مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

بررسی اثر فلور میکروبی محیط بر تغییرات میکروفلور گوارشی هتروتروف و تجزیه‌کننده نفت خام در چهار گونه از گاوماهی شکلان شمال خلیج فارس

محمد حسن تدین تاج‌آبادی[۱]، محمد شریف رنجبر[۱]، مهدی حسن شاهیان[۲*]، مجید عسکری حصنی[۲]، نرگس امراللهی بیوکی[۱]

[۱] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۸/۱۲/۲۳
اصلاح: ۹۹/۰۵/۰۱
پذیرش: ۹۹/۰۹/۰۹

کلمات کلیدی:
اکوسیستم
باکتری
تجزیه زیستی
خلیج فارس
گاو ماهیان
نفت خام

چکیده

فلور میکروبی محیط، نقش مهمی در شکل‌گیری فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی ایفا می‌کند. هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات فصلی کمیت میکروفلور گوارشی هتروتروف و تجزیه‌کننده نفت خام در چهار گونه از گاوماهی شکلان شمال خلیج فارس می‌باشد. نمونه‌برداری از گاوماهیان از پنج منطقه در شمال خلیج فارس و در دو فصل سرد و گرم انجام شد. در این تحقیق سنجش تراکم باکتری‌ها با دو روش شمارش مستقیم و روش شمارش حداکثر احتمالی صورت گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین تعداد باکتری‌های هتروتروف در فصل گرم مربوط به گاو ماهی *Periophthalmus waltoni* به ارزش ۶×۱۰^{۸} cfu/ml می‌باشد. تعداد باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کننده نفت خام قابل کشت موجود در فصل گرم در هر پنج منطقه مورد بررسی نسبت به فصل سرد بیشتر بود. میکروفلورهای روده گاو ماهی *Scartelaos tenuis* جمع‌آوری شده از منطقه حسینه دارای بیشترین کمیت می‌باشند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های غیرقابل کشت در میکروفلور گاوماهی *S. tenuis* بیشتر از گونه *P. waltoni* می‌باشند. نتایج این تحقیق تأیید می‌کند که داشتن درک مناسبی از تغییرات جمعیت میکروفلور گاوماهیان، می‌تواند جهت انجام تحقیقات اکولوژیکی برای این موجودات آبزی و مهم در اکوسیستم، حائز اهمیت باشد.

مقدمــه

به مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها که به طور طبیعی بر روی سطح خـارجی بـدن و یـا در انـدام‌هـای داخلـی ماهیـان زیسـت می‌کنند، فلور یا بار طبیعی میکروبی ماهی می‌گویند که به چهار دسته فلور باکتریایی، انگلی، قـارچی و ویروسـی طبقـه‌بنـدی می‌شوند. فلور میکروبی محیط، نقش مهمی در شکل‌گیری فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی ایفا می‌کند. در مقایسه بـا آب، دستگاه گوارش اکوسیستمی مملو از مواد غذایی است و در نتیجه برای رشد اکثر باکتری‌ها مطلـوب‌تـر اسـت. فلـور میکروبـی دستگاه گوارش ماهیان آب شور عموماً شامل جنس‌های *Flavobacterium*, *Aeromonas*,*Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Vibrio Pseudomonas* و *Micrococcus* می‌باشد (Kaseb, 2016).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: mshahi@uk.ac.ir

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

خانواده Oxudercidae یکی از خانواده‌های مهم گاوماهیان متعلق به راسـته گاومـاهی شـکلان (Gobiiformes) و رده ماهیـان استخوانی (Osteichthyes) است (Nelson *et al*., 2016). تعدادی از گونه‌های این گروه از ماهیان به عنوان گل‌خـورک ماهیـان معروف هستند. نام گل‌خورک (Mudskipper) برای چندین گونه خویشاوند این ماهیان اطلاق مـی‌شـود کـه بـه دلیـل عـادات عجیب و غریب دوگانه‌زیستی و همچنین حفاری و تغذیه از موجودات داخل بسترهای گلی و یا گلی-شنی مشـخص مـی‌شـوند (Ranjbaran and sotohian, 2014). این ماهیان معمولاً در پهنه‌های گِلی، خورها، مصب‌هـا و آب‌هـای سـاحلی در زمـان جـزر دیده می‌شوند (Sarafraz, 2009). گل‌خورک‌ها جزء گونه‌های کلیدی محیط بینکشندی در سواحل خلیج‌فارس و دریای عمـان محسوب می‌گردند (Taherizadeh, 2018).

از آنجایی که محیط زیست دریایی نسبت به آلودگی‌ها خصوصاً از نوع نفتی بسیار حساس است؛ بنابراین بررسی میـزان تجزیـه هیدروکربن‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها و کاهش آسیب به اکوسیستم مهم به نظر می رسد. تخمین زده می‌شود که ۱/۳ میلیون تن نفت در هر سال به محیط دریایی وارد می‌شود که بخش زیادی از این آلودگی به سـواحل مـی‌رسـند (McGenity *et al*., 2012; Hassanshahian and Cappello, 2013). آلودگی نفتی در محیط دریایی می‌تواند باعث زیان‌های اقتصادی در حوزه‌های گردشگری و صنایع منابع دریایی مانند صنعت تولید نمک دریایی در سواحل، تولید مواد شیمیایی دریایی، صنعت آبزی‌پـروری دریایی، صنعت ماهیگیری و طبیعت گردی شود. با توجه بـه افـزایش تقاضـای جهـانی نفـت، فعالیـت‌هـای بیشـتری از جملـه بهره‌برداری، استخراج و بازسازی در حال انجام است و حدود نیمی از محصولات نفتی در سرتاسر جهان از طریـق دریـا حمـل می‌شود، در نتیجه افزایش چشمگیر نشت نفت یا حوادث نشتی در سراسر جهان مانند چاه‌های نفتی، خطـوط لولـه، سـکوهای حفاری یا تانکرهای حمل و نقل وجود دارد. مهم‌تر از همه، نشت ترکیبات نفتی حاصل از این حوادث باعث ایجـاد آسـیب‌هـای شدید فیزیکی، شیمیایی و زیست محیطی به محیط‌های دریایی و ایجاد مسمومیت در پرندگان، پستانداران، مـاهی‌هـا و سـایر موجودات دریایی می‌شود. این امر یا باعث مرگ آن‌ها و یا با ورود به زنجیره غذایی جهانی و در نهایت صـدمه زدن بـه سـلامت انسان (آسیب اندام‌های داخلی مانند کلیه‌ها، ریه‌ها و کبد) می‌گردد (Xue *et al*., 2015; Hassanshahian *et al*., 2012).

