13 (1) 305-312, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Fungal metagenome diversity of recirculating aquaculture and biofloc rearing systems of common carp (*Cyprinus carpio*) by using ITS 2

Mona Tabarrok [1], Jafar Seyfabadi [2]*, Gholamreza Salehi Jouzani [3], Habibollah Younesi [4]

[1] *Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*
[2] *Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*
[3] *Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*
[4] *Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*

Key Words
Biofloc
Recirculating aquaculture system
Fungi
ITS
Rearing system
Common carp

Abstract

Introduction: Molecular methods have been used for systematic science and identification of fungal diversity. Among phylogenetic markers, the ITS gene has been identified as one of the most prominent methods of studying fungal communities. The purpose of this research is to classify fungi and analyze their communities in aquaculture systems.

Materials & Methods: In this study, after two-month rearing period of common carp, water quality and fungal community of farming systems including biofloc and recirculating aquaculture system were evaluated. In this study, after two-month rearing period of common carp, water quality and fungal community of farming systems including biofloc and recirculating aquaculture system were evaluated.

Result: The results of this study indicated that the water quality parameters in both systems were well within the acceptable levels for common carp culture. The identification of fungal showed that a large part of this population is unknown. The only known and dominant species in both systems is *Homophron spadiceum*.

Conclusion: Therefore, there was no difference in known species and communities.

* Corresponding Author's email: jseyfabadi@gmail.com
Received: 1 February 2020; Reviewed: 9 May 2020; Revised: 21 May 2020; Accepted: 7 June 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.133827

مقاله پژوهشی

بررسی تنوع متاژنوم قارچی سیستم مداربسته و بیوفلاک پرورش ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) با استفاده از ITS2

مونا تبرک[۱]، جعفر سیف‌آبادی[۲]، غلامرضا صالحی‌جوزانی[۳]، حبیب‌الله یونسی[۴]*

[۱] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

[۲] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

[۳] گروه میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[۴] گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

کلمات کلیدی

بیوفلاک
مداربسته
قارچ
ITS
سیستم پرورش ماهیان
کپور معمولی

چکیده

مقدمه: استفاده از روش‌های فیلوژنتیک مولکولی جهت پیشرفت علم سیستماتیک و شناسایی تنوع قارچی بسیار پرکاربرد است. در میان مارکرهای فیلوژنتیک، ژن ITS به‌دلیل مناسب بودن برای بارکد کردن و داشتن اطلاعات زیاد به‌عنوان یکی از برجسته‌ترین روش‌های مطالعه جوامع قارچی معرفی شده است. هدف از این تحقیق ایجاد چارچوبی فیلوژنتیک به‌عنوان آغازی برای طبقه‌بندی قارچ‌ها و تجزیه و تحلیل جوامع آن‌ها در سیستم‌های آبزی‌پروری است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بعد از یک‌دوره دو ماهه پرورش ماهی کپورمعمولی (۰/۳±۲۱/۵ گرم)، کیفیت آب و جامعه قارچی سیستم‌های پرورشی شامل بیوفلاک و مداربسته مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج حاصل از پارامترهای کیفی آب اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p<0/05$). هم‌چنین از لحاظ کیفیت آب هر دو سیستم شرایط مطلوبی را برای زیست ماهی فراهم نمودند. از لحاظ شناسایی جمعیت قارچی قسمت بزرگی از این جمعیت‌ها ناشناخته است و تنها گونه شناخته شده و غالب در هر دو سیستم مورد بررسی *Homophron spadiceum* است.

نتیجه‌گیری و بحث: بنابراین از لحاظ جوامع و گونه‌های شناخته شده تفاوتی مشاهده نگردید.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: jseyfabadi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۸ خرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.133827

