



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

13<sup>rd</sup> Year, Vol. 13, No. 51, Autumn 2024 pp. 129- 143

Received: 05/01/2023

Accepted: 07/03/2023

**(Research Paper)**

## Isolation and Identification of Crude Oil-degrading Bacteria from the Digestive System of some Northern Persian Gulf Fish

**Mohammad Hassan Tadayon Tajabadi**

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran,  
[tadaiion@yahoo.co.in](mailto:tadaiion@yahoo.co.in)

**Mohammadsharif Ranjbar**

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran, [sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir](mailto:sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir)

**Mehdi Hassanshahian** <sup>1</sup>

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran,  
[m\\_hsn2002@yahoo.com](mailto:m_hsn2002@yahoo.com)

**Majid Askari Hesni**

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran,  
[majidask@gmail.com](mailto:majidask@gmail.com)

**Narges Amrollahi Biuki**

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Hormozgan, Iran, [amrollahi@hormozgan.ac.ir](mailto:amrollahi@hormozgan.ac.ir)

### Abstract

Pollution of living organisms' ecosystems by crude oil and its products has harmful effects. The use of approaches such as bioremediation has received much attention due to their cost-effectiveness and being eco-friendly. In the present study, different types of Gobiiformes were collected from four regions in the north of the Persian Gulf, and then their intestinal bacterial flora was identified by biochemical and molecular polymerase chain reaction (PCR) methods. The ability of these bacteria to degrade crude oil was investigated using the gas chromatography (GC) technique. The obtained results showed the isolation of bacteria *Thalassospira permensis*, *Pseudomonas aestuaria*, *Cobetia marina*, and *Halomonas beimenensis* from the intestines of *Scartelaos tenuis*, *Periophthalmus waltoni*, *Istigobius ornatus*, and *P. waltoni*, respectively. Also, two strains of *T. permensis* and *H. beimenensis* with growth rates of 1.09 and 1.43 (OD<sub>600nm</sub>) had the highest crude oil decomposition with 85.17 and 88.13%, respectively. The results of this study revealed that the microbial flora of these fishes is effective in removing oil pollution. This process needs more investigation and optimization of bioremediation conditions.

**Keywords:** Bioremediation, Crude Oil-Degrading Bacteria, Gobiiformes, Persian Gulf.

<sup>1</sup> Corresponding Author



## Introduction

Gobiiformes are a species of vertebrates that are identified based on soft tissue characteristics and are present in all aquatic habitats. Eight families have been identified in the order Gobiiformes. Members of the Gobiidae family are the richest species of fish living in the coral reef ecosystem. Crude oil pollution in the marine environments is a global problem. This pollution has many effects on diversity of marine animals and microflora. The Persian Gulf is the main marine environment in the world and crude oil pollution takes place many times. Selection of a good strategy for management of crude oil pollution is crucial to decrease the effect of this contamination on marine animals. Marine ecosystems make up a large volume of the earth's surface. Compared to land environments, there are more severe conditions in aquatic ecosystems such as temperature, pH and salinity, which has caused organisms with special abilities to grow and live in these environments. Special abilities such as resistance to temperature and salinity can be useful in optimizing industrial pollution removal processes. For this reason, investigating marine organisms and their ability to remove oil pollution can be an interesting approach. Gobiiformes are small-sized, short-lived fish found in most coastal ecosystems. The family of Exocoetidae from the order of cowfish has 10 genera and 40 species, which also includes mudskippers. This research is a quantitative research that investigates the relationship between protozoan organisms such as fish and prokaryotes in polluted ecosystems. Also, normal intestinal flora bacteria were isolated and identified from some of the northern Persian Gulf bullfish, and their ability to improve crude oil bioremediation has been investigated.

## Materials and Methods

Fish samples were randomly collected in 2018 from four areas of Bandar Hasineh, Bandar Bustano, Bandar Lange, and Om-algarm in the north of the Persian Gulf of Iran. The fish caught by the random method were collected in the mentioned coastal areas at a depth of the Persian Gulf where there was a possibility of oil presence, and then they were transferred to the laboratory in sterilized honey jars under temperature control conditions and inside the ionolith. The caught fish were transferred to the laboratory under temperature control. In the laboratory, after identification and biometrics of the fish, the skin of the abdominal area of the samples was disinfected with ethanol. The fish were transported to the laboratory alive. In the laboratory, after the identification and biometrics of the fish, the skin of the abdominal area of the samples was disinfected with 70% ethanol, and in the abdominal area from the anus to the chest belt, the intestine was cut and separated. Then, the weight and length of the whole intestine were measured. The fish intestine sample was stored in sterile containers in the refrigerator for further experiments.

Crude oil degrading bacteria were first cultured in marine broth (MB) and after the isolates reached their logarithmic growth, 4 ml of the culture medium was poured into a test tube containing 6 ml of sterile kerosene and vortexed at high speed for 2 min. The strains were incubated in an ONR medium containing 1% crude oil for ten days. After the incubation period, 50 ml of DCM was added to the culture medium and transferred to the separating funnel to separate the organic phase from the aqueous phase.

## Research Findings

The isolate T1 oxidase and movement positive, catalase, nitrate reduction indole and citrate negative, the isolate T3 oxidase, catalase and movement positive but indole negative, isolates T10 and T11 catalase and movement positive but oxidase and indole negative. The difference between T10 and T11 isolates in the oxidation/fermentation test is -/- and -/+, respectively. Also, all isolates are halotolerant. Molecular identification was done considering the 16S rRNA gene sequences. The phylogeny tree was drawn using MEGA software version 5.2.10 by the Neighbor-Joining method with bootstrap 1000 and *Escherichia coli* genome (NR 024570.1). The numbers on each node represent the bootstrap number. The accession number of each strain in NCBI is mentioned before its name in the phylogenetic tree. The highest ability to decompose oil according to the analysis of the GC device was determined in isolates T1 and T11 with growth rates of 1.09 and 1.43 (in terms of OD<sub>600</sub> nm). These two strains had a higher growth rate than

other isolates. The chromatographic spectra of the isolates show the removal of oil compounds compared to the control.

The results related to E24 and BATH are reported in Table 3. According to these results the T4 and T7 strains have the highest BATH and E24 value (76 and 34 percent respectively). The strains that have high emulsification activity and also have better surface hydrophobicity can be selected as robust degrading bacteria because the petroleum hydrocarbons are hydrophobic and immiscible in water. Based on the results of this table, the best strains (T4 and T7) were selected to continue the studies.

