

Using PCR-DGGE and Soil Respiration to Characterize Bacterial Changes in Heavy Metal Contaminated Soils

Mohammad Hossein Hemmat-Jou

PhD student, Department of soil science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, m.h.hemmatjou@gmail.com

Ali Akbar Safari Sanjani*

Professor, Department of soil science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, safari_sinegani@yahoo.com

Asghar Mirzaie-Asl

Assistant professor, Department of soil science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, mirzaei.asl@gmail.com

Arezo Tahmourespour

Associate professor, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Isfahan (Khorasgan) branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, a.tahmoures.p@gmail.com

Abstract

Introduction: Soil contamination to heavy metals such as lead and zinc in and around mines causes a change in structure, complexity, diversity and activity of soil microbial communities like bacteria.

Materials and methods: In the present research, PCR-DGGE approach was used to investigate the effects of Pb and Zn-contamination in Bama mine near Isfahan city on bacterial diversity, structure and complexity. Basal Respiration (BR) and Substrate Induced Respiration (SIR) was also used to assess microbial activities. Nine samples from three locations (3 for each) with different levels of heavy metal contamination were taken (from low to high), then their DNA were directly extracted. Also a 468 base pair of their 16S rRNA genes were amplified using specific primers, and their fingerprints were obtained by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). BR and SIR were measured, and metabolic quotient was calculated. Finally, soil microbial activity in polluted conditions was achieved.

Results: Our findings illustrate that heavy metal contamination has negative effects on bacterial diversity. By increasing the bioavailability of Pb and Zn, the complexity and diversity of bacterial communities decreased and the frequency of resistant bacteria increased. By increasing Pb and Cd contamination, SIR reduced and this shows the reduction in microbial biomass. In these conditions, SIR and metabolic quotient was more sensitive than BR, so they are better ecological indicators in polluted soils.

Discussion and conclusion: Although bacterial diversity showed reduction in polluted soils, diversity is still relatively high. Bacterial ability to adapt in heavy metal contamination, bacterial resistance and their important functional roles in such conditions are valuable in soil ecosystem suggesting further researches on them.

Key words: Diversity, PCR-DGGE, Basal Respiration, Substrate Induced Respiration, Metabolic Quotient, Lead, Zinc, Bama mine

* Corresponding author

Received: June 25, 2018 / **Accepted:** September 22, 2018

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۵۶ - ۴۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۳۱

بهره‌گیری از انگشت‌نگاری PCR-DGGE و تنفس خاک برای شناخت دگرگونی‌های باکتریایی در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین

محمدحسین همت‌جو: دانشجوی دکتری گروه آموزشی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، m.h.hemmatjou@gmail.com
علی‌اکبر صفری سنجان: * استاد گروه آموزشی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، safari_sinegani@yahoo.com
اصغر میرزایی اصل: استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، mirzaei.asl@gmail.com
آرزو ظه‌مورت‌پور: دانشیار گروه آموزشی علوم پایه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، ایران، a.tahmoures.p@gmail.com

چکیده

مقدمه: آلودگی خاک به فلزهای سنگین سرب و روی پیرامون کانسارهای این فلزها باعث دگرگونی ساختار، پیچیدگی، گوناگونی و کارکرد ریزجانداران خاک مانند باکتری‌ها می‌شود.

مواد و روش‌ها: برای بررسی پیامد آلودگی معدن سرب و روی باما در اصفهان بر گوناگونی ریزجانداران خاک‌های پیرامون خود از روش نشانگر مولکولی موسوم به انگشت‌نگاری PCR-DGGE بهره‌گیری شد. ۹ نمونه از خاک‌های معدن باما با میزان آلودگی‌های کم تا زیاد برداشت شدند و پس از استخراج DNA هر یک از خاک‌ها، ناحیه ۴۶۸ جفت بازی درون ژن *16S rRNA* با PCR تکثیر شد. سپس الکتروفورز DGGE انجام شد و اثر انگشت‌های باکتریایی روی ژل به دست آمدند و برای برآورد گوناگونی ریزجانداران بهره‌برداری شدند. همچنین با اندازه‌گیری تنفس پایه (BR) و برانگیخته (SIR) خاک و محاسبه بهره‌متابولیک، تغییرات کارکرد ریزجانداران خاک بررسی شد.

نتایج: پیچیدگی و گوناگونی باکتری‌های خاک با افزایش مقدار در دسترس فلزهای سنگین سرب و روی کاهش می‌یابد و ساختار و گوناگونی آنها دگرگون می‌شود. فراوانی نسبی باکتری‌های پایدارتر با افزایش آلودگی خاک به فلزهای یادشده افزایش می‌یابد. آلودگی خاک کارکرد باکتری‌ها را کاهش می‌دهد؛ به طوری که تنفس برانگیخته خاک کاهش می‌یابد. تنفس برانگیخته و بهره‌متابولیک پاسخ نمایان‌تری به آلودگی خاک می‌دهند و برای سنجش چگونگی خاک بهتر از تنفس پایه هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: اگرچه گوناگونی باکتریایی با افزایش آلودگی کاهش معناداری نشان می‌دهد در خاک‌های بسیار آلوده شاهد گوناگونی به نسبت زیادی هستیم و علت آن احتمالاً مدت زمان زیاد آلودگی خاک است؛ زیرا فرصت کافی برای باکتری‌ها وجود داشته است تا به این آلودگی سازگار شوند و باکتری‌های پایدار در خاک‌های آلوده تکثیر شوند. این توانایی سازگاری باکتری‌ها و کارکردهای مهم بوم‌شناختی که در تنش فلزهای سنگین ایفای نقش می‌کنند بسیار ارزشمند هستند و انجام پژوهش‌های بیشتر درباره آنها را پیشنهاد می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: گوناگونی، PCR-DGGE، تنفس پایه، تنفس برانگیخته، بهره‌متابولیک، سرب، روی، کانسار باما

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

روش‌های مولکولی شناخت گوناگونی ریزجانداران خاک را امکان‌پذیر کرده‌اند؛ کاری که زمانی حتی گمان آن نیز دشوار بود. بوم‌شناسی مولکولی خاک به‌منظور تعیین گوناگونی ریزجانداران با استخراج، جداسازی و شناسایی نوکلئیک‌اسیدها و دیگر بخش‌های یاخته مانند اسیدهای چرب فسفولیپیدی و پروتئین‌های ریزجانداران خاک انجام می‌شود. شمارش مستقیم میکروسکوپی باکتری‌های خاک تنها یک یا دو رده از رده‌های بی‌شمار باکتری‌هایی را آشکار می‌کند که با کشت دادن به دست می‌آیند. روش‌های مولکولی دسترسی به ۹۰ تا ۹۹ درصد جامعه زیستی شناسایی نشده خاک را ممکن می‌کنند (۱).