یکی از راه‌های موجود برای رفع آلودگی‌های نفتی، تجزیه زیستی است. تجزیه زیستی فراینـدی اسـت کـه در طـی آن عوامـل زیستی از قبیل باکتری، قارچ و یا گیاه هیدروکربن‌ها و ترکیبات زنوبیوتیک را طی یک سری واکنش‌هـای پیچیـده بـه مـوادی ساده‌تر تبدیل می‌کنند. تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها فرایند اولیه در حذف هیدروکربن‌ها و مواد زنوبیوتیک اسـت. در فرآیند تجزیه زیستی، باکتری‌ها و قارچ‌ها عمدتاً تجزیه هیدروکربن‌ها را بر عهده دارند و گیاهان وظیفه هوا رسـانی بـه خـاک و رسوب و همچنین جذب و جمع‌آوری نمک‌ها و فلزات سنگین از خاک و رسوبات را بـر عهـده دارنـد. بـاکتری‌هـا و قـارچ‌هـا از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی به منظور رشد استفاده می‌کننـد و آن‌هـا را بـه مـوادی همچـون: نفتنیـک اسیدها، الکل‌ها، فنل‌ها، هیدروپراکسیدها، ترکیبات کربونیل، استرها و در نهایت دی‌اکسید کربن و آب تبدیل می‌کنند (Balba *et al*., 1998; Cappello *et al*., 2011; Hanson *et al*., 1997).

بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تنوع تغییرات میکروفلور گوارشـی هتروتـروف و تجزیـه‌کننـده نفـت خـام در چهـار گونـه گاوماهی *Periophthalmus waltoni* و *Scartelaos tenuis*، *Baleophthalmus dussumieri*، *Istigobius ornatus* شمال خلیج فارس در دو فصل سرد و گرم می‌باشد و همچنین تعیین پراکنش و کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خـام و بـاکتری‌هـای هتروتروف در برخی مناطق شمالی خلیج فارس از اهداف دیگر این تحقیق است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های ماهی متعلق به چهار گونه *Periophthalmus waltoni* و *Scartelaos tenuis*، *Baleophthalmus dussumieri*، *Istigobius ornatus* از پنج منطقه واقع در بخش شمالی خلیج فارس جمع‌آوری گردید. مناطق شامل جزیره ام الگرم، بوشهر (بستر گلی- شنی،"۳.۹۲۲ '۵۰°۲۷ N و "E ۵۲.۵۷۰ '۳۳°۵۱)، بندر حسینه (بستر گلی- شنی،"۵۸.۷ '۳۲°۲۶ N و " E ۲۸.۹ '۳۵°۵۴)، بندرلنگه (بستر صخره‌ای- شنی، "N۶۱۳ '۳۲°۲۶ و " ۶۳۴ '۵۲°۵۵ E) بندر خمیر (بستر گلی، N

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

شکل ۱. نقشه مناطق نمونه‌برداری در شمال خلیج فارس. ۱. جزیره ام الگرم در شرق استان بوشهر، ۲. بندر حسینه، ۳. بندر لنگه، ۴. بندر خمیر، ۵. بندر بوستانو.

"۴۶.۹۸۷۸ '۲۶°۵۸ و "۱۳.۸۴۴۴ '۵۵°۳۸ E) و بندر بوستانو (بستر گلی "۳۷.۵ '۲۷°۰۴ N و" ۴۶.۲ '۵۵°۵۹ E) بودند. نمونه‌برداری در دو فصل سرد (بهمن ماه) و گرم (مرداد ماه) انجام گرفت. در شکل (۱) نقشه محل‌های نمونه‌برداری‌نشان داده شده است.

آماده‌سازی نمونه‌های ماهی

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام، ابتدا نمونه‌های گاوماهی به روش تصادفی توسط تورهای دستی از مناطق مورد نظر صید و در ظروف پلاستیکی استریل شده تحت کنترل دمایی (داخل یونولیت) به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شناسایی و زیست‌سنجی ماهی‌ها، پوست ناحیه شکمی نمونه‌ها توسط پنبه الکل ضدعفونی و در ناحیه شکمی از بخش مخرجی تا کمربند سینه‌ای برش داده و سپس روده نمونه‌ها جداسازی و وزن و طول روده اندازه‌گیری شد. سپس روده و نمونه‌ها در ظروف استریل تا زمان انجام آزمایش‌های تعیین فلور میکروبی در یخچال نگهداری شدند (Gutierrez *et al.*, 2013).

محیط کشت‌های مورد استفاده

برای شمارش و تعیین تعداد جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت در ناحیه روده‌ای از محیط کشت اختصاصی ONR آگار با یک درصد نفت خام و جهت تعیین تراکم و کشت باکتری‌های هتروتروف میکروفلور روده از محیط کشت‌های مارین آگار استفاده شد.

