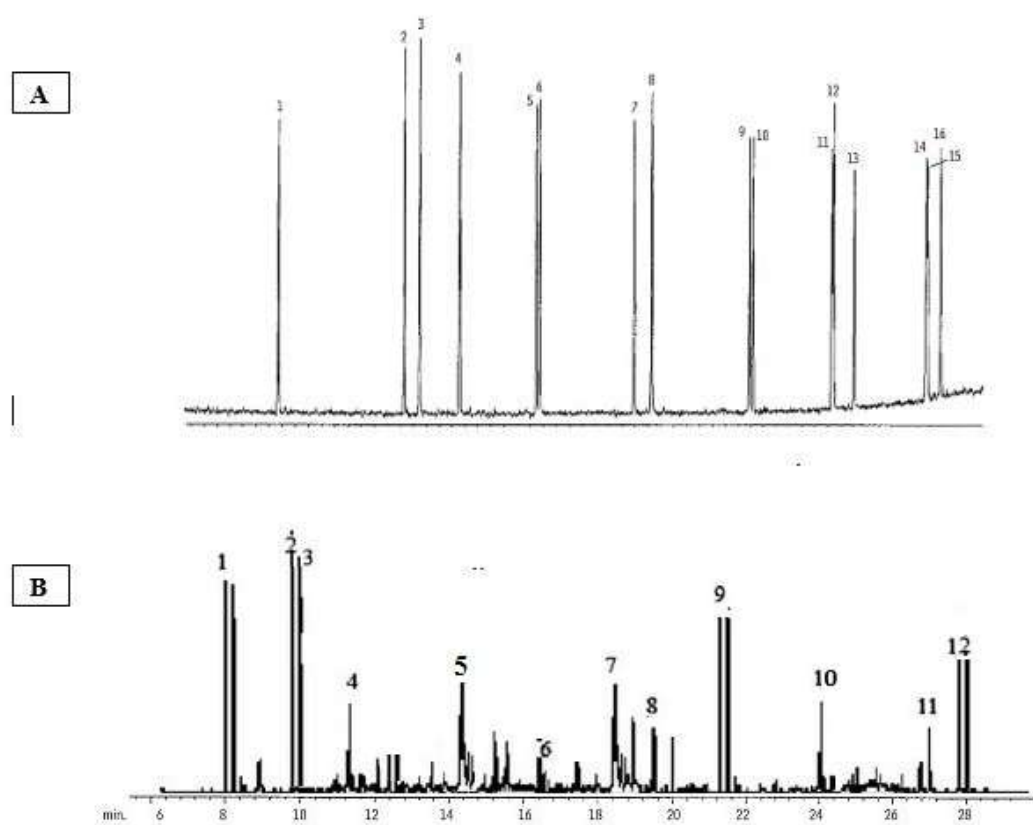
### بحث و نتیجه گیری

آگاهی از پتانسیل زیست پالایی سویه های باکتریایی جدا شده از مکان‌های آلوده، در انتخاب و طراحی بهترین روش زیست‌پالایی نقش اساسی را ایفا می‌کند (۳۱).