مقدمه

یکی از گونه‌های بسیار مهم بومی و پرورشی در حوزه جنوبی دریای خزر، کپورمعمولی(*Cyprinus carpio*) است (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). این ماهی در اکثر کشورهای دنیا به‌خصوص کشورهای آسیایی پرورش داده می‌شود. هم‌چنین در ایران نیز به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم اقتصادی و پرورشی کشور (از شمال تا جنوب ایران) شناخته شده است (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷). توسعه صنعت آبزی‌پروری به‌دلایل متعددی شامل کافی نبودن زمین و آب، تولید نهاده‌های غذایی و مسائل محیط زیستی ناشی از خروج پساب مزارع پرورش آبزیان، در سال‌های اخیر با مشکلات مختلفی مواجه شده است (Piedrahita، ۲۰۰۳). با رونق آبزی‌پروری و به تبع ورود پسماندهای تولیدی مانند مواد غذای خورده نشده و ترکیبات نیتروژن‌دار دفعی مثل آمونیاک به آلودگی محیط‌های آبی منجر می‌شود. بنابراین صنعت پرورش آبزیان نیازمند تکنولوژی‌های پیشرفته است تا کم‌ترین آسیب به محیط‌زیست وارد شود و در عین حال سود اقتصادی بیش‌تری را به‌همراه داشته باشد (Avnimelech، ۲۰۰۶). در سال‌های اخیر، فن‌آوری‌هایی مانند سیستم مدار بسته و بیوفلاک برای بهبود امنیت زیستی مزارع پرورش آبزیان و حفاظت از آب و خاک مورد توجه قرار گرفته است. در سیستم مداربسته موادزاید نیتروژن‌دار با تبدیل به اشکال مختلف دیگر (فرآیند نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون) از محیط آبی حذف می‌گردند اما در سیستم بیوفلاک مواد دفعی بازیافت و تبدیل به پروتئین‌های تک سلولی می‌شوند که این مواد مورداستفاده آبزیان قرارمی‌گیرد (رفیعی، ۱۳۹۷). به‌طورکلی سیستم‌های‌مذکور قادر به‌حفظ کیفیت آب هستند و مصرف آب در سیستم‌های آبزی‌پروری را به‌حداقل می‌رسانند. هر دو سیستم مذکور بر پایه فعالیت‌های موجودات میکروبی به‌خصوص فعالیت‌های باکتری‌های هتروتروف و اتوتروف کارایی دارند. مطالعات خارجی و داخلی نسبتاً زیادی برای شناخت ساختارهای میکروبی این سیستم‌ها انجام شده است(Ju و همکاران، ۲۰۰۸؛ MartínezPorchas وVargas-Albores، ۲۰۱۵). متاسفانه تعداد کمی از مطالعات تاکنون به قارچ‌های میکروسکوپی سیستم‌ها پرورش آبزیان پرداخته است. قارچ‌های‌میکروسکوپی می‌توانند به‌عنوان یکی‌از متنوع‌ترین ارگانیسم‌های یوکاریوتی درنظر گرفته شوند که نقش‌مهمی در تجزیه مواد آلی دارند. هم‌چنین وجود قارچ‌های میکروسکوپی رشته‌ای در بیوفلاک باعث تقویت و کمک به شکل‌گیری بیوفلاک بزرگ‌تر و قوی‌تر می‌شود. ثابت شده‌است که‌برخی‌از گونه‌های‌قارچی‌میکروسکوپی مانند *Aspergillus* sp. و *Penicillium* sp. درشکل‌گیری بیوفلاک‌نقش دارند. با روش‌های قدیمی، قارچ‌های میکروسکوپی را می‌توان با استفاده از رویکردهای مورفولوژیک از طریق مقایسه با سایرگونه‌های شناخته شده شناسایی کرد. با این‌حال، این روش‌های شناسایی اغلب مشکل‌ساز هستند زیرا چندین جنس از قارچ‌ها وجود دارند که از نظر مورفولوژیک یکسان، اما متعلق به گونه‌های مختلف هستند. از سوی دیگر، تنها با استفاده از رویکردهای مبتنی بر کشت پذیری، فقط به بخش کوچکی از تنوع قارچ‌ها می‌توان دسترسی پیدا کرد، برخلاف روش‌های گفته شده که به مهارت آزمایشگاهی زیادی نیاز دارند، ابزارهای شناسایی مولکولی امکان مطالعه قارچ‌های را که قابلیت کشت ندارند را نیز فراهم می‌کند، بنابراین درک ما در مورد اکولوژی قارچ‌ها را طی ۲۰ سال گذشته به‌طور قابل‌توجه‌ای بهبود بخشیده‌اند (Anderson و Cairney، ۲۰۰۴). علاوه بر این شناسایی مولکولی روشی سریع، دقیق و کارآمد برای تشخیص، مطالعات محیط زیستی و هم‌چنین روابط فیلوژنیک بین گونه‌ها است. استخراج DNA و یا RNA و به‌دنبال آن تقویت‌ژن خاص از طریق PCR امکان تمرکز بر جامعه قارچی متنوع یا عملکردهای هدفمند موجود در یک نمونه محیطی خاص را فراهم می‌کند. تکنیک‌های ترسیم انگشت‌نگاری و کلونینگ جامعه به‌طور گسترده‌ای برای مطالعه تنوع قارچ‌ها در طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Anderson و Cairney، ۲۰۰۴). پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های توالی‌یابی با دقت زیاد ممکن است برای مطالعه سیستم‌های قارچی با تنوع بالا نیز مفید باشد. کاربرد آن‌ها در محیط زیست میکروبی امکان بازیابی تعداد زیادی توالی از نمونه‌های مختلف را به‌طور هم‌زمان و تجزیه و تحلیل دقیق از تنوع میکروبی، فراهم می‌کند (Cardenas و Tiedje، ۲۰۰۸). روش‌های مختلف ژنتیکی برای مطالعه تنوع باکتری‌ها استفاده‌شده است (Rosech و همکاران، ۲۰۰۷؛ Acosta-Martinez و همکاران، ۲۰۰۸)، سپس فناوری‌های توالی‌یابی نوین برای شناسایی تنوع قارچ‌ها نیز به‌کار گرفته شد (Wallander و همکاران ۲۰۱۰؛ Blaalid و همکاران، ۲۰۱۲). تنوع قارچی از طریق تجزیه و تحلیل زیر واحد کوچک (SSU، ژن ۱۸S rRNA) یا فضا رونویسی داخلی (ITS) منطقه RNA ریبوزومی هسته‌ای مورد مطالعه قرار می‌گیرد. آغازگرهای اختصاصی متنوعی برای توالی‌یابی این دو منطقه توسعه یافته‌اند (White و همکاران، ۱۹۹۰؛ Gardes و Bruns، ۱۹۹۳) که برای بررسی تنوع قارچی در بسترهای پیچیده‌ای ازجمله خاک یا بافت‌گیاهی‌استفاده‌می‌شوند (Peltoniemi و همکاران، ۲۰۰۹؛ Vega و همکاران، ۲۰۱۰). Schoch و همکاران (۲۰۱۲) منطقه فضا رونویسی شده داخلی (ITS) از اپرون rRNA یوکاریوتیک را به‌عنوان یک بارکد DNA قارچی جهانی پیشنهاد کرد. توالی کامل منطقه ITS در پایگاه داده UNITE گنجانده شده است (Kõljalg و همکاران، ۲۰۱۳). جهت شناسایی مولکولی قارچ‌های میکروسکوپی، به‌طورکلی از جایگاه ژنی ITS (Internal transcribed spacer) مناطق rDNA استفاده می‌شود. زیرا منطقه ژن SrRNA ۱۸ به اندازه کافی سریع تکامل نمی‌یابد، بنابراین قارچ‌ها را در سطح طبقه‌بندی با رده‌های

