Journal of Microbial World
Volume 15, No. 3, December 2022

Original Article

Investigation of microbial diversity and prediction of functional genes involved in aromatic hydrocarbon degradation in Nyband Gulf

Mahsa Harirforoush[1], Mohammad Ali Amoozegar[2], Mahmoud Shavandi[3], Parvaneh Saffarian[4]

[1]Ph.D Candidate, Department of Biology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Professor, Department of Microbiology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. [3]Associate professor Microbiology and Biotechnology Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran. [4]Assistant assistant professor, Department of Biology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objective: Nayband Gulf is subjected to oil pollution due to the proximity to Assaluyeh industrial region. Prolonged exposure to contaminants affects the microbial population and shifts the population to the predominance of oil-degrading microbes. In this study, we investigate the microbial diversity in Nayband Gulf waters and predict the genes involved in aromatic hydrocarbon degradation under aerobic and anaerobic conditions.

Materials & Methods: Phenol-chloroform method was performed for extracting DNA from the Nayband Gulf water sample. Extracted DNA sequencing was performed by new generation sequencing technique. Then 16S rRNA gene-based amplicon sequencing was analyzed. Functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons under aerobic and anaerobic conditions were predicted from 16S rRNA gene sequences.

Results: Our findings indicate that aromatic hydrocarbons contamination in Nayband Gulf water resulted in the enrichment of Oceanospirillales (24.67%), Cellvibrionales (28.95%), SAR11 clade (20.97%), Rhodobacterales (6.17%), Rhodospirillales (7.12%) and Flavobacteriales (5.50%). Alphaproteobacteria (26.18%) and Gammaproteobacteria (42.23%) had the highest percentage. According to Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States, the genes involved in degradation of naphthalene under anaerobic conditions were most abundant in the sample.

Conclusion: The results of this study showed that long-term exposure to oil pollution and oil spills affects the microbial population. The microbial population of Nayband Gulf region, due to its proximity to the South Pars oil & gas region and the entry of oil pollutants into the water, has caused the domination of petroleum hydrocarbons degrading bacteria.

Keywords: Oil contamination, Next generation sequencing, Nayband Gulf, Aromatic hydrocarbons, microbial diversity, functional genes.

Received: 18 May 2022 Revised: 10 August 2022 Accepted: 6 November 2022

Correspondence to: Mohammad Ali Amoozegar
Tel: +98 2166113557
E-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Journal of Microbial World 2022, 15(3): 43-55
DOI:10.30495/jmw.2022.1958743.2019

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره سوم (پیاپی ۵۲) پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۵۵-۴۳

Original Article

بررسی تنوع میکروبی و پیش‌بینی ژن‌های عملکردی موثر در تجزیه ترکیبات آروماتیک در آب خلیج نایبند

مهسا حریرفروش[۱]، محمدعلی آموزگار[۲*]، محمود شوندی[۳]، پروانه صفاریان[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲]استاد، گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران. [۳]دانشیار، گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران. [۴]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: خلیج‌نایبند به دلیل مجاورت با منطقه صنعتی عسلویه در معرض آلاینده‌های نفتی است. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آلاینده‌ها بر جمعیت میکروبی تأثیر می‌گذارد و جمعیت را به سمت میکروب‌های تجزیه کننده نفت سوق می‌دهد. در این مطالعه به بررسی تنوع میکروبی در آب‌های خلیج نایبند و پیش‌بینی ژن‌های عملکردی موثر در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها: برای استخراج DNA از نمونه آب خلیج‌نایبند از روش استاندارد فنل‌کلروفرم استفاده شد. توالی یابی DNA استخراج شده با تکنیک توالی‌یابی نسل جدید انجام شد. سپس قطعه مبتنی بر ژن ۱۶S rRNAتجزیه وتحلیل شد. همچنین پیش‌بینی ژن‌های عملکردی موثر در تخریب هیدروکربن‌های آروماتیک تحت شرایط هوازی و بی‌هوازی انجام شد.

یافته‌ها: آلودگی هیدروکربن‌های آروماتیک در آب خلیج‌نایبند منجر به غالب‌شدن اعضای اشنوسپیرالس Oceanospirillales (۲۴/۶۷٪)، سلویبریونالس Cellvibrionales (۲۸/۹۵٪)، سار۱۱-کلد SAR11 clade (۲۰/۹۷٪)، رودوباکتریالس Rhodobacterales (۶/۱۷٪)، رودواسپیرالس Rhodospirillales (۷/۱۲٪) و فلاووباکتریالس Flavobacteriales (۵/۵٪) شده است. رده‌های آلفاپروتئوباکتریا Alphaproteobacteria (۲۶/۱۸٪) و گاماپروتئوباکتریا Gammaproteobacteria (۴۲/۲۳٪) بیشترین فراوانی را داشتند. با توجه به آنالیز داده‌ها (PICRUSt) ژن‌های موثر در تجزیه نفتالین در شرایط بی‌هوازی بیشترین فراوانی را در نمونه داشتند.

نتیجه‌گیری: قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آلودگی نفتی بر جمعیت میکروبی تأثیر می‌گذارد. جمعیت میکروبی منطقه نایبند نیز به دلیل مجاورت با منطقه نفتی پارس جنوبی و ورود آلاینده‌های نفتی به آب در جهت غالب شدن اعضای تجزیه کننده هیدروکربن‌ها پیش رفته است.

واژگان کلیدی: آلودگی نفت، توالی‌یابی نسل جدید، خلیج‌نایبند، هیدروکربن‌های آروماتیک، تنوع میکروبی، ژن‌های عملکردی.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۲۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۵/۱۹ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۱۵

مقدمه

آلودگی محیط زیست دریایی از طریق نشت نفت خام، بیش از یک میلیون تن در سال در سطح جهان تخمین زده می‌شود که باعث تأثیرات پایدار و شدید بر اکوسیستم‌ها و شبکه‌های غذایی دریاها می‌شود (۱). از جمله دلایل نشت نفت تراوش‌های طبیعی و انتشار لایه‌های دارای نفت در اعماق دریاست که می‌توانند به سطح آب انتقال پیدا کنند. همچنین

*) آدرس برای مکاتبه: بخش میکروبیولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱۶۶۱۱۳۵۵۷ پست الکترونیک: amoozegar@ut.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

