



فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ، شماره ، صفحه
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶

مقاله پژوهشی

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

محمدحسن تدین تاج‌الدینی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، tadaaiion@yahoo.co.in
محمد شریف رنجبر: دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران، sharif.ranjbar@hormozgan.ac.ir
مهدی حسن شاهیان*: استاد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، m_hsn2002@yahoo.com
مجید عسکری حصنی: دانشیار زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، majidask@gmail.com
نرگس امراللهی ییوکی: دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، ایران، amrollahi@hormozgan.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلودگی‌های زیستگاه‌های جانداران با نفت خام و فرآورده‌های آن پیامدهای زیان‌باری دارد. بهره‌گیری از روش‌هایی مانند زیست‌بهبودی 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.

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2023.136254.1516

مواد و روش‌ها: 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 پلیمراز شناسایی شدند. همچنین توانایی تجزیه نفت خام این باکتری‌ها با بهره‌گیری از تکنیک گاز کروماتوگرافی بررسی شد.

نتایج: نتایج به‌دست‌آمده از جداسازی، باکتری‌های *Pseudomonas aestusnigri*، *Thalassospira permensis*، *Periophthalmus*، *Scartelaos tenuis*، *Halomonas beimenensis* را به‌ترتیب از روده ماهیان *Cobetia marina* و *P. waltoni* مشخص کرده است. همچنین بیشترین تجزیه نفت خام به‌ترتیب با ۸۵/۱۷ و ۸۸/۱۳ درصد را دو سویه *H. beimenensis* و *T. permensis* با نرخ رشد ۱/۰۹ و ۱/۴۳ (OD_{600 nm}) داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: 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

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،

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 به صورت تصادفی در سال ۱۳۹۸ از چهار منطقه بندر حسینه، بندر بوستانو، بندر لنگه، ام‌الکرم 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 استریل شده در شرایط کنترل دمایی و داخل یونولیت به آزمایشگاه منتقل شدند. ماهیان به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شناسایی و بیومتریک^۴ 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 به طور جداگانه در شرایط استریل در ۱۰۰ میلی‌لیتر سالین بافر فسفات (PBS) برای یک هفته در شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در

کاهش جذب گردشگران را سبب می‌شود؛ از این رو، 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 جداسازی‌شده 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 میکروارگانیزم‌های 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^۱ ماهی‌هایی با اندازه کوچک و طول عمر کوتاه هستند که در بیشتر اکوسیستم‌های ساحلی یافت می‌شوند (۹). خانواده اکسودرسیده^۲ از راسته گاوماهی شکلان دارای ۱۰ جنس و ۴۰ گونه است که ماهیان گلخورک^۳ را نیز

توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ Shimadzu-UV-160A (کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد (۱۵).

شناسایی مولکولی: شناسایی مولکولی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و به کمک دستگاه ترموسایکلر BIORAD (کشور آمریکا) و پرایمرهای عمده Uni_1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3) و Bac27_F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) 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^۶ 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).

دقیقه و ۳۰ درجه سانتی‌گراد غنی‌سازی شدند. پس از دوره غنی‌سازی، ۱۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط ONR7a دارای ۱ درصد نفت خام (v/v) با شرایط یادشده به عنوان 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^۵ 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 به عنوان تنها منبع کربن کشت داده شدند. ترکیبات محیط کشت ONR7a به صورت 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 ۰/۰۲۶ 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). سویه‌های باکتریایی بالاترین چگالی نوری^۶ (OD) در ۶۰۰ نانومتر برای شناسایی گزینش شدند (۱۳).

شناسایی بیوشیمیایی: تشخیص بیوشیمیایی بر پایه پروتکل توصیف‌شده توسط Holt و Krieg (۱۹۸۴) برای تست‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول و احیای نترات انجام شد (۱۴).

بررسی مولکولی

استخراج ژنوم: ژنوم باکتری به روش فنل - کلروفرم استخراج شد و سپس چگالی نوری DNA استخراج‌شده

نتایج

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

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 (۲۱) به روش Neighbor-Joining با بوت‌استرپ^۱ ۱۰۰۰ و ژنوم باکتری / شریشیاکلی^{۱۱} (NR 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_{600 nm}) تعیین شد.

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 میلی‌لیتر دی‌کلرومتان^۸ (DCM) به محیط کشت، افزوده و به قیف جداکننده (۲۰۰ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر 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 دی‌کلرومتان بود.