پایین‌تر تشخیص می‌دهد. منطقه ITS، نشان‌دهنده سرعت زیادی از تکامل و در نتیجه تغییرات توالی بیش‌تری را بین گونه‌های نزدیک به هم نشان می‌دهد، بنابراین به‌عنوان یک بارکد DNA برای شناسایی قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Horton و Bruns، ۲۰۰۱؛ Schoch و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر این به‌دلیل این‌که منطقه ITS چند نسخه است (Vilgalys و Gonzalez، ۱۹۹۰)، این امکان را فراهم می‌کند تا از نمونه‌های حاوی غلظت کم DNA نیز بتوان استفاده کرد. در نتیجه استفاده گسترده‌ای از آن می‌شود. با توجه به موارد گفته شده هدف از پژوهش حاضر، تجزیه و تحلیل و مقایسه پارامترهای کیفی آب و داده‌های ITS2 به‌دست آمده با استفاده‌از ۴۵۴ پراکسوکسینگ با هدف قرار دادن آمپلیکون‌های ITS از rDNA قارچی استخراج شده از نمونه‌های سیستم مدار بسته و بیوفلاک پرورش کپور معمولی است.

مواد و روش‌ها

انجام مراحل آزمایشگاه در تابستان سال ۱۳۹۶ با انتقال بچه ماهیان از آمل به کارگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس آغاز گشت. پس از دو هفته مرحله سازگاری ۱۸۰ قطعه ماهی که از لحاظ وزنی در یک اندازه بودند به‌طور تصادفی انتخاب شدند. غذادهی ۳ وعده در روز با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به‌مدت ۶۰ روز انجام پذیرفت. در این تحقیق ماهیان در دو تیمار به‌شرح زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند: ۱- سیستم پرورش مدار بسته بدون تعویض آب، ۲- سیستم بیوفلاک بدون تعویض آب

برای اجرای این تحقیق سیستم مدار بسته آزمایشگاهی طراحی گردید. ابعاد مخازن پرورش ۱۰۰ لیتر و حجم آبگیری ۸۰ لیتر بود. در این مخازن، آب بعد عبور از یک فیلتر شنی ساده، به‌داخل ۳ فیلتر فیزیکی منتقل شده تا مواد جامد حذف شود سپس بیوفیلتر و بعد از آن فیلترذغال فعال تعبیه شده است (شکل ۱). جهت ایجاد سیستم بیوفلاک در یک مخزن از مواد آلی شامل خوراک تجاری ماهی (۳۲٪ پروتئین، ۱۰٪ چربی، ۱۹٪ کربوهیدرات) تهیه شده از کارخانه فرادانه، نسبت کربن به نیتروژن ۱۵ (Avnimelech، ۲۰۰۹) و پساب و خاک مزارع ماهی اضافه شد. منبع کربنی مورد استفاده نشاسته ذرت بود. بعد از طی چندین روز میزان آمونیاک و TSS سنجیده شد. بیوفلاک آماده شده به تانک‌های پرورش ماهی اضافه گردید. نمونه‌گیری‌ها و روند انجام آزمایش‌ها روی تیمارها برخی روزانه و برخی به‌صورت هر پنج روز یک‌بار مورد بررسی قرار می‌گرفت. روش‌های اندازه‌گیری مورد استفاده براساس کتاب استاندارد متد APHAانجام‌شد (Association). از دستگاه اکسیژن متر و pH متر دارای سنسور دما جهت اندازه‌گیری مقادیر مربوط به اکسیژن محلول و تغییرات pH نمونه‌ها استفاده شد. اندازه‌گیری مقادیر BOD, TSS، نیترات، نیتریت، آمونیاک و فسفات با استفاده از روش‌های کتاب استاندارد متد برای بررسی کیفیت آب پرورش ماهی (APHA) انجام شد.

شکل ۱: نمایی شماتیک از سیستم مداربسته طراحی شده جهت پرورش کپورمعمولی

استخراج DNA: در انتهای دوره پرورش حدود ۱ لیتر از آب پرورش ماهیان از فیلترهای کاغذی ۰/۲ میکرون عبور داده شد و نیز با استفاده از روش Griffiths و همکاران (۲۰۰۰) استخراج DNA انجام شد. کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد. نمونه‌های استخراج شده در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

PCR و توالی‌یابی: پس از استخراج DNA، ۴ میکرولیتر DNA به‌عنوان الگوی PCR استفاده شد. مخلوط PCR شامل محلول PCR امپلیکون مسترمیکس، ۰/۴ میکرولیتر از هر آغازگر در این تحقیق از پرایمرهای ITS4r و ITS3F استفاده شد (White و همکاران، ۱۹۹۰؛ Gardes و Bruns، ۱۹۹۳) و در انتها آب دو بار تقطیر اضافه شد تا حجم نهایی به ۴۰ میکرولیتر برسد. برنامه PCR به‌شرح این بود: ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و تعداد چرخه‌های ۲۶-۳۱ (۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه) تکثیر شدند. امپلیکون‌های PCR به‌دست آمده با استفاده از یک Wizard SV Gel و سیستم پاکسازی کننده محصول PCR جهت خوانش توالی‌ها آماده‌سازی می‌شود. آمپلیکون‌های خالص شده در یک لوله ۲ میلی‌لیتری مخلوط شدند و با استفاده از GS FLX Titanium (در چین) توالی شدند.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به کیفیت آب، با آزمون One – Way ANOVA انجام شدو برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون‌های پارامتریک (دانکن) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به‌صورت ME±SD گزارش شده و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت گرفت. از نرم‌افزار SPSS (version ۱۶) برای آنالیز آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودار و جداول استفاده شد.

