



## بررسی اثرات تجزیه زیستی پنج گونه از سیانوباکتری‌های جدا شده از مناطق آلوده نفتی جنوب کشور بر نفت خام ایران

فاطمه فروغی نیا<sup>۱</sup>، مهروز دزفولیان<sup>۲\*</sup>، شادمان شکروی<sup>۲</sup>، ناصر هرزندی<sup>۱</sup>، ندا سلطانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

<sup>۳</sup>گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشگاهی

### چکیده

تاریخچه مقاله:

تعدادی از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند ترکیبات موجود در نفت و ترکیبات وابسته به آن را تجزیه و پاکسازی کنند. در این پژوهش میزان تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفت خام توسط پنج گونه از سیانوباکتری‌های بومی مناطق نفتی جنوب ایران مورد بررسی قرار گرفته است. این گونه‌ها عبارتند از *Leptolyngbya* ISC25 و *Phormidium* ISC24 *Nostoc* ISC32 *Nostoc* ISC26 *Anabaena* ISC55 که بعد از رشد در محیط کشت اختصاصی و متعاقباً محیط کشت BG11، در حضور نفت به مدت ۲۸ روز هوادهی شدند. میزان هیدروکربن‌های باقیمانده قبل و پس از این مدت به روش GC و تغییرات پروتئین‌های بیان شده به روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. حضور ژن *cyp110A2* که از خانواده آنزیم‌های منواکسیژناز P450 می‌باشد نیز در این گونه‌ها توسط روش PCR بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان کل هیدروکربن‌های باقیمانده برای گونه‌های ذکر شده به ترتیب ۱۶/۱۱، ۴۶/۴۱، ۴۵/۸۴، ۳۸/۱۳ و ۴۴/۹۸ درصد بوده است. تغییر در بیان پروتئین‌ها در تمامی گونه‌ها به وضوح دیده شد. علاوه بر این نتایج PCR نشان داد که ژن *cyp110A2* تنها در دو نمونه *Anabaena* ISC55 و *Phormidium* ISC24 حضور دارد. نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که سیانوباکتری‌های مورد آزمایش *Phormidium* ISC24 و *Anabaena* ISC55 برای تجزیه نفت بوده و دو نمونه *Phormidium* ISC24 بهترین نمونه‌ها برای تجزیه زیستی نفت می‌باشند.

دریافت: ۹۲/۱۰/۰۴

اصلاح: ۹۲/۱۱/۱۱

پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۵

کلمات کلیدی:

تجزیه زیستی

سیانوباکتری

هیدروکربن

منواکسیژناز p450

### مقدمه

روش‌های حذف آلودگی‌های نفتی در آب، خاک و هوا به سه روش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی انجام می‌شود (Das and Chandran, 2011). از میان روش‌های فیزیکی می‌توان به ابزارهای جمع‌آوری کننده نظیر اسکیمر اشاره کرد. در روش شیمیایی اکسید کننده‌های شیمیایی به محیط افزوده می‌شوند که پرهزینه‌اند و می‌توانند منجر به تولید مواد جانبی خطرناک‌تر شوند. در روش بیولوژیکی، فناوری زیست‌پالایی به کار گرفته می‌شود تا سیستم زیستی خود برای تغییر شکل مواد شیمیایی زیانبار عمل کند. این روش بسیار کم‌ضررتر و بسیار ارزان‌تر از روش‌های فیزیکی و شیمیایی است.

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mehrdezfulian@yahoo.com

(Alemagi, 2007). میزان تاثیرگذاری این روش به توانایی میکروارگانیسم‌ها و مناسب بودن شرایط برای فعالیت آنها بستگی دارد. زیست پایایی به دو روش تقویت زیستی و تحریک زیستی انجام می‌گیرد بدون اینکه اثر ناخواسته‌ای روی محیط زیست داشته باشد (Das and Chandran, 2011). میکروارگانیسم‌هایی که در روش تجزیه زیستی استفاده می‌شوند به وسیله تولید سورفاکتانت‌ها (Galindo et al., 2011)، اسیدها و حلال‌ها (Watson et al., 2002) و آنزیم‌ها (Das and Chandran, 2011) در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی موثر می‌باشند.