ترکیبات محیط ONR در یک لیتر به شرح زیر است: محلول اول شامل: سدیم کلرید (۴۰ گرم)، سدیم سولفات (۳/۸ گرم)، سدیم بی‌کربنات (۰/۰۳۱ گرم)، پتاسیم کلرید (۰/۷۲ گرم)، سدیم برمید (۰/۰۸۳ گرم)، سدیم فلورید (۰/۰۰۲۶ گرم)، سدیم مونوفسفات (۰/۰۸۹ گرم)، اسید بوریک (۰/۲۷ گرم)، آمونیوم کلرید (۰/۲۷ گرم) و محلول دوم شامل کلسیم کلرید (۱/۴۶ گرم)، منیزیم کلرید (۱۱/۱۸ گرم)، استرانسیوم کلرید (۰/۰۲۴ گرم)، آهن کلرید (۰/۰۰۲ گرم)، تریس (۱/۳ گرم) است. اسیدیته محلول در ۷/۶ تنظیم شد. محیط کشت مارین آگار نیز مشابه محیط ONR است؛ تنها با این تفاوت که دارای پپتون و عصاره مخمر هر یک به میزان یک گرم بر لیتر می‌باشد (Hasanshahian and Emtiazi, 2008).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها با روش سریال رقت (CFU[1])

نمونه‌های روده پس از له شدن در بوته چینی، به‌صورت جداگانه تحت شرایط استریل در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS[2]) حل و به مدت یک هفته در شیکر با دور *rpm* ۱۶۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به منظور غنی‌سازی باکتری‌ها، نگه‌داری شدند. برای تهیه رقت مورد نظر، درون لوله‌های آزمایش ۹ میلی‌لیتر بافر PBS و ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها ریخته شد. برای شمارش هتروتروف‌ها، رقت 10^{-5} و 10^{-6} در لوله‌های آزمایش تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های مارین آگار کشت سفره‌ای داده شد. برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها رقت 10^{-3} و 10^{-2} تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های اوان آر آگار (ONR) حاوی ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن کشت سفره‌ای داده شد (Merck, Germany). پس از گرماگذاری در دمای ۳۵ درجه، بعد از ۳ روز شمارش کلنی‌ها انجام و طبق فرمول زیر تعداد کلنی‌ها محاسبه شد (Cavallo *et al*., 2009; Fuchsluger *el al*., 2010):

Cfu/ml = میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده × عکس رقت ×۱۰

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها با روش MPN[3]

ابتدا نمونه‌های روده پس از له شدن در بوته چینی، به‌صورت جداگانه تحت شرایط استریل در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS) حل و به مدت یک هفته در شیکر با دور rpm ۱۶۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس درون لوله‌های آزمایش میزان ۹ میلی‌لیتر بافر PBS و ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها ریخته شد. برای شمارش هتروتروف‌ها رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} در لوله‌های آزمایش تهیه و در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه به میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط مارین براث تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} تهیه شده، میزان۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح شد. برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} در لوله‌های آزمایش تهیه و در میکروپلیت های ۲۴ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط او ان آر براث حاوی ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن، تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت‌های تهیه شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح شد. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN به صورت ۳ تایی انجام شد. میکروپلیت‌های جهت شمارش هتروتروفها به مدت ۲ روز و میکرو پلیت‌های جهت شمارش تجزیه‌کننده‌ها به مدت ۴ روز در دمای ۳۰°C انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون، ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به عنوان شاخص مثبت آزمایش MPN به حساب آمد (Wrenn and Venosa, 1996).

نتایـج

نتایج حاصل از شناسایی و بیومتری ماهی‌های جمع‌آوری شده

نمونه‌های ماهی جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه، زیست‌سنجی و شناسایی شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده متعلق به ۴ جنس متفاوت بودند که در این بین جنس *Periophthalmus waltoni* نسبت به بقیه نمونه‌ها فراوانی بیشتری داشت. نتایج حاصل از شناسایی و زیست‌سنجی نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

تغییرات تعداد باکتری‌های هتروتروف ها نسبت به فصل در میکروفلور روده گاوماهی با روش مستقیم (سریال رقت)

کلیه نمونه‌های روده به دست آمده از گاوماهیان جمع‌آوری شده از پنج منطقه مختلف از لحاظ تغییر در جمعیت باکتری‌های هتروتروف در دو فصل سرد و فصل گرم با روش سری‌های رقت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله در شکل (۲) نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود تعداد باکتری‌های هتروتروف قابل کشت موجود در فصل گرم در تمام مناطق مورد بررسی از تعداد این باکتری‌ها نسبت به فصل سرد بیشتر است. بیشترین کمیت باکتری‌های هتروتروف در فصل

[1] Colony Forming Unit
[2] Phosphate Buffer Saline
[3] Most Probable Number

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

جدول ۱. نتایج حاصل از شناسایی و بیومتری نمونه‌های ماهی جمع‌آوری شده

شماره	منبع جداسازی	منطقه	فصل	وزن ماهی (g)	وزن روده ماهی (g)	طول کل ماهی (cm)	طول روده ماهی (cm)
۱	*Periophthalmus waltoni*	بندر حسینه ۱	سرد	۶/۵۲۹	۰/۱۵۲	۱۰/۳	۱۱/۸
۲	*Periophthalmus waltoni*	بندر بوستانو ۱	سرد	۱۳/۹۶	۰/۱۱۵	۱۳/۹۶	۱۱/۵
۳	*Scartelaos tenuis*	بندر حسینه ۲	سرد	۴/۱۳	۰/۱۲۵	۱۱/۱	۷/۹
۴	*Periophthalmus waltoni*	بندر خمیر	سرد	۳/۴	۰/۰۵۴	۷/۵	۵/۵
۵	*Istigobius ornatus*	بندر لنگه	سرد	۹/۳۹	۰/۲۷	۱۰	۵/۵
۶	*Periophthalmus waltoni*	ام الگرم- بوشهر	سرد	۱۴/۵۶	۰/۱۸	۱۲	۱۱
۷	*Baleophthalmus dussumieri*	بندر بوستانو۲	سرد	۲۵/۱۳	۰/۶۳	۱۴	۱۴/۸
۸	*Periophthalmus waltoni*	بندر حسینه ۱	گرم	۵/۱۲	۰/۱۷	۱۱	۱۰
۹	*Periophthalmus waltoni*	بندر بوستانو ۱	گرم	۱۵/۱۳	۰/۲۱۵	۱۶/۹۶	۱۴/۵
۱۰	*Scartelaos tenuis*	بندر حسینه ۲	گرم	۶/۲۴	۰/۲۰۵	۱۳/۱	۹/۹
۱۱	*Periophthalmus waltoni*	بندر خمیر	گرم	۲/۷۱	۰/۰۹	۷/۵	۶/۷
۱۲	*Istigobius ornatus*	بندرلنگه	گرم	۱۹/۷	۰/۱۹	۱۴/۵	۱۲/۶
۱۳	*Periophthalmus waltoni*	ام الگرم- بوشهر	گرم	۱۷/۵۶	۰/۲۵	۱۵	۱۴
۱۴	*Baleophthalmus dussumieri*	بندر بوستانو ۲	گرم	۳۰/۷۹	۰/۹	۱۸	۱۶/۸