انگشت‌نگاری^۱ PCR یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین روش‌های مولکولی برای بررسی گوناگونی زیستی است. برتری این روش سرعت بیشتر انجام آن در مقایسه با روش‌های توالی‌یابی^۲ است؛ از این رو، امکان بررسی تعداد زیاد نمونه طی زمان کم وجود دارد. روش‌های الکتروفورز ژل شیب‌دار و اسرشته‌ساز (DGGE) یا گرمایی^۳ (TGGE) و تجزیه و تحلیل چندشکلی طول قطعه محدود شده انتهایی^۴ (T-RFLP) از پرکاربردترین روش‌های انگشت‌نگاری PCR برای شناسایی جامعه ریزجانداران خاک هستند. از روش‌های یادشده برای جداسازی فراورده‌های PCR استفاده می‌شود؛ زیرا فراورده‌های PCR به‌دست‌آمده در پژوهش‌های گوناگونی زیستی دارای طول یکسان هستند. در بیشتر پژوهش‌ها جایگاه‌های بسیار متغیر ژن *16S rRNA* بررسی می‌شوند زیرا تبارزایی (فیلوژنتیک) ریزجانداران را نشان می‌دهند (۱ و ۲). کاربرد درست انگشت‌نگاری PCR در پژوهش‌های جمعیت به تفسیر

درست باندها یا الگوی لکه‌های حاصل روی ژل‌های الکتروفورز بستگی زیاد دارد. بیشتر تصویرهای ژل‌ها دیجیتال (شماره‌ای) هستند و از نرم‌افزار شناسایی کننده باندها روی ژل برای نشانه‌گذاری جایگاه هر باند بهره‌گیری می‌شود و الگوی حاصل با نرم‌افزار آماری بررسی می‌شود؛ نرم‌افزارهای گوناگونی مانند Canoco، GelCompar، BioNumerics و PHYLIP (در GenBank و RDPII) برای این کار در دسترس هستند که بیش از دیگر نرم‌افزارها کاربرد دارند (۳).

در روش‌های انگشت‌نگاری PCR از ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده می‌شود که برای جداسازی پروتئین‌ها، DNA تک‌رشته‌ای با اندازه حداکثر ۲ کیلوباز و DNA دو رشته‌ای با اندازه کمتر از ۱ کیلوباز بهره‌برداری می‌شود. ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید جداسازی درشت‌مولکول‌ها را بر پایه اندازه، شکل، بار الکتریکی و فراوانی G+C (بازهای آلی سیتوزین و گوانین) در ژن‌های تکثیرشده انجام می‌دهند. این روش جنبش مستقل از شکل DNA روی ژل پلی‌اکریل‌آمید پایه بسیاری از روش‌هایی است که از برهم‌کنش‌های درون‌رشته‌ای و میان‌رشته‌ای نوکلئوتیدها استفاده می‌کنند و در غربال‌گری سریع DNA تکثیرشده برای شناسایی ناهمانندی‌های بسیار کوچک در توالی نوکلئوتیدها به کار می‌روند (۱).

شناسه‌های اندازه‌گیری کارکرد مانند تنفس ریزجانداران که به دو روش تنفس پایه (BS)^۵ و برانگیخته (SIR)^۶ اندازه‌گیری می‌شود در بررسی پیامدهای آلودگی خاک بسیار سودمند هستند. تنفس خاک یکی از شناسه‌های کیفیت خاک است که بسیار سریع به دگرگونی‌های رخ داده در خاک واکنش نشان می‌دهد و از مهم‌ترین ویژگی‌های زیستی خاک به شمار

می‌رود (۴). تنفس خاک مواد خوراکی و انرژی را برای ریزجانداران و گیاهان فراهم می‌کند و سرآغاز کانی‌شدن کربن است. تنفس پایه فراوانی و زنده‌بودن جانداران و ریزجانداران هوازی، فراوانی مواد آلی ساده فروزینه‌شونده و بهداشت خاک، کارکرد و سرعت سوخت‌وساز مواد آلی در خاک را نشان می‌دهد. تنفس برانگیخته با افزودن مواد آلی ساده مانند گلوکز به خاک و گرماگذاری آن در شرایط بهینه طی زمان کوتاه (۱ تا ۳ ساعت) به دست می‌آید و فراوانی و زیست‌دهی ریزجانداران خاک (SMB) را نشان می‌دهد (۵). تنفس برانگیخته در پژوهش‌های آلودگی برای ارزیابی مدیریت خاک و دگرگونی زودگذر فراوانی و کارکرد ریزجانداران سودمند است (۵).