تانکرهای حمل نفت و کشتی‌های نفت کش، نشت تصادفی در خط لوله‌های احداث شده به منظور انتقال نفت به پالایشگاه و تخلیه پساب‌های پالایشگاه به دریاها، از علل آلودگی‌های نفتی دریاها می‌باشند (۲). یکی از علل عمده نگرانی‌ها در دوران اخیر حضور هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در آب است. وجود آن‌ها در محیط زیست به علت سمیت زیاد، اثرهای سرطان‌زایی و تخریب‌های زیست محیطی یک نگرانی بزرگ به شمار می‌رود (۳). هنگامی که نفت از منابع طبیعی یا مصنوعی وارد آب می‌شود، شروع به تجزیه می‌کند که بسته به شرایط از چند روز تا چند دهه طول می‌کشد. فرآیندهایی که نفت را در محیط پخش می‌کنند معمولاً این تخریب را تسریع می‌کنند. با این حال عوامل دیگری مانند دمای پایین آب می‌تواند این فرآیندها را مهار کنند. پخش شدن، تبخیر، پراکندگی، امولسیون سازی، انحلال، اکسیداسیون، ته نشینی و تجزیه زیستی از جمله فرآیندهای انتشار نفت در آب می‌باشند (٤). هنگامی که بخشی از ترکیبات نفتی در آب حل می‌شوند، به دلیل ویسکوزیته پایین نفت، به راحتی توسط باد و جریانات آبی به سایر نقاط منتقل می‌شوند و به سرعت باعث انتشار آلودگی می‌شوند (۵).

تجزیه هیدروکربن‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها مدت هاست به عنوان مکانیسمی برای نجات محیط‌های دریایی آلوده به نفت شناخته شده است (۱). باکتری‌های فراوانی شناسایی شده‌اند که از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند و توانایی حذف این ترکیبات سمی را دارند (٦). از مهمترین باکتری‌هایی که در محیط‌های آلوده به نفت یافت می‌شوند و می‌توان آن‌ها را به عنوان شاخصی از آلودگی نفتی در محیط دانست، اعضای راسته آلترومونادلس (Alteromonadales)، Rhodobacterales و Oceanospirillales می‌باشند (۷). فرایند تجزیه هوازی هیدروکربن‌های آروماتیک توسط باکتری‌ها با اکسیداسیون این ترکیبات آغاز می‌شود. به این صورت که ابتدا دو مولکول اکسیژن به یکی از حلقه‌های بنزن متصل می‌شود و از طریق آنزیم دی اکسیژناز، سیس دی هیدرودیول تولید می‌شود. خانواده اسفینگوموناداسه (Sphingomonadaceae) از شناخته شده‌ترین میکروارگانیسم‌ها در این مسیر می‌باشد. ترکیب سیس دی هیدرودیول توسط آنزیم دهیدروژناز به دی هیدروکسی آروماتیک (کاتکول) و کاتکول نهایتا به ترکیبات کم خطرتر تبدیل می‌شود و محصولات نهایی وارد چرخه کربس می‌شوند. سپس دومین حلقه بنزنی نیز به همین صورت تجزیه می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده است که اکسیداسیون نفتالین توسط آنزیم دی اکسیژناز توسط جنس‌های سودوموناس (Pseudomonas) و رودوکوکوس (Rhodococcus) انجام می‌شود. در اهداف زیست پالایی می‌توان تولید اکسیژناز توسط باکتری‌ها را با محرک زیستی افزایش داد. تجزیه بی‌هوازی ترکیبات آروماتیک اغلب آهسته‌تر انجام می‌شود. با این وجود در شرایط بی‌هوازی تجزیه بی‌هوازی آروماتیک‌ها توسط باکتری‌های احیاکننده نیترات و سولفات انجام می‌شود (۸). تجزیه در شرایط بی‌هوازی مسیرهای مختلفی دارد و حدواسط‌های متفاوتی ایجاد می‌شود که شناخته شده‌ترین آن‌ها، بنزوئیل-CoA می‌باشد (۹).

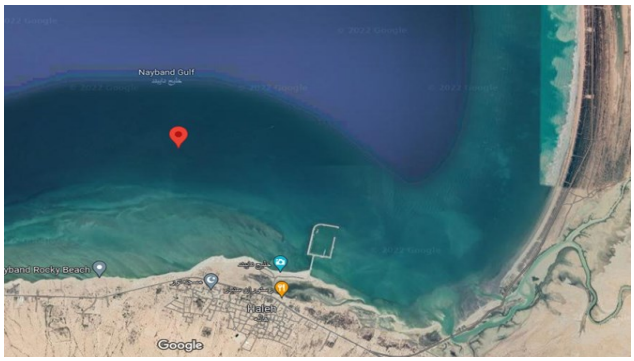
یکی از مناطق سرشار از ذخائر نفت و گاز دنیا منطقه خلیج فارس است. خلیج فارس به عنوان غنی‌ترین حوزه هیدروکربنی جهان شناخته می‌شود (۱۰). از آنجا که منطقه عسلویه در خلیج فارس محل احداث پالایشگاه‌های مجتمع گاز پارس جنوبی و کارخانه‌های متعدد پتروشیمی است، آب‌های این منطقه به طور مستقیم و غیر مستقیم در معرض ورورد انواع آلاینده‌ها می‌باشد. وارد شدن آلاینده‌های نفتی به محیط آبی بر روی تنوع میکروبی آن اکوسیستم اثر گذاشته و باعث تغییر و تحول جمعیت میکروبی می‌شود. خلیج نایبند به علت مجاورت با عسلویه (فاصله ۳۰ کیلومتری از مناطق صنعتی) بیشتر در معرض آلودگی‌های نفتی می‌باشد. طبق مطالعات انجام شده اصلی‌ترین آلاینده در منطقه عسلویه شامل ترکیبات آروماتیک با وزن مولکولی کم هستند که در طولانی مدت بر جمعیت میکروبی آب‌های عسلویه اثر می‌گذارد (۱۱). بنابراین شناخت تنوع میکروبی آب‌های عسلویه و نقش ژن‌های عملکردی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های این منطقه از نظر اکولوژیکی و مدیریت اثرات آلودگی‌های نفتی بسیار حایز اهمیت می‌باشد. از

جمله ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش، ژن‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک (تولوئن، نفتالین، زایلن، فنل) در شرایط هوازی و بی‌هوازی بود.