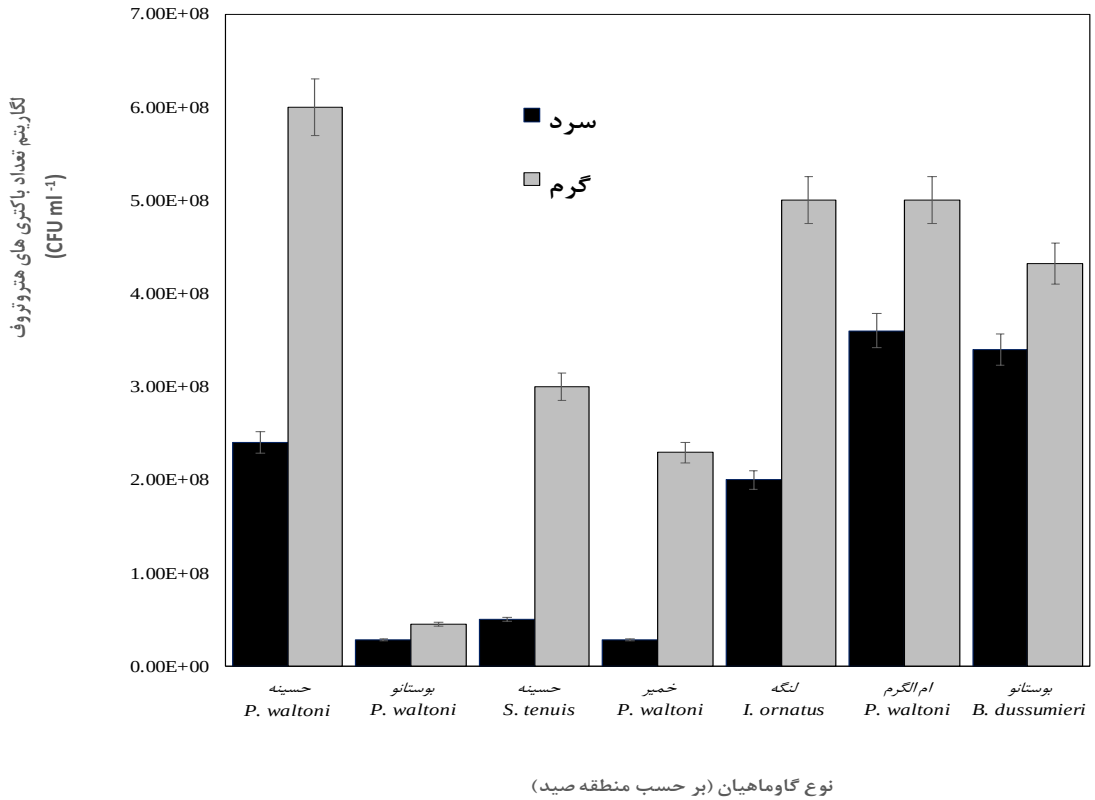
گرم مربوط به گاوماهی *P. waltoni* به ارزش $۱۰^{۸}$ ×۶ می‌باشد. در بین مناطق مورد بررسی، کمترین تراکم باکتری‌های هتروتروف مربوط به منطقه بوستانو (گاوماهی *P. waltoni*) و بیشترین کمیت مربوط به منطقه حسینه (گاوماهی *P. waltoni*) می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر این است که در مناطق بوشهر (ام‌الگرم، گاوماهی *P. walton*) و بوستانو (گاوماهیان *P. waltoni* و *B. dussumieri*) تعداد باکتری‌های هتروتروف در فصل سرد نسبت به فصل گرم در مقایسه با سایر نمونه‌ها اختلاف کمتری دارد.

تغییرات تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام نسبت به فصل در میکروفلور روده گاوماهی با روش مستقیم (سریال رقت)