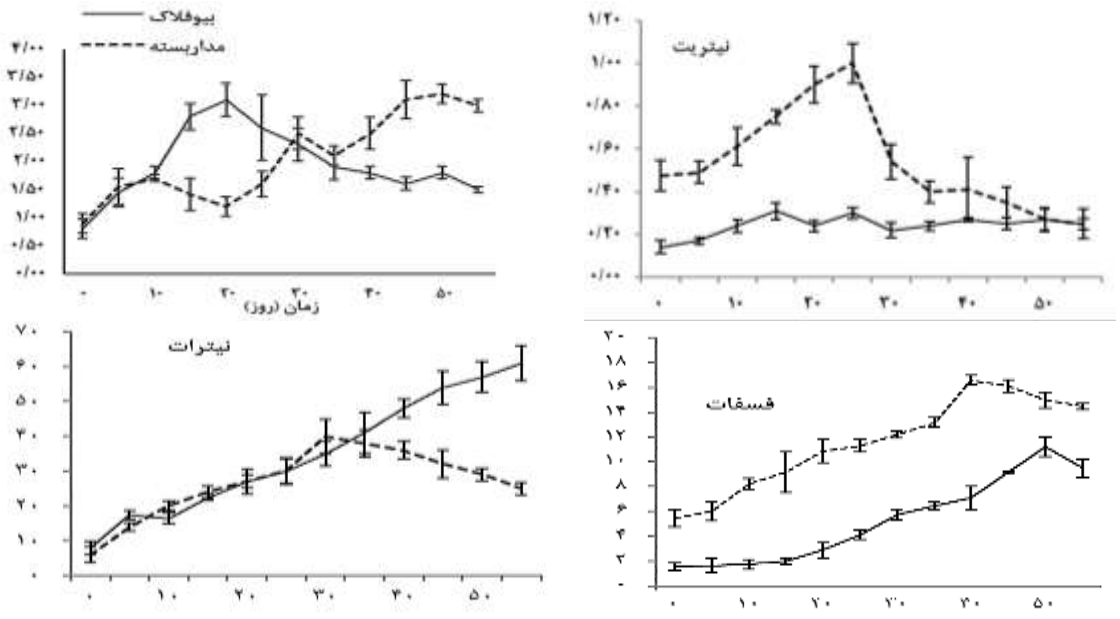
نتایج

برخی‌از پارامترهای‌فیزیکی‌وشیمیایی‌آب‌شامل دما، شوری، pH و اکسیژن محلول در جدول ۱ آورده شده است. داده‌های به‌دست آمده نشان داد که دما بین دو تیمار مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری ندارد. نتایج ثبت شده در این آزمایش نشان داد مقدار pH و اکسیژن محلول در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). میزان مواد جامد معلق در آب و BOD_5 در تیمار بیوفلاک به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار مداربسته بود (P<۰/۰۵). میانگین سطوح TSS (SD ±) به‌صورت معنی‌داری در سیستم بیوفلاک ۴۸۱/۵±۴۲/۲ بیش‌تر از سیستم‌مدار ۹۰/۷±۳۸/۳ بسته بود(P<۰/۰۵). نتایج اندازه‌گیری سایر متغیرهای کیفی آب مانند مواد معلق، BOD در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب، دو سیستم بیوفلاک و مداربسته

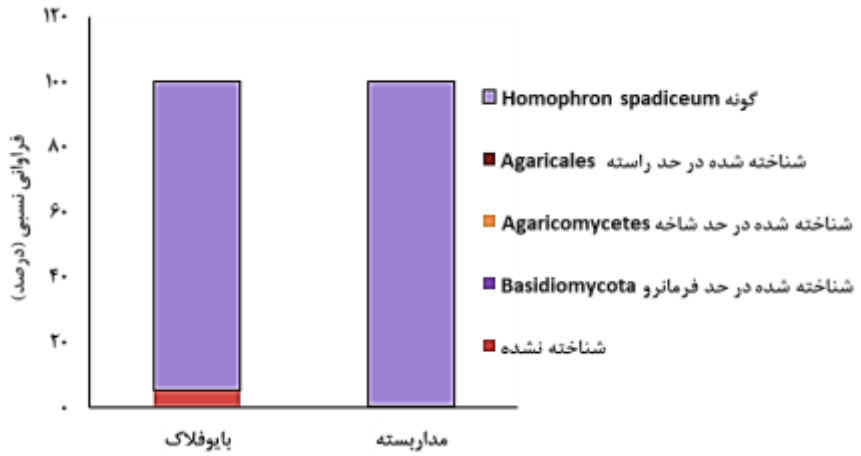
شاخص‌های مورد ارزیابی	سیستم بیوفلاک	سیستم مداربسته
دما (درجه سانتی‌گراد)	۲۷/۲ ± ۰/۶	۲۷/۷ ±۰/۴
pH	۶/۷۹±۱/۱[a]	۷/۱۳±۰/۲[b]
اکسیژن محلول در آب (میلی‌گرم درلیتر)	۷/۱۳±۰/۱[a]	۸/۱۷±۰/۱[b]
TSS (میلی‌گرم در لیتر)	۴۸۱/۵±۴۲/۲[b]	۹۰/۷±۳۸/۳[a]
BOD_5 (میلی‌گرم در لیتر)	۷۱/۷۵±۳/۷[b]	۲۴/۶۴±۲/۲[a]

میزان کل آمونیاک نیتروژنی (TAN)، میزان نیتریت NO_2-N، نیترات NO_3-N و فسفات PO_4^3-P در دو تیمار بیوفلاک و مداربسته مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده در فواصل زمانی هر ۵ روز در ۳ تکرار در شکل ۲ آمده است. میزان آمونیاک در هر دو سیستم در شروع انجام آزمایش افزایش بافت اما در طول آزمایش در تیمار بیوفلاک کاهش یافت. میزان نیتریت نیز به‌طور معنی‌داری در طول آزمایش در تیمار مداربسته بیش‌تر بود اما در انتهای دوره پرورش روند کاهشی نشان داد. نیترات در طول آزمایش روند صعودی در تیمار مداربسته و نزولی در بیوفلاک داشت. میزان فسفات به‌طور معنی‌داری در بیوفلاک کم‌تر از مداربسته بود (شکل ۲).