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص شناسایی تنوع میکروبی خلیج نایبند با روش توالی یابی نسل جدید (NGS) انجام نشده است، هدف از این مطالعه بررسی تنوع میکروبی آب منطقه خلیج نایبند در عسلویه بر اساس توالی‌یابی قطعه ۱۶S rRNA با روش NGS و پیش بینی ژن‌های عملکردی تجزیه‌کننده‌های آروماتیک با نرم افزار پیکراست (PICRUSt) در محیط آبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری: نمونه‌برداری از آب عسلویه (به ترتیب در عرض و طول جغرافیایی ۲۷.۴۱۹۶, ۵۲.۶۲۷۹) درخلیج فارس در مرداد ماه ۱۴۰۰ با استفاده از ظروف نمونه‌برداری نیسکین (Niskin bottle) انجام شد. میزان ۲۰ لیتر آب از عمق ۵ متری جمع‌آوری شد و برای فیلتراسیون مورد استفاده قرار گرفت. فیلتراسیون نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری آغاز شد. میزان ۲۰ لیتر نمونه با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر و با استفاده از پمپ خلاء و قیف استریل، فیلتر شد و زیست توده مربوط به فیلتر به منظور جلوگیری از تغییر جامعه میکروبی، در یخ خشک نگه‌داری شد تا شرایط مناسب برای فریز شدن زیست توده تامین شود. پس از انتقال نمونه به آزمایشگاه پژوهشگاه صنعت نفت، فیلترها برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۷۰- درجه سیلسیوس نگه‌داری شد.



شکل ۱: نقشه موقعیت جغرافیایی محل نمونه‌برداری.

ب) استخراج DNA به روش فنل‌کلروفورم: به منظور استخراج DNA، ابتدا فیلتر یخزده به کمک پنس استریل به چندین تکه کوچک تقسیم و سپس ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج به فالکون اضافه شد. بیدهای شیشه‌ای استریل اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه ورتکس انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از پروتئیناز K و نیز ۵۰ میکرولیتر از لیزوزیم اضافه شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه تا ۱ ساعت به طور ملایم شیک شد. پس از آن مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از ۱۰٪SDS اضافه و مخلوط شده و در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه با شیک ملایم گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعد به نسبت معین کلروفرم اضافه شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و این مرحله دو بار تکرار شد. پس از برداشتن فاز رویی مقدار ۰/۶ نسبت حجم، ایزوپروپانول سرد اضافه شده و نمونه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت یک شب گرمخانه‌گذاری شد. بعد از گذشت مدت زمان لازم، نمونه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس ایزوپروپانول را خالی کرده و اجازه دادیم تا در هوا خشک شود. پس از خشک شدن در ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر از بافر TE حل گردید و تا انجام آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (۱۲).

ج) سنجش غلظت و خلوص DNA استخراج شده: برای ارزیابی خلوص و مقدار DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری (نانودراپ) استفاده شد. ابتدا دستگاه به وسیله آب مقطر استریل کالیبره و سپس جذب نمونه DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده و غلظت اندازه‌گیری شد. سپس، میزان جذب خلوص DNA استخراجی از طریق نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ بررسی شد.

پس از اطمینان از کیفیت و همچنین غلظت مناسب DNA، توالی‌یابی کتابخانه ژنی بخش V_3-V_4ژن ۱۶S rRNA توسط آغازگرهای ۳۴۱F و ۸۰۶R با خوانش‌های ۲۵۰ جفت بازی بر اساس پلتفرم Illumina HiSeq 2500 توسط شرکت Novogene در هنگ‌کنگ انجام شد.

د) آنالیز بیوانفورماتیک: توالی‌یابی آمپلیکون براساس قطعه ژنی ۱۶S rRNAبه وسیله تکنیک NGS راهکاری جدید برای بررسی پروفایل جامعه میکروبی می‌باشد. اگرچه در توالی‌یابی قطعه خاصی از ژنوم تعداد کمی از ژن‌ها بررسی می‌شوند اما در مطالعه فیلوژنتیک، تاکسونومیک و عملکرد جامعه میکروبی بسیار کارا و موثر می‌باشد (۱۳).

در تکنیک NGS، از جمله نرم افزارهایی که برای آنالیز ژن ۱۶S rRNA و بررسی تنوع میکروبی استفاده می‌شود، نرم افزار QIIME2 (version 2022.2) (Quantitative Insights Into MicrobialEcology) می‌باشد. این نرم افزار یک خط مشی بیوانفورماتیک متن باز (Open-source) می‌باشد که با استفاده از داده‌های خام به‌دست‌آمده از تعیین‌توالی ژن ۱۶S rRNA، پروفایل تاکسونومیک را انجام می‌دهد (۱۴). ابتدا باید توالی‌های فاقد کیفیت حذف شوند. با حذف این توالی‌ها حجم کمتری از اطلاعات اما با کیفیت بالاتر برای آنالیز به دست می‌آید. سپس خوانش‌ها توسط نرم افزار FLASH (Fast LengthAdjustment Of Short reads) به منظور ایجاد تگ با هم ادغام می‌شوند. سپس تگ‌های حاصل توسط نرم فزار USEARCH در واحدهای تاکسونومیک عملکردی (Operational Taxonomic Unit (OUT)) با حد آستانه ۹۷٪ دسته‌بندی می‌شوند. نرم افزار QIIME از پایگاه داده Greengenes در بررسی جامعه میکروبی براساس ژن ۱۶S rRNA استفاده می‌کند (۱۵).

