



Original Research Paper

Phylogenetic diversity and relationship between of sediment, water and fish bacterial in Karoon River (case study: Ahvaz City)

Laleh Roomiani ^{1*}, Nersy Nasirabadi ¹, Hooman Ghasemi ²

¹ Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

² Department of Medical, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Key Words

Bacteria
Fish
Phylogenetic diversity
16S rRNA
Karoon River

Abstract

Introduction: Bacteria are the most abundant and richest group of organisms that play a vital role in many important ecosystem processes; hence their diversity has been investigated in various studies. This research was conducted with the aim of investigating the phylogenetic diversity of bacteria in the Karoon River and its relationship with sediment and fish.

Materials & Methods: This study was conducted in the spring of 2022 and on the bacteria of water samples, sediment and *Cyprinus carpio*, *Tilapia zilli* and *Barbus barbulus* of 4 stations of the Karoon River in Ahvaz city. Sequencing was used to purify the strains. Genomic DNA gene extraction was performed using general primers and the gene related to the ribosomal subunit (16S rRNA) was amplified. Phylogenetic analysis of the strains after determining the similar sequences and aligning the sequences, editing and drawing the phylogenetic tree with MEGA software (V.11) was performed.

Results: 50 strains of 8 bacterial families were isolated from water, sediments and fish. The strains belonging to the Bacillus family had the highest frequency in water, sediment and fish ($P < 0.05$). Also, in all the sampling areas, the bacterial diversity in the sediment was more than that of the water, and the composition of the bacterial community in the digestive system of fishes was more similar to the sediments on the riverside.

Conclusion: According to the results of the present study and the effectiveness of fish gut bacteria from sediments, knowing the natural bacterial flora of fish ecosystems can be effective in managing aquatic ecosystems and using them for different uses. On the other hand, due to the possibility of the spread of non-indigenous pathogens or resistant to antibiotics as a result of human sewage entering the river, it seems necessary to maintain the health of the river and purify the sewage before entering the Karoon River.

* Corresponding Author's email: l.roomiani@iauahvaz.ac.ir

Received: 1 September 2022; Reviewed: 3 October 2022; Revised: 1 November 2022; Accepted: 1 January 2023

(DOI): [10.22034/AEJ.2023.374637.2911](https://doi.org/10.22034/AEJ.2023.374637.2911)

مقاله پژوهشی

تنوع فیلوژنتیکی و ارتباط باکتری های رسوب، آب و ماهیان در رودخانه کارون
(مطالعه موردی شهر اهواز)لاله رومیانی^{*}، نرسی نصیرآبادی^۱، هومان قاسمی^۲^۱ گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران^۲ گروه پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

باکتری

ماهی

تنوع فیلوژنتیکی

ژن 16S rRNA

رودخانه کارون

مقدمه: باکتری ها فراوان ترین و غنی ترین گروه از موجودات هستند که در بسیاری از فرآیندهای مهم اکوسیستم نقش حیاتی دارند، از این رو در مطالعات مختلف تنوع آن ها مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش، با هدف بررسی تنوع فیلوژنتیکی باکتری های رودخانه کارون و ارتباط آن با رسوب و ماهیان انجام گرفت.

مواد و روش ها: این مطالعه در بهار ۱۴۰۱ و روی باکتری های نمونه های آب، رسوب و ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، تیلپیا (*Tilapia zilli*) و برزم (*Barbus barbus*) ۴ ایستگاه مربوط به رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز انجام شد. از روش کشت متوالی به منظور خالص سازی سویه ها استفاده شد. استخراج ژنی DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای عمومی انجام و ژن مربوط به زیر واحد ریبوزومی (16S rRNA) تکثیر گردید. تحلیل فیلوژنتیک سویه ها پس از تعیین توالی های مشابه و همراستاسازی توالی ها، ویرایش و رسم درخت فیلوژنتیک با نرم افزار MEGA (V.11) انجام شد.

نتایج: ۵۰ سویه از ۸ خانواده باکتری از آب، رسوبات و ماهیان جدا شد. سویه های متعلق به خانواده باسیلوس ها، بالاترین فراوانی را در آب، رسوب و ماهیان داشتند ($P < 0.05$). هم چنین در تمام مناطق نمونه برداری تنوع باکتریایی در رسوب بیش تر از آب بود و ترکیب جامعه باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان بیش تر شبیه رسوبات کناره های ساحل رودخانه بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر و تاثیرپذیری باکتری های روده ماهی از رسوبات، شناخت فلور باکتریایی طبیعی اکوسیستم ماهی، می تواند در مدیریت اکوسیستم های آبی و استفاده از آن ها برای کاربری های مختلف موثر باشد. از طرفی با توجه به امکان شیوع عوامل بیماری زای غیربومی و یا مقاوم در برابر آنتی بیوتیک ها در اثر ورود فاضلاب انسانی به رودخانه، حفظ سلامت رودخانه و تصفیه فاضلاب قبل از ورود به رودخانه کارون ضروری به نظر می رسد.