شکل ۲: میزان آمونیاک کل، نیتریت، نیترات و فسفات در دو تیمار مورد آزمایش

از مطالعه‌متاژنوم قارچها به‌طور متوسط ۹۷۱۱۹ بار خوانش برای بیوفلاک و ۹۶۸۰۸ بار برای سیستم مداربسته در هر نمونه به‌دست آمد. شاخص تنوع شانون هم نشان داد که تنوع قارچی در بیوفلاک بیش‌تر از سیستم مداربسته است. در مطالعه انجام شده تنها فرمانروی شناخته شده Basidiomycota بود. جمعیت غالب قارچی در هر دو تیمار مورد بررسی گونه *Homophron spadiceum* است. همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود درصد اندکی از قارچها شناسایی نشده است و یا در حد جنس و گونه شناسایی شده است.



شکل ۵: ساختار میکروقارچ‌های شناسایی شده در دو سیستم بیوفلاک و مدار بسته با استفاده از آنالیز ITS۲

بحث

این تحقیق در راستای مقایسه کارایی دو سیستم بیوفلاک و مداربسته از لحاظ کیفیت آب و ارتباط آن با جوامع قارچی انجام شده است. بنابراین در طول دوره پرورش شاخص‌های کیفی آب جهت سنجش توانایی سیستم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق حاضر میزان اکسیژن محلول و pH در تیمار بیوفلاک کم‌تر بود که دلیل این امر حضور باکتری‌های هتروتروف در این سیستم است که میزان دی اکسیدکربن بیش‌تری تولید می‌کنند (Tacon و همکاران، ۲۰۰۳؛ Wasielesky و همکاران، ۲۰۰۶). دلیل دیگر این نتایج ممکن است این باشد که باکتری‌های هتروتروف در مقایسه با باکتری‌های اتوتروف میزان قلیایت بیش‌تری به‌عنوان منبع کربن غیرآلی استفاده می‌کنند که این امر موجب تولید بیش‌تر دی اکسیدکربن درمحیط آبی می‌شود (Ebeling و همکاران، ۲۰۰۶؛ Deng و همکاران، ۲۰۱۸). میزان مواد معلق در تیمار بیوفلاک(۴۸۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در طول انجام آزمایش افزایش نشان داد، به‌دلیل افزایش تعداد ارگانیسم‌ها، افزودن آرد ذرت و غذادهی در طول آزمایش بوده است (Legarda و همکاران، ۲۰۱۹).

مقادیر آمونیاک در هر دو تیمار ابتدا افزایش یافت، سپس در طول آزمایش در تیمار بیوفلاک میزان آن کاهش نشان داد اما در تیمار مداربسته هم‌چنان روند افزایشی را در طول آزمایش نشان داد که دلیل این امر ممکن است کم‌تر بودن روند تبدیل آمونیاک به سایر شکل‌های نیتروژن معدنی باشد. در واقع می‌توان گفت میزان رشد باکتری‌های هتروتروف نسبت به اتوتروف‌ها بیش‌تر بوده‌است (Michaud، ۲۰۰۷؛ Ekasari وMaryam ، ۲۰۱۲). میزان آمونیاک ترشح شده از ماهی مستقیماً تحت تاثیر میزان غذادهی و میزان مواد دفعی آبزیان است (Brunty و همکاران، ۱۹۹۷). مقادیر نیتریت در تیمار بیوفلاک تقریباً در طول انجام آزمایش در یک بازه ثابت افزایش و کاهش را نشان داد اما در تیمار مداربسته تا اواسط دوره آزمایش میزان آن افزایش سپس کاهش یافت. مقادیر نیترات تا انتهای دوره آزمایش، روند افزایشی را نشان داد به‌جز در تیمار بیوفلاک که روند نزولی داشت. به‌طورکلی میزان نیتریت و نیترات در تیمار بیوفلاک بسیار کم‌تر از مداربسته بود. میزان ثابت نیتریت در تیمار بیوفلاک نشانگر این است که نیتریفیکاسیون در این تیمار از یک روند یکسان تبعیت می‌کند (Azim و Little، ۲۰۰۸). نیترات در طول آزمایش در تیمار مدار بسته روند افزایشی داشت که به‌دلیل انجام نشدن فرآیند دنیتریفیکاسیون در این تیمار است (Luo و همکاران، ۲۰۱۴) و علت کاهش در سیستم بیوفلاک این است که باکتری‌های درون فلاک توانایی استفاده از نیترات را به‌عنوان منبع نیتروژن دارند (Luque Almagro و همکارن، ۲۰۱۱). فسفات تقریباً در هر دو تیمار روند صعودی داشت اما در تیمار بیوفلاک میزان کم‌تری را نشان داد که می‌توان گفت باکتری‌های هتروتروف از فسفات برای تبدیل به فرم‌های قابل هضم استفاده می‌کنند (Luo و همکاران، ۲۰۱۴؛ Schneider و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعه محمودی و همکاران (۱۳۹۷) نیز نشان داد سیستم بیوفلاک اثر مثبتی بر تصفیه آب و حذف ترکیبات نیتروژنه دفعی دارد.