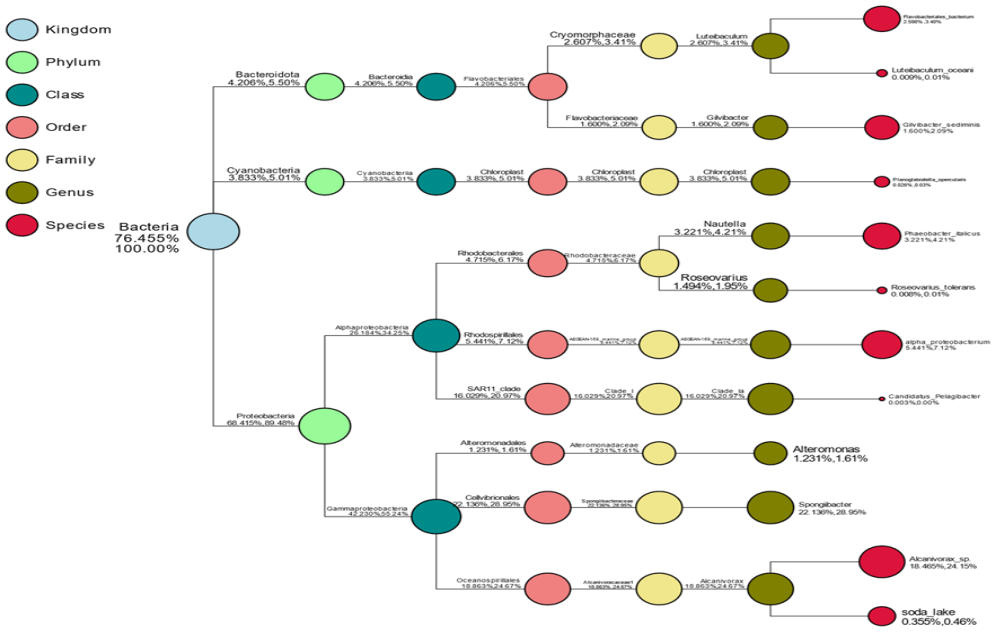
به منظور درک درست از عملکرد و ویژگی‌های متابولیکی جوامع میکروبی، پیش بینی ژن‌های عملکردی در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی به وسیله آنالیز متاژنوم با استفاده از داده‌های ۱۶S rRNA، با نرم افزار PICRUSt (version ۱.۱.۴) انجام شد. با استفاده از این نرم افزار می‌توان از طریق اطلاعات به‌دست‌آمده از توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA، کل ژنوم موجود در محیط و در نتیجه ژن‌های عملکردی در محیط را پیش‌بینی کرد (۱).

ه) آنالیز داده متاژنوم با استفاده از ژن ۱۶S rRNA با نرم‌افزار PICRUSt: به این منظور فایل BIOM به‌دست‌آمده از نرم افزار QIIME که حاوی جدول OUT می‌باشد به عنوان ورودی به PICRUSt داده شد. در PICRUSt برای پیش بینی متاژنوم‌های مربوطه، OTUها با دیتابیس Greengenes نگاشته شده و به هر OUT یک id داده شد. سپس پیش‌بینی ژن‌های عملکردی در محیط به‌وسیله اطلاعات به‌دست‌آمده از تعداد کپی‌نامبر ژن ۱۶S rRNA و با استفاده از دستور predict_metagenomes.py، توسط پایگاه داده KEGG Orthology انجام شد. مشارکت تاکساهای مختلف در Koهای مختلف با دستور metagenome_contributions.py محاسبه شده و به وسیله پکیج ggplot2 در نرم افزار R با دستور plot_metagenome_contributions نمایان شد (۱۶). اطلاعات ژنی و مسیرهای متابولیکی در تجزیه ترکیبات آروماتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی توسط پایگاه داده KEGG Orthology به‌دست آمد.

یافته‌ها

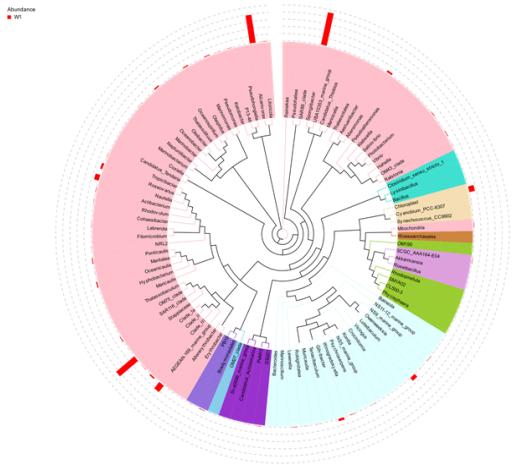
در این پژوهش جمعیت میکروبی و ژن‌های دخیل در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی در نمونه آب خلیج‌نایبند به روش توالی‌یابی نسل جدید مورد مطالعه قرار گرفت. میزان جذب خلوص DNA استخراجی از طریق نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ بررسی شد. براساس نتایج نانودراپ خلوص و مقدار DNA استخراج شده برای توالی‌یابی قطعه ۱۶S rRNA قابل قبول و غلظت DNA استخراج شده ۴۶/۷ ng/µl بود. همچنین OD ۲۶۰/۲۸۰ برابر با ۲/۲۳ و OD ۲۶۰/۲۳۰ برابر با ۰/۰۸ بود.

براساس نتایج NGS، در مجموع ۱۱۱۴۱۸خوانش از توالی‌یابی نمونه حاصل شد. پس از حذف توالی‌های با کیفیت کم و تکراری، در نهایت ۷۷۱۹۷ توالی با میانگین طول ۴۱۷ جفت باز به‌دست آمد. بعد از کنترل کیفی، توالی‌ها با ۹۷٪ شباهت به واحدهای عملکردی تاکسونومیک (OTU) طبقه‌بندی شدند. درخت تاکسونومی بر اساس ۱۰ گونه با فراوانی بالا به‌وسیله نرم افزار RSTUDIO رسم شد (شکل ۲).



شکل ۲: درخت تاکسونومی براساس ۱۰ گونه با فراوانی بالا در نرم افزار RSTUDIO. رنگ‌های مختلف نماینده رتبه‌های متفاوت طبقه‌بندی، اندازه دایره‌ها نشانگر فراوانی نسبی گونه‌ها، عدد اول زیر نام تاکسونومیک نشانگر درصد در کل تاکسون، و عدد دوم درصد در تاکسون انتخاب شده است.