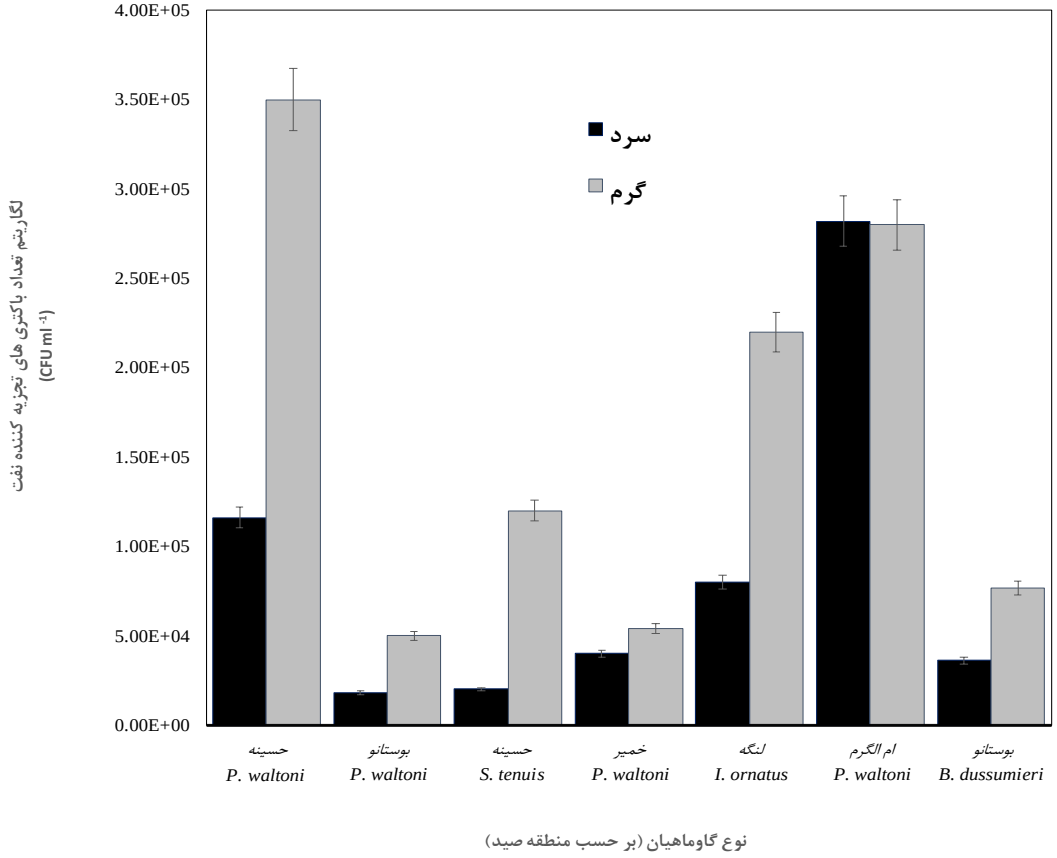
نتایج حاصل از این تعیین کمیت در شکل (۳) آمده است. با توجه به آنچه در این شکل دیده می‌شود تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در تمامی نمونه‌های روده گاوماهیان جمع‌آوری شده، دارای کمیت مناسبی می‌باشند. مشابه الگویی که در مورد باکتری‌های هتروتروف نیز شرح داده شد، در مورد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام کمیت این باکتری‌ها در فصل گرم نسبت به فصل سرد در مورد همه مناطق نمونه‌برداری بیشتر است. البته در منطقه بوشهر (ام‌الگرم، گاوماهی *P. waltoni*) تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در دو فصل سرد و گرم برابر است. بیشترین کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام قابل کشت در فصل گرم مربوط به گاو ماهی *P. waltoni* به ارزش $۱۰^{۵}$ ×۳/۵ می‌باشد. در بین پنج منطقه مورد بررسی، کمترین تراکم باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام قابل کشت، مربوط به منطقه بوستانو (*P. waltoni*) می‌باشد. بیشترین کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام قابل کشت نیز مربوط به منطقه حسینه (*P. waltoni*) است؛ اما به‌طورکلی تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در میکروفلور روده گاوماهیان به‌طور قابل‌توجهی کمتر از تعداد باکتری‌های هتروتروف است. به‌طور مثال؛ بیشترین کمیت در مورد هتروتروف‌ها $۱۰^{۸}$ است ولی در مورد تجزیه‌کننده‌ها $۱۰^{۵}$ می‌باشد، به عبارت دیگر هزار واحد کلنی کمتر است. البته این نتیجه نیز قابل انتظار است؛ زیرا باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام تنها از نفت خام استفاده می‌کنند، در حالی که باکتری‌های هتروتروف از منابع کربن دیگری نیز می‌توانند استفاده کنند.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]



شکل ۲. تغییرات در جمعیت باکتری‌های هتروتروف در میکروفلور روده گاوماهیان نسبت به فصل



شکل ۳. تغییرات در جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در میکروفلور روده گاوماهیان نسبت به فصل

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

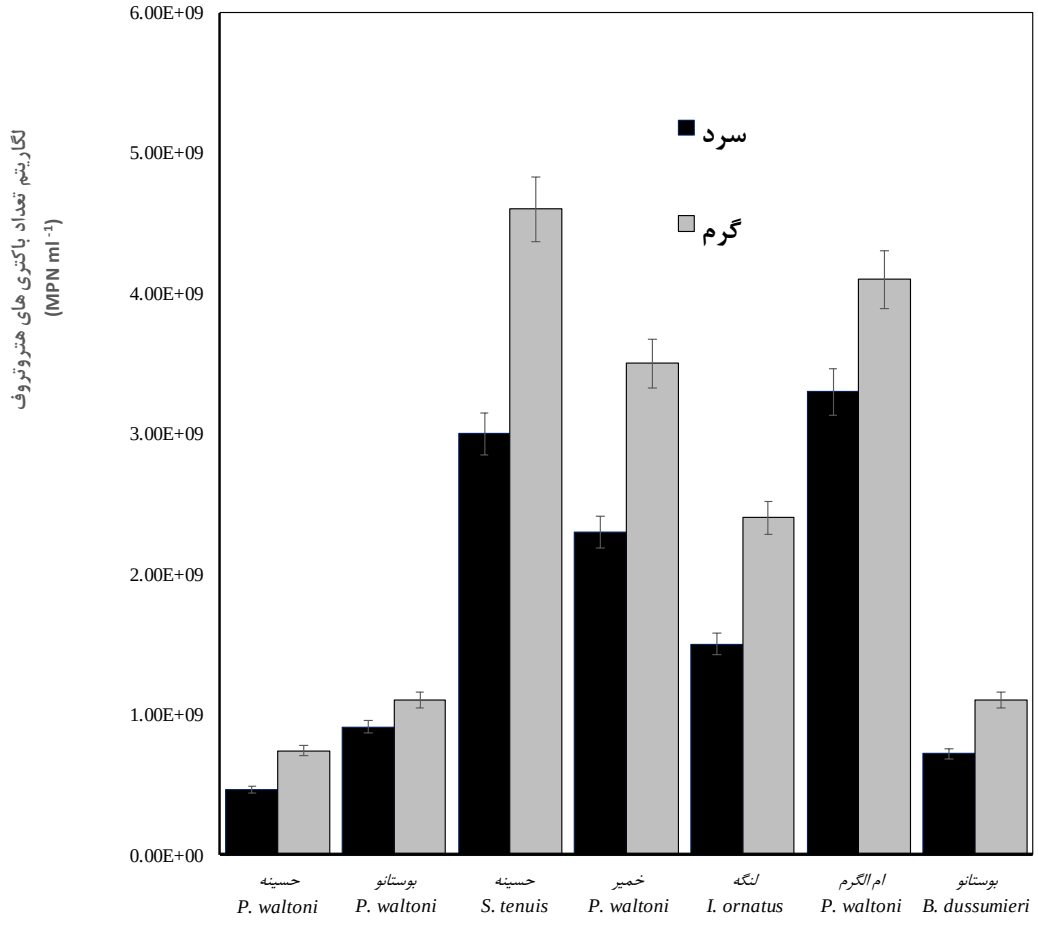
[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