در ادامه این تحقیق به شناسایی جمعیت قارچی دو تیمار پرورش ماهی کپورمعمولی پرداخته شد. به‌طورکلی قارچ‌ها موجوداتی گندخوار هستند و مواد مغذی را با تخریب و تجزیه مواد آلی مرده به‌دست می‌آورند. در آبزی‌پروری قارچ‌ها نقش‌های متنوعی را ایفا می‌کنند از سوی، آن‌ها نقش بیماری‌زایی دارند از سوی دیگر جایگزین پودر ماهی جهت تغذیه آبزیان هستند. دنیای قارچ‌های میکروسکوپی هنوز هم ناشناخته است. برای درک هرچه بهتر از این موجودات باید

ابتدا آن‌ها را شناسایی کرد. ژن‌های موجود در ارگانیسم‌ها به کندی دچار جهش و در نتیجه تنوع می‌شوند (Iwen و همکاران، ۲۰۰۲). از بین ژن‌های مورد بررسی، DNA ریبوزومی یا rDNA طی سال‌های متمادی برای شناسایی باکتری‌ها و ارگانیسم‌های یوکاریوتی مانند قارچ‌ها میکروسکوپی مورد استفاده قرار گرفته است. زیر واحد کوچک هسته‌ای مناطق DNA ریبوزومی (۱۸s rDNA) که جهت شناسایی قارچ‌های میکروسکوپی استفاده می‌شود، پایه مولکولی را جهت شناسایی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک قارچ‌ها فراهم می‌کند. پرایمرهای اختصاصی با هدف قرار دادن مناطق ITS از مجموعه ژن rDNA قارچ‌های میکروسکوپی، شناسایی جوامع قارچی را ممکن می‌سازنند (Manter و Vivanco، ۲۰۰۷). از آن‌جاکه منطقه ITS غیر رمزگذاری شده و دارای حفاظت ژنتیکی کم‌تری است (جهش روی آن‌ها سریع‌تر اثر می‌گذارد)، بنابراین از این منطقه ژنتیکی برای نشان دادن تمایز بین قارچ‌های میکروسکوپی استفاده می‌شود (Green و همکاران، ۲۰۰۴). در این تحقیق با استفاده از منطقه ITS_2 ژنی میزان تنوع جمعیت قارچی و نیز دنیای قارچ‌ها در سیستم‌های بسته آبزی‌پروری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد کم‌ترین تنوع قارچ‌های میکروسکوپی در تیمار سیستم مداربسته مشاهده گردید که ممکن است به‌دلیل غلظت کم‌تر مواد آلی موجود در این تیمار باشد. علاوه بر این، بیش‌ترین فراوانی تنوع قارچی در سیستم بیوفلاک که غلظت بالایی از مواد آلی در آن وجود دارد، نشان داده شد. در واقع در سیستم بیوفلاک خوراک خورده نشده، مواد دفعی مانند آمونیاک، مدفوع و میکروارگانیسم‌های مرده جمع می‌شوند، غلظت ماده آلی افزایش می‌یابد، بنابراین باعث حضور بیش‌تر قارچ‌های میکروسکوپی در بیوفلاک می‌شود. نتیجه به‌دست آمده مشابه نتایج حاصل از مطالعه Kasan و همکاران (۲۰۱۸) بر روی فلاک‌های پروش میگو است.

مطالعات‌قبلی نشان می‌دهد که قارچ‌های رشته‌ای ازجمله جنس پنیسیلیوم، آسپرژیلوس در تصفیه لجن اهمیت دارند و در فرآیند زیستی فلوکولاسیون شرکت می‌کنند، زیرا در تشکیل بیوفلاک‌های بزرگ‌تر و قوی‌تر موثر هستند. نکته قابل توجه این است که دو گونه *Penicillium* sp. و *Aspergillus* sp. در تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق مشاهده نشدند. در این تحقیق تعدادی از قارچ‌های توالی‌یابی شده ناشناخته گزارش شدند که این امر نشان‌دهنده ناشناخته بودن این حوزه از مطالعات است. در مطالعه Kasan (۲۰۱۸) از بیوفلاک تشکیل شده از پرورش میگو ۹ گونه قارچ شناسایی شد که شامل: *A. flavipes, A. A. tamarii, ,A. niger ,Aspergillus versicolor aculeatus,Penicillium citrinum, P. griseofulvum, Trichoderma virens, Pestalotiopsis microspore* بود.تفاوت این بررسی با پژوهش حاضر در این امر است که بیوفلاک پرورشگاه میگو در مطالعه مذکور از فضای باز و استخرهای خاکی تهیه شده بود بنابراین تنوع بیش‌تری از قارچ‌ها را نشان داد. شاید بتوان گفت استخرهای خاکی و محیط‌های فتواتروف که در آن‌ها جلبک‌های تک سلولی رشد و تکثیر می‌کنند نسبت به پرورشگاه‌های شیمواتوتروف که فاقد فعالیت جلبک‌ها هستند و در مخازن پرورش می‌یابند تنوع بیش‌تری دارند. در تحقیق حاظر بیش‌ترین گونه شناسایی شده مربوط به گونه *Homophron Spadiceum* بود. این گونه قارچی توسط Örstadius و همکاران (۲۰۱۵) در سوئد برای اولین بار گزارش داده شد. این گونه از فرمانروی Basidiomycota است که شامل حدود ۳۰،۰۰۰ گونه توصیف شده‌اند، که ۳۷ درصد از گونه‌های آن قارچ‌های واقعی هستند (Kirk و همکاران، ۲۰۰۱).مهم‌ترین و مشهورترین Basidiomycotaها دارای ساختارهای تولیدمثل جنسی هستند. Basidiomycota هم‌چنین شامل مخمرها (اشکال تک سلولی) و گونه‌های غیرجنسی نیز است (Fell و همکاران، ۲۰۰۱). Basidiomycota تقریباً در همه اکوسیستم‌های خاکی و هم‌چنین آب‌های شیرین و زیستگاه‌های دریایی یافت می‌شوند (Kohlmeyer، ۱۹۷۹؛ Hibbett و Binder، ۲۰۰۱).