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.

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

جدول ۱- نتایج شناسایی و جداسازی ماهی‌ها و جدایه‌های باکتریایی

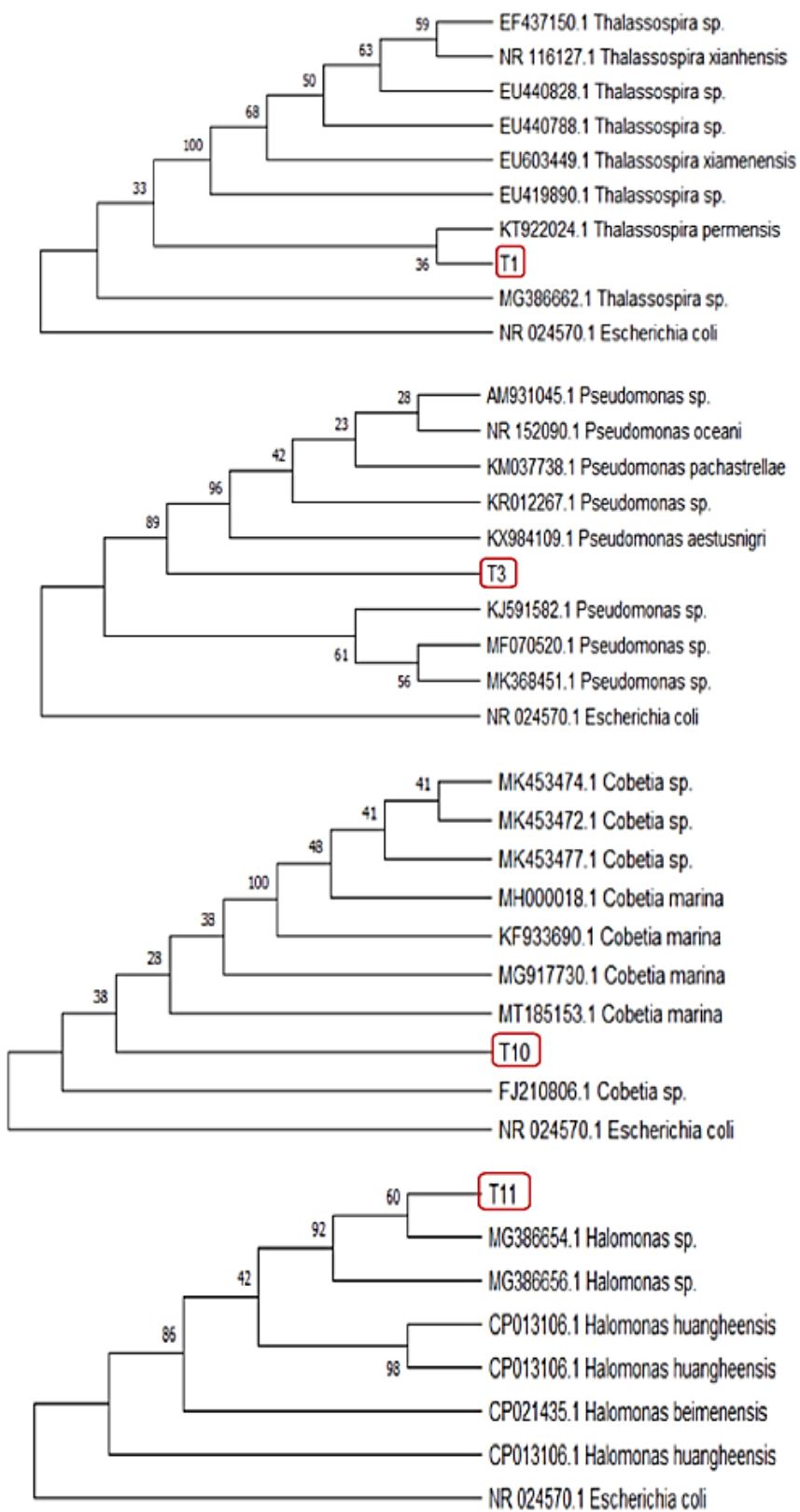
منطقه	مختصات جغرافیایی	نام مترادف	باکتری	نوع ماهی
بندر حسینیه	N۲۶°۳۲'۵۸٫۷" E۵۴°۳۵'۲۸٫۹"	T1	<i>Thalassospira permensis</i>	<i>Scartelaos tenuis</i>
بندر بوستانو	N۲۷°۰۴'۳۷٫۵" E۵۵°۵۹'۴۶٫۲"	T3	<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	<i>Periophthalmus waltoni</i>
بندر لنگه	N۲۶°۳۲'۶۱٫۳" E۵۴°۵۲'۶۳٫۴"	T10	<i>Cobetia marina</i>	<i>Istigobius ornatus</i>
ام‌الکرم	N۲۷°۵۰'۳۰٫۹۲۲" E۵۱°۳۳'۵۲٫۵۷۰"	T11	<i>Halomonas beimenensis</i>	<i>Periophthalmus waltoni</i>