منو اکسیژنازها دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که توسط ژن سیتوکروم P450 کد می‌شوند (Das and Chandran, 2011). توالی‌های مختلفی از ژن سیتوکروم P450 در سیانوباکتری‌ها شناسایی شده‌اند که عملکرد برخی از آنها هنوز مشخص نشده است. در گذشته مطالعات متعددی درباره توانایی سیانوباکتری‌ها در حذف آلودگی‌های نفتی انجام شده است. نتایج پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ انجام شده نشان داده است که میزان هیدروکربن‌های باقیمانده روغن موتور بعد از ۱۴ روز مواجهه با *Nostoc hatei* Synechocystis به ترتیب ۶۲/۳ و ۵۳/۲ درصد بوده است (Pimda and Bunnag, 2012a). مطالعه دیگری از همین گروه روی *N. piscinale* در یک دوره ۱۴ هفته‌ای، کاهش ۷۵ درصدی میزان هیدروکربن‌های ۳ درصد روغن موتور را نشان داده است (Pimda and Bunnag, 2012b). Odokuma و همکاران از تاثیر دو سیانوباکتری *Chlorella* و *Chroococcus* بر نفت نیجریه در یک دوره ۲۸ روزه توانسته میزان هیدروکربن‌های باقیمانده را به ترتیب به ۲۶/۷ و ۱۶/۷ درصد برسانند (Odkuma and Smith, 2007). پژوهشی که بر روی *Lyngbya lagerlerimi* صورت گرفت نشان داد که این گونه سیانوباکتری می‌تواند ۲۲/۶۹ درصد از هیدروکربن‌های نفتالین را طی مدت ۷ روز تجزیه کند. در حالیکه *Nostoc lincka* قادر به تخریب هیدروکربن‌های نفتالین نبوده است (Mostafa, 2012).

باتوجه به اثرات متفاوتی که گونه‌های مختلف سیانوباکتری در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها دارند، در این مطالعه اثرات تجزیه زیستی پنج گونه از سیانوباکتری‌های جدا شده از مناطق نفتی آلوده جنوب کشور بر روی نفت خام سبک ایران مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که گونه‌های بومی سیانوباکتری سالهاست به طور طبیعی در رفع آلودگی‌های نفتی موثر بوده‌اند در این مطالعه، توانایی پنج گونه سیانوباکتری جداسازی شده از مناطق آلوده نفتی از نظر میزان تجزیه نفت، دارا بودن ژن *cyp110A2* و تغییر بیان پروتئین‌ها در مواجهه با نفت خام مورد بررسی قرار گرفت تا توانایی این سیانوباکتری‌ها در تجزیه نفت خام مورد ارزیابی قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### خالص سازی و کشت سیانوباکتری‌ها

پنج گونه سیانوباکتری مورد استفاده در این مطالعه شامل: *Nostoc* ISC32، *Nostoc* ISC26، *Anabaena* ISC55، *Leptolyngbya* ISC25 و *Phormidium* ISC24 به طور خالص از کلکسیون ریزجلبک‌های پژوهشکده علوم کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شدند. این گونه‌ها در محیط کشت جامد برای خالص سازی و در محیط کشت مایع به منظور رشد و تکثیر، کشت داده شدند (Ferris and Hirsch, 1991; Andersen, 2005). محیط کشت BG11 برای رشد گونه‌های *Leptolyngbya* و *Phormidium* و محیط کشت BG11<sub>0</sub> برای رشد گونه‌های *Nostoc* و *Anabaena* مورد استفاده قرار گرفت.

### تست تجزیه زیستی نفت در حضور گونه‌های سیانوباکتری

به منظور بررسی قدرت تجزیه زیستی گونه‌های مورد مطالعه، در هر ظرف ۱۵ میلی لیتر سیانوباکتری با OD ۰/۵ و حجمی مناسب از نفت ریخته شد و حجم نهایی با افزودن محیط کشت به ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد به نحوی که درصد نفت در حجم نهایی، مقادیر ۰/۸، ۱/۶، ۴ و ۸ درصد گردید. دلیل استفاده از این درصدها اطلاعات اخذ شده از پیش تیمارهای متعددی بود که نشان می‌داد سیانوباکتری‌های مورد آزمایش در درصدهای ذکر شده تغییرات رشد را نشان می‌دهند و در

غلظت‌های بالاتر از ۸ در صد نفت خام قادر به رشد نیستند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۸ روز به وسیله پمپ هوا (۲۰۰ میلی لیتر در دقیقه) هوادهی شدند. بعد از طی دوره ۲۸ روزه ظروف حاوی درصدهای ۱/۶، ۴ و ۸ از نفت خام به علت بالا بودن غلظت نفت خام، قابل جداسازی و بررسی نبود بنابراین ادامه مطالعه بر روی نمونه ۰/۸ درصد نفت خام انجام شد.

از محیط کشت BG-11، سدیم نیترات و سدیم کربنات (منابع کربن و نیترات) حذف گردید تا باکتری‌ها مجبور به استفاده از هیدروکربن‌های نفت به عنوان منبع کربن برای تغذیه شوند. به منظور جبران منبع سدیم حذف شده، کلرید سدیم به میزان ۲ گرم در لیتر اضافه شد. نمونه شاهد متشکل از محیط کشت و نفت ساخته شد و در شرایط مشابه به مدت ۲۸ روز هوادهی گردید.

