

بررسی ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی در خاک‌های پیرامون معادن کرومیت در جنوب استان کرمان

پروین امیرانی پور^۱، قباد جلالی*^۲، جواد زمانی^۳



چکیده

مقاله پژوهشی

آلودگی خاک به فلزات سنگین، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها در طبیعت محسوب می‌شود. فلزات سنگین موجود در خاک نه تنها توسط گیاهان جذب و وارد زنجیره غذایی می‌شوند، بلکه ممکن است با ورود به آب‌های سطحی و زیرزمینی، سلامتی موجودات زنده و تنوع زیستی جانداران خاک‌زی را به خطر بی‌اندازند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی در خاک‌های پیرامون معادن کرومیت جنوب استان کرمان انجام شد. شناسایی باکتری‌های مقاوم به کروم با روش مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی قطعات ژن 16S rDNA صورت گرفت. طبق نتایج، ۱۵ جدایه باکتری مقاوم به کروم از مناطق مورد مطالعه جداسازی شد. بررسی نتایج تعیین توالی قطعات ژن 16S rDNA نشان داد که این جدایه‌های باکتریایی بیشتر به جنس باسیلوس تعلق داشتند. این جنس از باکتری‌ها به دلیل داشتن اسپور در برابر بسیاری از مواد ضد باکتریایی، حرارت، خشکی، یخ‌زدگی، سموم شیمیایی، فلزات سنگین و دیگر فاکتورهای مضر محیطی مقاومت نشان می‌دهند. همچنین با استفاده از آنالیز متانژنوم با روش توالی‌یابی نسل جدید ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین دو نمونه غیرمعدنی و معدنی بررسی شد. نتایج توالی‌یابی نسل جدید نشان داد که ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی خاک بین دو نمونه غیرمعدنی و معدنی تفاوت معنی‌داری دارد. به طوری که نتایج نشان داد شاخص تنوع آلفا (براساس تعداد کل واحدهای تاکسونومیک عملیاتی) در نمونه معدنی بیشتر از غیرمعدنی می‌باشد. همچنین تنوع بتا که نمایگر تنوع بین دو نمونه هست به وسیله آنالیز تحلیل مختصات اصلی انجام شد که نتایج نشان داد ترکیب جوامع باکتریایی در بین دو نمونه غیرمعدنی و معدنی متفاوت است. از آنجایی که روش توالی‌یابی نسل جدید به کار رفته در این پژوهش در مقایسه با سایر روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، با سرعت و دقت بیشتری به بررسی ژنوم یک نمونه محیطی می‌پردازد و همچنین راحت‌تر و دارای انحراف کمتر می‌باشد، جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین تیمارهای مختلف پیشنهاد می‌شود.

۱. کارشناسی ارشد علوم خاک، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

parvinamirany1395@gmail.com

۲. استادیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

gh.jalali@ujiroft.ac.ir

* نویسنده مسئول

۳. استادیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

ja.zamani@yahoo.com

۲۵۰۴-۱۰۹۸

شناسه مقاله:

۷۷۰-۷۸۶

شماره صفحه پایایی:

۱۴۰۴/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت:

۱۴۰۴/۰۵/۰۱

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۴/۰۵/۱۱

انتشار آنلاین:

روز ۹۵

زمان پذیرش:

واژگان کلیدی:

آلودگی فلزات سنگین، باکتری‌های مقاوم به کروم، تعیین توالی ژن 16S rDNA، توالی‌یابی نسل جدید متانژنوم.

استناددهی:

امیرانی پور، پ، جلالی، ق، و زمانی، ج. (۱۴۰۳). بررسی ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی در خاک‌های پیرامون معادن کرومیت در جنوب استان کرمان. مدیریت اکوسیستم‌های طبیعی، ۴(۲)، ۲۷-۴۳.

۱- مقدمه

فلزات سنگین از جمله کروم، کادمیوم، جیوه، روی، وانادیم، کبالت، آرسنیک، سرب، نیکل، منگنز و آهن به دلیل سمیت بالا و پایداری در محیط‌های آبی و خاکی، از مهم‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی به‌شمار می‌روند که می‌توانند سلامت انسان و اکوسیستم‌ها را به‌طور جدی تهدید کنند (Li, 2025). این فلزات به‌واسطه ورود از منابع متنوعی مانند فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی، استخراج معادن و تخلیه فاضلاب‌ها در محیط تجمع یافته و باعث کاهش کیفیت خاک و آب می‌شوند. بررسی‌های گسترده‌ای در سال‌های اخیر انجام شده است تا پراکندگی و میزان تجمع فلزات سنگین در انواع خاک‌ها از جمله خاک‌های شهری، صنعتی و کشاورزی شناسایی شود و اثرات زیست‌محیطی آن‌ها مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد (Sharafi and Salehi, 2025). این مطالعات نشان داده‌اند که شناخت دقیق میزان و نحوه پراکندگی فلزات سنگین، زمینه‌ساز توسعه استراتژی‌های مدیریتی موثر برای کاهش آلودگی و بهبود سلامت اکوسیستم‌های خاکی و آبی است.

کروم به‌عنوان یکی از فلزات سنگین، نقش مهمی در آلودگی محیط‌زیست ایفا می‌کند، به‌ویژه در مناطقی که فعالیت‌های صنعتی نظیر استخراج معادن، دباجی چرم، آبکاری فلزات و تولید رنگ و رنگ‌دانه‌ها به‌طور گسترده انجام می‌شود. ورود کروم به خاک و منابع آب زیرزمینی، به‌خصوص در شکل اکسید شده آن یعنی کروم شش‌ظرفیتی [Cr(VI)]، به دلیل تحرک‌پذیری بالا و سمیت شدید، می‌تواند پیامدهای زیان‌باری برای اکوسیستم‌های خاک‌زی، موجودات زنده و سلامت انسان‌ها به‌دنبال داشته باشد. علی‌رغم گذشت دهه‌ها از آغاز مطالعات پیرامون اثرات زیست‌محیطی کروم، این عنصر همچنان به‌عنوان یکی از آلاینده‌های اولویت‌دار در فهرست نهادهای بین‌المللی باقی مانده است و تلاش‌ها برای پایش، ارزیابی و کاهش اثرات آن در حال گسترش است (Xing et al., 2025). معادن کرومیت به‌عنوان منابع مهم کروم در طبیعت شناخته می‌شوند که با وجود ارزش اقتصادی بالا، می‌توانند تهدیداتی برای پوشش گیاهی منطقه و سلامت انسان ایجاد کنند (Das et al., 2021). میانگین کروم موجود در خاک‌های سطحی در مقیاس جهانی حدود ۵۴ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است که این میزان می‌تواند بسته به شرایط محیطی و فعالیت‌های انسانی متفاوت باشد (Ertani et al., 2017). در برخی مناطق نزدیک معادن، فلزات سنگین به‌ویژه در خاک‌های سطحی با غلظت‌های بالایی یافت می‌شوند که اغلب ناشی از رهاسازی مواد باطله معدن به‌صورت ناکارآمد و بدون مدیریت مناسب است. این مواد باطله که حاوی فلزات سنگین غلیظ شده هستند، تحت تأثیر عوامل جوی به خاک‌های مجاور و حتی اراضی کشاورزی نفوذ می‌کنند و آلودگی گسترده‌ای را ایجاد می‌نمایند. مطالعه‌ای در این زمینه نشان داده است که شدت آلودگی خاک‌های اطراف معادن به فعالیت‌های استخراجی و توسعه معدن در آن منطقه به‌طور مستقیم وابسته است (Naz et al., 2018).

فلزات سنگین به دلیل پایداری بالا و عدم تجزیه زیستی، به‌عنوان آلاینده‌های پایدار محیطی شناخته می‌شوند که قادرند ترکیب، تنوع و عملکرد میکروبی خاک را به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهند. یافته‌های اخیر نشان می‌دهند که حضور فلزات سنگینی مانند کروم، سرب و کادمیم در خاک منجر به کاهش قابل ملاحظه زیست‌توده میکروبی و تنوع جوامع باکتریایی می‌شود (Wang et al., 2025). با این وجود، برخی ریزجانداران با بهره‌گیری از مکانیسم‌های مقاومت زیستی نظیر جذب، ترسیب و پمپاژ یون‌های فلزی، توانایی بقا در محیط‌های آلوده را یافته و نقش مهمی در فرآیندهای پالایش زیستی خاک‌های آلوده ایفا می‌کنند. علاوه بر این، باکتری‌ها به‌واسطه سازگاری‌های پیچیده فیزیولوژیکی و ساختاری، قابلیت تطابق بالاتری با شرایط تنش‌زای خاک از خود نشان داده‌اند. این ویژگی‌ها باعث می‌شود تا آن‌ها در مقایسه با سایر ریزجانداران، مقاومت و پایداری بیشتری در مواجهه با عوامل نامساعد محیطی داشته باشند و به همین سبب، به شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی سلامت زیستی خاک در مناطق آلوده تبدیل شده‌اند (De Almeida Martins and Takahashi, 2025).

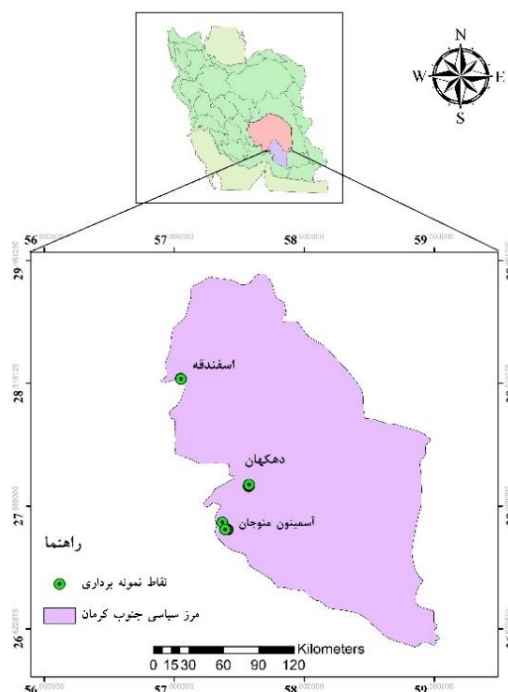
بنابراین، شناسایی، جداسازی و بررسی ویژگی‌های ریزجانداران، به‌ویژه باکتری‌ها، در زیست‌بوم‌های گوناگون نقش مهمی در درک عملکرد آن‌ها در اکوسیستم‌ها ایفا می‌کند. روش‌های مرسوم مبتنی بر کشت برای مطالعه ترکیب و تنوع میکروبی اگرچه رایج‌اند، اما تنها قادر به شناسایی بخش بسیار محدودی از ریزجانداران موجود هستند؛ به‌طوری که تخمین زده می‌شود کمتر از یک درصد از تنوع میکروبی از این طریق قابل شناسایی باشد (Oulas et al., 2015). در نتیجه، بهره‌گیری از روش‌های نوین مولکولی برای تحلیل جامع‌تر جوامع میکروبی خاک، امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است. یکی از روش‌های برجسته مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز که برای بررسی ترکیب و تنوع جوامع ریزجانداران، به‌ویژه باکتری‌های خاک، کاربرد دارد، متاژنومیکس است. این روش به مطالعه مستقیم ماده ژنتیکی میکروبی استخراج‌شده از نمونه‌های محیطی اطلاق می‌شود و با عناوینی همچون ژنتیک زیست‌محیطی یا ژنومیک جامعه شناخته می‌شود. متاژنومیکس شامل توالی‌یابی و تحلیل DNA بدون نیاز به کشت میکروارگانیسم‌هاست و از میان روش‌های غیرکشت‌محور، به‌عنوان روشی کارآمد و قدرتمند در شناسایی پروفایل میکروبی جوامع و تعیین پتانسیل ژنتیکی و عملکردی آن‌ها شناخته می‌شود. داده‌های حاصل، تصویری دقیق‌تر و جامع‌تر از تنوع میکروبی و نقش اکولوژیکی ریزجانداران ارائه می‌کند که روش‌های سنتی قادر به ارائه آن نیستند (Wang et al., 2022).

نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که فعالیت‌های انسان‌زاد، به‌ویژه معدن‌کاری، می‌توانند تأثیرات قابل توجه و بلندمدتی بر ویژگی‌های خاک، از جمله ترکیب و تنوع جوامع ریزجانداران، داشته باشند (Xing et al., 2025). از سوی دیگر، منطقه جنوب کرمان با استخراج بیش از ۷۰ درصد کرومیت کشور، به‌عنوان قطب اصلی این فلز شناخته می‌شود. این امر می‌تواند بر توزیع آلودگی فلز سنگین کروم در خاک‌های مجاور معادن، تحت تأثیر ریزگردها و جریان‌های سطحی و زیرسطحی آب و همچنین بر ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی خاک تأثیرگذار باشد (Zhang, 2025). بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به کروم و بررسی ترکیب جوامع باکتریایی در خاک‌های پیرامون معادن کرومیت در جنوب استان کرمان، با بهره‌گیری از آنالیز متاژنومیک و توالی‌یابی نسل جدید انجام شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری خاک

از اراضی پیرامون معادن کرومیت در جنوب استان کرمان، شامل مناطق اسفندقه (شهرستان جیرفت)، دهکهان (شهرستان کهنوج) و آسمینون (شهرستان منوجان)، تعداد ۱۲ موقعیت مکانی مختلف انتخاب شد. از هر موقعیت، سه نمونه خاک مرکب (شامل ده نمونه ساده) از عمق صفر تا ۱۵ سانتی‌متر برداشت گردید. جهت انجام نمونه‌برداری، از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده شد. شکل (۱) موقعیت منطقه مورد مطالعه را بر روی نقشه ایران نشان می‌دهد.



شکل (۱): نمای جغرافیایی منطقه مطالعه‌شده و توزیع نقاط نمونه‌برداری در جنوب استان کرمان

۲-۲- آنالیز آزمایشگاهی

۲-۲-۱- آنالیز برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و فلزات سنگین

ویژگی‌های مختلف خاک با استفاده از روش‌های استاندارد و پذیرفته‌شده اندازه‌گیری شدند. ترکیب بافت خاک بر اساس روش هیدرومتری تعیین گردید (Bouyoucos, 1951). میزان کربن آلی با استفاده از روش والکلی و بلاک (Walkley and Black, 1934) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، اسیدیته خاک در گل اشباع و هدایت الکتریکی در عصاره اشباع اندازه‌گیری شدند (Page, 1982). مقدار کربنات کلسیم معادل نیز به‌وسیله روش تیتراسیون بازگشتی با اسید کلریدریک (Alison and Modie, 1965) تعیین گردید. مقادیر میانگین این پارامترها در نقاط نمونه‌برداری شده در جدول (۱) ارائه شده است. مقادیر کل فلزات سنگین، کروم، کادمیوم، سرب، روی، مس، منگنز و نیکل نمونه‌های خاک با استفاده از محلول تیتراسیون سلطانی

1. Next-Generation Sequencing (NGS)

2. Completely Randomized Design (CRD)

3. Soil acidity (Soil pH)

4. Electrical Conductivity (EC)

5. Calcium Carbonate Equivalent (CCE)

(مخلوطی از اسید نیتریک و اسید کلریدریک با نسبت ۳:۱) استخراج (Chand and Prasad, 2013) و با استفاده از دستگاه اسپکترومتر جذب اتمی^۱ قرائت شدند.

جدول (۱): مقادیر میانگین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در موقعیت‌های نمونه برداری شده

نمونه	pH	هدایت الکتریکی	کربن آلی	کربنات کلسیم	شن	رس	سیلت	بافت خاک
S1	۷/۴۱	۰/۸۵	۰/۸۸	۴	۸۷/۲۹	۵/۲۱	۷/۵۰	شن لومی
S2	۷/۴۶	۰/۹۱	۰/۶۸	۴	۸۸/۲۴	۵/۴۴	۶/۳۲	شن
S3	۷/۵۲	۱/۹۸	۱/۰۷	۷/۷۵	۸۶/۷۶	۳/۶۷	۹/۵۶	شن لومی
S4	۸/۴۰	۰/۷۰	۰/۴۹	۱۲/۷۵	۸۵/۵۴	۶/۴۳	۸/۰۳	شن لومی
S5	۷/۹۹	۰/۳۷	۰/۶۸	۴	۹۲/۸۹	۳/۱۲	۳/۹۹	شن
S6	۸/۶۱	۰/۶۱	۰/۹۷	۱/۵	۹۲/۲۴	۴/۷۲	۳/۰۴	شن
S7	۷/۶۲	۰/۶۹	۰/۶۸	۴	۹۰/۰۹	۵/۷۶	۴/۱۵	شن
S8	۷/۵۱	۱/۰۵	۰/۱۲	۱۳	۹۰/۹۶	۰/۷۶	۸/۲۸	شن
S9	۷/۶۳	۱/۱۱	۱/۲۷	۴	۸۸/۸۴	۳/۴۲	۷/۷۴	شن
S10	۷/۸۴	۰/۷۱	۰/۸۹	۰/۲۵	۸۷/۰۶	۴/۹۳	۸/۰۱	شن لومی
S11	۸/۵۸	۰/۸۹	۰/۶۸	۱/۵	۹۳/۹۶	۰/۷۶	۵/۲۸	شن
S12	۷/۸۸	۰/۷۸	۰/۴۹	۱/۵	۹۰/۹۶	۳/۷۲	۵/۳۲	شن

S1: خاک مرتعی مجاور معدن اسفندقه (505015.6E 3158060.17N)، S2: خاک معدنی آسمینون (موقعیت ۱) (539760E 3029488N)، S3: خاک معدنی اسفندقه (504940.77E 3158267N)، S4: خاک معدنی آسمینون (موقعیت ۵) (540027.1E 3029811N)، S5: خاک معدنی آسمینون (موقعیت ۲) (539652E 3029328.38N)، S6: خاک معدنی آسمینون (موقعیت ۳) (536602E 3035634N)، S7: خاک معدنی آسمینون (موقعیت ۴) (540712E 3029363N)، S8: خاک مرتعی مجاور معدن آسمینون (538767E 3029508N)، S9: خاک مرتعی مجاور معدن دهکهان (556905E 3067097N)، S10: خاک اراضی باغی مجاور معدن دهکهان (556474E 3066470N)، S11: خاک معدنی دهکهان (موقعیت ۱) (556644E 3067832N) و S12: خاک معدنی دهکهان (موقعیت ۲) (556680E 3067937N).

۲-۲-۲- جداسازی و شناسایی باکتری‌های خاک

۱) استخراج DNA باکتری‌های خاک: پس از تهیه رقت‌های متوالی^۲ و کشت نمونه‌های خاک بر روی محیط نوترینت آگار^۳، شمارش کلنی‌های باکتریایی انجام گرفت و باکتری‌های رشد یافته جهت جداسازی و خالص‌سازی به صورت مجدد کشت داده شدند. به منظور بررسی مقاومت این باکتری‌ها به کروم، رشد آن‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف دی‌کرومات پتاسیم ارزیابی شد. در ادامه، تعداد ۱۵ جدایه مقاوم به کروم برای انجام توالی‌یابی ژنتیکی انتخاب شدند. استخراج DNA از این جدایه‌های خالص‌سازی شده با استفاده از روش جوشاندن (Dashti et al., 2009) صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ^۴ از طریق نسبت‌های جذب نوری A260/A230 و A260/A280 و نیز غلظت در A260 نانومتر ارزیابی شد و صحت استخراج نیز با الکتروفورز بر روی ژل آگارز^۵ تأیید گردید (Boesenberg-Smith et al., 2012).

۲) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز: برای انجام شناسایی مولکولی، ژن کدکننده زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی^۶ (16S rRNA) که دارای طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز^۷ است، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر شد. در این فرآیند، از جفت آغازگرهای همگانی باکتریایی^۸ (27F/1492R) به منظور تکثیر ناحیه 16S rDNA باکتری‌های خاک استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد و اجزای آن شامل: آغازگرهای رفت و برگشت^۹ (با غلظت نهایی هر کدام ۲۰ پیکومول)؛^{۱۰} مستر میکس رد (غلظت نهایی 1X)، DNA الگو (دو میکرولیتر) و آب دیونیزه بود. پس از آماده‌سازی ترکیب واکنش، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر^{۱۱} قرار داده شدند. شرایط دمایی و زمانی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بر اساس بهینه‌سازی قبلی تعیین شد. این چرخه شامل مراحل زیر بود: واسرشت^{۱۲} اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس؛ سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال^{۱۳} آغازگرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش^{۱۴} در ۷۲ درجه سلسیوس

1. The Perkin Elmer AAnalyst 7000 Atomic Absorption Spectrometer

2. Serial dilutions

3. Nutrient agar medium

4. NanoDrop Microvolume Spectrophotometers

5. Agarose gel electrophoresis

6. Small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)

7. base pairs or bp

8. Universal bacterial primers

9. Forward and Reverse primers

10. Picomol

11. Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (1.5mM MgCl2) (Ampliqon, Denmark)

12. Bio-Rad T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

13. Denaturation

14. Annealing

15. Extension

به مدت ۴۵ ثانیه؛ در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت. محصولات تکثیرشده تا زمان استفاده در مرحله الکتروفورز بر روی ژل آگارز، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۳) توالی‌یابی: مقدار ۵۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای توالی‌یابی ژن به آزمایشگاه تخصصی ارسال شد. توالی‌های ژنتیکی به‌دست‌آمده پس از دریافت، با استفاده از ابزار همترازی توالی‌های زیستی در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری ایالات متحده در سطح نوکلئوتیدی با توالی‌های ثبت‌شده مقایسه شدند تا میزان تشابه و روابط تبارزایی آن‌ها با سایر جدایه‌های پروکاریوتی مشخص شود. توالی‌های حاصل پس از بازبینی و ویرایش، به کمک نرم‌افزارهای تخصصی هم‌تراز شده و برای تحلیل‌های بعدی آماده گردیدند.

۲-۳- بررسی ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی خاک با روش توالی‌یابی نسل جدید

در روش متازنومیک مبتنی بر ژن‌های rRNA (مانند 16S برای باکتری‌ها، 18S برای یوکاریوت‌ها و ITS برای قارچ‌ها)، ابتدا DNA کل محیطی از نمونه خاک استخراج می‌شود. سپس نواحی هدف ژن‌های rRNA با استفاده از پرایمرهای بارکدار، از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر می‌شوند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از تخلیص و ارزیابی کمی، برای ساخت کتابخانه‌های ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این کتابخانه‌ها با استفاده از فناوری توالی‌یابی نسل جدید توالی‌یابی می‌شوند. در نهایت، داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی با روش‌های بیوانفورماتیکی پردازش و تحلیل شده تا ساختار و ترکیب جامعه میکروبی شناسایی شود. مراحل جزئی‌تر این فرآیند در ادامه شرح داده شده است.