مقدمه

میکروارگانسیم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها نقش مهمی را در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی مانند کربن و نیتروژن و هم‌چنین اکولوژیکی محیط‌های آبی بر عهده دارند. تنوع زیستی آن‌ها به دلیل اندازه بسیار کوچکی که دارند در محیط پنهان مانده است، اما اثرات آن‌ها در چرخه مواد غذایی کاملاً شناخته شده است (۱، ۲، ۳). مطالعه تنوع میکروارگانسیم‌ها باعث شناخت بهتر فلور طبیعی زیستگاه‌ها و افزایش ذخیره ژنتیکی و جداسازی گونه‌هایی می‌گردد که پتانسیل استفاده در بیوتکنولوژی را دارا می‌باشند تا گام موثر در جهت استفاده صنعتی برداشته شود. روش‌های مقایسه‌ای متعددی برای بررسی تنوع جمعیت باکتریایی انجام گرفته است (۴، ۵، ۶). هر یک از این روش‌ها دارای ویژگی‌هایی می‌باشند اما عموماً هیچ‌یک روش کاملی نیستند (۷، ۸). از این‌رو در طی سال‌های اخیر برای بررسی تنوع زیستی علاوه بر نوع محیط کشت اختصاصی، روش مولکولی PCR جهت تکثیر و آنالیز ژن‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. البته در این روش‌ها بخشی از میکروارگانسیم‌ها به دلیل غیرقابل کشت بودن در نظر گرفته نمی‌شوند و هم‌چنین نوع روش کشت و محیط کشت و شرایط فیزیکی انتخابی می‌تواند بر روی نتیجه تاثیرگذار باشد (۹). براساس این روش، تمامی سویه‌های متعلق به یک گروه، سطح قابل قبولی از ثبات صفات فنوتیپی را دارند و بیان یک گونه باید با بیش از یک سویه معین انجام شود (۱۰). سویه‌هایی با میزان تفاوت RNA ریبوزوم ۹۸/۷ درصد یا کم‌تر، اکثراً از اعضای گونه‌های مختلف می‌باشند، زیرا تفاوت نسبتاً زیاد در توالی 16S rRNA نشان‌دهنده یک ساختار DNA متفاوت است. این فیلو گروه‌ها از نظر خصوصیات زیست محیطی، سرعت رشد، توانایی متفاوت در استفاده از قندها و الگوی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از یکدیگر متمایز هستند که این موضوع در مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا و نوع آنتی‌بیوتیک مورد استفاده اهمیت بالایی دارد (۱۱). در حال حاضر یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده صنعت پرورش آبزیان در جهان عوامل بیماری‌زا به‌خصوص باکتری‌ها است که سالانه میلیون‌ها دلار به پرورش‌دهندگان خسارت وارد می‌کند و یکی از موضوعات مهم در توسعه آبی‌پروری محسوب می‌شود. جهت بررسی بیماری‌های آبزیان، شناخت ارتباط بین ماهی، محیط و عوامل بیماری‌زا بسیار مهم است و پایه و اساس مدیریت صحیح در تکثیر و پرورش می‌باشد. Sadar و همکاران، ساختار جمعیت باکتری‌های روده مزارع پرورش میگو و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها (۱۲) و Faeed و همکاران، روی باکتری‌های موجود در مزارع پرورش ماهی گلدفیش (*Carassius auratus*)، مطالعاتی را انجام داده‌اند (۱۳). Kim و همکاران، باکتری‌های عمده معده ماهی و ارتباط آن با نوع زیستگاه را