فلزهای سنگین در خاک به شکل محلول، تبادل، کمپلکس با مواد آلی، ترکیب با آنیون‌هایی مانند کربنات‌ها، فسفات‌ها و سولفیدها، ترکیب با اکسیدهای آهن، آلومینیوم و منگنز و در ساختمان کانی‌ها وجود دارند و تنها بخش کمی از آنها جذب می‌شود (۶). خاستگاه فلزهای سنگین طبیعی یا انسانی است. آلودگی خاک با فلزهای سنگین دارای خاستگاه انسانی باعث آلودگی پایدار و همیشگی خاک می‌شود ولی آلودگی خاک با فلزهای سنگین دارای خاستگاه طبیعی معمولاً پدیده‌ای فصلی و گذرا و وابسته به آب‌وهوا است که آلودگی پایدار در پی ندارد (۷). در معدن‌کاری به‌ازای بیرون کشیدن هر گرم فلز، مقدار بسیار زیادی مواد زائد سنگی حاوی فلزهای سنگین پدید می‌آید. این فلزها با فرایندهای آبشویی شیمیایی و زیستی جنبش‌پذیر می‌شوند و از زمین، خاک و آب‌ها می‌گذرند و در پایان به زنجیره غذایی می‌رسند (۸). سرب و روی از جمله مهم‌ترین فلزهای سنگین هستند که آلودگی زیادی ایجاد می‌کنند. اگرچه روی از عناصر غذایی کم مصرف برای

جانداران است که در ساختمان آنزیم‌های مهم وجود دارد هیچ کارکرد زیستی برای سرب یافت نشده است. هم‌زمانی جذب سرب و کادمیوم سمیت سرب را افزایش می‌دهد (۹). روی و کادمیوم به‌شکل تبادلی درمی‌آیند و بنابراین قابلیت جذب زیادی دارند اما سرب در خاک ته‌نشین می‌شود و جذب کمتری دارد. میانگین سرب کل در خاک ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم است و در خاک‌های آلوده تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هم می‌رسد. میانگین روی کل در خاک ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است و بیشتر از این مقدار نشانه آلودگی خاک به روی است (۶).

در پژوهش حاضر پیامدهای آلودگی کانسار سرب و روی باما بر خاک‌های پیرامون آن بررسی شد و برای نخستین‌بار در کشور، پیامدهای این آلودگی با به‌کارگیری روش انگشت‌نگاری PCR-DGGE برای ارزیابی گوناگونی ریزجانداران خاکزی بررسی شدند. تنفس پایه، تنفس برانگیخته و بهره متابولیک برای ارزیابی دگرگونی کارکردهای ریزجانداران اندازه‌گیری و محاسبه شدند. اهداف پژوهش حاضر عبارتند از:

۱- با به‌کارگیری روش PCR-DGGE دستیابی به باکتری‌های کشت‌پذیر و کشت‌ناپذیر و بررسی آنها انجام و شناخت بهتری از گوناگونی باکتری‌ها در سطوح متفاوت آلودگی خاک‌ها حاصل شود؛

۲- پیامدهای آلودگی بلندمدت (۵۰ سال) خاک به مقادیر کم تا زیاد سرب و روی بر ساختار، گوناگونی، پیچیدگی و کارکرد ریزجانداران خاک با به‌کارگیری روش‌های یادشده بررسی شود؛

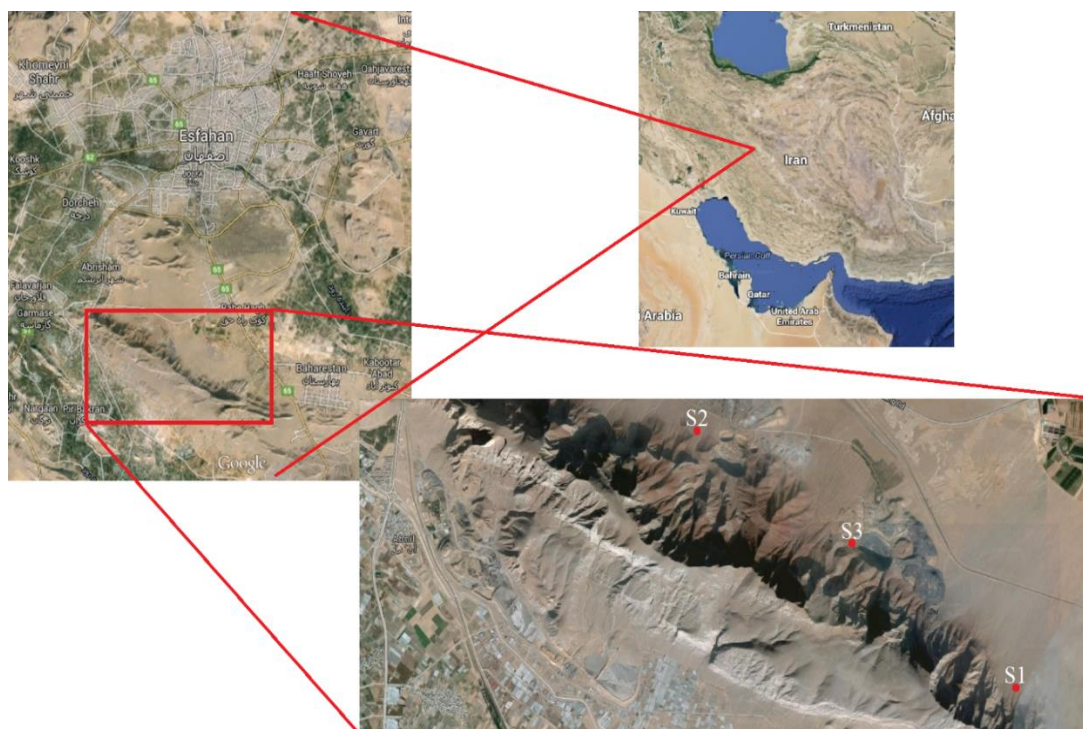
۳- باکتری‌های پایدار و سازگار شده در سطوح متفاوت آلودگی خاک‌ها شناسایی شوند؛

۴- توانایی روش‌های یادشده در چنین شرایطی سنجیده شود.