۱) استخراج DNA ژنومی از خاک: به‌منظور مقایسه ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی، دو نمونه خاک شامل یک نمونه معدنی و یک نمونه غیرمعدنی انتخاب شدند. استخراج DNA ژنومی از این نمونه‌ها با استفاده از روش گزارش‌شده توسط Basim et al. (۲۰۲۰) انجام شد.

۲) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: توالی پرایمرهای مرحله نخست واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نام‌های 515F و 926R در جدول (۲) ارائه شده است. پرایمرهای مورد استفاده در توالی‌یابی نسل جدید از سه بخش اصلی تشکیل شده‌اند: بخش اول، توالی اختصاصی پرایمر است که برای تکثیر ناحیه هدف و انجام توالی‌یابی به کار می‌رود؛ بخش دوم، توالی الحاقی جهت اتصال به توالی‌های آداپتور؛ و بخش سوم، توالی جداکننده است که امکان شناسایی نمونه‌ها در فرآیند توالی‌یابی مولتی‌پلکس را فراهم می‌سازد.

مواد تشکیل‌دهنده واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای راند اول آنالیز متازنوم در حجم کل ۲۵ میکرولیتر شامل موارد زیر بودند: هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت به مقدار ۱ میکرولیتر با غلظت نهایی ۱۰ پیکومول، بافر PCR 10X به میزان ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، تری‌فسفات دئوکسی‌نوکلئوتیدها با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار برای هر نوکلئوتید، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز نیم واحد به ازای هر واکنش ۲۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر DNA الگو و آب دیونیزه برای تکمیل حجم. پس از ترکیب اجزاء میکروتیوب‌ها در دستگاه چرخه دمایی قرار گرفتند و برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌گونه‌ای تنظیم شد که مرحله اولیه دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شود، سپس ۲۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد و الحاق رشته جدید به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد طی گردید. در پایان، مرحله طولیل‌شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. توالی پرایمرهای راند دوم واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت آنالیز متازنوم در جدول (۳) ارائه شده است. مواد مصرفی و مقادیر آن‌ها برای انجام واکنش راند دوم واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مشابه راند اول بود، با این تفاوت که به جای DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز راند اول به کار گرفته شد. همچنین برنامه زمانی و دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همانند راند اول بود، اما دمای مرحله اتصال آغازگرها به ۵۵ درجه سلسیوس افزایش یافت.

جدول (۲): توالی پرایمرهای راند اول توالی‌یابی نسل جدید جهت آنالیز متازنوم

نام پرایمر	توالی (3'-5')
515F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
926R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGYCAATYMTTTRAGTTT

1. BLAST

2. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3. BioEdit and GeneDoc

4. 18S refers to the 18S ribosomal RNA gene

5. The "ITS" in the context of fungi refers to the Internal Transcribed Spacer, a region of ribosomal DNA that is widely used as a DNA barcode for identifying and classifying fungi

6. Barcoding primers

7. Next-generation sequencing (NGS) libraries are made by cutting DNA into short pieces, adding adapters, and removing non-bound adapters

8. Target-Specific Sequence

9. Adapter Sequences

10. Indexing Sequences (Index Primers)

11. Multiplex Sequencing

12. deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

جدول (۳): توالی پرایمرهای راند دوم توالی‌یابی نسل جدید جهت آنالیز متاژنوم

نام پرایمر	توالی (3'-5')
NGS_i5_S507 F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGAGTATCGTCGGCAGCGTC
NGS_i7_N702 R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGG

۳) توالی‌یابی نسل جدید: پس از ساخت کتابخانه ژنومی، نمونه‌ها برای انجام آنالیز متاژنوم با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید به شرکت نووژن^۱ در انگلستان ارسال شدند. در این مرحله، داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی با دقت بالا تولید شده و پس از آن، پردازش‌های بیوانفورماتیکی لازم جهت تحلیل و شناسایی تنوع و ترکیب جوامع باکتریایی انجام می‌گیرد.

۴) تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی نسل جدید: پس از اتمام فرآیند توالی‌یابی، داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار تخصصی تحلیل شدند تا حجم گسترده اطلاعات تولیدشده به‌صورت مؤثر مورد بررسی قرار گیرد. در ابتدا، خوانش‌های خام^۲ از نظر کیفیت، طول قطعات و تطابق بین زوج خوانش‌ها^۳ فیلتر شدند تا داده‌های با کیفیت و قابل اطمینان انتخاب شوند. سپس این خوانش‌ها مونتاژ شده و با ژنوم مرجع هم‌تراز^۴ شدند. در مرحله نهایی، خوانش‌های به‌دست آمده با داده‌های نمونه‌های دیگر مقایسه شدند تا شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی میان نمونه‌ها شناسایی و تحلیل گردد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی‌های خاک

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک (جدول ۱)، درصد شن در تمام ۱۲ منطقه مورد بررسی بیش از ۸۵ درصد بوده و بافت سطحی خاک در تمامی نمونه‌ها در طبقه‌بندی شن یا شن لومی قرار گرفت. خاک‌های درشت‌بافت با دارا بودن نفوذپذیری بالا، شرایط مناسبی برای نفوذ آب و تغذیه سفره‌های آب زیرزمینی فراهم می‌کنند. با این حال، فقر رس و فقدان ظرفیت نگهداری و تصفیه آلاینده‌ها، توان پالایش خاک را کاهش داده و در صورت آلودگی خاک، احتمال انتقال آلاینده‌ها به منابع آب زیرسطحی افزایش می‌یابد. مقدار pH خاک در تمامی نمونه‌ها بین ۷ تا ۸/۵ بود که نشان‌دهنده قلیایی بودن خاک‌هاست. همچنین، هدایت الکتریکی خاک‌ها کمتر از ۲ دسی‌زیمنس بر متر اندازه‌گیری شد که در محدوده خاک‌های غیرشور قرار دارد. مقدار کربنات کلسیم معادل نیز در بازه‌ای بین ۰/۲۵ تا ۱۳ درصد قرار داشت و در هیچ‌یک از نمونه‌ها از ۱۵ درصد فراتر نرفت، بنابراین خاک‌ها در محدوده خاک‌های غیرآهکی طبقه‌بندی می‌شوند (Bolan et al., 2023). این ویژگی‌ها، به‌ویژه درشت‌بافت بودن خاک در کنار مقدار پایین کربنات کلسیم، می‌تواند خطر افزایش تحرک و فراهمی فلزات سنگین و در نتیجه ورود آن‌ها به زنجیره غذایی یا منابع آب زیرزمینی را افزایش دهد. میزان کربن آلی خاک‌ها نیز در بازه‌ای بین ۰/۱ تا ۱/۲۶ درصد متغیر بود.

۳-۲- فلزات سنگین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که تأثیر موقعیت مکانی و به‌تبع آن نوع خاک، بر تمامی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنادار بوده است. میانگین غلظت کل فلزات سنگین در خاک نمونه‌برداری شده از مناطق مختلف در جدول (۵) گزارش شده است. همچنین، جدول (۶) شامل محدوده‌های استاندارد غلظت فلزات سنگین بر اساس دستورالعمل سازمان حفاظت محیط زیست ایران (افیونی، ۱۳۹۰) می‌باشد.

بر اساس داده‌های جدول (۵)، غلظت کروم در بیشتر نمونه‌های خاک به‌ویژه در مناطق معدنی، بالا بوده است. کمترین غلظت کروم کل در موقعیت S1 برابر با ۱۰۳/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بیشترین مقدار آن در موقعیت S12 به میزان ۲۱۶۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ثبت شد. مقایسه این مقادیر با حدود استاندارد ارائه شده در جدول (۵) نشان می‌دهد که تنها در موقعیت S12 غلظت کروم در محدوده خطر قطعی قرار دارد. همچنین، در نمونه‌های مربوط به موقعیت‌های S3، S4، S6 و S7 غلظت کروم در محدوده امکان خطر ارزیابی شد. سایر موقعیت‌ها دارای مقادیر کروم در محدوده بی‌خطر بودند. بررسی‌های انجام شده بر اساس حدود استاندارد ارائه شده در جدول (۶) نشان داد که میانگین غلظت کل کادمیوم و سرب تنها در موقعیت S1 در محدوده بی‌خطر قرار داشت، در حالی که در سایر موقعیت (S2 تا S11) این فلزات در محدوده خطر ارزیابی شدند. میانگین غلظت کل نیکل در نمونه‌های S3، S4، S5، S6، S7، S8، S11 و S12 بالاتر از حد مجاز بود و در محدوده خطر قرار گرفت، در حالی که در موقعیت‌های S1، S2، S9 و S10 در محدوده بی‌خطر مشاهده شد. در مورد عنصر مس، نتایج نشان داد که میانگین غلظت کل آن در موقعیت S3، S5، S6، S7، S8، S9 و S10 در محدوده خطر قرار دارد، در حالی که در موقعیت‌های S1، S2، S4، S11 و S12 در سطح ایمن تشخیص داده شد. میانگین غلظت کل منگنز تنها

1. Novogene is a leading provider of genomic services and solutions with cutting edge NGS and bioinformatics expertise

2. QIAGEN CLC Genomics Workbench

3. In next-generation sequencing (NGS), raw reads are the unprocessed, raw sequence data directly outputted by sequencing instruments

4. paired-end reads

5. alignment

در نمونه S12 از حد مجاز فراتر رفت و در محدوده خطر قرار گرفت، در حالی که در سایر موقعیت‌ها (S1 تا S11) در محدوده بی‌خطر قرار داشت. همچنین، نتایج نشان داد که میانگین غلظت کل روی در تمامی نمونه‌ها در محدوده بی‌خطر بوده و نگرانی زیست‌محیطی از این نظر وجود ندارد.

جدول (۴): تحلیل آماری ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در مناطق نمونه‌برداری مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)						
		کروم	کادمیوم	سرب	نیکل	مس	روی	منگنز
خاک	۱۱	۱۳/۷۰ **	۲/۳۲ **	۸/۰۲ **	۵/۹۸ **	۳/۸۵ **	۱۰/۰۵ **	۷/۱۵ **
خطا	۲۴	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۳۰	۰/۴۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۳

نماد ** نشان‌دهنده معنی‌داری آماری در سطح احتمال یک درصد ($p < 0.01$) است.