تغییرات تعداد باکتری‌های هتروتروف‌ها نسبت به فصل در میکروفلور روده گاوماهی با روش شمارش حداکثر احتمالی

این سنجش برای درک بهتر جمعیت میکروفلور گاوماهیان جمع‌آوری شده از مناطق پنج‌گانه انجام شد. نتایج حاصل از تعین کمیت باکتری‌های هتروتروف با این روش در شکل (۴) آمده است. می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های هتروتروف در میکروفلور روده گاوماهی *Scartelaos tenuis* جمع‌آوری شده از منطقه حسینه، دارای بیشترین کمیت می‌باشند. برخلاف روش سریال رقت که بیشترین کمیت متعلق به گاوماهی *P. waltoni* بود، با روش شمارش حداکثر احتمالی (MPN) بیشترین کمیت متعلق به این جنس نبود. این اختلاف به این دلیل است که در روش سریال رقت، باکتری‌های قابل کشت روی محیط آگاردار شمارش می‌شوند؛ اما در روش MPN هم باکتری‌هایی که قابلیت تولید کلنی دارند و هم باکتری‌هایی که کلنی ایجاد نمی‌کنند بر اساس کدورت شمارش می‌شوند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های غیرقابل کشت در میکروفلور گاوماهی *S. tenuis* بیشتر از جنس *P. waltoni* می‌باشد. الگوی بیشتر بودن کمیت باکتری‌های هتروتروف در میکروفلور روده در فصل گرم نسبت به فصل سرد در این روش نیز مشاهده شد.

تغییرات تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام نسبت به فصل در میکروفلور روده گاوماهی با روش شمارش حداکثر احتمالی

با استفاده از نفت خام به‌عنوان منبع کربن و کدورت به‌عنوان شاخص مثبت، کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در میکروفلور روده نمونه‌های مورد بررسی، تعیین شد. نتایج حاصل در شکل (۵) آمده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود، باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام در میکروفلور روده گاو ماهی *S. tenuis* جمع‌آوری شده از منطقه حسینه دارای

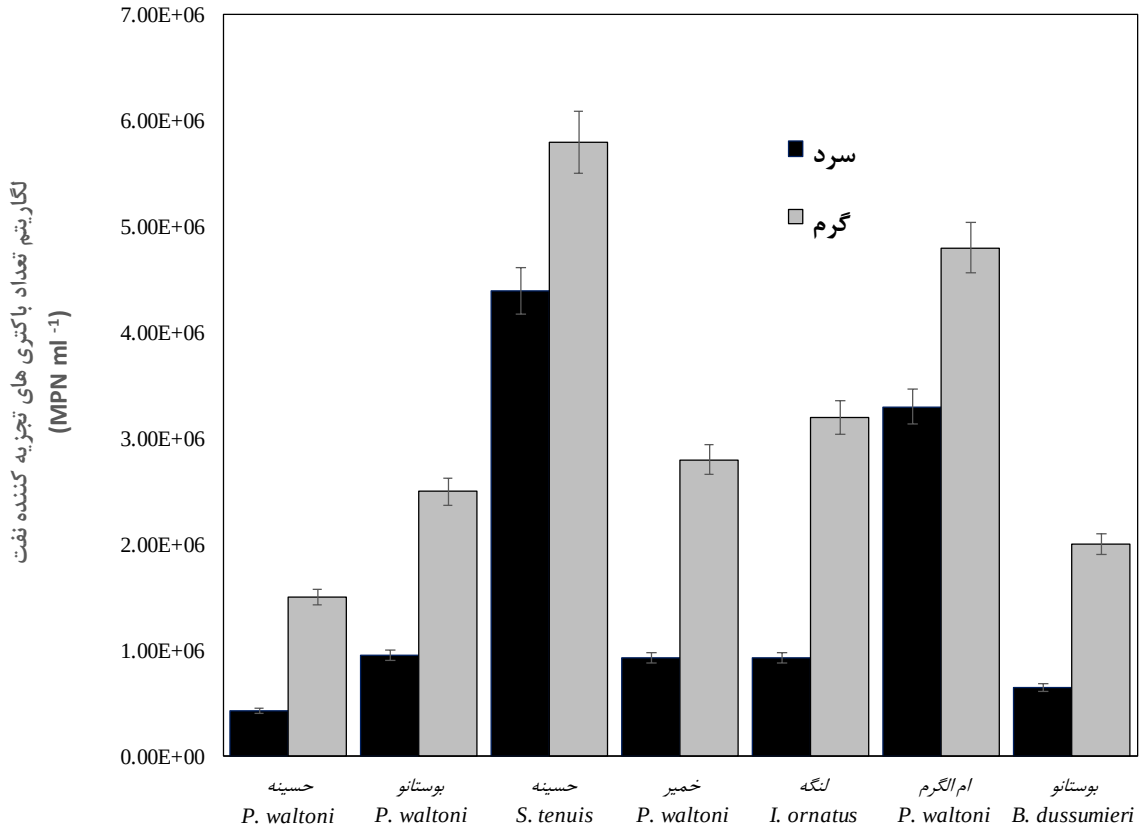


شکل ۴. شمارش حداکثر احتمالی باکتری‌های هتروتروف میکروفلور گاوماهیان از مناطق نمونه‌برداری گوناگون

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

بیشترین کمیت به ارزش ۶×۱۰^{۶} می‌باشد. بین باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام قابل کشت و غیرقابل کشت که با این روش سنجش گردیدند با باکتری‌های هتروتروف به دست آمده با این روش در خصوص منطقه و جنس گاو ماهی هم‌خوانی وجود دارد. این یافته نشان می‌دهد که درصد زیادی از میکروفلور روده گاوماهیان را باکتری‌های غیرقابل کشت که کلنی ایجاد نمی‌کنند ولی وجود دارند، تشکیل می‌دهند.