شیوه زندگی ارتباط صمیمی با سایر موجودات زنده، در Basidiomycota به‌خوبی توسعه یافته است که این رابطه هم‌زیستی هم می‌تواند مفید و هم می‌تواند خطرآفرین باشند. طبق مطالعات انجام شده این فرمانروی قارچی در چرخه تجزیه مواد آلی و تبدیل آن‌ها به اشکال معدنی نقش ایفا می‌کند مثلاً در خاک بر روی چرخه کربن و نیتروژن موثر است. اما در مورد نقش آن‌ها در مورد علوم آبی به‌خصوص شیلات و پرورش آبزیان تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است. بنابراین ضروری است تا با استفاده از ژن‌های دیگر به مطالعه سیستم‌های مختلف پرورش آبزیان جهت شناسایی جوامع قارچ‌های میکروسکوپی پرداخت.

به‌طورکلی در این مطالعه دو سیستم پرورش، بدون تعویض آب ماهیان به‌مدت دو ماه مورد ارزیابی کیفی آب و شناسایی قارچ قرار گرفت. نتایج کیفیت آب نشان داد سیستم بیوفلاک شرایط بهتری را برای پرورش ماهی فراهم می‌کند به‌طوری‌که این سیستم پرورش برخلاف مداربسته با مشکل تجمع نیترات مواجه نمی‌شود. شناسایی قارچ‌ها نشان داد تنها گونه شناخته شده و غالب در هر دو سیستم مورد مطالعه گونه *Homophron spadiceum* است. هم‌چنین میزان تنوع قارچی در سیستم بیوفلاک بالاتر از سیستم مدار بسته است.

منابع

۱. **عبدلی، ا. و نادری، م.، ۱۳۸۷.** تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. تهران انتشارات علمی آبزیان. صفحات ۲۴۲ تا ۲۴۴.

۲. **محمودی، م.؛ حاجی‌مرادلو، ع. و دستار، ب.، ۱۳۹۷.** بررسی کیفیت آب و رشد بچه‌ماهی کپورمعمولی *(Cyprinus carpio)* تحت

تغذیه با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروتئین در سیستم بیوفلوک. فصلنامه محیط‌زیست‌جانوری. سال ۱۰، شماره ۳، صفحات ۱۹۱ تا ۱۹۸.

۳. **رفیعی، ر.، ۱۳۹۷.** تنظیم نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن ورودی به سازگان مدار بسته پرورش از طریق غذا و ملاس برای تولید بیوفلاک و بررسی شاخص‌های رشد ماهی فیتوفاگ و کیفیت آب. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۱۰، شماره ۳، صفحات ۱۹۹ تا ۲۰۶.

4. **Acosta-Martınez, V.; Dowd, S.; Sun, Y. and Allen, V., 2008.** Tagencoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. Soil Biol Biochem. Vol. 40, pp: 2762-2770.

5. **Anderson, I.C. and Cairney, J.W.G., 2004.** Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environ Microbiol. Vol. 6, pp: 769-779.

6. **Avnimelech, Y., 2006.** Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. Aquacultural Engineering. Vol. 34, No. 3, pp: 172-178.

7. **Avnimelech, Y., 2009.** Biofloc technology: a practical guide book. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 182 p.

8. **Azim, M.E. and Little, D.C., 2008**. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. Vol. 283, No. 1-4, pp: 29-35. doi: https://doi.org/10.1016/ j.aquaculture.2008.06.036.

9. **Blaalid, R.; Carlsen, T.O.R.; Kumar, S.; Halvorsen, R.; Ugland, K.I.; Fontana, G. and Kauserud, H., 2012.** Changes in the rootassociated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyro sequencing. Mol Ecol. Vol. 21, pp: 1897-1908.

10. **Brunty, J.; Bucklin, R.; Davis, J.; Baird, C. and Nordstedt, R., 1997.** The influence of feed protein intake on tilapia ammonia production. Aquacultural Engineering. Vol.16, pp: 161-166. https://doi.org/10.1016/S0144-8609 (96) 01019-9.

11. **Cardenas, E. and Tiedje, J.M., 2008**. New tools for discovering and characterizing microbial diversity. Curr Opin Biotechol. Vol. 19, pp: 544-549.

12. **Deng, M.; Chen, J.; Gou, J.; Hou, J.; Li, D. and He, X., 2018.** The effect of different carbon sources on water quality, microbial community and structure of biofloc systems. Aquaculture. Vol. 482, pp: 103-110. 10.1016/j.aquaculture. 2017.09.030.

13. **Ebeling, J.M.; Timmons, M.B. and Bisogni, J., 2006.** Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. Aquaculture. Vol. 257, pp: 346-358. 10.1016/j.aquaculture.2006.03.019.

14. **Ekasari, J. and Maryam, S., 2012.** Evaluation of biofloc technology application on water quality and production performance of red tilapia *Oreochromis sp*. cultured at different stocking densities. Hayati Journal of Biosciences. Vol. 19, pp: 73-80. 10.4308/hjb.19.2.73.