جدول (۵): مقادیر میانگین برخی فلزات سنگین در نمونه‌های خاک (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)

نمونه	کروم	کادمیوم	سرب	نیکل	مس	روی	منگنز
S1	۱۰۲/۸۰	۱/۰۵	۲۲/۰۵	۱۴/۵۰	۱۶/۴۷	۲۰/۱۲	۵/۸۰
S2	۴۱۰	۱۵	۳۸۶/۲۵	۳۶۲/۵۰	۴۱۱/۲۵	۶۴۰	۱۷/۵۰
S3	۸۲۱/۲۵	۶۵	۱۳۷۳/۷۵	۱۶۹۵	۸۰۲/۵۰	۴۵۰	۲۳۵
S4	۷۱۸/۷۵	۵۷/۵۰	۱۴۵۱/۲۵	۱۴۳۵	۲۹۶/۲۵	۴۵۲/۵۰	۱۷۰
S5	۳۵۲/۵۰	۳۰	۶۷۷/۵۰	۸۶۷/۵۰	۱۱۲۷/۵۰	۲۰۰	۱۲۷/۵۰
S6	۷۱۵	۶۲/۵۰	۱۳۹۳/۷۵	۱۴۹۷/۵۰	۵۲۸/۷۵	۸۲۳/۶۵	۳۲۰
S7	۵۳۵	۲۶/۲۵	۶۹۶/۲۵	۷۲۱/۲۵	۸۱۵	۱۷۲/۵۰	۸۰
S8	۳۵۲	۴۵	۱۱۸۲/۵۰	۷۱۳/۷۵	۷۹۲/۵۰	۱۱۹۸/۷۵	۲۷۵/۵۰
S9	۲۵۰	۳۶/۲۵	۱۰۲۷/۷۵	۲۲۷/۵۰	۱۴۷۱/۲۵	۱۸۰۷/۵۰	۲۵۷/۵۰
S10	۱۸۳/۷۵	۳۲/۵۰	۷۸۳/۷۵	۵۱/۲۵	۲۱۲۰	۲۳۳۱/۲۵	۲۲۸/۷۵
S11	۴۰۲/۵۰	۵۰	۱۱۸۲/۵۰	۱۱۱۶/۲۵	۴۹۲/۵۰	۳۶۱/۲۵	۲۴۸/۷۵
S12	۲۱۶۲/۵۰	۱۳/۷۵	۳۷۵	۷۹۷/۵۰	۴۳۵	۹۵	۱۹۲۲/۵۰

جدول (۶): محدوده‌های مشخص شده استاندارد برای فلزات سنگین (غلظت: میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)

کروم	کادمیوم	سرب	نیکل	مس	روی	منگنز	
>۱۳۳۰	>۲۴	>۲۷۰	>۱۴۳۰	>۳۹۳۰	>۹۳۸۰	>۲۰۰۰	خطر قطعی
۴۸۰-۱۳۳۰	۸-۲۴	۶۰-۲۷۰	۵۳۰-۱۴۳۰	۵۰۰-۳۹۳۰	۵۶۲۰-۹۳۸۰	۱۰۰۰-۲۰۰۰	محدوده امکان خطر
<۴۸۰	<۸	<۶۰	<۵۳۰	<۵۰۰	<۵۶۲۰	<۱۰۰۰	بی خطر

۳-۳- جداسازی و شناسایی باکتری‌های خاک

۳-۳-۱- تعیین جمعیت باکتری‌های خاک

نتایج حاصل از تحلیل واریانس (جدول ۴) نشان داد که تأثیر موقعیت مکانی بر جمعیت باکتری‌های خاک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. بررسی میانگین جمعیت باکتری‌ها در موقعیت‌های مختلف (جدول ۷) حاکی از آن بود که در مناطق با غلظت بالاتر فلزات سنگین، جمعیت باکتریایی به‌طور معناداری کاهش یافته است. لازم به‌ذکر است که تشابه یا تفاوت در فراوانی باکتری‌های خاک بین نمونه‌های مختلف، لزوماً بیانگر شباهت یا تفاوت در گونه‌های موجود نیست. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای که تغییرات جمعیت باکتری‌های خاک در اثر تغییر کاربری اراضی از جنگل به مرتع با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی بررسی شد، تفاوت معناداری در جمعیت باکتری‌ها بین دو کاربری مشاهده نشد، اما تحلیل ترکیب جوامع باکتریایی با روش تحلیل فاصله بین ژنی ریبوزومی^۵ اختلاف معناداری را نشان داد (Suleiman et al., 2017). مشابه این موضوع در پژوهشی دیگر که جمعیت و ترکیب باکتری‌های متانوتروف‌ها را به ترتیب با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی و روش الکتروفورز با شیب شیمیایی^۴ در اراضی تحت تأثیر علف‌کش بررسی کرده بود، مشاهده شد؛ در این مطالعه جمعیت متانوتروف‌ها تفاوت معناداری نداشت، ولی ترکیب آن‌ها بر اساس نتایج روش الکتروفورز با شیب شیمیایی تفاوت معنی‌دار نشان داد (Seghers et al., 2003). همچنین، در تحقیق دیگری که جمعیت و ترکیب جوامع باکتریایی ریزوسفر برنج و خاک غیرریزوسفری را به ترتیب با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی و الکتروفورز با شیب شیمیایی مورد بررسی قرار داده بود، علاوه بر تفاوت معنادار در ترکیب جوامع، جمعیت باکتریایی نیز بین دو نوع خاک اختلاف معنی‌داری داشت (Hussain et al., 2012). این

1. Analysis of Variance (ANOVA)

2. quantitative PCR (qPCR)

3. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)

4. Methanotrophs are prokaryotes that metabolize methane as their source of carbon and chemical energy

5. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

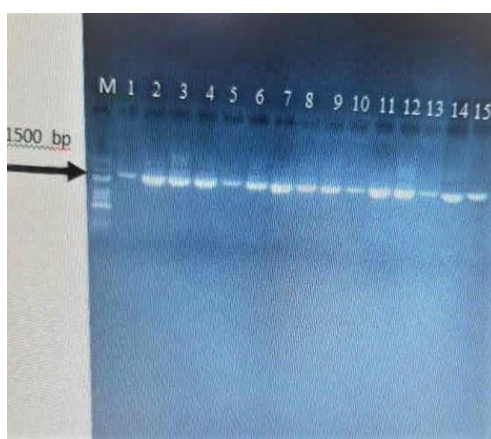
یافته‌ها بر اهمیت تمایز دقیق میان تغییرات جمعیتی و ساختاری در جوامع میکروبی تأکید داشته و ضرورت بهره‌گیری از روش‌های تحلیلی متنوع برای ارزیابی جامع‌تر میکروبیوتای خاک را نشان می‌دهد. بر این اساس، به‌منظور بررسی دقیق‌تر تفاوت‌های موجود در ترکیب باکتریایی خاک بین نمونه‌های معدنی و غیرمعدنی، از تحلیل متاژنومی قطعات 16S rDNA باکتریایی مبتنی بر فناوری توالی‌یابی نسل جدید استفاده شد.

جدول (۷): میانگین جمعیت کل باکتری‌های خاک در موقعیت‌های مختلف

موقعیت نمونه	جمعیت باکتری‌ها (CFU/gr soil)
S1	$1/14 \times 10^6$
S2	$1/15 \times 10^4$
S3	$2/18 \times 10^4$
S4	$3/26 \times 10^4$
S5	3×10^4
S6	$1/43 \times 10^4$
S7	$2/12 \times 10^4$
S8	$1/37 \times 10^6$
S9	$2/67 \times 10^5$
S10	$1/45 \times 10^6$
S11	$2/54 \times 10^4$
S12	$1/33 \times 10^4$

۳-۳-۲- شناسایی گونه‌های باکتریایی

پس از تهیه سری رقت‌های متوالی و کشت نمونه‌های خاک، خالص‌سازی و جداسازی کلونی‌های رشد یافته بر اساس رنگ و شکل کلونی انجام شد. در نهایت، ۱۵ جدایه انتخاب گردیدند. این جدایه‌ها پس از استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، برای شناسایی گونه‌ای به‌منظور توالی‌یابی ارسال شدند. نتایج اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده از باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از دستگاه نانودراپ نشان داد که DNA استخراجی از لحاظ کمی و کیفی در سطح مطلوبی قرار داشت؛ میانگین غلظت DNA برای تمامی نمونه‌ها بیش از ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. همچنین، بررسی نسبت‌های جذبی A260/A280 و A260/A230 نمونه‌های باکتریایی نشان داد که کیفیت DNA استخراج شده در محدوده مناسبی قرار دارد. همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده شده است، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعات ژن 16S rDNA باکتریایی با اندازه تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز به‌خوبی انجام شده است. محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت توالی‌یابی و شناسایی گونه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل (۲): الگوی الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توالی‌های 16S rDNA باکتریایی روی ژل آگارز (شماره‌ها مربوط به نمونه‌ها و M نشانگر مولکولی است).

براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعات تکثیرشده و مقایسه آن‌ها با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری ایالات متحده، مشخص گردید که این توالی‌ها دارای درصد بالایی از شباهت با توالی‌های موجود در بانک ژن هستند. این نتایج نشان‌دهنده تطابق قابل توجه

1. Soil microbiota refers to the diverse community of microorganisms inhabiting soil

2. colony-forming unit

جدایه‌های مورد بررسی با گونه‌های شناسایی شده قبلی می‌باشد. نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که ۱۵ جدایه باکتریایی خالص‌سازی شده در این مطالعه بیشترین شباهت را با گونه‌های *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Bacillus sp.*, *Pseudarthrobacter*, *Streptomyces griseus* و *Streptomyces sp.*، *Streptomyces rimosus*، *Lentzea sp.*، *phenanthrenivorans* زیاد این جدایه‌ها به این گونه‌ها یا گونه‌های بسیار نزدیک به آن‌ها تعلق دارند. این نتایج بیانگر تنوع نسبی در جوامع باکتریایی قابل جداسازی از نمونه‌های خاک مورد مطالعه است.

بررسی‌های ریخت‌شناسی و تحلیل‌های مولکولی نشان داد که اغلب باکتری‌های مقاوم به کروم جدا شده در این مطالعه، دارای مورفولوژی میله‌ای و رنگ‌آمیزی گرم مثبت بودند؛ ویژگی‌هایی که با یافته‌های Viti et al. (۲۰۰۶) مطابقت دارد. مطالعات اخیر نیز تأکید دارند که برخی گونه‌های متعلق به جنس *Bacillus*، از جمله *Bacillus paramycooides* و *Bacillus tropicus*، علاوه بر تحمل بالا نسبت به کروم، به دلیل دیواره سلولی مقاوم و توانایی تشکیل اسپور، در برابر تنش‌های محیطی مانند حرارت، خشکی و حضور فلزات سنگین نیز سازگاری بالایی دارند (Kalsoom et al., 2025). همچنین، شکل میله‌ای این باکتری‌ها باعث افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود که می‌تواند جذب یون‌های فلزی را تسهیل کند (Tuli et al., 2024). بر پایه این ویژگی‌ها، به نظر می‌رسد این گروه از باکتری‌ها گزینه‌های مناسبی برای کاربرد در فرآیندهای حذف زیستی کروم از خاک‌های آلوده، به‌ویژه در مجاورت مناطق صنعتی یا معادن فلزی باشند.

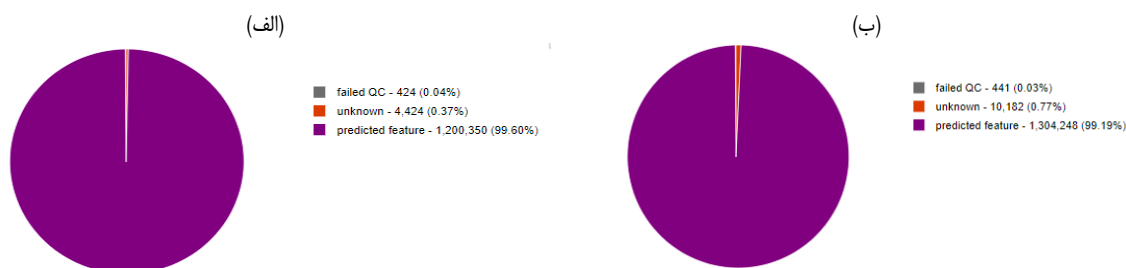
فلزات سنگین به‌عنوان آلاینده‌های محیطی، فشار انتخابی شدیدی بر جوامع میکروبی وارد می‌کنند و گونه‌های باکتریایی متعددی توانسته‌اند با غلظت‌های بالا و سمی این فلزات سازگار شوند (Mounaouer et al., 2014). تحقیقات اخیر، به جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به کروم پرداخته‌اند که نشان می‌دهد جنس *Bacillus* در میان این میکروارگانیسم‌ها نقش کلیدی دارد و به‌طور گسترده‌ای در خاک‌ها و پساب‌های آلوده حضور دارد (Salam et al., 2023). همچنین گونه‌هایی مانند *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Arthrobacter* در تحمل و پالایش زیستی کروم موثر شناخته شده‌اند (Wang et al., 2022).