بررسی کرده‌اند (۱۴). رودخانه کارون در منطقه‌ای به نام گتوند وارد دشت خوزستان می‌شود. سرچشمه اصلی این رودخانه از زردکوه بختیاری و کوه‌های زاگرس است که از به هم پیوستن چندین رودخانه فرعی و مهم‌تر از همه آب ونگ، بهشت‌آباد، منج، کوهرنگ، بارت و خرسان می‌باشد. یکی از دلایلی که سبب توجه به آلودگی رودخانه کارون شده است تخلیه انواع فاضلاب‌های شهری، صنعتی و کشاورزی به آن در کنار استفاده از آب این رودخانه به منظور پرورش آبزیان است. از این‌رو، شناسایی فیلوژنتیکی باکتری‌های این رودخانه، جهت شناسایی و کنترل باکتری‌های بیماری‌زا در مزارع پرورش ماهی اهمیت بالایی دارد و با توجه به گسترش روزافزون و وجود تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین فیلوگروه‌ها و فقدان این مطالعه در رودخانه کارون، این مطالعه با هدف بررسی تنوع فیلوژنتیکی باکتری‌های موجود در آب، رسوب و ماهی و ارتباط آن‌ها با هم در رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز انجام شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام نمونه‌برداری ابتدا نقشه‌های توپوگرافی محدوده مورد مطالعه تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. ایستگاه‌های نمونه‌برداری با توجه به شرایط طبیعی و امکان دسترسی به رودخانه انتخاب شد (شکل ۱). نمونه‌برداری به‌روش تصادفی از فروردین تا اردیبهشت سال ۱۴۰۱ در چهار ایستگاه رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز انجام شد. در تمامی ایستگاه‌های مورد بررسی دمای میانگین آب 20 ± 0.53 درجه سانتی‌گراد و محدوده‌ای بین ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد داشت. نمونه‌برداری در فواصل ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ متر انجام شد. نمونه‌های آب با استفاده از فالكون‌های پلاستیکی استریل با ظرفیت ۵۰ سی‌سی (۱۵) و نمونه‌های رسوبات از کناره‌های بستر رودخانه در محدوده چهار ایستگاه انجام شد (۱۶). نمونه‌برداری از ماهیان بومی (۲۵ نمونه) به روش تصادفی با استفاده از تور نایلونی با اندازه چشمه ۱۰-۶ سانتی‌متر و نیز قلاب (رشته‌هایی به طول ۲۰۰-۵۰۰ متر که دارای تعدادی قلاب در فواصل ۳ تا ۵ متر می‌باشد) انجام شد. در مجموع ۵۴۰ نمونه آب (۱۸۰ نمونه)، رسوب (۱۸۰ نمونه) و ماهی (۲۵ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در کنار یخ و در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید چمران شهر اهواز منتقل و تا قبل از انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند. در جدول ۱، مختصات نقاط نمونه‌برداری نشان داده شده است. در آزمایشگاه نمونه‌های آب با استفاده از فیلتر ۴۵ میکرومتر برای حذف جلبک‌ها و ذرات معلق بزرگ فیلتر شدند. سپس با استفاده از سانتریفیوژ (مدل HB320، ساخت شرکت بهسان، ایران) با دور ۵



شکل ۱: موقعیت نقاط نمونه برداری آب، رسوب و ماهی در رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز (سال ۱۴۰۱)

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی نمونه برداری از ایستگاه های مطالعاتی رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز (سال ۱۴۰۱)

منطقه نمونه برداری	مختصات جغرافیایی	نوع نمونه		
		ماهی	رسوب	آب
پل کیانپارس	N: ۳۱° ۲۱' ۱۵" E: ۴۸° ۴۳' ۱۲"	*	*	*
پارک جزیره	N: ۳۱° ۲۰' ۰۷" E: ۴۸° ۴۰' ۴۹"	*	*	*
پل پنجم	N: ۳۱° ۱۸' ۳۷" E: ۴۸° ۳۹' ۵۴"	*	*	*
پارک مالیات	N: ۳۱° ۱۶' ۴۸" E: ۴۸° ۳۹' ۳۶"	*	*	*

نتایج

نتایج آزمایشات مولکولی باکتری ها: پلیت حاوی دو باکتری خالص جداسازی شده در شکل ۲- الف نشان داده شده است. باندهای ژن 16S rRNA در کل ایزوله های باکتریایی نمونه های آب، رسوب و درون روده ماهیان شناسایی شد. ژل الکتروفورز باندهای تشکیل شده در شکل ۲- ب نشان داده شده است. از بین ۴۰۰ نمونه آب، رسوب و روده ماهیان با بررسی ژن 16S rRNA، ۵۰ سویه باکتری از ۸ خانواده به دست آمد و خانواده باسیلوس ها غالب بودند. نتایج شناسایی و تعیین هویت مولکولی ایزوله های باکتریای روده ماهی، رسوبات و آب با استفاده از تعیین توالی ژن 16S rRNA در جداول ۲ تا ۵ آمده است.

هزار دور در دقیقه، سانتریفیوژ و از رسوب به منظور تلقیح به محیط کشت بلاد آگار استفاده شد. محیط های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (Memmert IN55, Germany) انکوبه شدند (۱۵). در مورد نمونه های رسوبات، ۲۵ گرم از نمونه رسوب به ۲۲۵ میلی لیتر به محیط TSB (Trypticasein Soy Broth) با pH ۷/۳ منتقل شد. سپس نمونه ها با استفاده از رقت های متوالی تارقت 10^{-5} بر روی محیط بلاد آگار جهت جداسازی تلقیح شدند. محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (۱۶). گونه های کپور (*Cyprinus carpio*)، تیلپیا (*Tilapia zilli*) و برزم (*Barbus barbuls*) از رودخانه کارون صید و شناسایی با استفاده از کلید شناسایی Coad انجام شد (۱۷). قبل از باز کردن حفره بدن، سطح بطنی جانبی ماهی با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد. ۲۵ گرم از محتویات روده ماهی با استفاده از قیچی و تیغ اسکالپل و در مجاورت شعله به ۵۰ میلی لیتر محیط TSB منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (۱۴).