### **Discussion of Results and Conclusion**

Crude oil is perhaps the most complex mixture of organic chemicals found on Earth. Some components, for example, many saturated hydrocarbons, break down easily; while others, for example, polycyclic aromatic hydrocarbons with high molecular weight and polar components of crude oil, such as benzofurans, benzocarbazoles, and benzothiophenes, are persistent and toxic. The results obtained from this research show that the digestive microbiome of some Persian Gulf fish has the ability to break down crude oil and reduce this type of oil pollution. Optimizing this process requires further investigations. The bacteria identified in this study are both types of intestinal flora bacteria with adaptation developed over the years and environmental bacteria from sediment and seawater that entered the intestine and replaced the old bacteria. In general, there have been changes in the intestinal flora due to oil pollution, which have caused more sensitive bacteria to be eliminated and more compatible types to remain. In this study, the relationship between biosurfactant production and cell surface hydrophobicity and its effect on the decomposition of petroleum hydrocarbons by isolated strains was investigated. The results showed that the strains with higher hydrophobic levels produced more biosurfactants and had higher oil removal capability. Out of 11 degrading bacterial strains, six strains produced high levels of biosurfactants and reduced surface tension to below 40 mN/m.

These isolated bacteria can apply in the field of bioremediation. Some strategies can be applied in this case. Bioaugmentation is a strategy that can be used. In this strategies the isolated bacteria can increased in high volum and inoculated in contaminated seawater or sediments.

Finally some suggestions can be bring for future researches. Screening of crude oil degrading bacteria from another fishes or discover the mechanism of relationship between these bacteria with fishes. The phylogenetic diversity has some effects on bioremediation capability of isolated bacteria. In this research a diverse group of bacteria were isolated and it confirmed that when the diversity of bacteria in ecosystem was high can contribute to higher biodegradation of pollutants. Some limitations or challenges were associated with methodologies employed in the study such as the sampling zones for these fishes is very difficult to reach and then the sampling zones was limited. Also, some limitations exist about crude oil degradation assay. However, these limitations had not any significant effect on results.

## جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از دستگاه گوارش برخی از ماهی‌های شمال خلیج فارس

محمدحسن تدین تاج آبادی

استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

[tadaiion@yahoo.co.in](mailto:tadaiion@yahoo.co.in)

محمد شریف رنجبر

دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران.

[sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir](mailto:sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir)

مهدی حسن شاهیان 

استاد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[m\\_hsn2002@yahoo.com](mailto:m_hsn2002@yahoo.com)

مجید عسکری حسنی

دانشیار زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[majidask@gmail.com](mailto:majidask@gmail.com)

نرگس امراللهی بیوکی

دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، ایران.

[amrollahi@hormozgan.ac.ir](mailto:amrollahi@hormozgan.ac.ir)

### چکیده

آلودگی‌های زیستگاه‌های جانداران با نفت خام و فرآورده‌های آن پیامدهای زیان‌باری دارد. بهره‌گیری از روش‌هایی مانند زیست بهسازی با هزینه اندک و سازگار با محیط زیست بسیار شایان توجه قرار گرفته است. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی میکروبیوتای گوارشی تجزیه‌کننده نفت خام از برخی از ماهی‌های خلیج فارس انجام شد. در این بررسی انواعی از گاوماهی شکلان از چهار منطقه در شمال خلیج فارس گردآوری شده‌اند و سپس باکتری‌های روده آنها جداسازی و به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراسی شناسایی شدند. همچنین توانایی تجزیه نفت خام این باکتری‌ها با بهره‌گیری از تکنیک گاز کروماتوگرافی بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از جداسازی، باکتری‌های *Pseudomonas*، *Thalassospira permensis*، *Halomonas beimenensis* و *Cobetia marina aestusnigri*، *Scartelaos tenuis* را به ترتیب از روده ماهیان *Istigobius ornatus*، *Periophthalmus waltoni* و *P. waltoni* مشخص کرده است. همچنین بیشترین تجزیه نفت خام به ترتیب با ۸۵/۱۷ و ۸۸/۱۳ درصد را دو سویه *T. permensis* و *H. beimenensis* با نرخ رشد ۱/۰۹ و ۱/۴۳ (OD<sub>600 nm</sub>) داشتند. این بررسی آشکار کرد فلور میکروبی این ماهیان برای زدایش آلودگی‌های نفتی مؤثرند. این فرایند به بررسی‌های بیشتر و بهینه‌سازی شرایط زیست بهسازی نیاز دارد.

**واژه‌های کلیدی:** زیست بهسازی، باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام، گاوماهی شکلان، خلیج فارس

\* نویسنده مسئول مکاتبات

تدین تاج الدینی، محمد حسن، رنجبر، محمد شریف، حسن شاهیان، مهدی، عسکری، مجید، امراللهی، نرگس. جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام از دستگاه گوارش برخی از ماهی‌های شمال خلیج فارس. زیست‌شناسی میکروبی. ۱۴۰۳؛ ۱۳ (۵۱): ۱۲۹-۱۴۳.

doi: 10.22108/bjm.2023.136254.1516



## مقدمه

نفت خام به‌عنوان رایج‌ترین منبع سوختی جهان و حل‌ناپذیر در آب، ارزش اقتصادی زیادی دارد. تمامی فرایندهای مرتبط با نفت، از استخراج تا انتقال، تولید فرآورده‌های جانبی و مصرف آن سبب اشتغال‌زایی زیادی شده است. با وجود کارایی گسترده نفت، این ترکیب ارزشمند سبب ایجاد خساراتی اغلب جبران‌ناپذیر در حوزه‌های مانند محیط زیست، بهداشت و سلامت و در پایان اقتصاد می‌شود (۱).

تعریف آلودگی ساحلی توسط سازمان بهداشت جهانی به این گونه است «ورود مستقیم یا غیرمستقیم انسان توسط مواد یا انرژی به محیط دریایی، از جمله مصب که به اثرات مخربی مانند آسیب به منابع زنده و زندگی دریایی منجر می‌شود و خطرات سلامتی برای انسان دارد و مانعی برای فعالیت‌های دریایی، از جمله ماهیگیری و سایر مصارف قانونی دریا است و همچنین اختلالی که در کیفیت بهره‌گیری از آب دریا و کاهش امکانات رفاهی ایجاد می‌شود» (۲).