مشابه نتایج این پژوهش، یکتامنش و همکاران (۱۴۰۰) گونه‌های *Bacillus subtilis*، *Bacillus spp.* و *Bacillus cereus* را به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به کروم در پساب صنعتی خوزستان معرفی کردند. در مطالعه‌ای که با هدف شناسایی باکتری‌های مقاوم به کروم در رودخانه سلطان‌آباد شیراز انجام شد، چندین سویه متعلق به جنس *Pseudomonas* جداسازی گردیدند که توانایی بالایی در تحمل غلظت‌های زیاد کروم از خود نشان دادند. بر اساس نتایج این پژوهش، این سویه‌ها به‌عنوان گزینه‌های مناسب برای استفاده در مطالعات جذب و حذف زیستی فلز کروم از محیط‌های آلوده پیشنهاد شدند (شهینانی و همکاران، ۱۳۹۷).

به‌طور کلی، ریزجانداران به دلیل واکنش یون‌های فلزی با گروه‌های باردار منفی سطح سلولی، قادر به اتصال و جذب فلزات سنگین هستند. بررسی‌های جدید نشان داده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت، به‌ویژه به‌واسطه ساختار دیواره‌ی پپتیدوگلیکان و حضور اسیدهای تیکوئیک و لیپوتیکوئیک، نوروئیک‌های دارای بار منفی بیشتری برای اتصال به یون‌های فلزی فراهم می‌کنند (Fang et al., 2009). با توجه به این یافته‌ها و نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه گرفت که تحمل به جذب فلز در این ریزجانداران نتیجه فرایند تطبیق و انتخاب طبیعی در طول زمان است.

۳-۳-۳- بررسی ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی با روش توالی‌یابی نسل جدید

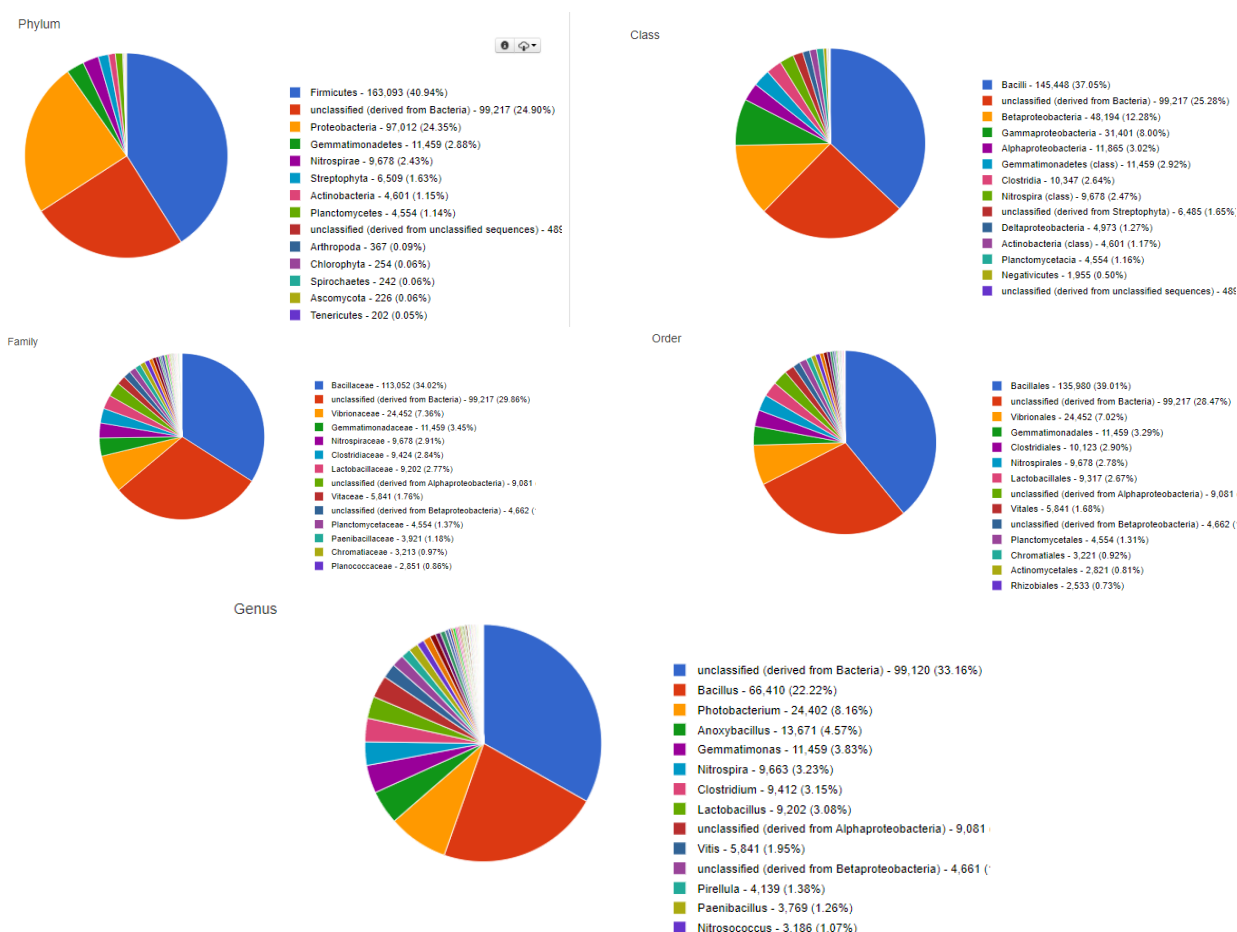
آنالیز متاژنوم این امکان را فراهم کرد تا ترکیب تاکسونومیک جوامع باکتریایی در دو نمونه خاک، یکی از منطقه غیرمعدنی و دیگری از منطقه معدنی، به‌صورت دقیق مقایسه شود. این روش توانست بیش از ۹۹ درصد توالی‌های تقویت‌شده ژن کدکننده 16S rRNA را که توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تولید شده بودند، شناسایی کند. نتایج حاصل از آنالیز متاژنومی برای دو نمونه نشان داد که در نمونه خاک غیرمعدنی و معدنی به‌ترتیب تعداد ۱۲۰۵۱۹۸ و ۱۳۱۴۸۷۱ توالی با طول تقریبی ۴۱۰ جفت باز به‌دست آمد (شکل ۳). این داده‌ها نمایانگر پوشش وسیع و دقت بالای روش توالی‌یابی نسل جدید در بررسی ساختار جامعه میکروبی خاک هستند.



شکل (۳): (الف) تعداد کل توالی خوانده شده در نمونه خاک غیرمعدنی (۰/۰۴ درصد ناموفق، ۰/۳۷ درصد ناشناخته و ۹۹/۶۰ درصد قابل قبول) و (ب) تعداد کل توالی خوانده شده در نمونه خاک معدنی (۰/۰۳ درصد ناموفق، ۰/۷۷ درصد ناشناخته و ۹۹/۱۹ درصد قابل قبول می‌باشد).

در ادامه، ساختار آرایه‌ای اصلی جوامع باکتریایی موجود در دو نمونه خاک مورد بررسی، بر پایه سلسله‌مراتب پنج‌طبقه‌ای طبقه‌بندی زیستی شامل: شاخه، رده، راسته، خانواده^۴ و جنس^۵ تحلیل و ارائه شده است. نتایج حاصل از تحلیل‌های متانومیک به تفکیک سطوح مختلف رده‌بندی به صورت نمودارهای درصد فراوانی نسبی در شکل‌های (۴) و (۵) نمایش داده شده‌اند که ترکیب باکتری‌های غالب در نمونه‌های خاک غیرمعدنی و معدنی را مشخص می‌کنند.

نتایج حاصل از تحلیل فراوانی نسبی باکتری‌های غالب در خاک غیرمعدنی در پنج سطح آرایه‌شناختی نشان داد که در سطح شاخه، بیشترین سهم مربوط به شاخه *Firmicutes* با ۴۰/۹۴ درصد و کمترین سهم به شاخه *Tenericutes* با ۰/۰۵ درصد اختصاص داشت. در سطح رده، رده *Bacilli* با ۳۷/۰۵ درصد فراوان‌ترین و *Negativicutes* با ۰/۵ درصد کم‌فراوان‌ترین گروه بودند. در سطح راسته، باکتری‌های متعلق به راسته *Bacillales* با ۳۹/۰۱ درصد بیشترین سهم را داشتند، در حالی که راسته *Rhizobiales* (از گروه *Alphaproteobacteria*) با ۰/۷۳ درصد کمترین سهم را به خود اختصاص داد. در سطح خانواده، خانواده *Bacillaceae* با فراوانی ۳۴/۰۲ درصد غالب بود و *Planococcaceae* با ۰/۸۶ درصد در پایین‌ترین رتبه قرار گرفت. همچنین در سطح جنس، باکتری‌های طبقه‌بندی نشده با ۳۳/۱۶ درصد بیشترین که نشان‌دهنده پیچیدگی ساختار جامعه باکتریایی و نیز وجود باکتری‌های کمتر شناخته‌شده در این نوع خاک است و جنس *Nitrosococcus* با ۱/۰۷ درصد کمترین فراوانی را نشان دادند. مطالعات پیشین غلبه شاخه‌های *Proteobacteria* و *Actinobacteria* را در اقلیم‌های نیمه‌خشک و خاک‌های قلیایی مشابه مناطق مورد مطالعه تأیید کرده‌اند (Makhalanyane et al., 2013) با این حال، در این تحقیق شاخه *Firmicutes* به‌عنوان شاخه غالب در نمونه خاک غیرمعدنی شناسایی شد، که نشان‌دهنده تفاوت ساختاری قابل توجه بین جوامع باکتریایی خاک در موقعیت‌های مکانی مختلف است. این تفاوت‌ها ناشی از اثرات مستقیم یا غیرمستقیم فعالیت‌های انسان‌زاد و تغییرات ذاتی ویژگی‌های خاک می‌باشد.