مواد و روش‌ها

جایگاه نمونه برداری از خاک: کانسار سرب و روی
 باما سومین کانسار سرب و روی بزرگ کشور در نزدیکی شهر اصفهان (منطقه ایران کوه) است که بیش از ۵۰ سال از بهره‌برداری آن می‌گذرد. روش‌های برداشت خاکساره این کانسار روش تونلی با کارگاه‌های استخراج و روش روباز است که باعث به‌جاماندن کانی‌های بسیار در کارگاه‌های استخراج می‌شوند. کانی‌های کربنات‌روی، کربنات‌سرب، همی‌مورفیت، هیدروزونیت و سنگ سرب یا گالن (PbS) بیشتر در بخش‌های رویین کانسار باما وجود دارند. زباله‌های حاصل از جداسازی کانی‌ها طی ۵۰ سال گذشته در جایگاه‌های ویژه‌ای انباشته شده‌اند و گیاهان روئیده پیرامون آنها با توجه به فراوانی زیاد سرب و روی در این جایگاه‌ها به این فلزها پایداری نشان

می‌دهند (۱۰) و شاید ریزجانداران این خاک‌ها نیز با چنین دشواری‌هایی سازگار شده باشند؛ موضوعی که در پژوهش حاضر بررسی خواهد شد.
 سه جایگاه نمونه برداری با آلودگی کم (بیرون از جایگاه معدن کاری)، با آلودگی متوسط (نزدیک به کانسار تپه سرخ) و با آلودگی زیاد (نزدیک به کانسار گوشفیل) با توجه به پژوهش‌های پیشین پارسادوست و همکاران (۱۰) برای نمونه برداری گزینش شدند و از خاک روئین (صفر تا ۱۰ سانتی متری) آنها در سه تکرار نمونه برداری شد (شکل ۱). ۹ نمونه خاک بی‌درنگ روی یخ گذاشته و به آزمایشگاه رسانده شدند و برای بررسی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی و همچنین جداسازی و بیرون کشیدن DNA خاک در یخچال نگهداری شدند.



شکل ۱- کانسار باما در بخش جنوبی شهر اصفهان و جایگاه‌های نمونه برداری؛ جایگاه‌های S1، S2 و S3 به ترتیب دارای آلودگی بسیار کم، متوسط و زیاد به فلزهای سنگین هستند. جایگاه‌های یادشده بر اساس پژوهش پارسادوست و همکاران (۱۰) انتخاب شده‌اند.

کارهای آزمایشگاهی: نمونه‌های خاکی که برای

اندازه‌گیری ویژگی‌های گوناگون خاک برداشت شده بودند هواخشک شدند و از الک ۲ میلی‌متری گذارنده شدند. سپس بافت خاک به روش هیدرومتری (۱۱)، اسیدیته خاک (۱۲)، هدایت الکتریکی خاک (۱۳)، کربن آلی خاک (۱۴)، نیتروژن خاک (۱۵)، فسفر قابل جذب خاک (۱۲)، پتاسیم تبادل‌پذیر خاک (۱۶)، غلظت کل (۱۷) و غلظت قابل جذب فلزهای سنگین با DTPA (۱۸) اندازه‌گیری شد. تعداد باکتری‌های کشت‌پذیر خاک در محیط کشت NA (نوترینت آگار) به روش شمارش کلنی به دست آمد (۵).

برای اندازه‌گیری تنفس پایه، ۱۰۰ گرم از هر نمونه خاک با رطوبت مناسب (۵۵ درصد گنجایش زراعی) در ظرف‌های مخصوص (سیلندرهای دو لیتری) ریخته و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. CO₂ پدیدآمده از تنفس ریزجانداران در محلول NaOH ۰/۱ نرمال که از پیش در لوله آزمایش‌های کوچک ریخته شده و درون سیلندرهای دارای خاک قرار داده شده بود گردآوری و باقیمانده سود سوزآور به وسیله تیتراسیون با HCl ۰/۱ نرمال اندازه‌گیری شد؛ در نهایت، مقدار تنفس با یکای میلی‌گرم دی‌اکسید کربن پدیدآمده در هر گرم خاک خشک در روز گزارش شد (۵). برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته نیز پیش‌ماده گلوکز به خاک افزوده و سپس CO₂ پدیدآمده اندازه‌گیری شد (۵).

برای ارزیابی گوناگونی، پیچیدگی و ساختار جامعه باکتریایی خاک از روش PCR-DGGE بهره‌گیری شد. نخست DNA خاک با بهره‌گیری از

کیت توانمند استخراج DNA از خاک^۸ (ساخت شرکت MO BIO) بر پایه دستور کار سازنده جداسازی شد. پس از بیرون کشیدن DNA هر نمونه خاک، کیفیت و کمیت آن با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد وزنی/حجمی و با دستگاه اسپکتروفوتومتر NonoDrop-1000 بررسی شد. با توجه به اینکه نسبت OD₂₆₀^۹ (چگالی نوری در طول موج ۲۶۰) به OD₂₈₀ (چگالی نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر) کمتر از ۱/۷ نشان از آلودگی DNA به پروتئین و نسبت OD₂₆₀ به OD₂₃₀ (چگالی نوری در طول موج ۲۳۰ نانومتر) کمتر از ۲ نشان از آلودگی DNA به اسیدهای هیومیک خاک است (۳) DNA حاصل در بازه غلظت پاک قرار داشت. پس از به دست آوردن DNA خاک، ناحیه ۴۶۸ جفت‌بازی ژن *16S rRNA* باکتریایی با به کارگیری آغازگر پیش‌برنده ۳۳۸ (F338) و برگشتی ۸۰۵ (R805) که تکثیرکننده ناحیه یادشده هستند و انجام PCR تکثیر شد. (۱۹). بسیار مهم است که یک توالی پر از بازهای سیتوزین و گوانین به پایانه ۵' آغازگر پیش‌برنده افزوده شود که به آن گیره^{۱۰} گفته می‌شود. پیوند هیدروژنی میان این بازها نیرومندتر از آدنین و تیمین است و توالی پر از گوانین و سیتوزین دمای ذوب زیادی دارد؛ در نتیجه، طی آزمایش ذوب نمی‌شود و مانند گیره یا انبرک توالی‌های *16S rRNA* ناهمانند را از هم جدا می‌کند (۲۰). یادآوری می‌شود ناهمانندی میان گونه‌ها در روش PCR-DGGE مهم است و این ناهمانندی گاهی به اندازه‌ای اندک است که هیچ‌گونه گوناگونی بدون گیره GC به دست نمی‌آید (۲۱). توالی‌های به کاررفته در زیر آورده شده‌اند (۱۹):

5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'

5'-ACT CCT ACG GGA GGC AG-3'

5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'

توالی GC (GC-clamps):

توالی آغازگر پیش‌برنده (F338):

توالی آغازگر برگشتی (R805):