بیشتر فرایندهای مرتبط با نفت خام در زمان استخراج، انتقال است که اغلب توسط کشتی‌های بزرگ انجام می‌شود و سوختن آن می‌تواند سبب آلودگی محیط زیست شود. آسیب‌هایی که از این منظر به اکوسیستم وارد می‌شود، دارای طیف گسترده‌ای است. مرگ برخی از جانداران در محیط زیست سبب اختلال در چرخه و عدم تعادل در اکوسیستم می‌شود. آلودگی با ترکیبات نفتی در برخی از اندام‌های موجوداتی تجمع می‌یابد که در زنجیره غذایی سایر جانداران حضور دارند و از این طریق آلودگی به موجوداتی منتقل می‌شود که در تماس مستقیم با فرآورده‌های نفتی نبوده‌اند و سبب ایجاد مشکلاتی در سلامت آنها می‌شود. آلودگی نفتی در سیستم آب‌های زیرزمینی یا دریاها سبب آلودگی در آب آشامیدنی

انسان‌ها می‌شود. از طرف دیگر، آلودگی‌هایی که در خطوط ساحلی رخ می‌دهند نیز علاوه بر نابودی جانداران متنوع این نواحی، کاهش جذب گردشگران را سبب می‌شود؛ از این‌رو، به نظر می‌رسد آلودگی‌های نفت خام و فرآورده‌های آن اجتناب‌ناپذیر باشد؛ به همین دلیل تحقیق و بررسی درباره تکنیک‌های کاهش یا حذف آلودگی‌های مرتبط با نفت ضرورت می‌یابد (۳، ۴).

زیست بهسازی، فرایندی که حذف آلودگی‌های ترکیباتی مانند نفت را با بهره‌گیری از جانداران بررسی می‌کند، به دلیل برخی مزایا مانند سازگاری با محیط زیست شایان توجه محققان قرار گرفته است (۵). در این میان توجه ویژه‌ای به باکتری و قارچ‌های جداسازی شده از خاک و توانایی آنها در حذف آلودگی‌های نفتی شده است (۶). در برخی دیگر از گزارش‌ها موجودات دریایی مانند اسفنج‌ها و مرجان و همچنین میکروارگانیسم‌های رسوبات دریایی بررسی شده‌اند (۷).

اکوسیستم‌های دریایی حجم زیادی از کره زمین را تشکیل داده‌اند. نسبت به محیط‌های خشکی، در اکوسیستم‌های آبی شرایط شدیدتری مانند دما، pH و شوری وجود دارد که سبب شده است موجوداتی با توانایی‌های ویژه قادر به رشد و زندگی در این محیط‌ها باشند (۸). توانایی‌های ویژه‌ای مانند مقاومت نسبت به دما و شوری در بهینه‌سازی فرایندهای صنعتی حذف آلودگی می‌توانند مفید باشند. به همین دلیل، بررسی موجودات دریایی و توانایی حذف آلودگی‌های نفتی آنها می‌تواند رویکرد جالب توجهی باشد.

راسته گاوماهی شکلان<sup>۱</sup> ماهی‌هایی با اندازه کوچک و طول عمر کوتاه هستند که در بیشتر اکوسیستم‌های ساحلی یافت می‌شوند (۹). خانواده

دوره غنی‌سازی، ۱۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط ONR7a دارای ۱ درصد نفت خام (v/v) با شرایط یادشده به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی افزوده شد. انکوباسیون برای چندین هفته انجام شد. در پایان از پاساژ نهایی رقت‌های  $10^{-4}$  و  $10^{-5}$  از محیط تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به محیط مارین آگار<sup>۵</sup> منتقل شد. پس از ۲ روز، کلنی‌های یگانه یا جداگانه از هر محیط کشت‌گزینش و به محیط کشت جدید مارین آگار منتقل شدند تا کلنی خالص تهیه شود. برای غربالگری باکتری‌های برتر تجزیه‌کننده نفت خام، باکتری‌های جداشده در محیط ONR7a با نفت به‌عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. ترکیبات محیط کشت ONR7a به‌صورت سدیم کلراید ۴۰ گرم، سدیم سولفات ۳/۸ گرم، سدیم بی‌کربنات ۰/۰۳ گرم، پتاسیم کلراید ۰/۷۲ گرم، سدیم بروماید ۰/۰۸ گرم، سدیم فلورید ۰/۰۰۲۶ گرم، سدیم مونوفسفات ۰/۰۹ گرم، اسید بوریک ۰/۰۳ گرم، کلسیم کلراید ۱/۴۶ گرم، منیزیم کلراید ۱۱/۱۸ گرم، استرانسیون کلراید ۰/۰۳ گرم، آهن کلراید ۰/۰۰۲ گرم، تریس ۱/۳ گرم و pH برابر ۷ است (۱۲). سوبه‌های باکتریایی با بالاترین چگالی نوری<sup>۶</sup> (OD) در ۶۰۰ نانومتر برای شناسایی گزینش شدند (۱۲، ۱۳).

شناسایی بیوشیمیایی: تشخیص بیوشیمیایی برپایه پروتکل توصیف‌شده توسط Krieger و Holt (۱۹۸۴) برای تست‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول و احیای نیتراژ انجام شد (۱۴).

### بررسی مولکولی

استخراج ژنوم: ژنوم باکتری به روش فنل - کلروفرم استخراج شد و سپس چگالی نوری DNA استخراج‌شده توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ Shimadzu-UV-160A (کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد (۱۵).

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی با واکنش

اکسودرسیده<sup>۲</sup> از راسته گاوماهی شکلان دارای ۱۰ جنس و ۴۰ گونه است که ماهیان گلخورک<sup>۳</sup> را نیز شامل می‌شود (۱۰). در اینجا هدف، انجام پژوهش‌های کمی است که ارتباط بین موجودات پریاخته مانند ماهیان و پروکاریوت‌ها در اکوسیستم‌های آلوده را بررسی می‌کند. همچنین، باکتری‌های فلور نرمال روده برخی از گاوماهی شکلان شمال خلیج فارس جداسازی و شناسایی شدند و توانایی زیست بهسازی نفت خام توسط آنها بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی ماهی‌ها: نمونه‌های ماهی به‌صورت تصادفی در سال ۱۳۹۸ از چهار منطقه بندر حسینه، بندر بوستانو، بندر لنگه، ام‌الگرم در شمال خلیج فارس ایران جمع‌آوری شدند. ماهی‌های شکارشده به روش تصادفی در مناطق ساحلی ذکرشده در عمقی از خلیج فارس جمع‌آوری شدند که احتمال حضور نفت وجود داشت و سپس در جارهای عسلی استریل‌شده در شرایط کنترل دمایی و داخل یونولیت به آزمایشگاه منتقل شدند. ماهیان به‌صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شناسایی و بیومتریک<sup>۴</sup> ماهی، پوست ناحیه شکم نمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و در ناحیه شکم از مقعد تا کمر بند قفسه سینه بریده و روده جدا شد. سپس وزن و طول روده کامل اندازه‌گیری شدند. نمونه روده ماهیان در ظروف استریل برای ادامه آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شد (۱۱).