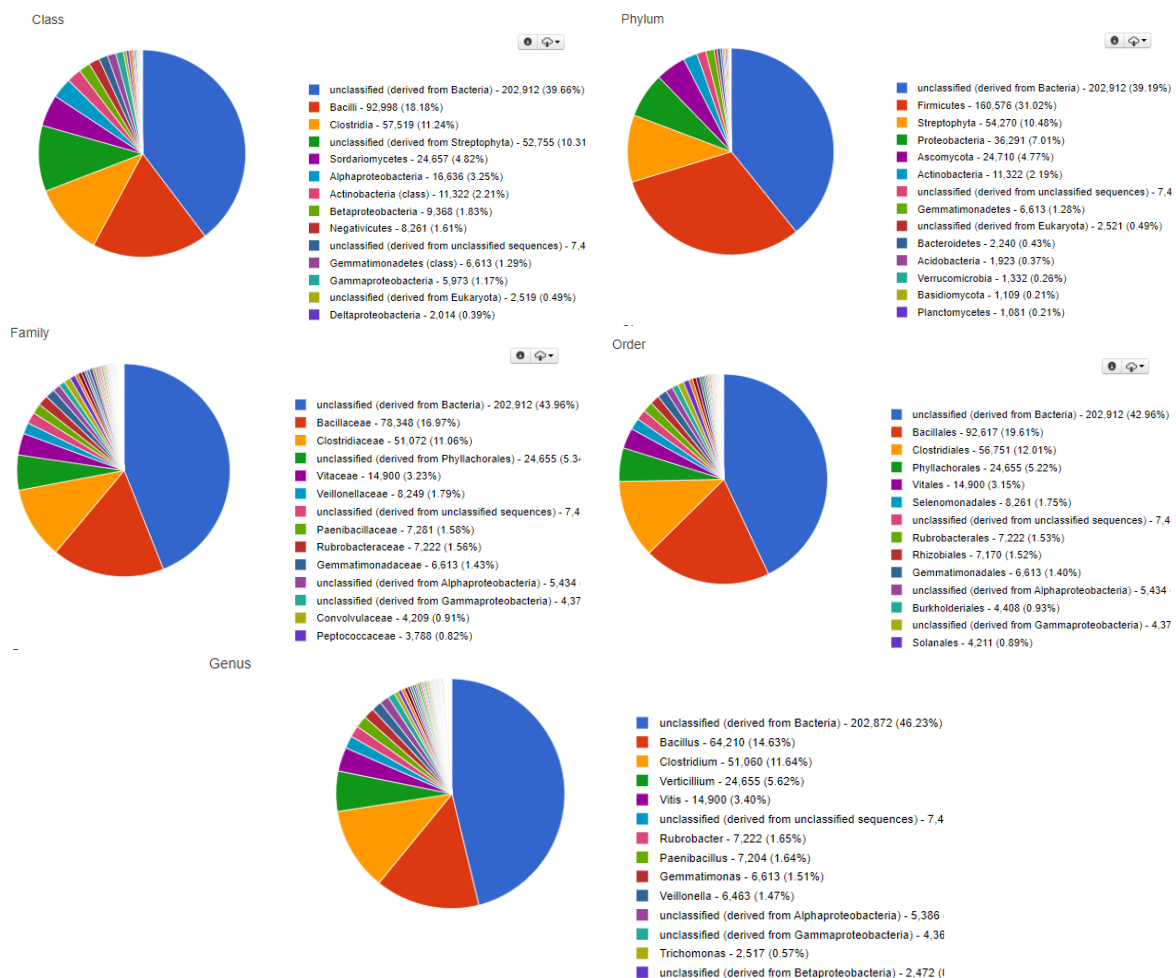
شکل (۴): فراوانی نسبی باکتری‌های غالب خاک غیرمعدنی در پنج‌طبقه آرایه‌شناختی (شاخه، رده، راسته، خانواده و جنس)

1. Phylum
2. Class
3. Order

4. family
5. Genus
6. Unclassified derived from Bacteria

بر اساس نتایج حاصل از تحلیل فراوانی نسبی باکتری‌های غالب در خاک معدنی در پنج سطح آرایه‌شناختی، در سطح شاخه بیشترین فراوانی (۳۹/۱۹) درصد) به باکتری‌های طبقه‌بندی نشده و کمترین آن (۰/۲۱) درصد) به شاخه *Planctomycetes* تعلق داشت. در سطح رده نیز بیشترین فراوانی (۳۹/۶۶) درصد) به رده طبقه‌بندی نشده و کمترین (۰/۳۹) درصد) به *Deltaproteobacteria* مشاهده شد. در سطح راسته، باکتری‌های طبقه‌بندی نشده با ۴۲/۹۶ درصد فراوان‌ترین گروه بودند و کمترین فراوانی (۰/۹) درصد) به *Gammaproteobacteria* تعلق داشت. در سطح خانواده، گروه طبقه‌بندی نشده ۴۳/۹۶ درصد از باکتری‌ها را شامل می‌شد و کمترین سهم (۰/۸۲) درصد) مربوط به خانواده *Peptococcaceae* بود. در نهایت، در سطح جنس نیز بیشترین سهم (۴۶/۲۳) درصد) به باکتری‌های طبقه‌بندی نشده و کمترین (۰/۵) درصد) به گروه *Betaproteobacteria* اختصاص داشت.

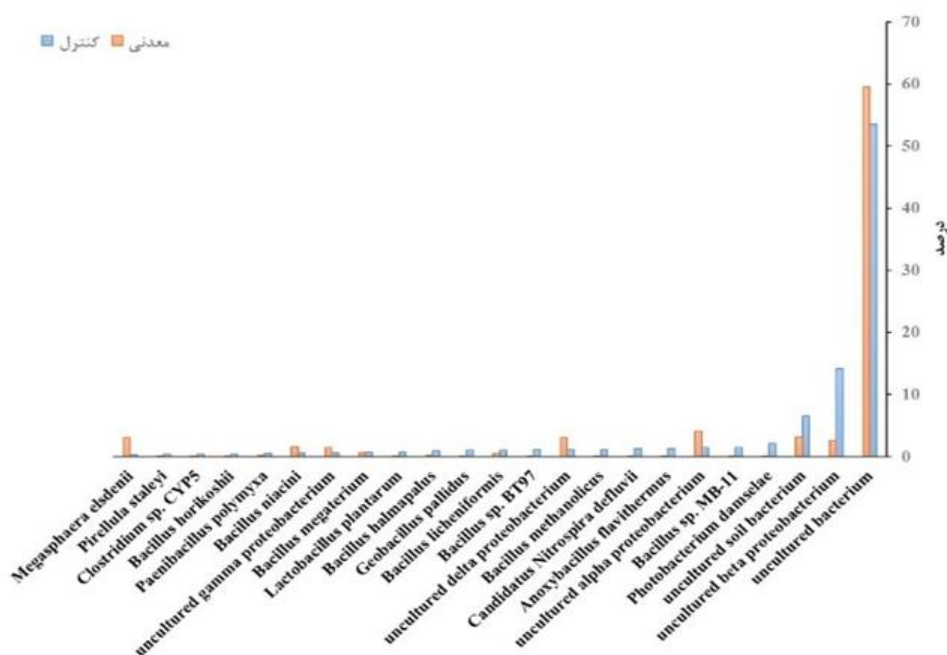
فراوانی بالای باکتری‌های طبقه‌بندی نشده در تمامی سطوح آرایه‌شناختی خاک‌های معدنی، که احتمالاً ناشی از شرایط خاص این محیط‌ها از جمله حضور فلزات سنگین و فشارهای محیطی ویژه است، بیانگر پیچیدگی و تنوع بالقوه جامعه میکروبی و شکل‌گیری جوامعی با ساختار متفاوت و کمتر شناخته شده می‌باشد؛ نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که آلودگی کروم تأثیر قابل توجهی بر ساختار جامعه باکتریایی نمونه معدنی داشته و غالب باکتری‌های موجود در تمامی سطوح طبقه‌بندی، متعلق به گروه‌های طبقه‌بندی نشده هستند که به دلیل کمبود داده‌های مرجع ژنتیکی و محدودیت‌های پایگاه‌های اطلاعاتی مانند مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری ایالات متحده، شناسایی و طبقه‌بندی دقیق آن‌ها با چالش مواجه است. علاوه بر این، وجود فراوان گونه‌های ناشناخته و طبقه‌بندی نشده در خاک‌های آلوده به فعالیت‌های معدنی، اهمیت توسعه روش‌های پیشرفته متاژنومیک و گسترش پایگاه‌های داده ژنتیکی را برجسته می‌سازد. این گونه‌های ناشناخته ممکن است نقش‌های کلیدی در فرآیندهای اکولوژیکی، از جمله بیورمیدیشن^۱ و تثبیت فلزات سنگین، ایفا کنند که شناخت دقیق‌تر آن‌ها می‌تواند راه‌گشای بهبود روش‌های پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده باشد (Furtak et al., 2020).



شکل (۵): فراوانی نسبی باکتری‌های غالب خاک معدنی در پنج طبقه آرایه‌شناختی (شاخه، رده، راسته، خانواده و جنس)

شکل (۶) مقایسه‌ای از ترکیب گونه‌های غالب در دو نمونه خاک غیرمعدنی و معدنی ارائه می‌دهد. همچنین، شکل (۷) تنوع آلفا را بر اساس تعداد کل واحدهای تاکسونومیک عملیاتی نشان می‌دهد؛ واحدهایی که به‌عنوان توالی‌های منحصربه‌فرد برای توصیف جوامع باکتریایی از طریق توالی‌یابی قطعات ژن 16S rRNA به کار می‌روند. همچنین، تنوع بتا که بیانگر تفاوت‌های ترکیب جامعه باکتریایی بین دو نمونه است، با استفاده از روش تحلیل مختصات اصلی^۴ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۸).

با توجه به نتایج مقایسه ترکیب گونه‌های غالب در دو نمونه غیرمعدنی و معدنی (شکل ۶)، مشاهده می‌شود که فراوانی برخی از گونه‌های غالب در این دو نمونه تفاوت دارد. شایان ذکر است که در این نمودار تنها گونه‌هایی با فراوانی بالاتر نمایش داده شده‌اند. نتایج حاصل از شکل (۷) نشان می‌دهد که شاخص تنوع آلفا، مبتنی بر تعداد کل واحدهای تاکسونومیک عملیاتی، در نمونه‌های خاک معدنی نسبت به نمونه‌های غیرمعدنی بالاتر است. همچنین، شاخص شانون که ترکیبی از غنا و یکنواختی جمعیت می‌باشد، هرچند مؤثر است، اما به تنهایی قادر نیست تمام پیچیدگی‌های تنوع پروکاریوت‌های خاک را به‌طور کامل منعکس کند؛ از این‌رو، اندازه‌گیری تنوع باکتریایی با محدودیت‌ها و چالش‌هایی همراه است (Wang et al., 2022). این موضوع ضرورت دقت در تفسیر شاخص‌های تنوع میکروبی و استفاده از روش‌های مکمل برای تحلیل جامع‌تر تنوع زیستی را برجسته می‌سازد. از سوی دیگر، بررسی تنوع بتا (شکل ۸) با استفاده از آنالیز متاژنومیک مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید قطعات 16S rDNA نشان داد که ترکیب جوامع باکتریایی در نمونه‌های غیرمعدنی و معدنی به‌طور قابل توجهی با یکدیگر تفاوت دارد. روش تحلیل مختصات اصلی نمایانگر جداسازی واضح نمونه‌های خاک معدنی و غیرمعدنی در فضای دو بعدی است که نشان‌دهنده تفاوت‌های ساختاری و گونه‌ای میان توالی‌های واحدهای تاکسونومیک عملیاتی استخراج شده از هر نمونه می‌باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که آلودگی محیطی نقش کلیدی در بازآرایی ساختار و تنوع جوامع میکروبی خاک ایفا کرده و موجب تغییر در ترکیب باکتریایی خاک می‌گردد.



شکل (۶): مقایسه فراوانی گونه‌های غالب در دو نمونه غیرمعدنی و معدنی

خاک سطحی به دلیل ساختار فیزیکی و شیمیایی ناهمگن، به‌عنوان زیستگاه‌های متنوعی برای بقا و رشد ریزجانداران خاک‌زی عمل می‌کند (Yao et al., 2006). تغییرات در ویژگی‌های این خاک، به‌ویژه آلودگی، تأثیر قابل توجهی بر ترکیب و ساختار جوامع باکتریایی آن دارد. تأثیر آلودگی‌های فلزی بر تغییر ساختار جوامع باکتریایی خاک به‌طور گسترده‌ای گزارش شده است (Zhao et al., 2020; Salam et al., 2023).