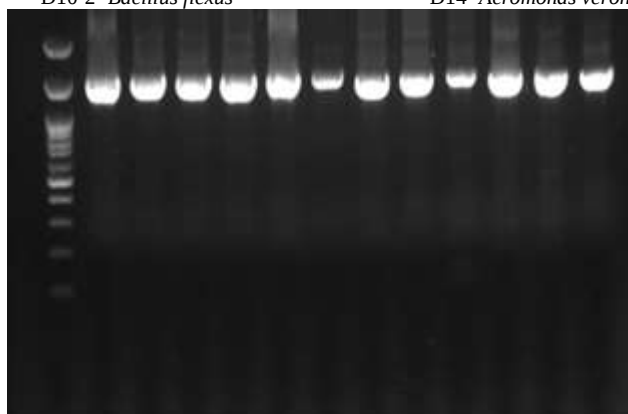
خالص سازی سویه ها: به منظور خالص سازی سویه ها کشت متوالی از تک کلونی ها انجام شد. کلنی هایی که بعد از چند بار متوالی کشت، مشخصات ثابتی از نظر ویژگی های گرم و ریخت شناسی (فرم و اندازه کلنی، مورفولوژی سلول و تولید رنگدانه) از خود نشان دادند به عنوان کلونی خالص در نظر گرفته شدند (۱۸).

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک سویه ها: شناسایی نهایی جدایه های منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA انجام شد. ابتدا از نمونه های منتخب DNA ژنومی به روش جوشاندن جداسازی شد (۱۹). نمونه های تک کلنی مخلوط با آب مقطر استریل در میکروتیوب هایی ۲ میلی لیتر در دستگاه Dry Block Heating Thermoblock در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس جهت شوک سرمایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند. میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی -5' 27F: 1492R: 5'-GGTT و AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (۱۹) ACCTTGTTACGACTT-3' انجام گرفت. محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال شد. نتایج حاصل از آن با استفاده از نرم افزار Chromas Pro ویرایش و با استفاده از نرم افزار BLAST با توالی های معتبر ثبت شده در پایگاه داده ها، نزدیک ترین سویه از نظر توالی ژن 16S rRNA مشخص شد. تحلیل فیلوژنتیک سویه ها پس از تعیین توالی های مشابه و همراستاسازی توالی ها، ویرایش و رسم درخت فیلوژنتیک با نرم افزار MEGA (V.11) انجام شد (۲۰).

الف

D10-2- *Bacillus flexus*D14- *Aeromonas veronii*

ب



شکل ۲: الف - نمونه‌های خالص باکتری روی محیط کشت بلاد آگار، ب - باندهای ژن 16S rRNA

جدول ۲: نتایج مرفولوژی باکتری‌ها از آب، رسوبات و ماهیان بومی رودخانه کارون در محدوده شهر اهواز

Cell shape	Gram stain	Species
coccus-shaped	+	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>
rod-shaped	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>
rod-shaped	-	<i>Phaeodactylibacter xiamenensis</i>
rod-shaped	+/- variable	<i>Peribacillus frigoritolerans</i>
rod-shaped	variable	<i>Bacillus flexus</i>
rod-shaped	+	<i>Bacillus safensis</i>
Rod- shaaaped	-	<i>Comamonas aquatica</i>
rod-shaped	-	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>
rod-shaped	-	<i>Aeromonas veronii</i>
rod-shaped	+	<i>Bacillus paramycoides</i>
rod-shaped	-	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis</i>
rod-shaped	+	<i>Exiguobacterium profundum</i>
rods which are 83% motile	-	<i>Enterobacter hormaechei</i>
rod-shaped	-	<i>Klebsiella sp.</i>
heterotypic synonym	+	<i>Bacterium enrichment</i>
rod-shaped	-	<i>Shewanella litorisediminis</i>
rod-shaped	-	<i>Aeromonas dhakensis</i>
rod-shaped	+	<i>Bacillus thuringiensis</i>
rod-shaped	-	<i>Proteus terrae</i>
rod-shaped	-	<i>Proteus vulgaris</i>
rod-shaped	-	<i>Escherichia coli</i>
rod-shaped	-	<i>Kluyvera sp.</i>
rod-like	+	<i>Kurthia sp.</i>
rod-shaped	-	<i>Aeromonas jandaei</i>
rod-shaped	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
rod-shaped	+	<i>Bacillus sp.</i>
rod-shaped	-	<i>Proteus sp.</i>

جدول ۳: باکتری‌های تعیین هویت شده با توالی ژن 16S rRNA از نمونه‌های آب

نوع نمونه	تعداد نمونه (در هر تراکست)			نوع باکتری	ایستگاه
	A ₁ (۵۰m)	A ₂ (۱۰۰m)	A ₃ (۱۵۰m)		
آب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Rhinoscleromatis</i>	۱
آب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Bacterium enrichment</i> , <i>Klebsiella</i> sp.	۲
آب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Rhinoscleromatis</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Aeromonas veronii</i>	۳
آب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Bacterium enrichment</i> , <i>Bacillus</i> sp.	۴