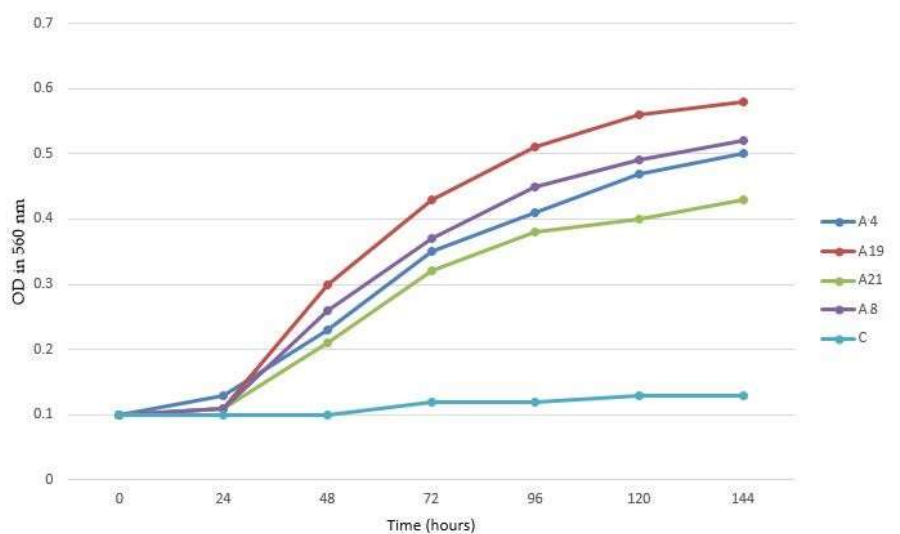
نتایج بررسی توانایی زیست پالایی سویه های مورد بررسی در این مطالعه برای اولین بار نشان داد که (جدول ۲): ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به عنوان ن. فارسیینیکا، ایزوله های A3، A19 براساس نتایج تستهای فنوتیپی و مولکولی به عنوان ن. کراپستندی و ایزوله A22 به عنوان ن. فلومینا شناسایی شدند، قادر به زیست پالایی و مصرف ترکیب PAH به 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٪ PAH در محیط کشت است و به دنبال آن ایزوله های A4، A26، A27 و A73 که به عنوان ن. فارسیینیکا شناخته می‌شوند، و ایزوله های A3، A19 که به عنوان ن. کراپستندی 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 می‌توانند انواع مختلف ترکیبات PAH را تخریب کرده و ترکیبات را به سایر مواد کم خطر تبدیل کنند (شکل ۴).



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



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. ۱. نفتالین ۲. استنافتیلن ۳. استنافتن ۴. فلورن ۵. فنترن 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 [h، a] آنتراسن



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

در مطالعه حاضر، ۱۹ سوبه نوکاردیا از ۹۰ نمونه جمع آوری شده از منابع محیطی جداسازی و شناسایی شد. ایزوله‌ها بر اساس تعیین توالی‌های 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 توانایی زیست‌پالایی موم پارافین، روغن خام و فنل می‌باشد (۳). ن. سیریاسی جرجیکا در رده دوم قرار گرفت که ۱۶٪ از ایزوله‌ها را شامل می‌شد. این ارگانسیم که اولین بار در سال ۲۰۰۱ از نمونه‌های بالینی جدا شد، گزارش شده است که می‌تواند PAHها 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 زیست‌پالایی آن گزارش نشده است. مطالعه حاضر نشان داد که ن. کراپنستدی توانایی تخریب فنل و PAHها را دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که، ۶ گونه، ن. کوبلیا، ن. کارنه، ن. اتیدیدیسکاواریوم، ن. فلومینا و ن. سانگورئوسیس، که به ترتیب از اکوسیستم‌های خاص ایران از جمله دریاچه نمک سدیم سولفات، ساحل خلیج فارس، کارخانه پتروشیمی و زمین‌های کشاورزی در اطراف چاه نفت جدا شدند واجد خصوصیات زیست‌پالایی زیر بودند.