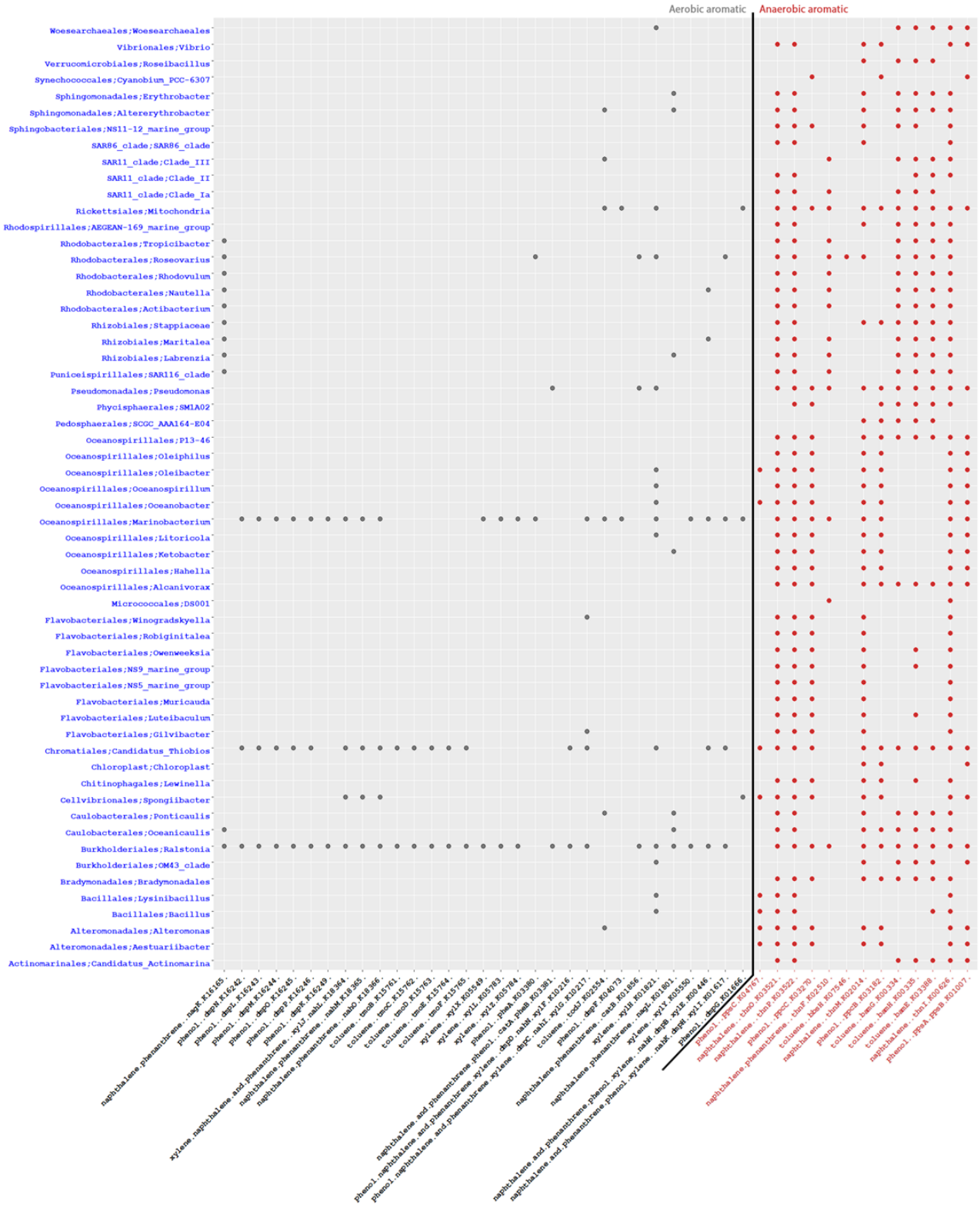
براساس داده‌های به‌دست‌آمده از درخت تاکسونومی (شکل ۲)، بیشترین راسته به ترتیب مربوط به Cellvibrionales با فراوانی ۲۸/۹۵٪، Oceanospirillales ۲۴/۶۷٪ و SAR11 clade ۲۰/۹۷٪ می‌باشد. رده‌های Alphaproteobacteria با فراوانی ۱۸/۲۶٪ و Gammaproteobacteria با فراوانی ۴۲/۲۳٪ بیشترین فراوانی را داشتند.



شکل ۳: تفسیرOTU های موجود در نمونه (در سطح جنس و گونه)، نمودار هیستوگرامی نشان دهنده فراوانی هرOTU می‌باشد. رسم با نرم افزار RSTUDIO.

نتایج شکل ۳، OTUهای موجود در نمونه آب را در سطح جنس و گونه بیان می‌کند. بر این اساس، بیشترین درصد فراوانی به‌ترتیب متعلق به جنس‌های اسپانجی باکتر (Spongiibacter) ۲۲٪، آلکانیووراکس (Alcanivorax) ۱۸/۸۶٪، Clade_Ia ۱۶/۰۲٪، AEGEAN-169_marine_group ۵/۴٪ می‌باشد. همچنین گونه‌های کلروپلاست (Choloroplast)، نائوتلا (Nautella)، جیلویباکتر (Gilvibacter) و آلتروموناس (Alteromonas) به‌ترتیب با فراوانی‌های ۳٪ ، ۳٪، ۱/۵٪، ۱٪ در نمونه وجود دارند. سایر گونه‌ها کمتر از ۱٪ دارند. ۰/۰۶٪ از پروفایل میکروبی متعلق به قلمرو آرکی‌ها می‌باشد که شامل راسته Nitrosopumilales و Woesearchaeales هستند. تنوع آلفا در واقع معیاری از غنای گونه می‌باشد وهر چه مقدار آن بیشتر باشد، نشان‌دهنده تنوع بیشتر گونه‌های موجود در آن نمونه است (۱۷).

براساس شکل ٤، پیش بینی می‌شود که ژن‌های تجزیه‌کننده نفتالین، فنل و تولوئن در شرایط بی‌هوازی در اکثر گونه‌ها وجود دارد. همچنین ژن تجزیه‌کننده نفتالین در شرایط هوازی در بیشتر گونه‌ها وجود دارد.



شکل ٤: پیش‌بینی حضور و یا عدم حضور آنزیم‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک در آب خلیج‌نایبند در منطقه عسلویه. ردیف‌ها نشان‌دهنده باکتری‌ها بر حسب گونه می‌باشد. وجود نقاط نشان‌دهنده حضور آنزیم‌ها می‌باشد. هر ستون نام آنزیم تجزیه‌کننده است که ابتدا نام ترکیب تجزیه‌شونده، نام آنزیم و سپس شماره دسترسی KEGG orthologous آن آورده شده است. آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی به ترتیب با رنگ مشکی و قرمز نشان داده شده است. این نمودار با پکیج ggplot2 در Rstudio نمایش داده شده است.