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها: برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام، در آغاز باکتری‌های موجود در نمونه‌های آزمایش‌شده به‌طور جداگانه در شرایط استریل در ۱۰۰ میلی‌لیتر سالیین بافر فسفات (PBS) برای یک هفته در شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه و ۳۰ درجه سانتی‌گراد غنی‌سازی شدند. پس از

به قیف جداکننده (۲۰۰ میلی لیتر حجم) منتقل شد تا فاز آلی از فاز آبی جدا شود. به فاز آلی دارای نفت محلول در DCM، ۳ گرم سولفات سدیم (مرک، آلمان) برای جذب آب مانده، افزوده و یک شب (۱۲ ساعت) در دمای اتاق در حدود ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه از کاغذ واتمن شماره ۹۱ عبور داده شد و در دمای محیط برای تبخیر DCM قرار گرفت. پس از تبخیر DCM، ۳ میکرولیتر از DCM مجدداً به ۱ میکرولیتر نفت مانده، افزوده و توسط GC بررسی شد (۲۰). سنجش نفت باقی مانده در طول موج ۴۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر دو شعاعی (Backman, Germany) انجام شد.

مشخصات ستون به کاررفته به شرح زیر است: ستون مویرگی cp-sil 5 cb و آشکارساز FID (عرض ۰/۲۵ میکرومتر، قطر ۳۲۰ میکرومتر، طول ۳۰ متر) cp8740. هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده شد. دمای اولیه ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، دمای انتقال ۴۰ درجه و دمای نگهداری ستون ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳/۳۲ دقیقه و سپس ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه، دمای نهایی ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان ۰/۷ میلی لیتر در دقیقه بود. پیک‌های به دست آمده از GC با شاهد (نمونه نفت خام بدون باکتری) سنجیده، مقایسه و درصد تجزیه هر سویه برآورد شد. حلال به کاررفته در دستگاه دی کلرومتان بود.

### نتایج

شناسایی ماهی‌ها و جدایه‌های باکتریایی: نمونه‌های ماهی گردآوری شده به ۳ جنس مختلف *Scartlaos* *Istigobius* و *Periophthalmus waltoni tenuis ornatus* متعلق بودند که در این میان جنس *P. waltoni* در برابر حدود ۱۴ نمونه صیدشده در چهار منطقه بندر حسینه، بندر بوستانو، بندر لنگه، ام‌الگرم در خلیج فارس فراوان تر بود (جدول ۱).

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و به کمک دستگاه ترموسایکلر BIORAD (کشور آمریکا) و پرایمرهای عمومی Uni\_1492R (5'-(TACGYTACCTTGTACGACTT-3 و Bac27\_F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت (۱۶). پرایمرهای به کاررفته توسط شرکت سیناژن سنتز و تهیه شد. برنامه زمانی و دمایی PCR به صورت ۳۵ سیکل، دناتوراسیون ۱ دقیقه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد، گسترش ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، دمای آنلینگ برای پرایمرهای Uni\_1492R و Bac27\_F به ترتیب ۵۳/۶ و ۵۶/۷ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. از سویه *Pseudomonas putida* W30 به عنوان کنترل مثبت (۱۷) و آب مقطر دیونیزه به عنوان کنترل منفی بهره‌گیری شد (۱۸).

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس باند ۱۴۰۰ جفت‌باز از ژل آگارز، طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (k0513) استخراج و برای تعیین توالی فرستاده شد. نتایج توالی‌یابی در NCBI<sup>7</sup> بلاست شدند و درصد همولوژی آنها بررسی شد (شرکت بیونر کره جنوبی). وابستگی فیلوژنتیکی توالی‌ها با روشی بررسی شد که قبلاً یا کیموف و همکاران توضیح داده بودند و نزدیکی بالاتر از ۹۸ درصد به عنوان جنس و گونه باکتری مجهول لحاظ شد. رسم درخت فیلوژنتیک با بهره‌گیری از نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۰.۲.۵ انجام شد (۱۹).

تجزیه نفت خام توسط باکتری‌ها: اثر تجزیه زیستی جدایه‌های باکتریایی با بهره‌گیری از روش گاز کروماتوگرافی (GC) بررسی شد. سویه‌ها در محیط ONR7a دارای ۱ درصد نفت خام (v/v) برای به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند. پس از دوره انکوباسیون، ۵۰ میلی لیتر دی کلرومتان<sup>۸</sup> (DCM) به محیط کشت، افزوده و

024570.1) انجام شد و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. اعداد روی هر گره نشان‌دهنده عدد بوت‌استرپ هستند. شماره دسترسی هر سویه در NCBI قبل از نام آن در درخت فیلوژنتیک یاد شده است.

نتایج بررسی GC: بالاترین توانایی تجزیه نفت با توجه به آنالیز دستگاه GC در جدایه‌های T1 و T11 با نرخ رشد ۱/۰۹ و ۱/۴۳ (برحسب OD<sub>600</sub> nm) تعیین شد. این دو سویه نسبت به سایر جدایه‌ها سرعت رشد بیشتری داشتند. نتایج به دست آمده از این آنالیز در شکل ۲ و جدول ۳ نشان داده شده‌اند. طیف‌های کروماتوگرافی جدایه‌ها نسبت به شاهد (شکل ۲) نشان‌دهنده حذف ترکیبات نفتی هستند. درصد تجزیه نفت خام توسط هریک از جدایه‌ها با محاسبه سطح زیر منحنی طیف‌های گاز کروماتوگرافی حاصل شده از هر جدایه با کسر کردن از پیک حلال به دست آمد.

نتایج مربوط به تشخیص جدایه‌ها با بهره‌گیری از تکنیک‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. جدایه T1 اکسیداز و حرکت مثبت، کاتالاز، اندول احیای نیترات و سیترات منفی، جدایه T3 اکسیداز، کاتالاز و حرکت مثبت اما اندول منفی، جدایه‌های T10 و T11 کاتالاز و حرکت مثبت اما اکسیداز و اندول منفی است. تفاوت دو جدایه T10 و T11 در تست اکسیداسیون / تخمیر به ترتیب -/ و +/- است. همچنین تمامی جدایه‌ها هالوتولرانت هستند.