شکل ۵. شمارش حداکثر احتمالی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام میکروفلور گاوماهیان از مناطق نمونه‌برداری گوناگون

بحث

فلور میکروبی محیط، نقش مهمی در شکل‌گیری فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی ایفا می‌کند. در مقایسه با آب، دستگاه گوارش اکوسیستمی است که از مواد غذایی پر شده است و در نتیجه برای رشد اکثر باکتری‌ها مطلوب‌تر است. روده ماهیان تا قبل از تفریخ شدن تقریباً استریل است اما به مجرد تفریخ شدن تخم ماهی و تماس لارو با محیط اطراف، میکروب‌های مختلفی در روده ماهی کلنی تشکیل می‌دهند (Subarna *et al*., 2002).

میکروفلور روده تابع فلور باکتریایی آب اطراف است. تغییر شرایط تغذیه‌ای و محیطی می‌تواند میکرو اکوسیستم لوله گوارشی ماهی را تغییر دهد. همچنین در زمان شرایط استرس‌زا ممکن است فلور میکروبی روده تغییر کند. عوامل زیستی (مهاجرت، بیماری و تغذیه)، عوامل فیزیکی (دمای آب، نوع بستر، صید و دست‌کاری) و عوامل زیست محیطی (تغییرات فصلی، پدیده‌های طبیعی مانند شوری آب، بارندگی، بار مواد آلی، آلودگی‌ها، فلزات سنگین) از جمله فاکتورهای تأثیرگذار بر فلور باکتریایی ماهیان هستند (Todd *et al*., 2010).

تاکنون روش‌های گوناگونی برای حذف نفت خام در محیط‌های دریایی توسعه پیدا کرده است. از جمله این روش‌ها می‌توان روش‌های فیزیکی و شیمیایی مثل اسکیمر، سورفکتانت، سوزاندن، محدودسازی و مواد شیمیایی را نام برد. هر چند این

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

روش‌ها به طور مؤثری می‌توانند نفت خام را از محیط دریایی حذف کنند، ولی خود آلودگی ثانویه ایجاد می‌نمایند که برخی مواقع از آلودگی اولیه نفت خام خطرات بیشتری دارد. تجزیه به عنوان یک فرایند اساسی در حذف آلاینده‌ها از محیط زیست می‌باشد (Wang *et al*., 2006; Rahman *et al*., 2004).

از ماهی گل‌خورک به عنوان نشانگر زیستی برای نشان دادن تأثیر تجمع فلزات سنگین (Zn, Cd, Cu و Pb) و آلودگی‌های سموم که توسط رودها به دریا و اقیانوس وارد می‌شود، استفاده می‌گردد. فلزات سنگین در بافت‌های مختلف تمرکز می یابند. تماس بدن ماهی با آلودگی‌های موجود در آب، رسوب و یا غذای آلوده شده باعث تجمع مواد مذکور در بدن موجود می‌شود (Ranjbaran and Sotohian, 2014).

گونه‌های گل‌خورک در ایران از نظر اقتصادی اهمیت ندارند، اما به عنوان غذای پرندگان، ماهیان و از نظر اکولوژی در جنگل‌های حرا مهم هستند. در سال‌های اخیر، از گاو ماهیان به طور گسترده، به عنوان مدل آزمایشگاهی در مطالعات تطابق در شرایط یوری هالین و یوری ترمال، اکوفیزیولوژی، تغییرات مورفولوژیک برای سازش در شرایط خشکی، نقش انتخاب جفت در تکامل و مراقبت‌های والدینی، شاخص زیستی و نشانگر زیستی جهت سنجش شرایط زیستی در سواحل گلی و مانگرو استفاده شده است (Yakimov *et al*., 2007).

در سال‌های اخیر علاقه زیادی به مطالعه بر روی موجودات دریایی که در اکوسیستم دریایی آلوده به مواد نفتی زندگی می‌کنند، ایجاد شده است. در این میان گاو ماهیان به دلیل تغذیه و زندگی در رسوبات تازه ته‌نشین یافته و در نتیجه تماس مستقیم با مواد آلوده آب و همچنین فعالیت معلقخواری با باکتری‌های جمع شده در رسوبات و آب از اعضای مهم اکوسیستم دریایی هستند که نقش مهمی در فرآیند پاکسازی ایفا می‌کنند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که دستگاه گوارش گاوماهیان زیستگاه‌های طبیعی برای برخی از گونه‌های باکتریایی است. تفاوت‌های کمی و کیفی در میکروب‌های غالب گاو ماهیان به تفاوت ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مناطقی که این ماهی‌ها جمع‌آوری شدند، مربوط می‌شوند (Taherizadeh, 2018).

در این تحقیق میکروفلور گوارشی چند گونه متفاوت از گاوماهیان که از پنج منطقه گوناگون در خلیج فارس جمع‌آوری شده بودند از لحاظ دو دسته مهم از باکتری‌ها شامل باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام و باکتری‌های هتروتروف ساکن روده در دو فصل سرد و گرم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که کمیت این دو گروه از باکتری‌ها در گونه‌های متفاوت گاوماهیان با همدیگر اختلاف دارد و از طرفی حتی دو گونه مشابه که از دو منطقه متفاوت در خلیج فارس جمع‌آوری شده بودند نیز تراکم متفاوتی از لحاظ میکروفلور مورد بررسی داشتند. این نتایج نشان می‌دهد که میکروفلور روده این ماهیان هم تحت تأثیر مستقیم شرایط محیطی و هم به نوع جنس و گونه مرتبط است.

تاکنون هیچ تحقیق مشابهی روی این نوع از ماهیان در خلیج فارس انجام نشده است و این تحقیق از این لحاظ دارای نوآوری است؛ اما تحقیقات مشابهی در خصوص اثر آلودگی بر روی جوامع میکروبی صورت گرفته است که در ادامه به چند مورد از آن‌ها اشاره می‌شود.