جدول ۲- درصد تشابه و شماره دسترسی هر جدایه

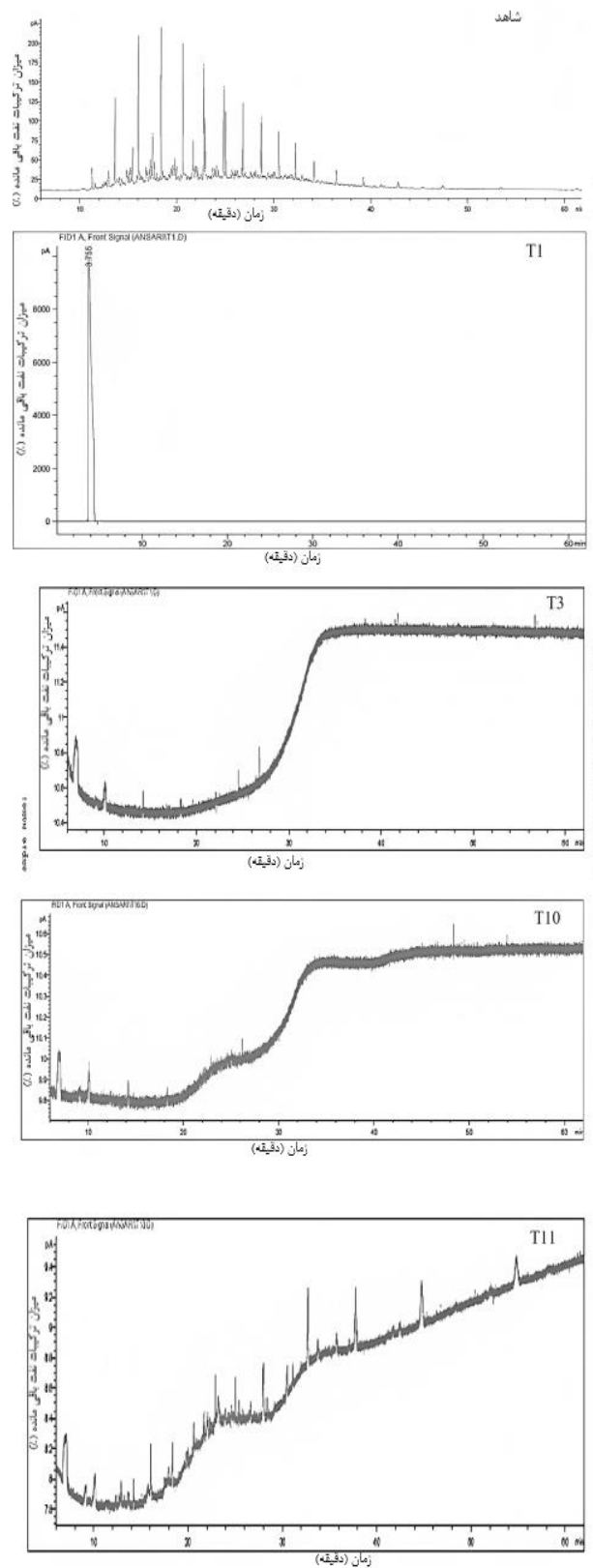
درصد همسانی	جنس و گونه باکتریایی مورد تطبیق	شماره دستیابی	سویه
۹۵	<i>Thalassospira permensis</i>	MT180856	T1
۹۳	<i>Pseudomonas aestusnigri</i>	MT180855	T3
۹۷	<i>Cobetia marina</i>	MT180860	T10
۹۸	<i>Halomonas beimenensis</i>	MT180859	T11

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

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



شکل ۱- درخت فیلوژنی جدایه‌های باکتریایی جداشده از روده ماهیان



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

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 میکرواگانیزم‌هایی باشد که توانایی تجزیه نفت را دارند (۲۲).