۱۰ و ۱۵ درصد) با نسبت ۳۷/۵ اکریل آمید به ۱ بیس اکریل آمید با شیب چگالی ۳۵ تا ۷۰ درصد و اسرشته‌ساز از محلول ۱۰۰ درصد آن (با اوره ۷ مولار و فرم آمید ۴۰ درصد وزنی/حجمی) آماده شد. شیب غلظت بر اساس دستورکار مویزر و همکاران (۲۰) با به کارگیری نسبت‌های مختلف اوره و فرم آمید تهیه شد. افزون بر فرآورده PCR از نشانگر اندازه DNA یا همان نردبان یا خط کش (ساخت شرکت Qiagen) نیز روی ژل بارگیری شد تا سنجشی برای اندازه هریک از باندهای به دست آمده روی ژل باشد. برای اجرای الکتروفورز از بافر TAE بهره‌گیری شد که با EDTA و تریس - استات ساخته می‌شود. الکتروفورز به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با ولتاژ الکتریکی ۷۰ ولت انجام شد. پس از آن، ژل‌ها با به کارگیری نیترات نقره رنگ آمیزی شدند و در دستگاه SyngeneGBox Gel Documentation System ساخت شرکت Syngene با نور فرابنفش دیده شدند و تصویرهای^{۱۲} دیجیتالی آنها به دست آمد. سپس، تصویرها با نرم‌افزار Quantity-One Software 4.6.9 ساخت شرکت Bio-Rad آمریکا تجزیه و تحلیل شدند. این کارها دربرگیرنده ساخت ماتریس بود/نبودباند، حذف خطای پس‌زمینه از چاهک‌های الکتروفورز، شناسایی هر باند به‌طور جداگانه و تطبیق هریک از باندها با همان موقعیت در نیم‌رخ‌های ناهمانند بودند. سپس از رابطه زیر شناسه گوناگونی شانون - وینر برای باکترهای خاک به دست آمد (۲۲):

$$H' = -\sum (n_i/N) \ln(n_i/N)$$

در این رابطه، n_i ارتفاع پیک باند i ، i شمار هر باند در نیم‌رخ‌های DGGE و N جمع ارتفاع پیک‌های همه باندهاست و این شناسه گوناگونی آلفا را بیان می‌کند.

برای تکثیر بخش ناحیه ۴۶۸ جفت بازی ژن *I6S* *rRNA* باکتریایی با آغازگرهای یادشده از واکنشگرهای زیر بهره‌گیری شد: ۱ میکرولیتر DNA الگو یا DNA جداشده از خاک، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌برنده، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR، ۱۲ میکرولیتر آب PCR سترون و بدون DNA (از آب مقطر پزشکی بهره‌گیری شد) (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر). گام‌های انجام PCR که با دستگاه Applied Biosystems 96 well Thermal Cycler انجام شدند عبارتند از:

- واسرشته‌سازی نخستین: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه؛
- واسرشته‌سازی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه؛
- پیوند آغازگرها: ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه؛
- گسترش: ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه.

این سه گام اصلی PCR در ۳۵ چرخه تنظیم شدند و در نهایت، گسترش پایانی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

آمپلیکون‌های به دست آمده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد وزنی/حجمی و سپس بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفتومتر NonoDrop-1000 بررسی و کیفیت و کمیت سنجی شدند.

برای انجام الکتروفورز روی ژل شیب‌دار واسرشته‌ساز (DGGE) از دستگاه Bio-Rad; DCode™ Universal Mutation Detection System طراحی شده برای این کار بهره‌گیری و از دستورکار پیشنهادی مویزر^{۱۱} و همکاران (۲۰) پیروی شد. نخست ۲۰۰ نانوگرم از آمپلیکون PCR در ژل پلی‌اکریل آمید بارگیری شد. ژل پلی‌اکریل آمید (۵،

خاک بنیاد پژوهش‌های خاک و آب کشور، آلودگی خاک‌ها به سرب و روی زیاد و به کادمیوم متوسط است و خاک‌ها به نیکل آلودگی ندارند. جدول‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهند با افزایش آلودگی خاک از S1 تا S3 فراوانی باکتری‌ها به طور معناداری کاهش می‌یابد؛ این کاهش فراوانی باکتریایی وابسته به افزایش آلودگی فلزهای سنگین در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است (۲۳-۲۵).

همبستگی پیرسون میان غلظت کل و قابل جذب فلزهای سنگین مثبت و معنادار است. ضریب همبستگی (R^2) برای سرب، روی، کادمیوم و نیکل به ترتیب برابر ۰/۷۴، ۰/۷۷، ۰/۷۹ و ۰/۶۶ است. هرچند همبستگی مثبت و معناداری میان مقادیر کل و قابل جذب سرب و کادمیوم وجود دارد مقدار کل فلزهای سنگین تنها آگاهی اندکی از مقدار قابل جذب آنها ارائه می‌دهد (۲۶). بیشتر بخش‌های محلول در آب و تبادلی فلزهای سنگین برای جانداران قابل جذب هستند و تأثیر معناداری بر آنها دارند (۲۷) و دیگر بخش‌های آنها کم‌جنبش هستند و قابلیت جذب چندانی ندارند. همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد مقدار قابل جذب فلزهای سنگین اندازه‌گیری شده بسیار کمتر از مقدار کل این فلزها است.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: ناهمانندی ویژگی‌های بررسی‌شده در میان تیمارها در پایه ۹۵ درصد ($P < 0.05$) با بهره‌گیری از تجزیه واریانس یک‌سویه^{۱۳} و به کارگیری نرم‌افزار SPSS 19 بررسی و آزمون شد. از همبستگی پیرسون برای نشان دادن روابط میان تیمارها بهره‌گیری شد؛ روابط به این ترتیب هستند: میزان کل با میزان قابل جذب سرب و روی، میزان کل و میزان قابل جذب سرب و روی با تنفس پایه، تنفس برانگیخته، باندهای DGGE و شناسه گوناگونی شانون.