Hassanshahian و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که آلودگی نفت می‌تواند تغییرات عمده‌ای در جوامع میکروبی دریایی در خلیج فارس و دریای خزر ایجاد کند که در هنگام آلودگی تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت افزایش می‌یابد.

Bayat و همکاران (۲۰۱۵) جداسازی و غنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از صدف دوکفه‌ای در خلیج فارس را مورد بررسی قرار دادند. در این گونه‌ها فعالیت امولسیون کنندگی و تولید بیوسورفاکتانت، همچنین اثرات برخی از عوامل مؤثر بر تجزیه نفت خام توسط سویه‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق اولین گزارش در خصوص باکتری‌های تجزیه نفت خام از صدف در خلیج فارس است.

با مقایسه دو تحقیق ذکر شده با تحقیق حاضر این نتیجه به دست می‌آید که همخوانی بین نتایج دو تحقیق مذکور با نتایج به دست آمده در این تحقیق وجود دارد؛ بدین صورت که افزایش تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام پس از ایجاد آلودگی وجود دارد و در محیط‌های آلوده تعداد تجزیه‌کننده‌ها افزایش قابل‌توجهی داشت.

در مجموع نتایج این تحقیق ثابت کرد که تراکم باکتری‌ها در میکروفلور روده گاو ماهیان مورد بررسی در فصل گرم افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که در همه نمونه‌های مورد بررسی و سنجش شده با دو روش متفاوت شمارش، این نتیجه به دست آمد.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

نتیجه افزایش کمیت با افزایش دما را بدین صورت می‌توان تفسیر کرد که با افزایش دما یکسری از باکتری‌هایی که در حالت اسپور در میکروفلور روده قرار دارند با افزایش دما فعال گشته و به فرم رویشی درمی‌آیند و لذا کمیت باکتری‌ها با افزایش دما بیشتر می‌شود. هنگامی‌که ماهی وارد فصل سرد می‌شود با توجه به استرس دمایی، غذای کافی برای تعدادی از باکتری‌ها جهت رشد در میکروفلور روده کاهش می‌یابد؛ لذا تعدادی از آن‌ها وارد فاز سکون رشد و تعدادی نیز در فاز خفته یعنی سپور وارد می‌شوند تا بتوانند استرس وارده را تحمل کنند و به محض عادی شدن شرایط دوباره به فرم رویشی برگردند.

منابـع

Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. Journal of Microbiological Methods. 32(2): 155-164.

Bayat, Z., Hassanshahian, M., Askari Hesni, M. 2015. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin. 101: 85-91.

Cappello, S., Russo, D., Santisi, S., Calogero, R. 2011. Presence of hydrocarbon-degrading bacteria in the gills of mussel Mytilusgallo provincialis in a contaminated environment: a mesoscale simulation study. Chemistry and Ecology. 3: 1-14.

Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Stabili, L. 2009. Culturable heterotrophic bacteria in sea water and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). Environment Monitoring Ass*essment.* 149: 465-475.

Fuchsluger, C., Preims, M., Fritz, I. 2010. Automated measurement and quantification of heterotrophic bacteria in water samples based on the MPN method. Journal Indian Microbiology and Biotechnology. 38: 241-247.

Gutierrez, T., Singleton, D., Berry, D., Yang, T., D.Aitken, M., Teske, A. 2013. Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. ISME Journal. 7: 2091-2104.

Hanson, K.G., Anuranjini, N., Madhavi, K., Anjana, J.D. 1997. Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacte*r sp. A3. Current Microbiology. 35(3): 191-193.

Hassanshahian, M., Cappello, S. 2013. Crude oil biodegradation in the marine environments. Biodegradation - Engineering and Technology book. Intech-Open Press. 342 p.

Hasanshahian, M., Emtiazi, G. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. International Biodegradation. 62: 170-178.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S. 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin. 64: 7-12.

Hassanshahian, M., Zeynalipour, M., Hosseinzadeh Musa, F. 2014. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). Marine Pollution Bulletin. 82: 39- 44.

Kaseb, A. 2016. Effects of colloidal silver nanoparticles on bacterial floral changes of water, gut, gill and skin of Caspin Kutum (*Rutilus Frisii Kutum*). MSc thesis of fisheries. Faculty of marine science. Tarbiat Modares University. (in Persian)

Nelson, J., Grande, T., Wilson, M. 2016. Fishes of the World. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 326: 329: 331.

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M. 2004. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource Technology. 85: 257-261.

Ranjbaran, M., Sotohian, F. 2014 Biogenic Activities of mudskipper in the Recent Intertidal Mud Flats along the Qeshm Island Coast, south of Iran. Journal of Animal Environment. 6: 257-264. (in Persian)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]

Sarafraz, Z. 2009. Basic Investigation of the Dynamics of the Population of Mudskippers in the Qeshm Island and Bandar Abbas Coastal Areas. MSc thesis of marine biology. Shahid Beheshti University. (in Persian)

Subarna, R., Dipak, H., Debabrata, B., Dipa, B., Ranajit, K. 2002. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. World Journal Microbiology and Biothnology. 18: 575-581.

Taherizadeh, M. 2018. Investigation of the Ecology of Mudskippers in the Coastal Areas of Hormozgan Province. Research Project, Ministry of Agriculture. Research, Training and Extension of Agriculture. Fisheries Research Institute of the Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Institute.

McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., Gbemisola, O. 2012. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. Aquatic Biosystems. 8(10): 89-108.

Todd, P.A., Ong, X., Chou, L.M. 2010. Impacts of pollution on marine life in Southeast Asia. Biodiversity Conservation. 19(4): 1063-1082.

Wrenn, B.A., Venosa, A.D. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure. Journal Microbiology. 42(3): 252-258.

Wang, L., Tang, Y., Wang, Sh., Liu, R., Liu, M.Z., Zhang, Y., Liang, F.L., Feng, L. 2006. Isolation and characterization of a novel thermophilic Bacillus strain degrading long-chain n-alkanes. Extremophiles. 10: 347-356.

Xue J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., Wu, Y. 2015. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments. Current Microbiology. 12 (1): 55-63.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. Current Opinion in Biotechnology. 18(3): 257-266.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-12-04]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.1.8]