شناسایی مولکولی با در نظر گرفتن توالی‌های ژن *16S rRNA* انجام شد و نتایج مربوط به درصد تشابه و شماره دسترسی هر جدایه در جدول ۲ آمده‌اند. رسم درخت فیلوژنی با بهره‌گیری از نرم‌افزار MEGA ورژن ۵.۲.۱۰ (۲۱) به روش Neighbor-Joining با بوت‌استرپ<sup>۱۰۰۰</sup> و ژنوم باکتری / شریشیا کلی (NR )

جدول ۱- نتایج شناسایی و جداسازی ماهی‌ها و جدایه‌های باکتریایی

Table (1): Isolation and Identification of fishes and isolated bacteria

منطقه	مختصات جغرافیایی	نام مترادف	باکتری	نوع ماهی
بندر حسینیه	E۵۴°۳۵'۲۸.۹" N۲۶°۳۲'۵۸.۷"	T1	<i>Thalassospira permensis</i>	<i>Scartelaos tenuis</i>
بندر بوستانو	E۵۵°۵۹'۴۶.۲" N۲۷°۰۴'۳۷.۵"	T3	<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	<i>Periophthalmus waltoni</i>
بندر لنگه	E۵۴°۵۲'۶۳.۴" N۲۶°۳۲'۶۱.۳"	T10	<i>Cobetia marina</i>	<i>Istigobius ornatus</i>
ام‌الگرم	E۵۱°۳۳'۵۲.۵۷۰" N۲۷°۵۰'۳.۹۲۲"	T11	<i>Halomonas beimenensis</i>	<i>Periophthalmus waltoni</i>

جدول ۲- درصد تشابه و شماره دسترسی هر جدایه

Table (2): Percentage of similarity and accession number of each isolates

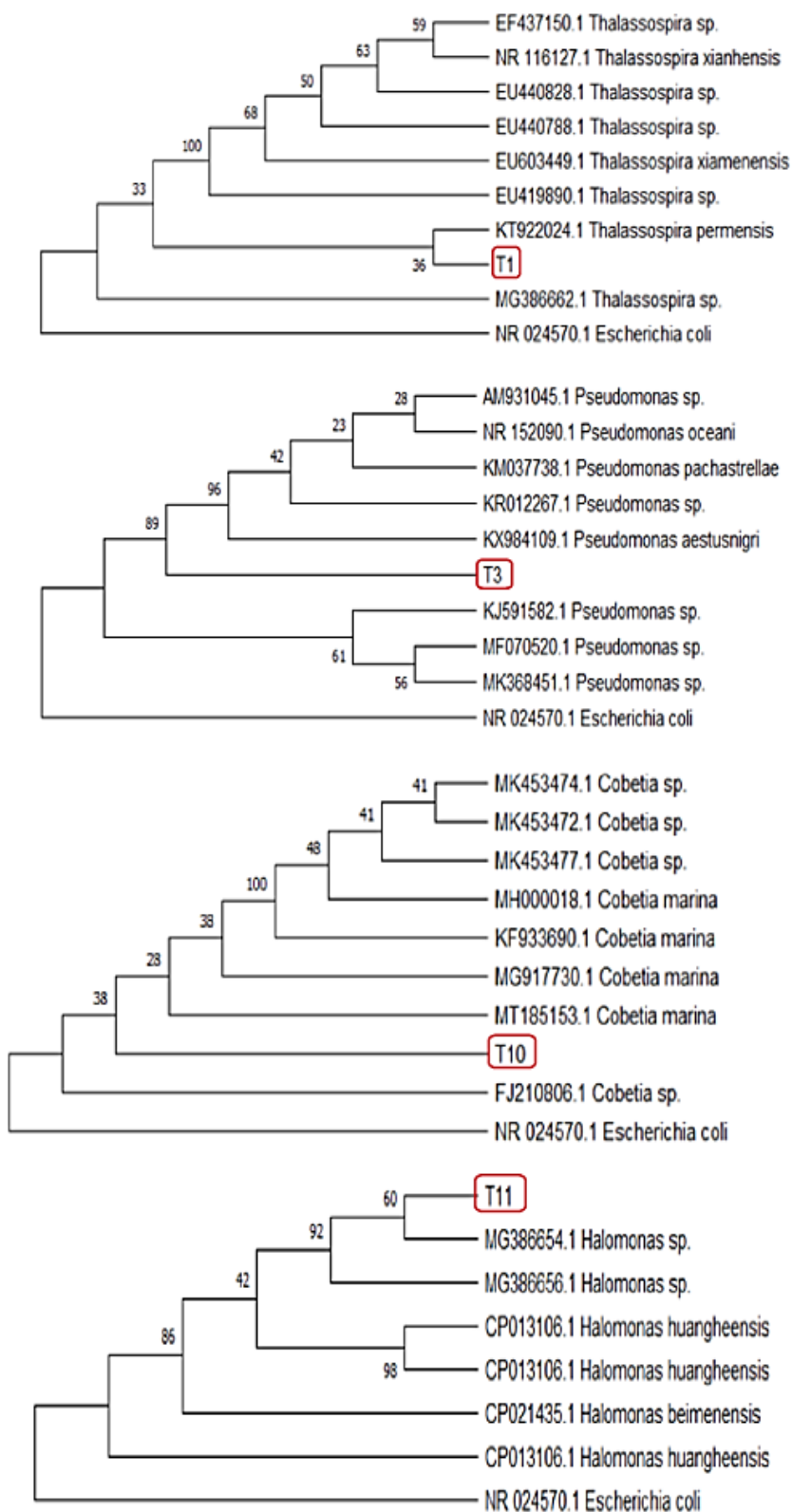
سویه	شماره دستیابی	جنس و گونه باکتریایی مورد تطبیق	درصد همسانی
T1	MT180856	<i>Thalassospira permensis</i>	۹۵
T3	MT180855	<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	۹۳
T10	MT180860	<i>Cobetia marina</i>	۹۷
T11	MT180859	<i>Halomonas beimenensis</i>	۹۸

جدول ۳- سنجش میزان حذف نفت خام در جدایه‌های باکتریایی به روش گاز کروماتوگرافی

Table (3): Percentage of crude oil degradation in bacteria isolates by Gas Chromatography method