ترکیب جوامع باکتریایی خاک به‌طور گسترده‌ای با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد مطالعه قرار گرفته است. به‌عنوان نمونه، در مطالعه‌ای ترکیب جوامع باکتریایی خاک تحت شش تیمار مختلف شامل علف‌کش و کود، با استفاده از سه روش آنالیز منحنی ذوب

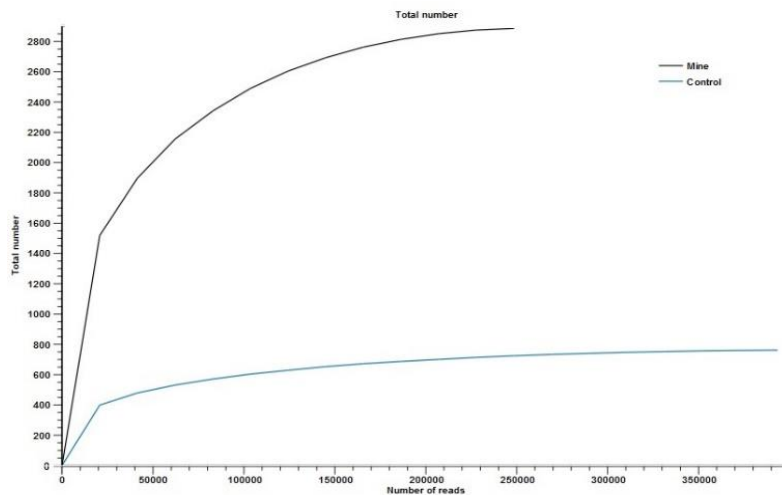
1. Alpha diversity in bacteria, refers to the diversity of bacterial species within a single sample or habitat

2. Operational taxonomic units (OTUs)

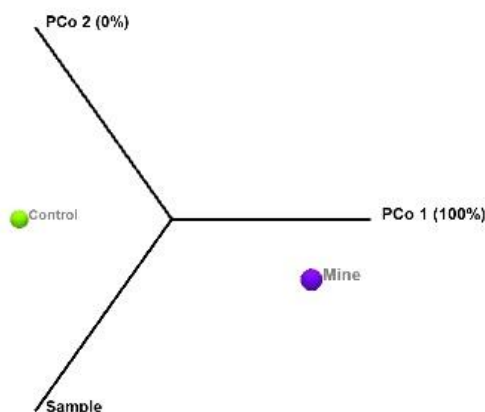
3. Beta diversity in bacteria refers to the dissimilarity or difference in bacterial community composition between two or more ecosystems or samples

4. Principal Coordinates Analysis (PCoA, = Multidimensional scaling, MDS) is a method to explore and to visualize similarities or dissimilarities of data

DNA با کیفیت بالا، الکتروفورز با شیب شیمیایی و توالی‌یابی آقطعات ژن 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که هر سه روش به‌طور مشابه توانستند میزان شباهت و تفاوت میان تیمارها را به‌خوبی تشخیص دهند (Hjelms et al., 2014). در پژوهشی دیگر، ترکیب جوامع باکتریایی در سیستم‌های مختلف خاک در منطقه غرب هند با استفاده از سه روش آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا، الکتروفورز با شیب شیمیایی و کلونینگ ژن 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که هر سه روش به‌طور مشابه قادر به تفکیک اختلافات میان نمونه‌های خاک بودند (Soni and Goel, 2010).



شکل (۷): تنوع آلفا بر اساس تعداد کل واحدهای تاکسونومیک عملیاتی برای دو نمونه غیرمعدنی و معدنی



شکل (۸): تحلیل مختصات اصلی ترکیب جوامع باکتریایی در بین دو نمونه غیرمعدنی و معدنی بر اساس ماتریس فاصله Bray-Curtis

با پیشرفت فناوری، پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند که توالی‌یابی نسل جدید به‌عنوان روشی حساس و دقیق، امکان تحلیل جامع‌تر و با جزئیات بیشتر ترکیب و عملکرد جوامع باکتریایی خاک را فراهم می‌آورد (Zhang et al., 2021; Wang et al., 2022). به‌عنوان نمونه در پژوهشی ترکیب و عملکرد باکتریایی را در سایت‌های آلوده به چندین فلز سنگین از جمله کروم با توالی‌یابی ژن 16S rRNA بررسی کردند و دریافتند که روش توالی‌یابی نسل جدید توانایی آشکارسازی جابجایی ساختاری جوامع را در سطوح کروم پایین‌تر از حد آستانه نیز دارد (Zhang et al., 2025). در مطالعه‌ای دیگر بر روی خاک‌های آلوده به چندین فلز سنگین از جمله کروم، تحلیل مبتنی بر توالی‌یابی نسل جدید تغییرات ساختاری قابل توجهی در جوامع باکتریایی آشکار کرد که روش‌های سنتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز محور قادر به شناسایی آن نبودند (Zhao et al., 2020). همچنین در مطالعه‌ای که در مناطق آلوده به کروم و سرب انجام شد، مشخص گردید که توالی‌یابی نسل جدید قادر است گونه‌های نادری را که به این فلزات واکنش نشان می‌دهند شناسایی کند و حجم وسیعی از داده‌ها را برای تحلیل‌های اکولوژیکی فراهم آورد (Wang et al., 2022). آلودگی فلزی به‌طور چشم‌گیری ساختار

1. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM)

2. 454-based 16S rRNA gene amplicon sequencing

3. Cloning of 16S rRNA gene

ریزجانداران خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد و استفاده از توالی‌یابی نسل جدید امکان تحلیل دقیق این تغییرات را فراهم می‌کند (Wang et al., 2025).

نتایج این پژوهش نیز نشان داد که روش توالی‌یابی نسل جدید به‌عنوان ابزاری بسیار حساس و دقیق قادر است ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی خاک را با دقتی فراتر از روش‌های کلاسیک شناسایی و تحلیل کند. با تولید میلیون‌ها داده توالی در هر آزمایش، توالی‌یابی نسل جدید امکان تشخیص گونه‌های کم‌وفور و مقایسه ساختار جمعیت‌ها در سطح فیلوژنتیکی را فراهم می‌آورد، چیزی که در تکنیک‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز محدود به باندهای الکتروفورز با شیب شیمیایی یا تعداد کلون‌های کلونینگ بود (Oulas et al., 2015). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل متاژنومیک اجازه می‌دهد تا نه تنها ترکیب گونه‌ای بلکه توزیع ژن‌های عملکردی مرتبط با مقاومت و تحمل به استرس‌های محیطی مانند آلودگی فلزات سنگین بررسی شود، امری که در تحلیل‌های سنتی قابل دسترسی نیست (Zhu et al., 2025). همچنین رویکرد ترکیبی زیست‌پالایی، همراه با روش توالی‌یابی نسل جدید، راهکاری مؤثر برای ترمیم زیستی خاک‌های آلوده و درک ساز و کارهای عملکردی جوامع ریزجانداران است (Zhang et al., 2025).

۴- نتیجه‌گیری

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر آلودگی فلز سنگین کروم روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک و همچنین جداسازی گونه‌های مقاوم به این فلز سنگین در مناطق پیرامون معادن کرومیت جنوب استان کرمان انجام شد. نتایج نشان داد با در نظر گرفتن بالا بودن غلظت کروم به‌عنوان یک آلاینده محیطی در برخی خاک‌های اراضی مجاور مناطق معدنی، باید اقدامات لازم جهت کاهش انتقال این آلاینده از خاک‌های معدنی و آلوده به اراضی مجاور و حتی آب‌های سطحی و زیرزمینی و در نتیجه جلوگیری از انتقال آن‌ها به زنجیره غذایی انسان صورت گیرد. با توجه به موقعیت‌های مورد مطالعه و تنوع نمونه‌های گرفته شده از چند موقعیت جنوب استان کرمان، این مناطق در معرض آلودگی‌های مختلف از جمله آلودگی خاک به برخی فلزات سنگین از جمله کروم قرار گرفته است. بنابراین تعیین دقیق‌تر غلظت فلزات سنگین در این مناطق و جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به انواع فلزات سنگین از این مناطق و ارائه راه‌های مؤثر و برنامه‌ریزی‌های مدیریتی مناسب و کارآمد جهت پیشگیری، کنترل و کاهش آلودگی خاک‌های مجاور مناطق معدنی به فلزات سنگین و همچنین پاکسازی مناطق آلوده از طریق استفاده از پتانسیل زیستی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین در قالب پروژه‌های زیست‌پالایی می‌تواند اقدام مناسب باشد و سوبه‌های باکتریایی جدا شده در این پژوهش به دلیل مقاومت بالا به کروم، می‌توانند پتانسیل بالایی برای پاکسازی خاک معادن و آب‌های آلوده به کروم می‌باشند. طی یک دهه گذشته در حوزه اکولوژی میکروبی، پیشرفت‌های چشم‌گیری رخ داده است که این پیشرفت مرهون روش‌های جدید متاژنومیکس و تکنیک‌های توالی‌یابی در این حوزه می‌باشد. استخراج مستقیم DNA و توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی این امکان را برای محققان فراهم کرده است که دنیای میکروارگانیسم‌ها را دقیق‌تر و عمیق‌تر مطالعه کنند. در این پژوهش جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک از آنالیز متاژنوم (با روش توالی‌یابی نسل جدید) استفاده شد. نتایج این روش نشان داد که آلودگی کروم ترکیب جوامع باکتریایی خاک‌های اطراف معادن کرومیت را به شدت تغییر می‌دهد. به‌طوریکه شاخه غالب در نمونه غیرمعدنی، شاخه *Firmicutes* بود در حالی که در نمونه معدنی بیشترین باکتری‌ها مربوط به شاخه طبقه‌بندی نشده بودند، که ممکن است به دلایل وجود تعداد زیادی از باکتری‌های که هنوز شناسایی نشده‌اند و نبودن توالی این باکتری‌ها در پایگاه مورد بررسی (مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری ایالات متحده) باشد. همچنین روش توالی‌یابی نسل جدید توانست تفاوت‌های موجود بین خاک نمونه غیرمعدنی و معدنی را نشان دهد. به‌طوریکه تحلیل‌های مربوط به تنوع بتا (روش تحلیل مختصات اصلی) جداسازی واضحی میان ساختار جوامع باکتریایی خاک‌های معدنی و غیرمعدنی نشان دادند، که بیانگر تغییرات اساسی در ترکیب جمعیت‌ها بر اثر آلودگی است.

از آنجایی که روش توالی‌یابی نسل جدید نسبت به روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از سرعت و دقت بالاتری در تحلیل ژنوم نمونه‌های محیطی برخوردار است و علاوه بر سهولت اجرا، انحراف کمتری نیز در نتایج آن مشاهده می‌شود، استفاده از این تکنیک برای مقایسه ترکیب و تنوع جوامع باکتریایی خاک در تیمارهای مختلف به‌عنوان روش ترجیحی پیشنهاد می‌شود. با بهره‌گیری از روش توالی‌یابی نسل جدید می‌توان تغییرات کمی و کیفی ساختار جمعیت‌های میکروبی را با وضوح بالا رصد کرد و گونه‌های نادری را که در روش‌های سنتی قابل شناسایی نیستند، شناسایی نمود.

انتظار می‌رود گسترش کاربرد این فناوری در مطالعات زیست‌محیطی و خاک‌شناسی، به‌ویژه در بررسی ترکیب و تنوع ریزجانداران خاکی در زیست‌گاه‌های متفاوت، نقش مؤثری در ارتقای راهبردهای مدیریت پایدار خاک ایفا کند و با فراهم آوردن داده‌های دقیق‌تر و قابل اتکا، بستر مناسبی برای تدوین سیاست‌های احیاء و حفاظت خاک در برابر عوامل مخرب زیست‌محیطی فراهم آورد. لازم به ذکر است که در توالی‌یابی نسل جدید، انتخاب پرایمرها تأثیر چشم‌گیری بر پروفایل باکتریایی خاک دارد؛ زیرا استفاده از یک جفت پرایمر ممکن است برخی گروه‌های باکتریایی را حذف یا بیش‌برآورد کند و دقت سنجش تنوع را کاهش دهد (Rintala et al., 2017). بنابراین، برای افزایش دقت و پوشش کامل‌تر جوامع باکتریایی، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های هم‌راستا از حداقل دو مجموعه پرایمر با توالی‌های متفاوت استفاده شود تا سوگیری‌های احتمالی به حداقل رسیده و نتایج قابل اعتمادتری حاصل گردد.