نفت خام شاید پیچیده‌ترین مخلوط مواد شیمیایی آلی باشد که در زمین یافت می‌شود. برخی از اجزا، 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 سوخت و ساز منحصربه‌فردی برای تولید ترکیبات بیواکتیو^{۱۲} و بیوسورفاکتانت‌ها^{۱۳} 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. 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^{۱۴} 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^{۱۵} 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^{۱۶} 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 دتیلاز - 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 آلوده^{۱۷} 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 azotoforman* هستند (۳۰).

غنی‌سازی شده با بهره‌گیری از فلورن^{۲۱} و فنانترون^{۲۲} به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی جدا شدند (۳۴).

سررا^{۲۳} و همکاران با بررسی میکروبیوتای گوارشی ماهی *Dicentrarchus labrax* سویه‌های شناسایی شده را *Acidobacteria*، *Proteobacteria*، *Planctomycetes*، *Acinetobacter*، *Firmicutes* و *Verrucomicrobia* 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 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.
- (2) Vikas M., Dwarakish G. Coastal pollution: a review. *Aquatic Procedia* 2015; 4: 381-8.

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

همچنین، سلطانی و همکاران، غلظت 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 جزر و مدی خلیج فارس انجام شده است. در مجموع، ۸۰ سویه باکتریایی از روده، آب دریا و رسوبات گل‌آلود شناسایی شدند که سویه‌های *Praclostridium*، *Eubacterium tenue*، *Vibrio hyugaensis* و *bifermentans* برای نخستین بار از این مناطق جداسازی شده‌اند (۳۳).

مقدم و همکاران تحقیقی را با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای^{۲۰} از رسوبات سطحی خلیج نایند و ارزیابی کارایی طرح آزمایشی مبتنی بر آمار برای بهینه‌سازی تجزیه بیولوژیکی فنانترون و فلورن توسط جامعه غنی شده انجام داده‌اند. در این پژوهش، باکتری‌های تجزیه‌کننده PAH از رسوبات سطحی جدا شدند. سویه گرم منفی باکتریایی شامل *Marinobacter*، *Roseovarius pacificus*، *hydrocarbonoclasticus* و *Pseudidiomarina sediminum* از جامعه

- (3) Bhattacharjee S., Dutta T. Chapter 1 - An overview of oil pollution and oil-spilling incidents. In: Das P, Manna S, Pandey JK, editors. *Advances in Oil-Water Separation*. Elsevier; 2022: 3-15.
- (4) Kumari B., Kriti, M., Singh G., Sinam G., Singh DP. Microbial Remediation of Crude Oil-Contaminated Sites. In: Shukla V, Kumar N, editors. *Environmental Concerns and Sustainable Development: Volume 1: Air, Water and Energy Resources*. Singapore: Springer Singapore; 2020: 33.۵۱-۳
- (5) Vidali M. Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry* 2001; 73 (7): 1163-72.
- (6) Englert CJ., Kenzie EJ., Dragun J. *Bioremediation of petroleum products in soil. Principles and practices for petroleum contaminated soils*. Routledge; 2019.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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): 4455.
- (16) Bayat Z., Hassanshahian M., Hasani MA. Study the symbiotic crude oil-degrading bacteria in the mussel *Macra stultorum* collected from the Persian Gulf. *MAR POLLUT BULL* 2016; 105 (1): 120-4.
- (17) Hasanshahian M., Ravan H. Cloning and gene expression of alkane hydroxylase gene from *Pseudomonas putida*. *Agricultural Biotechnology Journal* 2017; 9 (1): 1-14.
- (18) Cappello S., Denaro R., Genovese M., Giuliano L., Yakimov MM. Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. *Journal of Microbiological Research* 2007; 162 (2): 185-90.
- (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.
- (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.
- (21) Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Journal of Molecular Biology and Evolution* 2018; 35 (6): 1547.
- (22) Head IM., Jones DM., Röling WF. Marine microorganisms make a meal of oil. *Journal of Nature Reviews Microbiology* 2006; 4 (3): 173-82.
- (23) Mohanrasu K., Rao RGR., Raja R., Arun A. Bioremediation Process by Marine Microorganisms. *Encyclopedia of Marine Biotechnology* 2020; 4: 2211-28.
- (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): 2226.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.
- (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.

- (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.
- (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.

-
- 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