### آنالیز شیمیایی

میزان نفت تجزیه شده (TPH<sup>۱</sup>) با روش کروماتوگرافی گازی (GC<sup>۲</sup>) مدل 6890 N-ALIENT بعد از طی دوره ۲۸ روزه اندازه‌گیری شد.

### آنالیز مولکولی

بررسی تغییرات بیان پروتئین در گونه‌های سیانو باکتری قبل و بعد از مواجهه با نفت توسط روش SDS-PAGE بررسی شد. برای آماده سازی نمونه‌ها، ۰/۱ گرم از سیانوباکتری‌ها وزن شدند، چند بار متوالی در فریزر و در دمای محیط قرار گرفتند، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول لیز شامل ۰/۶۲۵ مولار Tris-HCl، ۰/۲٪ SDS، ۱۰٪ گلیسرول V/V، و ۰/۵٪ 2-mercaptoethanol V/V به سیانوباکتری‌ها اضافه و پس از ۲۰ دقیقه فریز شدن در دمای اتاق ورتکس شدند. بعد از آن الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد. برای SDS-PAGE از ژل متراکم کننده ۰/۵٪ و ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل آمید استفاده شد.

برای مطالعه DNA های گونه‌های باکتری ابتدا DNA به وسیله کیت استخراج DNA ژنومی Genomic DNA Purification kit شرکت فرمنتاز استخراج شد، سپس کیفیت DNA های استخراج شده به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد تایید قرار گرفت (Sambrook and Russell, 2001) و سپس فرآیند PCR با استفاده از پرایمرهای موجود در جدول ۱ که برای ژن *cyp110A2* اختصاصی هستند انجام شد. مطالعه محصولات حاصل از PCR. به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با دستگاه‌های Transilluminator و Gel documentation صورت پذیرفت.

جدول ۱. پرایمرهای به کار رفته برای شناسایی ژن *cyp110A2*

پرایمر	ژن	سکانس
Ancyp F 2	cytochrome P450 ( <i>cyp110A2</i> ) gene	5'TACCCTGGCCCCAGAGGGTG3'
Ancyp R2	(200bp)	5'TGGAAAGTCTCCGAACAGCAGGG3'

### آنالیز آماری

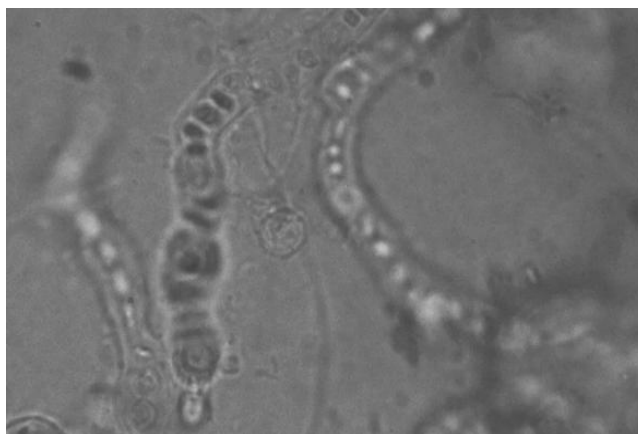
همه آزمایش‌ها ۳ بار انجام شد و برای آنالیز آماری نتایج از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و تست Tukey استفاده شد. میزان P-value مساوی و کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معیار معناداری در نظر گرفته شد.

<sup>1</sup> Total Petroleum Hydrocarbons

<sup>2</sup> Gas Chromatography or GC Chromatography

## نتایج

به منظور اطمینان از خلوص گونه های سیانوباکتری، در هر مرحله از مطالعه از آنها اسلاید میکروسکوپی تهیه شد. در هر مرحله با مطالعه میکروسکوپی، عدم آلودگی نمونه ها تایید گردید (شکل ۱). نمودارهای آنالیز کروماتوگرافی گازی محیط کشت نمونه های تیمار شده به منظور تعیین میزان تغییرات TPH احتمالی بر اساس PA (پالس های الکتریکی تولید کننده گرما) در زمان رسم شد و مقدار کربن های شاخص در ترکیب محیط کشت مشخص شد (شکل ۲).