منابع

- افیونی، م. (۱۳۹۰). راهنمای تعیین حداکثر بار مجاز آلودگی منابع آلاینده قابل تخلیه به منابع خاک. اداره کل محیط زیست استان اصفهان. ۵۲۲ ص.
- شهینانی، ا.، جعفری ثالث، ع.، باقری زاده، ی.، ارزیابی بیروگانی، پ.، شیرالی، م.، و عبدلی سنجانی، م. (۱۳۹۷). جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به کروم از رودخانه سلطان‌آباد شیراز. *هوزان*، ۳(۲)، ۲۰-۱.
- یکتامنش، ه.، دودی، م.، و زرین‌دخت، ا. (۱۴۰۰). جداسازی و شناسایی مولکولی و پاکسازی زیستی باکتری‌های مقاوم به کروم از پساب‌های دباغی و چرم‌سازی خوزستان، ایران. *زیست‌شناسی میکروارگانیسم*، ۱۰(۳۸)، ۷۱-۸۴.
- Allison, L. E., and Moodie, C. D. (1965). Carbonate determination by volumetric and back-titration methods. In C. A. Black (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties* (pp. 1379–1396). Madison, WI: American Society of Agronomy.
- Basim, Y., Mohebbi, G., Jorfi, S., Nabizadeh, R., Aghadiri, M., Moghadam, A., Soleymani, F., and Jaafarzadeh Haghghi Fard, N. (2020). Comparison of performance and efficiency of four methods to extract genomic DNA from oil contaminated soils in south-western of Iran. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18(2), 463–468.
- Boesenberg-Smith, K. A., Pessarakli, M. M., and Wolk, D. M. (2012). Assessment of DNA yield and purity: an overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), 1-6.
- Bolan, N., Srivastava, P., Rao, C. S., Satyanaraya, P. V., Anderson, G. C., Bolan, S., Nortjé, G. P., Kronenberg, R., Bardhan, S., Abbott, L. K., Zhao, H., Mehra, P., Satyanarayana, S. V., Khan, N., Wang, H., Rinklebe, J., Siddique, K. H. M., and Kirkham, M. B. (2023). Distribution, characteristics and management of calcareous soils. *Advances in agronomy*, 182, 81-130.
- Bouyoucos, G. H. (1951). A Recalibration of the Hydrometer for Making Mechanical Analysis of Soils. *Agronomy Journal*, 43, 434-438.
- Chand, V., and Prasad, S. (2013). ICP-OES assessment of heavy metal contamination in tropical marine sediments: A comparative study of two digestion techniques. *Microchemical Journal*, 111, 53-61.
- Das, P. K., Das, B. P., and Dash, P. (2021). Chromite mining pollution, environmental impact, toxicity and phytoremediation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(2), 1369-1381.
- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., and Dashti, H. M. (2009). Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41(2), 117-122.
- De Almeida Martins, J., and Takahashi, J. (2025). Integration of natural soil amendments enhances microbial resilience and function in heavy-metal-contaminated soils. *Journal of Applied Soil Research*, 58, 112–124.
- Ertani, A., Mietto, A., Borin, M., and Nardi, S. (2017). Chromium in agricultural soils and crops: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(5), 190.
- Fang, L., Cai, P., Chen, W., Liang, W., Hong, Z., and Huang, Q. (2009). Impact of cell wall structure on the behavior of bacterial cells in the binding of copper and cadmium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 347(1-3), 50-55.
- Furtak, K., Grządziel, J., Gałazka, A., and Niedźwiecki, J. (2020). Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. *Catena*, 188, 104448.
- Hjelms, M. H., Hansen, L. H., Bælum, J., Feld, L., Holben, W. E., and Jacobsen, C. S. (2014). High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), 3568-3575.
- Hussain, Q., Pan, G. X., Liu, Y. Z., Zhang, A., Li, L. Q., Zhang, X. H., and Jin, Z. J. (2012). Microbial community dynamics and function associated with rhizosphere over periods of rice growth. *Plant Soil Environ*, 58(2), 55-61.
- Kalsoom, K., Din, S. U., Ceylan, E., Hasan, F., Khan, S., Badshah, M., and Shah, A. A. (2025). Cloning and expression of chromate reductase from *Bacillus paramycoides* S48 for chromium remediation. *Scientific Reports*, 15(1), 18796.
- Li, D., Zhang, X., Zhang, H., Fan, Q., Guo, B., and Li, J. (2025). A global meta-analysis reveals effects of heavy metals on soil microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 491, 138018.
- Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Birkeland, N. K., Cary, S. C., Marla Tuffin, I., and Cowan, D. A. (2013). Evidence for successional development in Antarctic hypolithic bacterial communities. *The ISME Journal*, 7(11), 2080-2090.
- Mounaouer, B., Nesrine, A., and Abdennaceur, H. (2014). Identification and characterization of heavy metal-resistant bacteria selected from different polluted sources. *Desalination and Water Treatment*, 52(37-39), 7037-7052.
- Naz, A., Chowdhury, A., Mishra, B. K., and Karthikeyan, K. (2018). Distribution of heavy metals and associated human health risk in mine, agricultural and roadside soils at the largest chromite mine of India. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(5), 2155-2175.
- Oulas, A., Pavloudi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., and Iliopoulos, L. (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics and biology insights*, 9, BBI-S12462.
- Page, A. L. (1982). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Soil Science Society of America.
- Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., Eerola, E., Pursiheimo, J. P., Laiho, A., Pekkala, S., and Huovinen, P. (2017). Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16S rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 28(1), 19.
- Salam, L. B., Obayori, O. S., Ilori, M. O., and Amund, O. O. (2023). Chromium contamination accentuates changes in the microbiome and heavy metal resistome of a tropical agricultural soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(9), 228.
- Seghers, D., Verthé, K., Reheul, D., Bulcke, R., Siciliano, S. D., Verstraete, W., and Top, E. M. (2003). Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(2), 139-146.
- Sharafi, S., and Salehi, F. (2025). Comprehensive assessment of heavy metal (HMs) contamination and associated health risks in agricultural soils and groundwater proximal to industrial sites. *Scientific Reports*, 15, 7518.
- Soni, R., and Goel, R. (2010). Triphasic approach for assessment of bacterial population in different soil systems. *Ekologija*, 56(3-4), 99-104.

- Suleiman, A. K. A., Pylro, V. S., and Roesch, L. F. W. (2017). Replacement of native vegetation alters the soil microbial structure in the Pampa biome. *Scientia Agricola*, 74(1), 77-84.
- Tuli, S. R., Ali, M. F., Jamal, T. B., Khan, M. A. S., Fatima, N., Ahmed, I., and Sharmin, S. A. (2024). Characterization and molecular insights of a chromium-reducing bacterium *Bacillus tropicus*. *Microorganisms*, 12(12), 2633.
- Viti, C., Mini, A., Ranalli, G., Lustrato, G., and Giovannetti, L. (2006). Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, 34(2-3), p. 125-139.
- Walkley, A., and Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29-38.
- Wang, J. X., Liu, S. S., Han, S. Y., and Wang, A. Y. (2022). High-throughput sequencing reveals soil bacterial community structure and their interactions with environmental factors of the grassland fairy ring. *Environmental Microbiology Reports*, 14(4), 479-493.
- Wang, Z., Deng, G., Hu, C., Hou, X., Zhang, X., Fan, Z., Zhao, Y., and Peng, M. (2025). Microbial diversity and community assembly in heavy metal-contaminated soils: insights from selenium-impacted mining areas. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1561678.
- Xing, Y., Zheng, Y., and Wang, X. (2025). Integrated strategies for effective remediation of chromium-contaminated soils: advancements, challenges, and sustainability implications. *Environmental Advances*, 100614.
- Yao, H., Bowman, D., and Shi, W. (2006). Soil microbial community structure and diversity in a turfgrass chronosequence: land-use change versus turfgrass management. *Applied Soil Ecology*, 34(2-3), 209-218.
- Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., and Xie, Y. (2021). Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766364.
- Zhang, Y., Peng, J., Wang, Z., Zhou, F., Yu, J., Chi, R., and Xiao, C. (2025). Metagenomic analysis revealed the bioremediation mechanism of lead and cadmium contamination by modified biochar synergized with *Bacillus cereus* PSB-2 in phosphate mining wasteland. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1529784.
- Zhao, X., Huang, J., Zhu, X., Chai, J., and Ji, X. (2020). Ecological effects of heavy metal pollution on soil microbial community structure and diversity on both sides of a river around a mining area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16), 5680.
- Zhu, S., Mao, H., Yang, X., Zhao, W., Sheng, L., Sun, S., and Du, X. (2025). Resilience mechanisms of rhizosphere microorganisms in lead-zinc tailings: Metagenomic insights into heavy metal resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 292, 117956.

Investigation of the composition and diversity of bacterial communities in soils surrounding chromite mines in the south of Kerman province

Parvin Amiranipour ¹, Ghobad Jalali ^{*2}, Javad Zamani ³



Research Article

1. M.Sc. in Soil Science, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

parvinamirany1395@gmail.com

2. Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

gh.jalali@ujiroft.ac.ir

* Corresponding author

3. Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

ja.zamani@yahoo.com

Article Code: 2504-1098

Countinus Pagination: 770-786

Received: 20 April 2025

Accepted: 23 July 2025

Online: 02 August 2025

Review speed: 95 days

Citation:

Amiranipour, p., Jalal, G., and Zamani, J. (2024). Investigation of the composition and diversity of bacterial communities in soils surrounding chromite mines in the south of Kerman province. *Management of Natural Ecosystems*, 4(2), 27-43.

Abstract

Soil contamination with heavy metals considered one of the most important environmental pollutants. Heavy metals present in the soil are not only absorbed by plants and transferred into the food chain, but may also threaten the health of living organisms and reduce soil biodiversity by into surface and groundwater sources. The present study was conducted to investigate the composition and diversity of bacterial communities in soils surrounding chromium mines in the south of Kerman province. Chromium-resistant bacteria were identified using PCR-based molecular methods and sequencing of 16S rDNA gene fragments. Also, using metagenome analysis with next generation sequencing, the composition of soil bacterial communities between two control and mining-impacted samples was investigated. According to the results, 15 strains of chromium-resistant bacteria were isolated from the studied areas. sequencing analysis results showed that these bacterial isolates mostly belonged to *Bacillus* genera. Also, metagenome analysis showed that the composition and diversity of soil bacterial communities were significantly different between the control and mining-impacted samples. It can be concluded that some bacterial species have adapted to high concentrations of heavy metals in contaminated soils. The majority of examined and chromium-resistant bacteria in this study were Gram-positive bacilli. This group of bacteria exhibits resistant to many antibacterial substances, heat, dryness, freezing, chemical toxins, heavy metals and other harmful environmental factors due to their spores. Since the next-generation sequencing method used in this research examines the genome of an environmental sample with more speed and accuracy by spending an acceptable cost compares to other PCR-based methods, and it is also easier to use and has less deviation, this method is suggested to compare the composition of soil bacterial communities between different treatments.

Key Words:

Heavy metal contamination, Chromium-resistant bacteria, 16S rDNA sequencing, Metagenomic next-generation sequencing.