نتایج

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های خاک: جدول‌های ۱ و ۲ ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک‌های بررسی‌شده را نشان می‌دهند. بسیاری از ویژگی‌ها همانند هستند و تنها محدودیتی که بر رشد، کارکرد و گوناگونی ریزجانداران تأثیرگذار است غلظت فلزهای سنگین به‌ویژه بخش قابل جذب آن‌هاست. همان‌طور که آشکار است ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های نمونه‌برداری شده از سه جایگاه نمونه‌برداری همانند هستند و تنها در آلودگی به فلزهای سنگین تفاوت معنادار دارند. در کل، بر اساس استانداردهای آلودگی

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌های کانسار باما

زیستی	شیمیایی						فیزیکی	جایگاه نمونه‌برداری
	فسفر (mg kg ⁻¹)	پتاسیم (mg kg ⁻¹)	نیترژن کل (درصد)	کربن آلی (درصد)	اسیدیته	هدایت الکتریکی (dS m ⁻¹)		
شمار باکتری‌ها (شمارش پرگنه)	۱۹/۳ ^a	۲۹۱ ^a	۰/۰۵ ^a	۰/۱۲ ^a	۷/۵ ^a	۰/۵ ^a	لومی	S1
	۲۰/۱ ^a	۲۷۹ ^a	۰/۰۵ ^a	۰/۱۴ ^a	۷/۵ ^a	۰/۵ ^a	لومی	S2
	۱۹/۵ ^a	۲۸۴ ^a	۰/۰۶ ^a	۰/۱۵ ^a	۷/۷ ^a	۰/۵ ^a	لومی	S3

حرف‌های a، b و c نشان‌دهنده ناهمانندی‌های معنادار آماری در پایه ۱ درصد ($P < 0.01$) هستند.

جدول ۲- مقادیرهای کل و قابل جذب فلزهای سنگین در خاک‌های کانسار باما

غلظت قابل جذب (mg kg ⁻¹)				غلظت کل (mg kg ⁻¹)				جایگاه نمونه برداری
Cd	Ni	Zn	Pb	Cd	Ni	Zn	Pb	
۰/۶۴ ^a	۵/۲۴ ^a	۷/۳۳ ^c	۱۹/۲ ^c	۴/۰۶ ^a	۶۶ ^a	۶۹ ^c	۱۶۴ ^c	S1
۰/۵۹ ^a	۵/۱۱ ^a	۱۸/۱۲ ^b	۲۵/۷ ^b	۳/۷۹ ^a	۶۸ ^a	۱۶۱ ^b	۲۰۵ ^b	S2
۰/۶۱ ^a	۵/۰۶ ^a	۳۱/۲۶ ^a	۳۲/۶ ^a	۳/۹۱ ^a	۶۵ ^a	۲۸۷ ^a	۲۹۷ ^a	S3

جایگاه S1: دارای آلودگی بسیار کم به فلزهای سنگین

جایگاه S2: دارای آلودگی متوسط به فلزهای سنگین

جایگاه S3: دارای آلودگی زیاد به فلزهای سنگین

در کل، خاک‌ها آلودگی زیاد به سرب و روی و آلودگی متوسط به کادمیوم دارند و به نیکل آلودگی ندارند.

حرف‌های a, b و c نشان‌دهنده ناهمبندی‌های معنادار آماری در پایه ۱ درصد ($P < 0.01$) هستند.

تنها به توده زنده و فراوانی ریزجانداران در خاک بستگی دارد. نسبت تنفس پایه به تنفس برانگیخته یا زیتوده خاک نشان‌دهنده بهره متابولیک^{۱۴} است و میزان تنش در خاک را نشان می‌دهد. هرچه بهره متابولیک خاک بیشتر باشد بخش بیشتری از کربن آلی مصرف شده توسط ریزجانداران برای تولید انرژی و زنده ماندن آنها به کار رفته است (۵). جدول ۳ بهره متابولیک کربن آلی را در خاک‌های بررسی شده نشان می‌دهد.

در بررسی فراوانی باکتری‌ها نیز همبستگی زیاد، منفی و معناداری میان فراوانی باکتری‌ها و غلظت سرب ($R^2 = -0.74$) و روی ($R^2 = -0.81$) به دست آمد که نشان می‌دهد با افزایش قابلیت جذب فلزهای سنگین در خاک‌ها کاهش معناداری در فراوانی ریزجانداران به ویژه باکتری‌ها رخ می‌دهد؛ این یافته با گزارش‌های دیگران همخوانی دارد (۳۱ و ۳۲). پیامد ناگوار سرب بر فراوانی باکتری‌های خاک بیشتر از روی است و آنها پاسخ نمایان تری به افزایش سرب نشان می‌دهند زیرا همان‌طور که گفته شد سرب هیچ‌گونه کارکرد زیستی ندارد (۹).

نتایج تنفس ریزجانداران: جدول ۳ نشان‌دهنده تنفس پایه و برانگیخته خاک است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تنفس پایه با افزایش آلودگی خاک از S1 تا S3 افزایش می‌یابد؛ این افزایش میان خاک‌های S2 و S3 معنادار نیست ولی میان خاک‌های S1 و S2 معنادار است و علت آن اینست که با افزایش آلودگی به ریزجانداران تنش وارد می‌شود و آنها برای زنده ماندن تنفس بیشتری انجام می‌دهند. پژوهشگران (۲۸ و ۲۹) گزارش کرده‌اند تنفس خاک با افزایش بسیار زیاد غلظت فلزهای سنگین به شکل معناداری کاهش می‌یابد ولی غلظت‌های اندک و کمی بیشتر از معمول پیامدی بر تنفس پایه خاک ندارند. یافته‌ها در مورد تنفس برانگیخته و تنفس پایه یکسان نیستند؛ به شکلی که تنفس برانگیخته با افزایش آلودگی خاک از S1 تا S3 کاهش می‌یابد و این کاهش میان سه جایگاه معنادار است. پژوهشگران گزارش کرده‌اند اگرچه تنفس پایه شناسه بسیار خوبی از کیفیت خاک است تنفس برانگیخته شناسه بهتری نسبت به تنفس پایه در شرایط آلودگی خاک به فلزهای سنگین است (۲۹-۳۱). تنفس پایه به اندوخته ماده آلی و توده زنده یا فراوانی ریزجانداران وابسته است اما تنفس برانگیخته