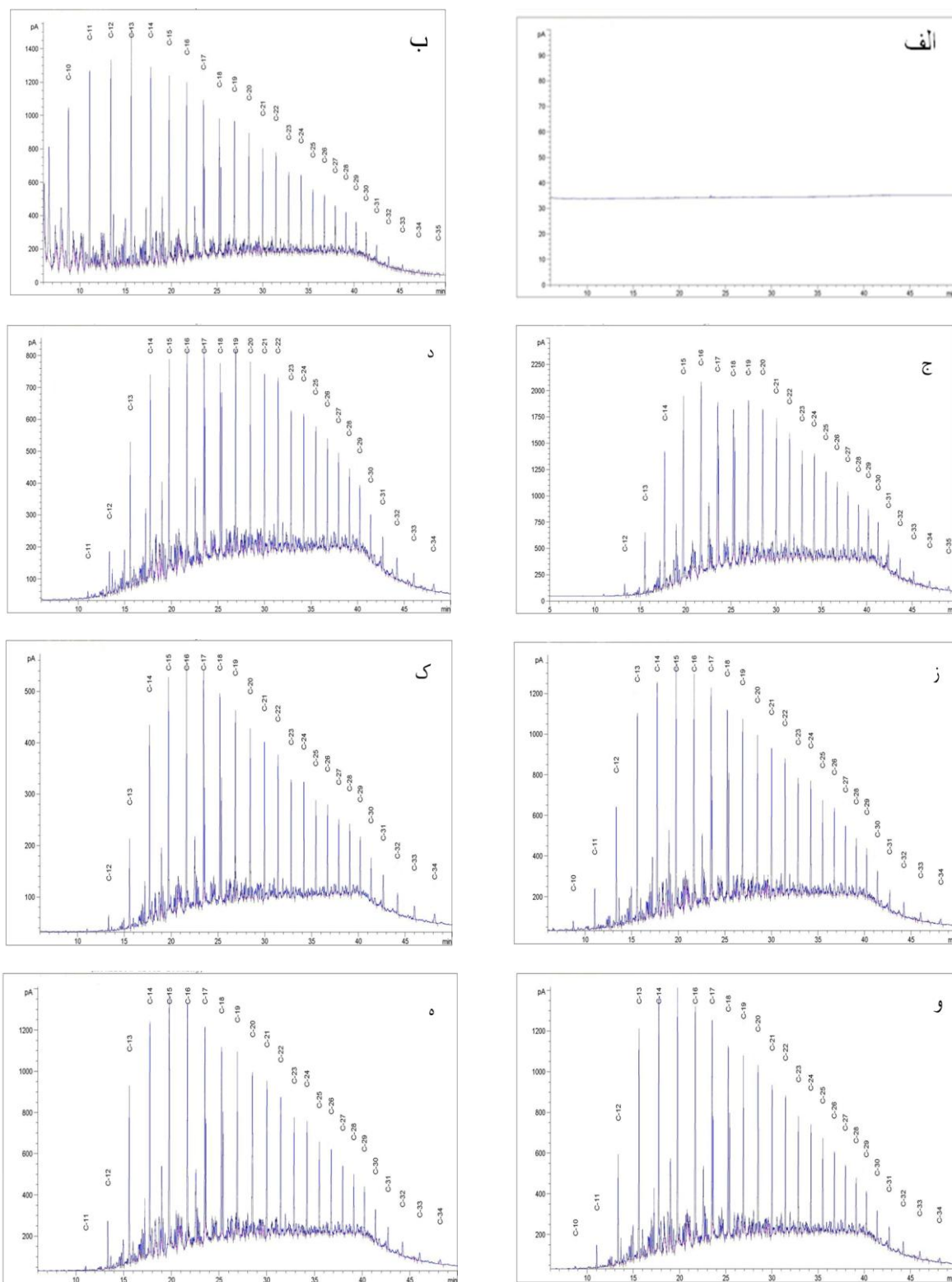


شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری *Anabaena* ISC55 با درشتنمایی 1000X

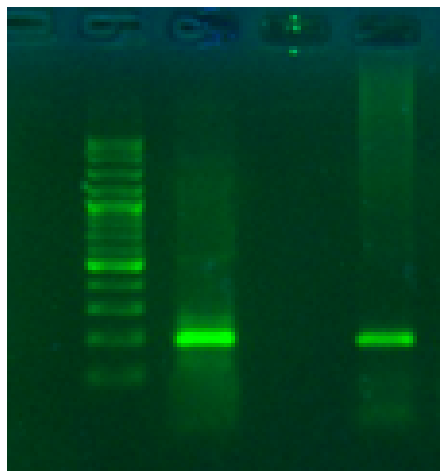
چنانکه در شکل ۲- الف مشاهده می شود هیچ گونه منبع کربنی در محیط کشت وجود ندارد. برای کنترل آزمایشات، نفت مورد آزمایش در طول این مطالعه بر اساس حضور مقدار هیدروکربن های شاخص از نظر تعداد کربن ها از شماره ۱۰ تا ۳۵ به وسیله GC تعیین شد (شکل ۲- ب). سپس برای آنکه تاثیرات اکسیداسیون خود به خودی نفت بدون حضور هرگونه میکروارگانیسمی بررسی گردد نتیجه تست GC بر روی مخلوط محیط کشت خالص و نفت انجام شد (شکل ۲- ج) که حاکی از آن است که هیدروکربن های  $C_{10}$  و  $C_{11}$  از بین رفته اند و دیگر کربن ها تا حدی کاهش داشته اند. نتایج تست GC برای تیمارهای سیانوباکتری های *Phormidium* ISC24 و *Leptolyngbya* ISC25 نشان داد که در مدت ۲۸ روز این سیانوباکتری ها توانستند  $C_{11}$  و  $C_{35}$  را حذف و دیگر کربن ها را کاهش دهند (شکل ۲- د و ه). سیانوباکتری های *Nostoc* ISC26 و *Nostoc* ISC32 فقط  $C_{35}$  را شکسته و بقیه کربن ها تا حدودی کم شده اند (شکل ۲- و و ز). از میان این پنج گونه مورد مطالعه، گونه *Anabaena* ISC55 توانست با تاثیر بیشتری باعث حذف  $C_{10}$ ،  $C_{11}$  و  $C_{35}$  شود و دیگر کربن ها را کاهش دهد. (شکل ۲- ک). در جدول ۲ نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی و میزان کل هیدروکربن ها و درصد هیدروکربن های نفت بعد از ۲۸ روز نشان داده شده است.