جدول ۴: باکتری‌های تعیین هویت شده با توالی ژن 16S rRNA از رسوبات

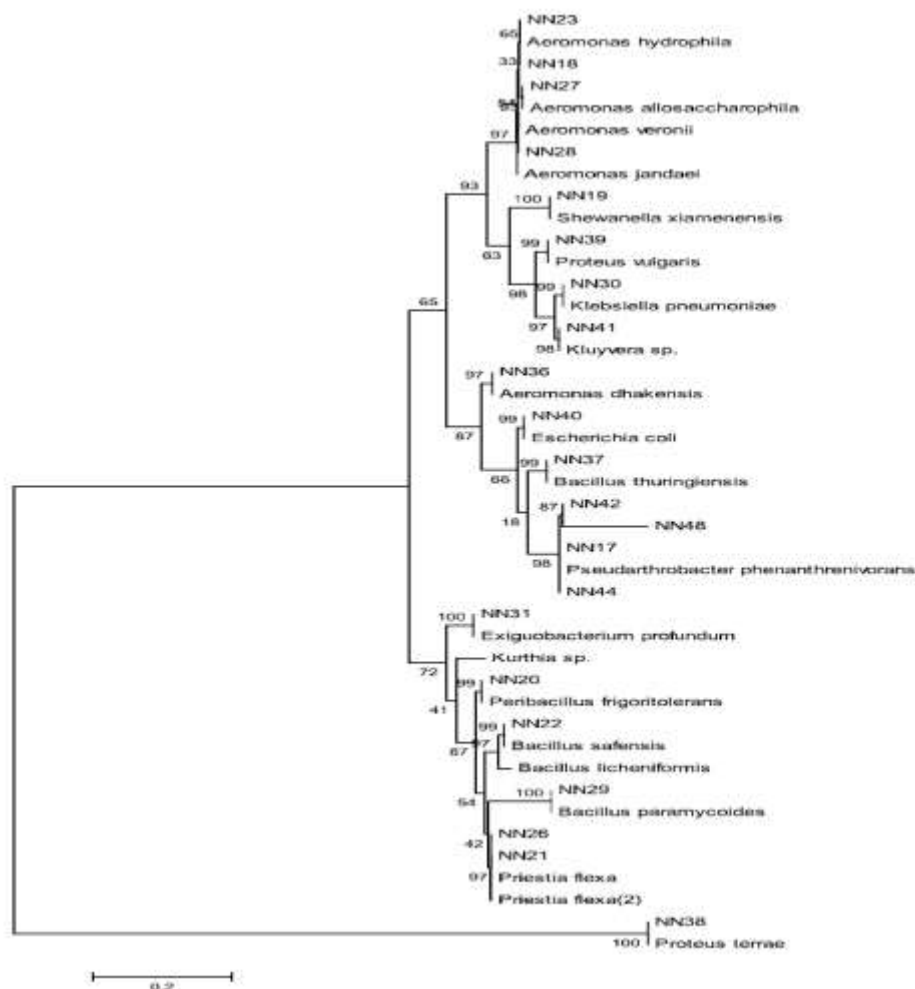
نوع نمونه	تعداد نمونه (در هر تراکست)			نوع باکتری	ایستگاه
	A ₁ (۵۰m)	A ₂ (۱۰۰m)	A ₃ (۱۵۰m)		
رسوب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Shewanella xiamenensis</i> , <i>Peribacillus frigoritolerans</i> , <i>Bacillus flexus</i> , <i>Uncultured beta proteobacterium</i> <i>Aeromonas allosaccharophila</i>	۱
رسوب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus safensis</i> , <i>Bacillus flexus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Exiguobacterium profundum</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> , <i>Shewanella litorisediminis</i> , <i>Aeromonas dhakensis</i>	۲
رسوب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus safensis</i> , <i>Bacillus flexus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Shewanella litorisediminis</i> , <i>Aeromonas dhakensis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i>	۳
رسوب	۱۵	۱۵	۱۵	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Aeromonas dhakensis</i> , <i>Bacterium enrichment</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> , <i>Bacillus paramycoides</i>	۴