جدول ۳- نتایج تنفس پایه، تنفس برانگیخته و بهره‌متابولیک خاک‌های کانسار باما

بهره‌متابولیک	تنفس برانگیخته (mg CO ₂ g ⁻¹ dry soil d ⁻¹)	تنفس پایه (mg CO ₂ g ⁻¹ dry soil d ⁻¹)	جایگاه نمونه برداری
۰/۲۴۶ ^c	۱/۹۲ ^a	۰/۰۱۹ ^b	S1
۰/۶۰۱ ^b	۱/۶۱ ^b	۰/۰۳۹ ^a	S2
۰/۹۰۳ ^a	۱/۱۸ ^b	۰/۰۴۳ ^a	S3

حرف‌های a, b و c نشان‌دهنده ناهمبستگی‌های معنادار آماری در پایه ۱ درصد ($P < 0.01$) هستند.

بهره‌گیری شدند. شمار باندهای به دست آمده در هریک از نیم‌رخ‌های DGGE بازتابی از گوناگونی باکتریایی خاک هاست و هریک از باندها نشان‌دهنده یک گونه است (۳۳). شکل ۲ اثر انگشت‌های به دست آمده از بررسی گوناگونی باکتریایی را نشان می‌دهد که بازتابی از آلودگی خاک‌ها هستند. چند باند در همه نمونه‌ها و تکرارهای آنها یکسان و همانند هستند و به احتمال بسیار زیاد نشان‌دهنده باکتری‌های سازگار و پایدار نسبت به آلودگی فلزهای سنگین سرب و روی در خاک‌ها هستند که در تیمارهای غیرآلوده و آلوده یافت می‌شوند. تصویرهای DGGE نشان می‌دهند باندهای ناهمبند در هریک از نیم‌رخ‌ها وجود دارند و دگرگونی گوناگونی باکتریایی هریک از خاک‌ها را نشان می‌دهند. پیچیدگی و گوناگونی نیم‌رخ‌های خاک از S1 تا S3 در اثر افزایش آلودگی سرب و روی کاهش می‌یابد. خاک جایگاه بدون آلودگی (S1) با ۳۸ باند (یا غنای گونه‌ای ۳۸) بیشترین گوناگونی را دارد و میانگین شناسه‌شانون برای سه تکرار آن ۴/۸۳ است (جدول ۴). پس از آن، گوناگونی باکتری‌های خاک کاهش می‌یابد؛ به شکلی که خاک دارای آلودگی متوسط (S2) دارای ۳۳ باند (غنای گونه‌ای ۳۳) و میانگین شناسه‌گوناگونی شانون برای سه تکرار آن ۴/۲۷ است. ناهمبندی میان این دو خاک در پایه ۱ درصد معنادار است. در خاک جایگاه دارای بیشترین آلودگی (S3) نیز غنای گونه‌ای

همبستگی میان تنفس پایه و غلظت قابل جذب سرب و روی معنادار نیست ولی همبستگی میان تنفس برانگیخته و غلظت قابل جذب سرب و روی، زیاد، منفی و به ترتیب منفی ۰/۷۱ و منفی ۰/۵۵ است که نشان‌دهنده تأثیرپذیری بیشتر و پاسخ‌دهندگی زیاد تنفس برانگیخته خاک به آلودگی آن است.

همان‌طور که بهره‌متابولیک نشان می‌دهد این شناسه با افزایش آلودگی خاک افزایش می‌یابد و نشان‌دهنده تنش بیشتر است؛ در نتیجه، کربن ریزجاندارانی بیشتری با افزایش آلودگی خاک به شکل CO₂ درمی‌آید. همبستگی میان بهره‌متابولیک و غلظت قابل جذب سرب و روی در خاک نشان‌دهنده تنش فلزها بر ریزجانداران در خاک‌های آلوده است. ضریب همبستگی برای سرب و روی به ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۷۸ است. شناسه بهره‌متابولیک نیز برای هر سه نمونه خاک از S1 تا S3 افزایش معناداری نشان می‌دهد که پیامدی از تنش بیشتر وارد شده به ریزجانداران است.

بررسی گوناگونی ژن‌های باکتریایی: ناحیه ۴۶۸

جفت بازی ژن‌های *16S rRNA* باکتری‌های نمونه‌های خاک با به کارگیری آغازگر پیش‌برنده GC-F338 و برگشتی R805 و انجام PCR تکثیر شد. سپس نواحی تکثیر شده با انجام الکتروفورز DGGE از یکدیگر جدا شدند و اثر انگشت‌های به دست آمده از الگوی بانندی روی ژل برای به دست آوردن گوناگونی باکتریایی

بیشتری نسبت به S2 و S2 گوناگونی و پیچیدگی بانندی بیشتری نسبت به S3 دارد زیرا باندهای شفاف و ضعیف‌تر بیشتر در S3، سپس در S2 و پس از آن، در S1 دیده می‌شوند. بر پایه یافته‌های والیس^{۱۸} و همکاران (۳۶) نیز گوناگونی و پیچیدگی ژنتیکی باکتری‌ها با افزایش شمار باندها در پس‌زمینه نیم‌رخ‌های DGGE بیشتر می‌شود و چنین چیزی به ترتیب در نیم‌رخ‌های S1، S2 و S3 دیده می‌شود و نشانه دیگری از کاهش گوناگونی باکتری‌ها با افزایش غلظت سرب و روی است. الگوی دیگری که نشان‌دهنده یافته یادشده است بر پایه گزارش دینگ^{۱۹} و همکاران (۳۷) است «پیدایش چندین باند شفاف همراه با باندهای تیره‌تر و غالب‌تر که بسیار نزدیک به یکدیگر هستند نشان از گوناگونی بیشتر است.» از سوی دیگر، نیم‌رخ S3 دارای باندهایی است که مقدار بازهای آلی گوانین و سیتوزین (G+C) آنها بیشتر از نیم‌رخ S2 است و این نوع باندها در خاک جایگاه S2 نیز بیشتر از خاک جایگاه S1 دیده می‌شوند. باندهای دارای نوکلئوتیدهای گوانین و سیتوزین در برابر اوره و فرم‌آلدهید پایدارتر هستند و جنبش کمتری دارند. یکی از مهم‌ترین تفاوت‌های S3 با S1 و S2 وجود یک باند با جنبش کم (G+C زیاد) در نیم‌رخ S3 است که نشان‌دهنده وجود باکتری‌های ویژه‌ای در این خاک است که با آلودگی زیاد سرب و روی آن سازگار شده‌اند و فراوانی زیادی دارند (شکل ۲). پیدایش دیگر باندهای جدید با جنبش کمتر (گوانین و سیتوزین بیشتر) و روشن یا ضعیف‌تر در این خاک آلوده‌تر بازتابی از شمار کمتر باکتری‌های سازگار شده با آلودگی خاک است (۳۸) که بیشتر در نیم‌رخ S3 و اندکی در نیم‌رخ S2 دیده می‌شوند. باکتری‌های دارای فراوانی کمتر با باندهای ضعیف‌تر و شفاف‌تر یا روشن‌تر نشان داده می‌شوند که ناهمانندی‌های هر یک