آنالیز واریانس یکطرفه برای نتایج TPH حاکی از معناداری نتایج به دست آمده است ( $F=9.597$ ,  $P<0.0001$ ). علاوه بر این نتایج تست Tukey نشان داد که همه گونه ها با نمونه نفت خام اختلاف معنادار ( $P<0.0001$ ) داشته اند در حالیکه فقط گونه *Anabaena* ISC55 اختلاف معناداری ( $P<0.05$ ) با گروه کنترل نشان می دهد. سیانوباکتری *Anabaena* ISC55 موثرترین گونه در تجزیه نفت و *Nostoc* ISC32 ضعیف ترین گونه مورد بررسی در این مطالعه بوده اند.

نتایج حاصل از تست PCR بر روی نمونه های مورد مطالعه نشان داد که ژن *cyp110A2* متعلق به خانواده منواکسیژنار P450 در دو سیانوباکتری *Anabaena* ISC55 و *Phormidium* ISC24 حضور دارند (شکل ۳). بقیه نمونه ها هیچ بانندی در PCR از خود نشان ندادند. بهترین پاسخ در تجزیه نفت نیز مربوط به این دو نمونه بود.

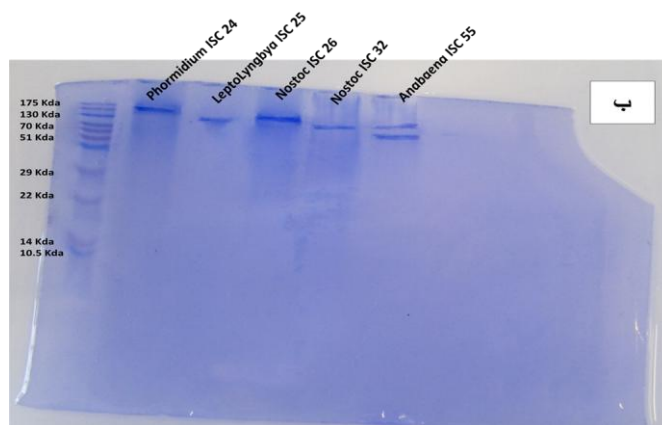
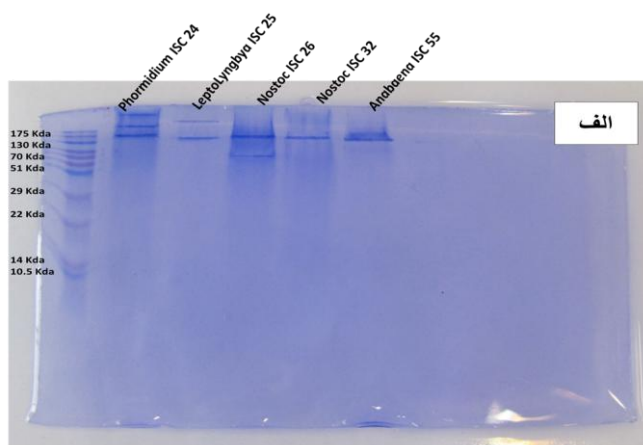


شکل ۲- الف) نمودار GC محیط کشت بدون نفت؛ ب) نمودار GC نفت مورد آزمایش؛ ج) نمودار GC محیط کشت و نفت خام؛ د) نمودار GC نفت باقی مانده در تیمارنمونه *Phormidium* ISC24؛ ز) نمودار GC نفت باقی مانده در تیمارنمونه *Nostoc* ISC32؛ ک) نمودار GC نفت باقی مانده در تیمارنمونه *Anabaena* ISC55؛ و) نمودار GC نفت باقی مانده در تیمارنمونه *Nostoc* ISC26؛ ه) نمودار GC نفت باقی مانده در تیمارنمونه *Leptolyngbya* ISC25.