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

بیشتر مطالعات قبلی بر روی جداسازی اکتینومایست‌ها، از محیط‌های طبیعی که به راحتی قابل دسترسی هستند متمرکز بوده است، به طوری که، اکتینومایست‌ها از این محیط‌ها به راحتی جدا و توانای زیست‌پالایی آنها در ارتباط با آلاینده‌های موجود در آن محیط‌های معمولی بررسی می‌شود (۵ و ۲۱). با این حال مطالعه‌ای در مورد محیط‌های خاص و اکتینومایست‌هایی که در محیط‌های خاص ساکن هستند وجود ندارد. این محیط‌های خاص به دلیل شرایط شدید، منحصر به فرد هستند که از دسترسی آسان به آنها جلوگیری می‌کند و متعاقباً اکتینومایست‌ها و دیگر گونه‌های باکتریایی واجد توانای زیستی از این محیط تا حد زیادی کشف نمی‌شوند (۵ و ۲۱). از اینرو در این مطالعه برای اولین بار انواع منابع محیطی موجود در اکوسیستم‌های مختلف ایران از نظر وجود گونه‌های مختلف نوکاردیا به عنوان یکی از مهمترین باکتریهای واجد پتانسیل زیستی بالا، غربالگری گردید و مشخص گردید که این منابع و نوکاردیاهای موجود در آن واجد توانایی‌های زیستی مختلف از جمله زیست‌پالایی آلاینده‌هایی مانند PAH+، فنل و دیگر ترکیبات مشابه می‌باشند، که از این اطلاعات می‌توان در ردیابی امحا و خنثی کردن انواع آلاینده‌ها در کشور استفاده نمود.

جداسازی گونه‌های مختلف نوکاردیا که از اکتینومایست‌های با پتانسیل کاتابولیک بالا هستند، برای استفاده در فرایندهای زیست‌پالایی 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 گونه‌های نوکاردیا موجود در محیط‌های با شرایط سخت زیستی، مانند اکوسیستم‌های دارای آلودگی صنعتی، خانگی و بیمارستانی، گونه‌های نوکاردیا جدا شده از اکوسیستم‌های بکر و دست‌نخورده ایران مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت و توانایی زیست‌پالایی آنها بررسی گردید...

جدید که توانایی زیست‌پالایی ترکیبات شیمیایی متفاوت را دارند بالا برده، که در نتیجه میتوان از این گونه‌ها در فرآیندهای مختلف تصفیه بیولوژیکی استفاده کرد. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اکوسیستم‌های متنوع ایرانی و به ویژه محیط‌های غیر متعارف، زیستگاه انواع مختلف گونه‌های آکتینومایست و به ویژه گونه‌های نوکاردیاهای با ظرفیت زیست‌پالایی انواع مختلف آلاینده‌های آلی می‌باشد. در پایان به این نتیجه میرسیم که، علی‌رغم 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 می‌شود در مطالعات آینده بر روی این امر تاکید ویژه گردد.

تخریب لوئیسیت را دارد (۱-۳). ن. اتیتیدیسکاواریوم از نظر منابع محیطی در همه جا وجود دارد و اغلب از نمونه‌های 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. سانگورلونسسیس، مشخص گردید که هیچ‌گونه گزارشی در مورد توانایی زیست‌پالایی وجود ندارد. اما نتایج مطالعه ما برای اولین بار نشان داد که ن. فلومینیا، ن. کیشیجنسیس و ن. سانگورلونسسیس، توانایی تخریب فنل و PAHها را در محیط‌های آماده شده دارند، و می‌توانند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غربالگری مناطق بکر و دست‌نخورده‌ای که دارای اکتینومایست‌های ناشناخته هستند، شانس کشف و جداسازی گونه‌های میکروبی

## منابع

- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Intern J Environ Bioremedi & Biodegrad*, 3(1), 28-39.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Farashi A, & M., S. (2017). Biodiversity hotspots and conservation gaps in Iran. *J Nat Conserv*, 39, 37-57.
- Gibbs, H. D. (1927). Phenol tests III. The indophenol test. *Journal of Biological Chemistry*, 72(2), 649-664.
- 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.

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., Voutsas, 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., & Indiamawe, O. (2020). Clean-up of crude oil-contaminated soils: bioremediation option. *Intern J Environ Scie and Technol*, 17(2), 1185-1198.
19. Priyadarshane, 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.

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

Hosseini Sh.<sup>1</sup>, Azadi D.<sup>2\*</sup> and Absalan A.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Genetics, Islamic Azad University, Marvdasht branch, Marvdasht, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> 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 *rpoB* 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 use this bacteria in bioremediation process, although they have not received much attention for such significant usage.

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