جدول ۵: باکتری‌های تعیین هویت شده با توالی ژن 16S rRNA از ماهیان

نوع نمونه	تعداد نمونه (در هر تراکست)			نوع باکتری	ایستگاه
	A ₁ (۵۰m)	A ₂ (۱۰۰m)	A ₃ (۱۵۰m)		
کیپور معمولی	۲	-	۵	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Shewanella xiamenensis</i> , <i>Peribacillus frigoritolerans</i> , <i>Bacillus flexus</i> , <i>Uncultured beta proteobacterium</i> <i>Aeromonas allosaccharophila</i> ,	۱
برزم	۲	-	۲	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Kluyvera</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Peribacillus frigoritolerans</i>	۱
تیلاپیا	۱	-	۳	<i>Kluyvera</i> sp., <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Kurthia</i> sp., <i>Peribacillus frigoritolerans</i> , <i>Bacillus safensis</i>	۱
کیپور معمولی	-	۲	-	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Proteus terrae</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Peribacillus frigoritolerans</i> , <i>Bacillus safensis</i>	۲
برزم	-	۳	-	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Proteus terrae</i> , <i>Peribacillus frigoritolerans</i> , <i>Bacillus safensis</i>	۲
تیلاپیا	-	-	-	<i>Kluyvera</i> sp., <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Kurthia</i> sp., <i>Peribacillus frigoritolerans</i> , <i>Bacillus safensis</i> , <i>Aeromonas allosaccharophila</i>	۲
کیپور معمولی	۲	۳	-	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus flexus</i> , <i>Aeromonas veronii</i> , <i>Bacterium enrichment</i> , <i>Aeromonas jandaei</i>	۳
برزم	۲	-	-	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter hormaechei</i>	۳
تیلاپیا	۱	۲	-	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Shewanella litorisediminis</i>	۳
کیپور معمولی	۶	-	۴	<i>Bacillus thuringiensis</i> st, <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Kluyvera</i> sp., <i>Bacterium enrichment</i> , <i>Aeromonas dhakensis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i>	۴
برزم	۲	-	-	<i>Kurthia</i> sp., <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Exiguobacterium profundum</i>	۴
تیلاپیا	۲	-	۱	<i>Kurthia</i> sp., <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Shewanella litorisediminis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Exiguobacterium profundum</i> , <i>Bacillus flexus</i>	۴

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه ۷ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳).

آنالیز فیلوژنتیک باکتری‌ها: توالی‌های به دست آمده در بانک ژنی NCBI ثبت و توالی ژنی مربوط به هر کدام دریافت شد. آنالیز



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک جدایه‌های حاصل از آب، رسوبات و ماهیان بومی با نرم افزار MEGA

بحث

عملکردهای فیزیولوژیکی مختلف مانند تولیدمثل، رشد، تغذیه، ایمنی و پاسخ‌های استرس نقش دارند (۲۱، ۲۲). Nayak و همکاران، عنوان کردند که میکروبیوتای دستگاه گوارش ماهی نقش حیاتی در تغذیه، ایمنی و مدیریت سلامت ماهی دارد (۲۳). هم‌چنین میکروبیوم روده ماهی نقش حیاتی در رشد سیستم عصبی (۲۴) رفتار (۲۵)، ایمنی (۲۶)، هضم غذا و متابولیسم (۲۷) میزبان دارد. فیلوژنی میزبان و رژیم غذایی دو عامل اصلی شکل‌دهنده میکروبیوم روده ماهی هستند (۲۸). یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد سویه اصلی آب، رسوبات و ماهیان در رودخانه کارون متعلق به خانواده باسیلوس‌ها بود. هم‌چنین نتایج نشان داد که غنا و تنوع باکتریایی رسوبات بالاتر از نمونه‌های دستگاه گوارش ماهی و آب بود، ولی شباهت بین باکتری‌های دستگاه

بیماری‌های ناشی از میکروارگانیسم‌های محیط، نقش مهمی در شکل‌گیری فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی ایفا می‌کنند. با این حال، نشانه‌های فزاینده‌ای وجود دارد که طیف گونه‌های بیماری‌زا و هم‌چنین محدوده جغرافیایی و میزبان در بین پاتوژن‌های ماهی در حال گسترش است که منجر به ظهور عوامل بیماری‌زای جدید می‌شود (۲۰). این موضع در مناطق گرمسیری مثل استان خوزستان به دلیل دمای بالای آب اهمیت بیش تری دارد زیرا با افزایش درجه حرارت، محیط مناسبی برای رشد باکتری‌ها ایجاد می‌گردد و در نتیجه فعالیت‌های متابولیسمی افزایش می‌یابد. میکروبیوتای روده ماهی در

منابع آب، رشد روزافزون جمعیت و افزایش تولید فاضلاب موجب آلودگی محیط زیست به ویژه ورود پاتوژن های بیماری زا شده است. از این رو تعیین آلاینده های آن، پیشگیری، کنترل آلودگی از طریق تصفیه فاضلاب و استفاده بهینه از منابع آب موجود با توجه به نیاز آبی به خصوص در کشاورزی و پرورش آبزیان، الزامی است. از جمله پیامدهای این گونه آلودگی ها می توان به آلودگی های میکروبی اشاره نمود که علاوه بر خود آبزیان، با انتقال آلودگی به مصرف کنندگان خسارت مالی و شاید جانی را سبب شوند (۳۵، ۳۴). با توجه به نتایج مطالعه حاضر و تاثیر پذیری باکتری های روده ماهی از رسوبات و امکان شیوع عوامل بیماری زای غیربومی و یا مقاوم در برابر آنتی بیوتیک ها در اثر ورود فاضلاب انسانی به رودخانه، حفظ سلامت رودخانه و تصفیه فاضلاب قبل از ورود به رودخانه کارون ضروری به نظر می رسد.