شکل ۳. حضور ژن *cyp110A2* مربوط به *Anabaena ISC55* در ژل آگارز اولین باند بعد از لدر و باند اختصاصی ژن *cyp110A2* در *Phormidium ISC24* دومین باند بعد از لدر.

مقایسه نتایج الکتروفورز SDS-PAGE قبل و بعد از مواجهه سیانوباکتری‌ها با نفت نشان داد میزان بیان پروتئین‌ها بر اثر تیمار نفت تغییر کرده است. همه باندها در نمونه بدون تیمار در ۱۳۰ کیلو دالتون مشاهده شدند، در حالی که بعضی از باندها در روز ۱۴ پس از تیمار با نفت خام به ۱۷۵ کیلو دالتون منتقل شدند و علاوه بر آن باندهای سنگین‌تر نیز مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴. SDS Page پروتئین‌ها در سیانوباکتری‌ها؛ الف- پس از ۱۴ روز تیمار با نفت خام، ب- قبل از تیمار سلول‌ها با نفت.

جدول ۲. میزان کل هیدروکربن‌ها ی نفت پس از ۲۸ روز

نمونه	میزان کل هیدروکربن (TPH)	درصد هیدروکربن‌ها
<i>Phormidium</i> ISC24	۱۷۵۹	۳۸/۱۳
<i>Leptolyngbya</i> ISC25	۲۰۷۵	۴۴/۹۷
<i>Nostoc</i> ISC26	۲۱۴۱	۴۶/۴۱
<i>Nostoc</i> ISC32	۲۱۱۵	۴۵/۸۴
<i>Anabaena</i> ISC55	۷۴۳	۱۶/۱۱
نمونه فاقد نفت	۰	۰
نمونه کنترل حاوی نفت	۳۴۳۷	۷۴/۴۹
نمونه نفت	۴۶۱۴	۱۰۰

### بحث

سیتوکروم‌ها گروهی از هموپروتئین‌های دارای فعالیت اکسیژنازی می‌باشند که در بیشتر نمونه‌های زیستی مشاهده می‌شوند (Nebert *et al.*, 1989). تاکنون بیش از ۱۱۰۰۰ ژن کد کننده سیتوکروم یافته شده است که در حدود ۹۷۷ خانواده توزیع شده‌اند. خانواده‌های سیتوکروم‌ها بر اساس مشابهت توالی‌ها و بر پایه نوع پروتئین ناقل الکترون و سیستم تحویل الکترون (Hanneman *et al.*, 2007) نام‌گذاری می‌شوند (Nelson *et al.*, 1996). تعیین خصوصیات ساختارهای کریستالی چندین سیتوکروم نشان داده است که این مولکول‌ها دارای منحصر به فردترین پیچ خوردگی‌هایی می‌باشند که تاکنون در یک خانواده آنزیمی مشاهده شده است (Lamb *et al.*, 2007).

سیتوکروم‌ها در سه عمکرد اساسی در موجودات زنده شرکت می‌کنند. اول اینکه آنها در سنتز متابولیت‌های اولیه ضروری نظیر هورمون‌های استروئیدی که برای رشد و تمایز و تنظیم هموستازی پستانداران مورد نیاز می‌باشند دخالت می‌کنند. ثانیاً آنها مسئول پاسخ به عوامل خارجی و سم زدایی مولکول‌های خارجی بوده و بالاخره نقش آفرینان اصلی در بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که نقششان ممکن است تاکنون مشخص نشده باشد اما بسیاری از این متابولیت‌های ثانویه دارای نقش‌های بسیار مفیدی به عنوان دارو هستند (Lamb *et al.*, 2007; Lammers *et al.*, 1990).

متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاهان و میکروب‌ها که حاصل از فعالیت مشخص سیتوکروم‌ها می‌باشد شامل ایزوپروپونیدها، آلکالوئیدها، فنیل پروپنوییدها و اسیدهای چرب و مسیر سنتز پلی‌کتایدها می‌شوند (Edwards *et al.*, 2004). از محصولات مفید دارویی که به وسیله سیتوکروم‌ها کاتالیز می‌شوند می‌توان به کدیین و مورفین و اریتروماپسین اشاره کرد (Cupp-Vickery and Poulos, 1995; Unterlinner *et al.*, 1999) که امروزه کاربردهای وسیعی در پزشکی دارند. چندین نوع ژن سیتوکروم و ژن شبه سیتوکروم تاکنون در ژنوم سیانوباکتری‌ها تعیین شده، هرچند تاکنون توجه اندکی نسبت به خصوصیات کارکردی آنها معطوف گردیده است.