جنس روزئوواریوس (Roseovarius) آنزیم‌های مربوط به ژن‌های تجزیه‌کننده نفتالین، فنل، زایلن در شرایط هوازی و تولوئن و نفتالین در شرایط بی‌هوازی را دارد. جنس مارینوباکتریوم (Marinobacterium) که از اعضای راسته Oceanospirillales می‌باشد اکثر ژن‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها را در ژنوم خود دارد. پیش‌بینی می‌شود این جنس تجزیه‌کننده فنل، زایلن، نفتالین در شرایط هوازی و فنل و نفتالین در شرایط بی‌هوازی باشد.Sar11 که از رده Alphaproteobacteria فراوان ترین هتروتروف در محیط‌های دریایی می‌باشد و حساسیت بالقوه به آلاینده‌های نفتی دارد (۱۸). راسته بورخولدریالس (Burkholderiales)، توانایی تجزیه طیف وسیعی از ترکیبات به‌ویژه ترکیبات آروماتیک را به عنوان منبع کربن و انرژی دارد.

به منظور آنالیز تنوع گونه‌ای در یک نمونه از تنوع آلفا استفاده می‌شود که توسط چندین شاخص بررسی می‌شود. شاخص‌های تنوع آلفا شامل گونه‌های مشاهده شده، شانون (Shannon)، chao1، ACE و سیمپسون می‌باشد. تنوع یک جامعه با چهار شاخص اول رابطه مستقیم و با شاخص سیمپسون (simpson) رابطه عکس دارد (۱۹). در این نمونه گونه‌های مشاهده شده Chao1 و ACE نشان‌دهنده غنای گونه‌ای جامعه میکروبی است. شاخص‌های آماری تنوع آلفا با آستانه خوشه‌بندی ۹۷٪ شامل شاخص شانون، سیمپسون، گونه‌های مشاهده شده، ACE و chao1 به ترتیب ٤/٢٨٦، ۰/۰۸۸۸، ۲۹۱، ۲۹۱.۰۰۰ و ۲۹۱.۰۰۰ بود.

بحث

میکروبیوم دریایی یک زیستگاه پیچیده و کمتر شناخته شده است که نقش مهمی در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی جهانی ایفا می‌کند (۲۰). عسلویه میزبان طیف گسترده‌ای از صنایع گاز طبیعی و پتروشیمی است و آب اطراف آن در معرض آلودگی ترکیبات آروماتیک قرار دارد (۱۱). هیدروکربن‌های آروماتیک ترکیباتی سبک و از اجزای رایج نفت خام هستند و گروهی از آلاینده‌های آلی پایدار را تشکیل می‌دهند. وجود ترکیبات آروماتیک و پساب‌های حاصل از پالایشگاه‌های گازی در مدت زمان طولانی بر روی جمعیت میکروبی تاثیر گذاشته و باعث تغییر میکروبیوم این آب‌ها می‌شود (۲۱).

میکروارگانیسم‌ها حاوی آنزیم‌هایی هستند که قادر به تجزیه هیدروکربن‌ها در شرایط هوازی و بی‌هوازی بوده و از آن‌ها به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (۲۲).

نتایج حاصل از NGS در این مطالعه نشان داد که مواجهه میکروارگانیسم‌ها با آلاینده‌های نفتی باعث تغییر پروفایل میکروبی به سمت غالب شدن اعضای Oceanospirillales، Cellvibrionales، SAR11_clade، Rhodobacterales، Rhodospirillales و Flavobacteriales در نمونه آب عسلویه شده است. رده Gammaproteobacteria حاوی متنوع‌ترین و مهمترین باکتری‌های اجباری تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها (Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria (OHCB)) می‌باشند که نقش عمده‌ای در زیست پالایی ترکیبات نفتی در اکوسیستم دریایی ایفا می‌کنند و در محیط‌های نفتی به شدت غنی می‌شوند. اعضای راسته Oceanospirillales، Cellvibrionales و Alteromonadales که متعلق به رده Gammaproteobacteria می‌باشند از جمله باکتری‌های اجباری تجزیه‌کننده‌های هیدروکربن‌ها هستند که تنها در حضور هیدروکربن‌ها رشد می‌کنند و به عنوان شاخص محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی در نظر گرفته می‌شوند (۲۳). جنس‌های Alcanivorax، Spongiibacter و Alteromonas به ترتیب از شناخته‌شده‌ترین جنس‌های این اعضا می‌باشند که مطابق شکل ٤ پیش‌بینی می‌شود اکثر ژن‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک را در ژنوم خود دارند. اکثر گونه‌های باکتریایی ژن‌های تجزیه‌کننده فنل در شرایط بی‌هوازی شامل ژن‌های *pps* (زیرواحدهای A، B و C) و *ppc* (زیرواحدهای B و C) را دارند. همچنین ژن‌های تجزیه‌کننده نفتالین در شرایط بی‌هوازی شامل ژن *thn* (زیرواحدهای O، P، F، M و I) در اکثر گونه‌های باکتریایی وجود دارد. ژن *bam* (زیرواحدهای E، H، G) که تجزیه‌کننده تولوئن در شرایط بی‌هوازی می‌باشد در اکثر گونه‌های باکتریایی یافت می‌شود. در زیستگاه‌های دریایی،

فراوانی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات آلی کم است که در مواجهه با نفت غالب می‌شوند (۲۴). مقادیر بالای ترکیبات آلیفاتیک معمولا منجر به غنی شدن اعضای Oceanospirillales می‌شود در حالی که Cellvibrionales، Alteromonadales و Rhodospirillales اعضای غالب در نمونه‌های آلوده به ترکیبات پلی‌آروماتیک هستند (۱۱). Cellvibrionales با درصد فراوانی حدود ۲۲/۱۳ در نمونه آب عسلویه دارای ژن‌هایی برای تجزیه ترکیبات آروماتیک می‌باشد که این موضوع بیان کننده آلودگی بالای آب‌های عسلویه به ترکیبات آروماتیک است. هنگام آلودگی دریا با آلاینده‌های نفتی اعضای Oceanospirillales افزایش می‌یابند، بنابراین افزایش آن‌ها نشان‌دهنده آلودگی جدید در منطقه در هنگام نمونه‌برداری است (۲۵).