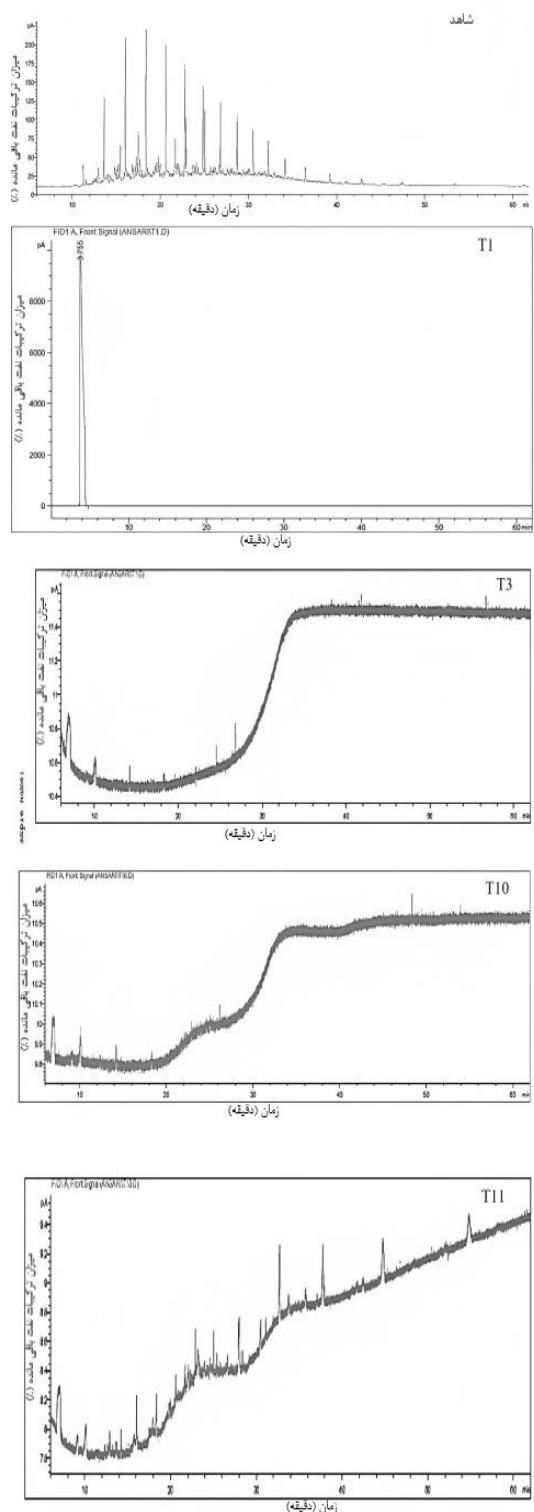
سویه	میزان رشد (OD <sub>600</sub> nm)	درصد حذف نفت خام براساس GC
T1 ( <i>Thalassospira permensis</i> )	۱/۰۹	۸۵/۱۷
T3 ( <i>Pseudomonas aestusnigri</i> )	۰/۸۰	۳۷/۱۳
T10 ( <i>Cobetia marina</i> )	۰/۵۵	۶۴/۱۳
T11 ( <i>Halomonas beimenensis</i> )	۱/۴۳	۸۸/۱۳





شکل ۱- درخت فیلوژنی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از روده ماهیان

Figure (1): Phylogenetic tree of bacteria isolates that obtained from fishes intestine



شکل ۲- آنالیز گاز کروماتوگرافی. نمونه شاهد: نمونه نفت خام بدون باکتری. محور افقی: زمان بر حسب دقیقه. نمودار عمودی: غلظت ترکیب بر حسب شدت سیگنال آشکارساز

Figure (2): GC analysis of blank sample, Sample of crude oil without bacteria, the horizontal line: Time and Vertical line: density

## بحث

سالانه صدها میلیون لیتر نفت از منابع طبیعی و انسانی وارد محیط می‌شوند. ورود طبیعی نفت به تنهایی می‌تواند تمام اقیانوس‌های جهان را پوشش دهد. عدم غرق شدن کره زمین با نفت می‌تواند نشان‌دهنده تنوع و کارایی میکروگانیزم‌هایی باشد که توانایی تجزیه نفت را دارند (۲۲).

نفت خام شاید پیچیده‌ترین مخلوط مواد شیمیایی آلی باشد که در زمین یافت می‌شود. برخی از اجزاء، برای مثال بسیاری از هیدروکربن‌های اشباع‌شده، به آسانی تجزیه می‌شوند؛ درحالی‌که برخی دیگر، برای مثال هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای با وزن مولکولی بالا و اجزای قطبی نفت خام مانند بنزوفوران‌ها، بنزوکاربازول‌ها و بنزوتیوفن‌ها ماندگار و سمی هستند (۲۲).

باکتری‌های دریایی می‌توانند در آب دریا، رسوبات، اعماق دریا و زیستگاه‌های ساحلی زنده بمانند. در اکوسیستم‌های آبی، برخی از باکتری‌ها از سوخت‌وساز منحصربه‌فردی برای تولید ترکیبات بیواکتیو<sup>۱۲</sup> و بیوسورفاکتانت‌ها<sup>۱۳</sup> و تشکیل بیوفیلم استفاده می‌کنند تا بتوانند خود را با شرایط زیستگاه‌های دریایی سازگار کنند (۲۳).

میکروارگانیزم‌ها برای زنده ماندن به مواد مغذی، برای مثال نیتروژن، فسفات، برخی عناصر کمیاب، کربن و انرژی نیاز دارند. میزان عمل تجزیه زیستی به شرایط رشد میکروب‌ها مانند پذیرنده‌های الکترون، در دسترس بودن اکسیژن، دما، pH، شوری و فشار بستگی دارد (۲۴، ۲۵). هر چهار جدایه *P. permensis*، *T. permensis*، *H. beimenensis* و *C. marina aestusnigri* بررسی شده در این پژوهش که از روده ماهیان در مناطق مختلف شمال خلیج فارس جداسازی شده‌اند، هالوتولرانت هستند و توانایی بقا در محیط‌های شور را دارند.