منابع

1. Rosenberg, E., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1): 78-90.
2. Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P.V., Sritunyalucksana, K. and Flegel, T.W., 2016. Itsathitphaisam O. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquacultur*, 452: 69-87.
3. Gozari, M., Mortazavi, M., Bahador N. and Rabbaniha, M., 2016. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2): 630-644
4. Chandler, D.P., Li, S.M., Spadoni, C.M., Drake, G.R., Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K. and Brockman, F.J., 1997. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 23: 131-144.
5. Dunbar, J., Takala, S., Barns, S.M., Davis, J.A. and Kuske, C.R., 1999. Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1662-1669.
6. Boera, S.I., Burcea, A., Coman, C., Banaduc, D. and Curtean-Banaduc, A., 2021. Bacterial Microbiomes in the Sediments of Lotic Systems Ecologic Drivers and Role: A Case Study from the Mureș River, Transylvania, Romania. *Water*, 13: 3518-3529.
7. Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G. and Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2354-2359.
8. Prosser, J.I., 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*, 244: 9-17.
9. Chandler, D.P., Li, S.M., Spadoni, C.M., Drake, G.R., Balkwill, D.L., Fredrickson, J.K. and Brockman, F.J., 1997. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from

گوارش و رسوبات کناره های ساحل رودخانه بیش تر از آب بود. فواصل ژنتیکی بین سویه های مختلف موجود در درخت فیلوژنتیک نشان دهنده شباهت بالا، جهش پایین در ژن 16S rRNA و پایداری در محیط است. Sadeghi و همکاران، در مطالعه ای شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی سویه های ویبریو جدا شده از میگوی سفید غربی پرورشی در استان هرمزگان، با استفاده از ژن 16S rRNA را روش مناسبی برای شناسایی باکتری ها ذکر کردند و عنوان کردند که تغییر پذیری و انعطاف در میان ژنوم گونه های ویبریو عامل فاصله ژنتیکی بین سویه های مختلف موجود در درخت فیلوژنتیک است (۲۹). Pourgholam و همکاران، از آنالیز PCR ژن 16S rRNA برای تفکیک باکتری استرپتوکوکوس عامل بروز بیماری در ماهی های ۸ استان و تشخیص نوع آنتی بیوتیک مربوطه استفاده کردند (۳۰) که تأیید کننده توانایی 16S rRNA در مطالعه حاضر در تمایز و شناسایی باکتری ها است. Ghassemzadeh و Shahnavaز، تنوع فیلوژنتیکی باکتری های دریاچه بزرگان و نقش اکولوژی آن ها را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که سویه های شناسایی شده متعلق به گروه های beta-Gamma-Proteobacteria، Bacteroidetes و Firmicutes بود. تنوع جنس های متعلق به باکتری های گرم منفی بیش تر بوده و شامل *Pseudomonas*، *Flavobacterium*، *Collimonas*، *Varivorax*، *Luteibacter*، *Xanthomonas* می باشد. در حالی که باکتری های گرم مثبت از تنوع و تعداد کمتری برخوردار بوده و شامل جنس های *Staphylococcus*، *Fictibacillus*، *Bacillus*، *Paenibacillus* بود که از نظر نوع باکتری های گرم مثبت با مطالعه حاضر همخوانی ندارد و این موضوع را می توان با توجه به تفاوت زیستگاه و رودخانه محل زیست باکتری و ماهی توجیه کرد که شرایط زیست محیطی متفاوتی برای باکتری فراهم کرده است. Fadaeifard و همکاران، حضور باکتری های لاکتوکوکوس گارویه و پرسینا راگری، آئروموناس هیدروفیلا، ویبریو آئرنولیتیکوس در کلیه و کبد ماهی تیلاپپای نیل (*O. niloticus*) را گزارش و عنوان کردند که کنترل این نوع آلودگی ها باید با تکیه بر مدیریت محیط زیست باکتری یعنی آب و نیز غذای ماهی صورت گیرد (۳۱). Nekuiefard و همکاران، وجود آلودگی باکتریایی در آب دریاچه را خطری جدی برای سلامت ماهیان پرورشی و نیز مصرف کنندگان دانستند و پیشنهاد کردند که برنامه های مدیریتی و نظارتی جهت ممانعت و یا کاهش ورود آلاینده ها به این آب ها اتخاذ شود (۳۲). در واقع آلودگی های میکروبی آب های مرتبط با مزارع پرورش ماهی، علاوه بر خود آبزی با انتقال این آلودگی به جوامع مصرف کننده و کاهش تقاضا برای مصرف ماهی ناشی از آلودگی، خسارت های مالی گسترده ای را نیز به همراه دارد. Naderi و همکاران، امکان شیوع آلودگی در نتیجه مصرف ماهیان آلوده به باکتری را محتمل دانستند (۳۳). با توجه به شرایط اقلیمی، محدودیت