سرعت و کارایی فرآیند تجزیه زیستی به عوامل متعددی مانند pH، محتوای اکسیژن، دما، در دسترس بودن و غلظت آلاینده‌ها و تنوع و ساختار جامعه میکروبی موجود در منطقه آلوده بستگی دارد. دما از عوامل تاثیرگذار در تجزیه زیستی می‌باشد. حلالیت آلاینده‌ها با افزایش دما بیشتر شده و در نتیجه دسترسی زیستی به آلاینده‌ها افزایش می‌یابد. اما با افزایش دما حلالیت اکسیژن کاهش می‌یابد و این امر متابولیسم هوازی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در عدم حضور اکسیژن پذیرنده نهایی الکترون مانند سولفات و نیترات برای اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات نشان داده است که تجزیه بی‌هوازی ترکیبات آروماتیک در شرایط احیاکننده سولفات و نیترات رخ می‌دهد (۲۶). در مطالعه حاضر با توجه به نتایج به دست آمده، اکثر باکتری‌ها قادر به تجزیه ترکیبات آروماتیک در شرایط بی‌هوازی بودند. از آنجا که نمونه‌گیری در فصل گرم سال انجام شده می‌توان ادعا کرد بالا بودن دمای آب می‌تواند از عوامل تاثیرگذار بر تجزیه آلاینده‌ها در شرایط بی‌هوازی باشد. همچنین از آنجا که ژن‌های تجزیه کننده نفتالین در شرایط بی‌هوازی فراوان‌ترین ژن‌ها در نمونه می‌باشد، می‌توان بیان کرد آب‌های خلیج نایبند آلودگی بالایی به آلاینده نفتالین دارند.

در مطالعه متاژنومی که توسط رضایی (Rezaei) و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی آب و رسوب خلیج فارس انجام شد، جمعیت میکروبی غالب در آب‌های عسلویه شامل Alteromonadales، SAR86، ترموپلاسماتا (Thermoplasmata)، Rhodobacterales و Flavobacteriales بودند (۱۱).

در سال ۲۰۲۰ مطالعه‌ای توسط فرناندز (Fernandes) و همکاران در خصوص تنوع میکروبی آب‌های عرب و خلیج بنگال بر اساس توالی‌یابی ژن ۱۶srRNA انجام شد. در سطح شاخه اکثر OTUها شامل Bacteroidetes، Chloroflexi Cyanobacteria، (مارینو باکتریا) Marinimicrobia، Planctomycetes و Proteobacteria بودند (۲۷).

باکوسا (Bacosa) و همکاران در سال ۲۰۱۸ به مطالعه متاژنومی در خصوص جمعیت میکروبی رسوبات خلیج مکزیک در نزدیکی نشت نفت Deepwater horizon پرداختند. این مطالعه نشان داد که با تخریب هیدروکربن‌ها در طی چندین سال در آن منطقه، جامعه میکروبی به سمت غالب‌شدن اعضای Colwelliaceae، Alteromonadaceae، Methylococales، Alcanivorax، Bacteriovorax و Phaeobacter رفته است (۲۸).

در مطالعه حاضر باکتری Alcanivorax که به عنوان یک باکتری تجزیه کننده هیدروکربن در محیط‌های دریایی آلوده به نفت خام شناخته شده است فراوانی در حدود ۱۸/۶۸٪ داشت که نشان‌دهنده آلودگی آب عسلویه به ترکیبات نفتی می‌باشد. در واقع گونه‌های Alcanivorax زمانی که مواد مغذی نیتروژن و فسفر به مقدار کافی وجود داشته باشد به جمعیت باکتریایی غالب در آب دریای آلوده به نفت تبدیل می‌شوند (۲۹).

میلر (Miller) و همکاران در سال ۲۰۱۹، پاسخ جمعیت میکروبی تجزیه‌کننده هیدرکربن‌ها را در شرایط هوازی و بی‌هوازی در دریای خزر بررسی کردند. نمونه آب خزر برای مطالعه درمیکروکازم جمع‌آوری شد. مطالعه توالی‌یابی آمپلیکون ۱۶SrRNA با تکنیک NGS از آب‌های خزر حضور رده‌های Flavobacteriales، (اکتینومایسلاتس) Actinomycetales و

Oceanospirillales را نشان داد. مجاورت آب خزر با هیدروکربن‌های نفتی در میکروکازم تحت شرایط بی‌هوازی، طی ۱۷ روز انجام شد. نتایج نشان داد که تجزیه زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک در شرایط بی‌هوازی بسیار بیشتر از شرایط هوازی بود و خانواده غالب در این شرایط Oceanospirillales بود. در مطالعه حاضر Oceanospirillales که ۱۸/۸٪ درصد از جامعه پروکاریوتی آب‌های عسلویه را شامل می‌شد، به دنبال آلودگی نفتی دریایی غالب شده‌اند (۳۰). اعضای راسته Nitrosopumilales که از رایج‌ترین آرکی‌های آب دریا می‌باشند، شیمولیتوتروف اکسیدکننده آمونیوم بوده و با اکسید کردن آمونیاک به نیتریت انرژی خود را تامین می‌کنند. اعضای راسته Woesearchaeales که بیشتر در آب‌های سطحی دریا و رسوبات دریایی یافت می‌شوند، همزیستی اجباری با سایر موجودات دارند. این آرکی‌ها فاقد اکثر ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوسنتزی اصلی هستند و احتمالاً بسیاری از محصولات سلولی را مستقیماً از میزبان خود دریافت می‌کنند. بدون کمپلکس سنتاز ATP کامل، این آرکی‌ها ممکن است برای تهیه ATP به میزبان خود متکی باشند (۳۱). اعضای راسته Burkholderiales که توانایی قابل توجه در تجزیه ترکیبات آروماتیک دارند، احتمالا به دلیل وجود عناصر متحرک ژنتیکی در ژنوم آن‌ها و عناصر خارج کروموزومی مانند پلاسمید می‌باشد (۳۲).