تاکنون ۱۰۰ نوع پروتئین سیتوکروم در سیانوباکتری‌ها شناسایی شده است که ۶۳ توالی از ۱۰۰ توالی شناخته شده مورد تعیین خصوصیات قرار گرفته. از این تعداد تقریباً نیمی از آنها به خانواده *CYP110* و ۱۲ تا از آنها به *CYP213* تعلق دارد.

این در حالی است که *CYP120* دارای ۱۰ عضو می باشد. از خانواده سیتوکروم *CYP110*، سیتوکروم *CYP110HC* از 7120 *Nostoc* sp. PCC شباهتی به سایر سیتوکروم‌های باکتریایی ندارد و یک آنزیم سیتوزولیک نیست بلکه متصل به غشا است و شبیه سیتوکروم‌های یوکاریوتی می باشد. این سیتوکروم به وسیله آلکان‌ها القا نمی شود و در تجزیه زیستی آلکان‌ها نیز شرکت نمی کند اما در امگا هیدروکسیلاسیون رشته های طولیل اسیدها چرب شرکت می کند و یک نقش کلیدی را در تثبیت ازت ایفا می کند (Torres et al., 2005).

سیانوباکتری‌های دریایی از جنس های *Microcoleus* و *Phormidium* که به عنوان زیست تجزیه آلودگی نفتی با استفاده از *CYP* به عنوان کاتالیست برای شکستن آلکان‌ها نقش دارند (Cardini and Jurtschuk, 1968). ژن سیتوکروم ۱۱۰ به صورت بسیار حفظ شده است و در شکل گیری هتروسیست سیانوباکتری‌های *Anabaena*، *Calothrix*، *Nostoc* و *Fremyella* نقش دارد. توالی اسیدهای آمینه *CYP110* بیشترین شباهت را با خانواده سیتوکروم P450 پستانداران و *Bacillus megatarium* P450 دارند. اولین مرحله از تجزیه آلکان‌ها در بسیاری از سیستم‌های میکروبی یک هیدروکسیلاسیون وابسته به p450 است (Lamb et al., 2007; Harel et al., 2004). *CYP110A2* از نظر توالی سرتاسری مشابهت کمی با سایر آنزیم‌های آلکان هیدروکسیلاز نظیر خانواده *CYP52* دارد (Scheller et al., 1996)، با این حال در تحقیق حاضر ارتباط مستقیمی بین حضور ژن *cyp110A2* و میزان تجزیه انواع هیدروکربن‌های موجود در نفت خام دیده شد، بنابراین حضور ژن *cyp110A2* می تواند به عنوان شاخص در تعیین نمونه‌های فعال در تجزیه نفت مورد استفاده قرار گیرد.

میزان بیان پروتئین‌ها بر اثر تیمار نفت تغییرات مشخصی را نشان داد و پس از تیمار با نفت خام باندهای ۱۷۵ کیلودالتون و باندهای سنگین تر مشاهده شدند. نفت خام همیشه با مقادیر زیادی نمک همراه است که این امر سبب تنش شوری و تغییر بیان پروتئین‌ها در پاسخ به تنش شوری شده و در بیشتر سیانوباکتری‌ها این تنش سبب تغییر بیان پروتئین‌ها و ایجاد باندهای پروتئینی سنگین تر می شود که در مطالعه حاضر نیز نظیر آن مشاهده شد (Kumar and Bhagwat, 1989). معمولاً پس از آستانه‌ای که در آن پروتئین‌های تنش القا می شوند افزوده شدن بر غلظت نفت می تواند سبب کاهش چشمگیر در رشد و سپس مضمحل شدن سیانوباکتری شود.

در مجموع از نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان اینگونه برداشت کرد که گونه *Anabaena* ISC55 در طی این دوره ۲۸ روزه از چهارگونه مورد بررسی دیگر موثرتر بوده است. خود تجزیه پذیری نفت، میزان هیدروکربن‌های باقیمانده را به ۷۴/۴۹ درصد کاهش می دهد در حالیکه حاصل عملکرد *Anabaena* ISC55 سبب می شود هیدروکربن باقیمانده به ۱۶/۱۱ درصد برسد. مطالعاتی با نتایج مشابه این تحقیق وجود دارد (Galindo et al., 2011; Odkuma and Smith, 2007). نتایج پژوهش حاضر نشان میدهد که دو گونه *Nostoc* بومی ایران ISC26 و ISC32 قادرند  $C_{35}$  را به طور کامل تجزیه کنند. تفاوت مشاهده شده بین نتایج این پژوهش با مطالعات دیگر می تواند ناشی از تفاوت در شرایط آزمایش، اکوسیستم، میکروارگانیسم‌ها و تفاوت‌های فیزیولوژیکی و آنزیمی آنها باشد و می تواند تایید کند که سیانوباکتری‌های بومی ایران بر نفت خام ایران اثر تجزیه زیستی دارند البته باید در نظر داشت که غلظت نفت موجود در مناطق آلوده نفتی بر میزان تجزیه‌کنندگی نفت به وسیله این سیانوباکتری‌ها تاثیر مستقیم دارد. در مناطق آلوده، کاهش غلظت نفت به وسیله روش‌های فیزیکی می تواند زمینه را برای تجزیه زیستی نفت فراهم سازد. بر این اساس می توان از این گونه‌ها برای حذف آلودگی‌های نفتی آب و خاک در مناطق نفتی جنوب کشور استفاده کرد.