- gut microbiome associated with cognitive development. *Biological Psychiatry*. 83: 148-159.
25. **Archim E.A. and Tung, J., 2015.** Social behavior and the microbiome. *Microbiol*. 35: 8-15.
 26. **Levy, M., Blacher, E. and Elinav, E., 2017.** Microbiome, metabolites and host immunity. *Current Opinion in Microbiology*. 35: 8-15.
 27. **Hollister, E.B., Gao, C. and Versalovic, J., 2014.** Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*. 146: 1449-1458.
 28. **Youngblut, N.D., Reischer, G.H., Walters, W., Schuster, N., Walzer, C., Stalder, G., Ley, R.E. and Farnleitner, A.H., 2019.** Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. *Nature Communications*. 10: 2200-2210.
 29. **Sadeghi, M.R., Tamdani Jahrami, S., Bahri, A.H. and Ghazi, M., 2016.** Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio harveyi* strains isolated from western white shrimps - Tiab region - Hormozgan. *Journal of Aquatic Ecology*. 7(2): 65-59
 30. **Pourgholam, R., Laluei, F., Saeedi, A.A., Zahedi, A., Safari, R., Taghavi, M.J., NasrollahzadehSaravi, H. and Pourgholam, H., 2009.** Distribution and Molecular identification of some causative agents of streptococcosis isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 10(1): 109-122.
 31. **Fadaeifard, F., Hajian, A., Omid, F., Shahini Tiran, F. and Cheraghi, A.H., 2018.** Identification of some Bacterial infections in Nile Tilapia cultured in Bafgh fishery research center. *Journal of Veterinary Research*; 73: 283-289.
 32. **Nekuiefard, A., Khezri, M. and Seidgar, M., 2020.** Studying of some bacterial contamination characteristics of Hassanlu reservoir lake for fish cage culture. *Advanced Aquaculture Sciences Journal*. 3: 75-88.
 33. **Naderi, Sh., Shariat, M., Nadafi, K. and Preacher F., 2014.** Relationship between biological indices and water quality parameters in the distribution of drinking water in rural areas of Qazvin province. The collection of articles of the 6th national conference on health environment. Mazandaran Faculty of Medical Sciences and Health.
 34. **Abkenar, A.M., 2022.** The study of changing in water physicochemical parameters of coral area in Chabahar Golfs. *Journal of Animal Environment*. 14: 365-376. (In Persian)
 35. **Kashef, S., Mashhadi, A. and Pournouri, M., 2022.** Development of Makran beaches and its environmental pollution in the Oman Sea. *Journal of Animal Environment*. 14: 307-316. (In Persian)
 - adeep subsurface sediment. *FEMS Microbiology Ecology*. 23:131-144
 10. **Stackebrandt, E. and Frederiksen, W., 2002.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52(3): 1043-1052.
 11. **Stackebrandt, E. and Ebers, J., 2006.** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today*. 33(4): 152-162.
 12. **Sardar, A., Jianmin, X., Sahib, Z., Zhong, H., Yueling, Z., Runlin, C. and Hui, W., 2022.** Bacterial community structure and bacterial isolates having antimicrobial potential in shrimp pond aquaculture. *AMB Express*. 12: 82-93.
 13. **Faeed, M., Omidvar, S., Ghasemi, M., Mehrabi, M., Hasheminasab, F. and Daghigh rohi, J., 2018.** The study on Zoonotic bacteria in Gold fish (*Carassius auratus auratus*) of Guilan province farms. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 7: 27-35.
 14. **Kim, P.S., Shin, N.R., Lee, J.B., Kim, M.S., Whon, T.W., Hyun, D.W., Yun, J.H., Jung, M.J., Kim, J.Y. and Bae, J.W., 2021.** Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish. *Microbiome*. 9: 166-172.
 15. **Wilson, K., 1987.** Preparation of genomic DNA from bacteria, In *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, B.R., Kingston, F.M., Moore, R.E., Seidman, D.D., Smith, J.G., Struhl, J.A., New York; John Wiley and Sons.
 16. **Caton, T.M., Witte, L.R., Ngyuen, H.D., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A. and Schneegurt, M.A., 2004.** Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microbial Ecology*. 48(4): 449-462.
 17. **Lane, D.J., 1991.** 16S/23S *rRNA sequencing*. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons. 115-175.
 18. **Queipo-Ortun˜o, M.I., Colmenero, J.M., Reguera, M.A., Garcia-Ordon˜ez, M.E., Pachon, M., Gonzalez, H.D. and Morata, P., 2005.** Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clinical Microbiology and Infection*. 11: 713-718.
 19. **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30 (12): 2725-2729
 20. **Maher, M., Palmer, R., Gannon, F. and Smith, T., 1995.** Relationship of a novel bacterial fish pathogen to *Streptobacillus moniliformis* and the fusobacteria group, based on 16S ribosomal RNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology*. 18(1): 79-84.
 21. **Johny, T.K., Puthusseri, R.M. and Bhat, S.G., 2021.** A primer on metagenomics and next-generation sequencing in fish gut microbiome research. *Aquaculture Research*. 52: 4574-4600.
 22. **Butt, R.L. and Volkoff, H., 2019.** Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Neuroendocrine Science*. 1-9.
 23. **Nayak, S.K., 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture*. 41: 1553-1573.
 24. **Carlson, A., Xia, K., Azcarate-Peril, M.A., Goldman, B.D., Ahn, M., Styner, M.A., Thompson, A.L., Geng, X., Gilmore, J.H. and Knickmeyer, R.C., 2018.** Infant