15. **Fell, J.W.; Boekhout, T.; Fonseca, A. and Sampaio J.P., 2001.** Basidiomycetous yeasts. pp: 1-36. In: The Mycota VII. Systematics and Evolution. Part B. (Mclaughlin, D.J.; McLaughlin, E.G. and Lemke, P.A., eds.). Springer-Verlag, Berlin.

16. **Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993.** ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol. Vol. 2, pp: 113-118.

17. **Green, J.L.; Holmes, A.J.; Westoby, M.I.; Oliver, Briscoe, D.; Dangerfield, M.; Gillings, M. and Beattie A.J., 2004.** Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. Nature. Vol. 432, pp: 747-750, 10.1038/nature03034.

18. **Griffiths, R.I.; Whiteley, A.S.; O'Donnell, A.G. and Bailey, M.J., 2000.** Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA & rRNA based microbial community composition. Appl environ microbiol. Vol. 66, pp:5488-5491.

19. **Hibbett, D.S. and Binder, M., 2001.** Evolution of marine mushrooms. Biol. Bull. Vol. 201, pp: 319-322.

20. **Horton, T.R. and Bruns, T.D., 2001.** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Mol Ecol. Vol. 10, pp: 1855-1871.

21. **Iwen, P.C.; Hinrichs, S.H. and Rupp, M.E., 2002.** Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol. Vol. 40, pp: 87-109.

22. **Ju, Z.Y.; Forster, I.; Conquest, L. and Dominy, W., 2008**. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquaculture Research. Vol. 39, pp: 118-133. doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x.

23. **Kasan, A.N.; Ghazali, A.N.; Hashim, F.N. and Jouhari, H., 2018.** 18s rDNA Sequence Analysis of Microfungi from Biofloc-based System in Pacific Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei* Cultur. Biotechnology. Vol. 17, pp: 135-141.

24. **Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C.; Stalpers, J., 2001.** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th ed. CAB International, Wallingford, UK.

25. **Kohlmeyer, J. and Kohlmeyer, E., 1979.** Marine mycology: the higher fungi. New York: Academic.

26. **Kõljalg, U.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K. and Tedersoo, L., 2013.** Towards a unified paradigm for sequence based identification of fungi. Molecular Ecology. Vol. 22, pp: 5271-5277. https://doi.org/10.1111/mec.12481.

27. **Legarda, E.C.; Poli, M.A.; Martins, M.A. and Pereira, S.A., 2019.** Integrated recirculating aquaculture system for mullet and shrimp using biofloc technology. Aquaculture. Vol. 512, pp:734308. 10.1016/j.aquaculture. 2019.734308.

28. **Luo, G.; Gao, Q.; Wang, C. and Liu, W., 2014.** Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. Aquaculture. Vol. 422, pp: 1-7. 10.1016/j. Aquaculture.2013.11.023.

29. **Luque-Almagro, V.M.; Gates, A.J.; Moreno-Vivián, C. and Ferguson, S.J., 2011.** Bacterial NO_3-N assimilation: gene distribution and regulation. Portland Press Limited.

30. **Manter, D.K. and Vivanco, J.M., 2007.** Use of ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. J Microbiol Methods. Vol. 71, pp: 7-14.

31. **Martínez-Córdova, L.R.; Emerenciano, M.; Miranda Baeza, A. and Martínez-Porchas, M., 2015**. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. Reviews in Aquaculture. Vol: 7, pp: 131-148. doi: https://doi.org/10.1111/raq.12058.

32. **Michaud, L., 2007.** Microbial communities of recirculating aquaculture facilities: interaction between heterotrophic and autotrophic bacteria and the system itself. Scienze

Ambientali: Ambiente Marino e Risorse"(XVIII CICLO): University of Messina.

33. **Örstadius, L.; Ryberg, M. and Larsson, E., 2015.** Molecular phylogenetics and taxonomy in Psathyrellaceae (Agaricales) with focus on psathyrelloid species: introduction of three new genera and 18 new species. Mycological Progress. Vol. 14, No. 25, pp: 1-42.

34. **Peltoniemi, K.; Fritze, H. and Laiho, R., 2009.** Response of fungal and actinobacterial communities to water-level drawdown in boreal peatland sites. Soil Biol Biochem. Vol. 41, pp: 1902-1914.

35. **Piedrahita, R.H., 2003.** Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. Aquaculture. Vol. 226, pp: 35-44.

36. **Roesch, L.F.W.; Fulthorpe, R.R.; Riva, A. and Casella, G., 2007**. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J. Vol. 1, pp: 283-290.

37. **Schneider, O.; Blancheton, J.P.; Varadi, L.; Eding, E.H. and Verreth, J.A.J., 2007.** Cost price and production strategies in European recirculation systems. Linking Tradition & Technology Highest Quality for the Consumer, Firenze, Italy, WAS.

38. **Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V. and Spouge, J.L., 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. P Natl Acad Sci USA. Vol. 109, pp: 6241-6246.

39. **Tacon, A.G.J. and Forster, I.P., 2003.** Aqua feed and the environment: policy implications. Aquaculture. Vol: 226, pp: 181-189.

40. **Vega, F.E.; Simpkins, A. and Aime, M.C., 2010.** Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. Fungal Ecol. Vol. 3, pp: 122-138.

41. **Vilgalys, R. and Gonzalez, D., 1990**. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete Thanatephorus praticola. Curr Genet. Vol. 18, pp: 277-280.

42. **Wallander, H.; Johansson, U. and Sterkenburg, E., 2010.** Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce forests. New Phytol. Vol. 187, pp: 1124-1134.

43. **Wasielesky, W.Jr.; Atwood, H.; Stokes, A. and Browdy, C.L., 2006.** Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for White shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 258, pp :396-403.

44. **White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.B. and Taylor, J.W., 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. and White, T.J., eds), pp: 315-322. Academic Press, San Diego, CA.