## منابع

- Alemagi, D. 2007. The oil industry along the Atlantic coast of Cameroon: assessing impacts and possible solutions. *Resources Policy*. 32(3): 135-45.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal culturing techniques*. First Edition. Academic Press. 70p.
- Cardini, G., Jurtschuk, P. 1968. Cytochrome P-450 involvement in the oxidation of n-octane by cell-free extracts of *Corynebacterium* sp. strain 7E1C. *Journal of Biological Chemistry*. 243: 6070-6072.



- Cupp-Vickery, J.R., Poulos, T.L. 1995. Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2: 144-153.
- Edwards, D.J., Marquez, B.L., Nogle, L.M., McPhail, K., Goeger, D.E., Roberts, M.A., Gerwick, W.H. 2004. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chemistry & Biology*. 11: 817-833.
- Das, N., Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*. doi:10.4061/2011/941810.
- Ferris, M.J., Hirsch, C. 1991. Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*. 57(5): 1448-52.
- Galindo, H., Revah, S., Cervantes, F., Arriaga, S. 2011. Effect of surfactant and oil additions in the biodegradation of hexane and toluene vapours in batch tests. *Environmental Technology*. 32(2): 167-73.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R. 2007. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1770(3): 330-44.
- Harel, Y., Ohad, I., Kaplan, A. 2004. Activation of photosynthesis and resistance to photoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust. *Plant Physiology*. 136(2): 3070-3079.
- Kumar, S., Bhagwat, A. 1989. Salinity-Stress-Induced Proteins in two Nitrogen-Fixing *Anabaena* strains differentially tolerant to salt. *Journal of Bacteriology*. 171(2): 909-915.
- Lamb, D.C., Waterman, M.R., Kelly, S.L., Guengerich, F.P. 2007. Cytochromes P450 and drug discovery. *Current Opinion in Biotechnology*. 18: 504-512.
- Lammers, P.J., McLaughlin, S., Papin, S., Trujillo-Provencio, C., Ryncarz, A.J. 1990. Developmental rearrangement of cyanobacterial nif genes: nucleotide sequence, open reading frames, and cytochrome P-450 homology of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 nifD element. *Journal of Bacteriology*. 172(12): 6981-6990.
- Mostafa, M. 2012. Biodegradation of Phenolic and Polycyclic Aromatic Compounds by Some Algae and Cyanobacteria. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 3:133. doi:10.4172/2155-6199.1000133.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Feyereisen, R. 1989. Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica*. 19(10): 1149-1160.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W. Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Estabrook, R.W., Neberet, D.W. 1996. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6: 1-42.
- Odokuma, L., Smith, V. 2007. Biodegradation of a Nigerian crude oil by a microalga and a cyanobacterium. *Tropical Freshwater Biology*. 16(1): 17-30.
- Pimda, W., Bunnag, S. 2012<sup>a</sup>. Biodegradation of used motor oil by single and mixed cultures of cyanobacteria. *African Journal of Biotechnology*. 11(37): 9047-78.
- Pimda, W., Bunnag, S. 2012<sup>b</sup>. Biodegradation of used motor oil by *Nostoc piscinale* TISTR 8401. *African Journal of Microbiology Research*. 6(10): 2367-72.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 203 p.
- Scheller, U., Zimmer, T., Kargel, E., Schunck, W.H. 1996. Characterization of the n-alkane and fatty-acid hydroxylating cytochrome-p450 forms 52A3 and 52A4. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 328(2): 245-254.
- Torres, S., Fjetland, C.R., Lammers, P.J. 2005. Alkane-induced expression, substrate binding profile, and immunolocalization of a cytochrome P450 encoded on the nifD excision element of *Anabaena* 7120. *BMC Microbiology*. 5: 1-12.
- Unterlinner, B., Lenz, R., Kutchan, T.M. 1999. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase. *The Plant Journal*. 18: 465-475.
- Watson, J., Jones, D., Swannell, R., Van Duin, A. 2002. Formation of carboxylic acids during aerobic biodegradation of crude oil and evidence of microbial oxidation of hopanes. *Organic Geochemistry*. 33(10): 1153-69.