پیش بینی وجود ژن‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی تجزیه کننده ترکیبات آروماتیک، بیانگر آلودگی بالای آب‌های عسلویه به ترکیبات آروماتیک به ویژه نفتالین می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه بررسی تنوع میکروبی آب منطقه خلیج نایبند در عسلویه با روش نسل جدید توالی‌یابی (NGS) و پیش بینی ژن‌های عملکردی تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک در شرایط هوازی و بی‌هوازی با نرم افزار پیکراست انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه طولانی مدت با آلودگی‌های نفتی و نشت نفت به مرور زمان بر روی جمعیت میکروبی اثر گذاشته و ترکیب جامعه میکروبی را به سمت فراوانی بیشتر اعضای تجزیه کننده ترکیبات نفتی سوق می‌دهد. جمعیت میکروبی منطقه نایبند نیز به دلیل مجاورت با منطقه نفتی پارس جنوبی و ورود آلاینده‌های نفتی به ستون آب، به سمت غالب‌شدن اعضای تجزیه‌کننده هیدروکرن‌های نفتی رفته است.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پژوهشگاه صنعت نفت تهران به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال تشکر را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Neethu CS, Saravanakumar C, Purvaja R, Robin RS, Ramesh R. Oil-Spill Triggered Shift in Indigenous Microbial Structure and Functional Dynamics in Different Marine Environmental Matrices. Sci Rep [Internet]. 2019;9(1):1–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-37903-x
2. Ivshina IB, Kuyukina MS, Krivoruchko A V., Elkin AA, Makarov SO, Cunningham CJ, et al. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. Environ Sci Process Impacts [Internet]. 2015;17(7):1201–19. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/C5EM00070J
3. Kyrklund T, Dreij, K. Human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons as ambient air pollutants; 978-92-890-5653-3, Copenhagen. WHO Regional Office for Europe 2021.
4. Coil D, Lester E, Higman B. Oil Degradation in the Sea. Gr Truth Trekking [Internet]. 2010;(November):1.Availablefrom:http://www.groundtruthtrekking.org/Issues/AlaskaOilandGas/OilDegradation.html
5. Mishra AK, Kumar GS. Weathering of Oil Spill: Modeling and Analysis. Aquat Procedia [Internet].2015;4(Icwrcoe):435–42.Availablefrom:http://dx.doi.org/10.1016/j.aqpro.2015.02.058
6. Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, et al. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. Front Microbiol. 2018;9(December):1–11.
7. Hu P, Dubinsky EA, Probst AJ, Wang J, Sieber CMK, Tom LM, et al. Simulation of Deepwater Horizon oil plume reveals substrate specialization within a complex community of hydrocarbon degraders. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(28):7432–7.
8. Hassanshahian M, Abarian M, Cappello S. Biodegradation of Aromatic Compounds. Biodegrad Bioremediation Polluted Syst - New Adv Technol. 2015;(January 2016).
9. Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Front Microbiol. 2016;7(AUG).
10. Joydas T V., Qurban MA, Borja A, Krishnakumar PK, Al-Suwailem A. Macrobenthic community structure in the northwestern Arabian Gulf, twelve years after the 1991 oil spill. Front Mar Sci. 2017;4(AUG):1–18.
11. Rezaei Somee M, Dastgheib SMM, Shavandi M, Ghanbari Maman L, Kavousi K, Amoozegar MA, et al. Distinct microbial community along the chronic oil pollution continuum of the Persian Gulf converge with oil spill accidents. Sci Rep [Internet]. 2021;11(1):1–15. Available from: https://doi.org/10.1038/s41598-021-90735-0
12. Martín-Cuadrado AB, López-García P, Alba JC, Moreira D, Monticelli L, Strittmatter A, et al. Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. PLoS One. 2007;2(9).

13. Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A, Shafquat A, Abu-Ali G, Morgan XC, et al. Sequencing and beyond: integrating molecular “omics” for microbial community profiling. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2015 Jun 18 [cited 2022 May 9];13(6):360–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25915636/

14. Estaki M, Jiang L, Bokulich NA, McDonald D, González A, Kosciolek T, et al. QIIME 2 Enables Comprehensive End-to-End Analysis of Diverse Microbiome Data and Comparative Studies with Publicly Available Data. Curr Protoc Bioinforma. 2020;70(1):1–46.

15. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl Environ Microbiol. 2006;72(7):5069–72.

16. Mukherjee A, Chettri B, Langpoklakpam JS, Basak P, Prasad A, Mukherjee AK, et al. Bioinformatic Approaches Including Predictive Metagenomic Profiling Reveal Characteristics of Bacterial Response to Petroleum Hydrocarbon Contamination in Diverse Environments. Sci Rep. 2017;7(1):1–22.

17. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2009;75(23):7537–41.

18. Sun J, Steindler L, Thrash JC, Halsey KH, Smith DP, Carter AE, et al. One Carbon Metabolism in SAR11 Pelagic Marine Bacteria. 2011;6(8).

19. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2009 Dec [cited 2022 May 7];75(23):7537–41. Available from: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.01541-09

20. Murillo AA, Molina V, Salcedo-Castro J, Harrod C. Editorial: Marine Microbiome and Biogeochemical Cycles in Marine Productive Areas. Front Mar Sci. 2019;6(October):1–3.

21. Hazen TC, Dubinsky EA, DeSantis TZ, Andersen GL, Piceno YM, Singh N, et al. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. Science (80-). 2010;330(6001):204–8.

22. Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, et al. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. Front Microbiol. 2018 Mar 29;9:2885.

23. Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. 2007;

24. Gregson BH, Mckew BA, Holland RD, Nedwed TJ, Prince RC, Mcgenity TJ, et al. Marine Oil Snow , a Microbial Perspective. 2021;8(January).

25. Mason OU, Scott NM, Gonzalez A, Robbins-Pianka A, Bælum J, Kimbrel J, et al. Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. ISME J. 2014;8(7):1464–75.

26. Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. J Chem Technol Biotechnol. 2005;80(7):723–36.

27. Fernandes GL, Shenoy BD, Damare SR. Diversity of Bacterial Community in the Oxygen Minimum Zones of Arabian Sea and Bay of Bengal as Deduced by Illumina Sequencing. Front Microbiol. 2020;10(January):1–14.

28. Bacosa HP, Erdner DL, Rosenheim BE, Shetty P, Seitz KW, Baker BJ, et al. Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. ISME J [Internet]. 2018;12(10):2532–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41396-018-0190-1

29. Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. Predominant growth of Alcanivorax strains in oil- contaminated and nutrient-supplemented sea water. 2002;4: 141–7.

30. Lazure P. A model of the general circulation in the Persian Gulf and in the Strait of A model of the general circulation in the Persian Gulf and in the Strait of Hormuz : Intraseasonal to interannual variability. 2015;(May 2018).

31. St John E, Reysenbach AL. Nanoarchaeota. Encycl Microbiol. 2019 Jan 1;274–9.

32. Okoh A, Ajisebutu S, Babalola G, Trejo-Hernandcz MR. Potential of Burkholderia cepacia RQ1 in the biodégradation of heavy crude oil. Int Microbiol. 2001;4(2):83–7.