ماچادو<sup>۱۴</sup> و همکاران در بررسی توانایی زیستگاه‌های حرا در زیست بهسازی نفت خام سه کلاس باکتریایی *Gammaproteobacteria*، *Flavobacteriales* و *Clostridiales* را غالب‌ترین انواع شناسایی شده مشخص می‌کنند (۲۶). تحقیقی با هدف شناسایی میکروپلاستیک‌ها در رسوبات و ماهی‌های *P. waltoni* در جنگل‌های حرا در جنوب ایران انجام شد. نتایج نشان دادند بیشتر میکروپلاستیک‌های یافت شده از پلی‌استایرن، پلی‌پروپیلن و پلی‌اتیلن ترفتالات<sup>۱۵</sup> ساخته شده‌اند؛ درحالی‌که هیچ میکروپلاستیکی در بافت ماهی یافت نشد (۲۷). تفاوت این پژوهش با پژوهش حاضر در نوع آلودگی بررسی شده و شباهت آن، گونه ماهی بررسی شده است. در پژوهشی دیگر، شیرانی<sup>۱۶</sup> و همکاران *P. waltoni* را به‌عنوان نشانگر زیستی در مناطق آلوده به نفت خلیج فارس معرفی می‌کنند (۲۸). همچنین، شیرانی و همکاران، اثر آلودگی نفتی خلیج فارس بر ماهی *P. waltoni* را با توجه به سه آنزیم اتوکسی رزازورین O دیلاز - ۲، گلوکاتینون S ترانسفراز و کاتالاز بررسی می‌کنند (۲۹)؛ با این حال، هیچ نوعی از بررسی میکروبی در این پژوهش‌ها انجام نشده است. در بررسی آلاه<sup>۱۷</sup> و همکاران مشخص شد باکتری‌های جدا شده از پوست، آبشش و روده ماهی می‌توانند نفت خام را به‌عنوان منبع کربن و انرژی مصرف کنند. نتایج آنالیزهای مولکولی نشان دادند جدایه‌ها مربوط به *Bacillus flexus*، *Bacillus velezensis*، *Pseudomonas brenneri* و *Pseudomonas azotoformans* هستند (۳۰).

رائو<sup>۱۸</sup> و همکاران در بررسی خود اعلام می‌کنند ماهی *Boleophthalmus* sp. کمترین میزان تجمع کل هیدروکربن‌های نفتی<sup>۱۹</sup> را از بین ۱۰ ماهی بررسی شده در سواحل غربی هند داشته است (۳۱).

همچنین، سلطانی و همکاران، غلظت

*Roseovarius pacificus*, *hydrocarbonoclasticus*  
*Pseudidiomarina sediminum* از جامعه غنی‌سازی شده با بهره‌گیری از فلورن<sup>۲۱</sup> و فنانترن<sup>۲۲</sup> به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی جدا شدند (۳۴).

سررا<sup>۲۳</sup> و همکاران با بررسی میکروبیوتای گوارشی ماهی *Dicentrarchus labrax* سویه‌های شناسایی شده *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* و *Firmicutes*, *Acinetobacter* معرفی می‌کنند که البته درصد تشکیل‌دهنده هر کدام به رژیم غذایی ماهی بستگی دارد (۳۵).

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان می‌دهند میکروبیوم گوارشی برخی از ماهیان خلیج فارس توانایی تجزیه نفت خام و کاهش این نوع از آلودگی‌های نفتی را دارند. بهینه‌سازی این فرایند به بررسی‌های بیشتر نیاز دارد. باکتری‌های شناسایی شده در این بررسی در واقع از هر دو نوع باکتری‌های فلور روده با سازگاری ایجاد شده طی سالیان و باکتری‌های محیطی رسوب و آب دریا هستند که وارد روده شده و جایگزین باکتری‌های قدیمی شده‌اند. به‌طور کلی تغییراتی در فلور روده به‌دلیل آلودگی نفتی ایجاد شده که سبب شده‌اند باکتری‌های حساس‌تر حذف شوند و انواع سازگارتر باقی بمانند.

## References

- (1) Douglas LD., Rivera-Gonzalez N., Cool N., Bajpayee A., Udayakantha M., Liu G-W., et al. A Materials Science Perspective of Midstream Challenges in the Utilization of Heavy Crude Oil. *ACS Omega*, 2022; 7(2): 1547-74. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06399>
- (2) Alwan, H., Resen, A., Bashar, A., Abdulabbas, A., & Hassanshahian, M. (2022). Biodegradation of Marine Pollutants by Microorganisms: A Bibliometric Analysis. *Research in Biotechnology and Environmental*

هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای معطر در سه گونه ماهی خوراکی *Liza abu*، *Leuciscus vorax* و *Coptodon zillii* از رودخانه اروند و خلیج فارس را به مقدار کم گزارش می‌کنند که می‌تواند به‌دلیل حضور باکتری‌های تجزیه‌کننده در دستگاه گوارش این جانوران باشد (۳۲)؛ البته آنالیز میکروبی در این بررسی انجام نشده بود.

پژوهشی با هدف شناسایی باکتری‌های گونه‌ای ماهی به نام *Boleophthalmus dussumieri* از خانواده *Gobiidae* و از زیرخانواده *Oxudercinae* در مناطق ساحلی بین جزرومدی خلیج فارس انجام شده است. در مجموع، ۸۰ سویه باکتریایی از روده، آب دریا و رسوبات گل‌آلود شناسایی شدند که سویه‌های *Praclostridium*، *Eubacterium tenue* و *bifermentans* و *Vibrio hyugaensis* برای نخستین بار از این مناطق جداسازی شده‌اند (۳۳).

مقدم و همکاران تحقیقی را با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای<sup>۲۰</sup> از رسوبات سطحی خلیج نایبند و ارزیابی کارایی طرح آزمایشی مبتنی بر آمار برای بهینه‌سازی تجزیه بیولوژیکی فنانترن و فلورن توسط جامعه غنی‌شده انجام داده‌اند. در این پژوهش، باکتری‌های تجزیه‌کننده PAH از رسوبات سطحی جدا شدند. سویه گرم منفی باکتریایی شامل *Marinobacter*

*Science*, 1(2): 43–53.

<https://doi.org/10.58803/rbes.v1i2.8>

- (3) Sabernejad A., Bashar A., Rihan M., Kazem N., Hassanshahian, M. Comparing the Effects of Diesel Oil Pollution on Forest and Industrial Soil Microbial Community. *Research in Biotechnology and Environmental Science*, 2022; 1(1): 6–11. <https://doi.org/10.58803/rbes.2202.1.1.02>
- (4) Santisi, S., Cappello, S., Catalfamo, M., Mancini, G., Hassanshahian, M., Genovese, L., Giuliano, L. and Yakimov, M.M. Biodegradation of crude oil by

- individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015; 46(2): 377-87. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131276>
- (5) Vidali, M. "Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 2001; 73(7): 1163-1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- (6) Bayat Z, Hassanshahian M, Cappello S. Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review. *Open Microbiol J*, 2015 Jul 31; 9: 48-54. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4676050/>
- (7) Kimes NE., Callaghan AV., Aktas DF., Smith WL., Sunner J., Golding B., et al. Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Journal of Frontiers in Microbiology*, 2013; 4: 50. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00050>
- (8) Nichols C., Guezennec J., Bowman J. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Journal of Marine Biotechnology*, 2005; 7 (4): 253-71. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-5118-2>
- (9) Thompson A. Habitat and mutualism affect the distribution and abundance of a shrimp-associated goby. *Journal of Marine and Freshwater Research*, 2004; 55 (1): 105-13. <https://doi.org/10.1071/MF03099>
- (10) Murdy EO. *A taxonomic revision and cladistic analysis of the oxudercine gobies (Gobiidae: Oxudercinae)*. Australian Museum; 1989.
- (11) Gutierrez T., Singleton DR., Berry D., Yang T., Aitken MD., Teske A. Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *The ISME Journal*, 2013; 7(11): 2091-104. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.98>
- (12) Dyksterhouse SE., Gray JP., Herwig RP., Lara JC., Staley JT. Cycloclasticus pugetii gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995; 45(1): 116-23. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-116>
- (13) Hasanshahian M., Emtiazi G. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *Journal of International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008; 62 (2): 170-8. <https://doi.org/10.1016/j.jibiod.2008.01.004>
- (14) Krieg NR., Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Yi Hsien Publishing Co.; 1984.
- (15) Sambrook J., Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006; (1): 44-55. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
- (16) Bayat Z., Hassanshahian M., Hasani MA. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 2016; 105(1): 120-4. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.042>
- (17) Hassanshahian M., Bayat Z., Cappello S., Smedile F., Yakimov M. Comparison the effects of bioaugmentation versus biostimulation on marine microbial community by PCR-DGGE: a mesocosm scale. *Journal of Environmental Sciences*, 2016; 43: 136-46. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.09.013>
- (18) Hasanuzzaman M., Umadhay-Briones KM., Zsiros SM., Morita N., Nodasaka Y., Yumoto I., Okuyama H. Isolation, Identification, and Characterization of a Novel, Oil-Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. *Curr Microbiol*, 2004; 49: 108-114. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4267-x>

- (19) Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., K T. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, 2018; 35: 1547-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- (20) Viesser JA., Sugai-Guerios MH., Malucelli LC., Pincerati MR., Karp SG., Maranhão LT. petroleum-tolerant Rhizospheric Bacteria: isolation, characterization and Bioremediation potential. *Journal of Scientific Reports*, 2020; 10 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59029-9>
- (21) Bayat Z., Hassanshahian M., Hesni MA. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 2015; 101(1): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.021>
- (22) Parhamfar M., Bayat Z., Parhamfar M., Hassanshahian M., Hosseini SS. Investigation of Oil-in-Water Emulsions Treatment by Crude Oil Degrading Bacteria and Coagulation with Cationic Polyacrylamide. *J Pet Environ Biotechnol*, 2018; 9: 369. [10.4172/2157-7463.1000369](https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000369)
- (23) Bayat Z., Akbari N., Hassanshahian M., Cappello S., Salehinasab, A. Screening of Biosurfactant-producing Bacteria from Symbiotic Microbes with Gastropods in the Persian Gulf. *Research in Biotechnology and Environmental Science*, 2022; 1(1): 1-5. <https://doi.org/10.58803/rbes.v1i1.1>
- (24) Sayed K., Baloo L., Sharma NK. Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021; 18 (5): 22-26. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052226>
- (25) Varjani SJ., Upasani VN. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Journal of International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017; 120: 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>
- (26) Machado LF., de Assis Leite DC., da Costa Rachid CTC., Paes JE., Martins EF., Peixoto RS., et al. Tracking mangrove oil bioremediation approaches and bacterial diversity at different depths in an in situ mesocosms system. *Journal of Frontiers in Microbiology*, 2019; 10: 2107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02107>
- (27) Maghsodian Z., Sanati AM., Ramavandi B., Ghasemi A., Sorial GA. Microplastics accumulation in sediments and Periophthalmus waltoni fish, mangrove forests in southern Iran. *Chemosphere*, 2021; 264: 128543. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128543>
- (28) Shirani M., Mirvaghefi A., Farahmand H., Abdollahi M. Biomarker responses in mudskipper (Periophthalmus waltoni) from the coastal areas of the Persian Gulf with oil pollution. *Journal of Environmental Toxicology and Pharmacology* 2012; 34 (3): 705-13. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.018>
- (29) Shirani M., Mirvaghefi A., Farahmand H., Abdollahi M. Assessing the effects of oil pollution of the Persian Gulf on activities of 3 different enzymatic biomarkers in gill of mudskipper Periophthalmus waltoni (Bushehr coastal area). *Journal of Natural Environment*, 2014; 67 (2): 157-184. <https://doi.org/10.22059/JNE.2014.51299> [In Persian].
- (30) Ullah S., Ali N., Dawar F., Nughman M., Rauf M., Khattak M., et al. Biodegradation of petroleum by bacteria isolated from fishes of Indian Ocean. *Brazilian Journal of Biology*, 2021; 82. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.244703>
- (31) Rao MN., Ram A., Rokade M., Raja P., Rakesh P., Chemburkar P., et al. A preliminary estimate of total petroleum hydrocarbons in water and some commercially important fish species in

- the Amba estuary, west coast of India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2016; 97 (1): 56-62. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1819-2>
- (32) Soltani N., Moore F., Keshavarzi B., Sorooshian A., Javid R. Potentially toxic elements (PTEs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish and prawn in the Persian Gulf, Iran. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019; 173: 251-65. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.005>
- (33) Ghotbeddin NN., Roomiani L. Identification and the First Record of Marine bacteria *Mudskippers Boleophthalmus dussumieri* (Valenciennes, 1837) by 16S rRNA on the Northern Intertidal areas of Persian Gulf, Iran. *Journal of Research Square*, 2020: 1-18. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-37231/v1>
- (34) Moghadam MS., Ebrahimipour G., Abtahi B., Ghassempour A., Hashtroudi MS. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2014; 12 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40201-014-0114-6>
- (35) Serra CR., Oliva-Teles A., Enes P., Tavares F. Gut microbiota dynamics in carnivorous European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed plant-based diets. *Journal of Scientific Reports*, 2021; 11 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80138-y>

- 
- 1- Gobiiformes
  - 2- Oxudercidae
  - 3- Mudskipper
  - 4- Biometrics
  - 5- Marine agar
  - 6- Optical density
  - 7- National Center for Biotechnology Information
  - 8- Dichloromethane
  - 9- Whatman filter paper 1
  - 10- Bootstrap
  - 11- *Escherichia coli*
  - 12- Bioactive
  - 13- Biosurfactants
  - 14- Machado
  - 15- Polyethylene terephthalate
  - 16- Shirani
  - 17- Ullah
  - 18- Rao
  - 19- Total Petroleum Hydrocarbons
  - 20- Polycyclic aromatic hydrocarbons
  - 21- Fluorene
  - 22- Phenanthrene
  - 23- Serra