کاهش می‌یابد و به ۲۷ می‌رسد زیرا تنها ۲۷ باند در نیم‌رخ آن دیده می‌شود و میانگین گوناگونی شانون برای سه تکرار آن ۳/۷۱ است که این کاهش از دیدگاه آماری معنادار است (جدول ۴)؛ بنابراین، آلوده‌ترین خاک (S3) کمترین شمار باند، ساده‌ترین الگوی DGGE و کمترین مقدار شناسه گوناگونی شانون را دارد.

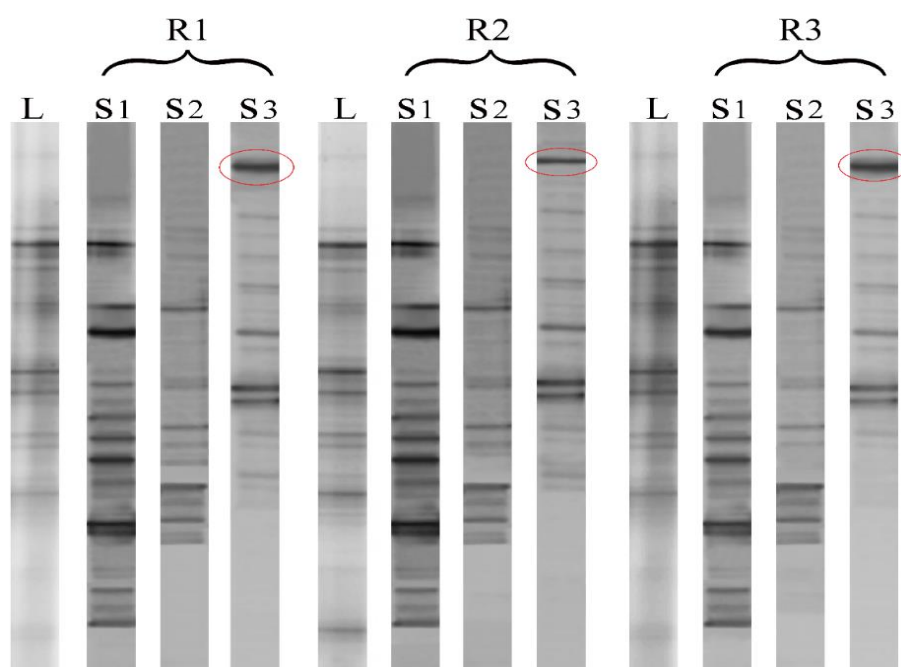
بررسی شناسه یکنواختی گونه‌ای پیلو^{۱۵} نشان می‌دهد یکنواختی گونه‌ای باکتری‌ها با افزایش آلودگی از S1 تا S3 کاهش می‌یابد و این کاهش میان S1 و S2 معنادار نیست ولی میان S2 و S3 معنادار است؛ پس یکنواختی گونه‌ای باکتری‌ها که تا اندازه‌ای در خاک غیرآلوده وجود دارد با افزایش آلودگی کاهش می‌یابد. برخی گونه‌های باکتریایی با افزایش آلودگی چیره می‌شوند و این چیرگی و غیریکنواختی گونه‌ای به‌ویژه در خاک‌های جایگاه S3 دیده می‌شود. باکتری‌های چیره‌شده همان باکتری‌های پایدارتر نسبت به آلودگی زیاد سرب و روی هستند و بنابراین آلودگی خاک به سرب و روی پیامد بسیار آشکاری بر گوناگونی باکتریایی خاک بررسی شده دارد و در نیم‌رخ‌های DGGE بازتاب می‌یابد. یافته‌های پژوهش‌های لی^{۱۶} و همکاران (۳۴) و هو^{۱۷} و همکاران (۳۵) نیز همانند هستند. بررسی‌های آنها نشان می‌دهند با افزایش آلودگی خاک به سرب و روی باندهای ویژه‌ای به دست می‌آیند و چیرگی برخی گونه‌های باکتریایی غیریکنواختی را افزایش می‌دهد که همگی نشان از وجود باکتری‌های پایدارتر دارند.

شمار باندها با افزایش آلودگی به فلزهای سنگین در خاک کم می‌شود و فراوانی برخی باندهای ضعیف و شفاف افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده کاهش گوناگونی باکتریایی است. S1 گوناگونی و پیچیدگی بانندی

خاک‌ها دارد. همبستگی میان شناسه گوناگونی شانون با تنفس پایه معنادار نیست اما همبستگی میان گوناگونی شانون با تنفس برانگیخته زیاد، مثبت و معنادار است. همبستگی میان گوناگونی شانون و بهره متابولیک زیاد، منفی و معنادار ($R^2 = -0.77$) است. نشان می‌دهد هنگامی که گوناگونی ریزجاننداری زیاد باشد کربن کمتری به شکل CO_2 درمی‌آید و بهره متابولیک کمتر می‌شود.

از تیمارها را نشان می‌دهند و نماینده باکتری‌های ویژه خاک هستند (۳۹). یافته‌های یادشده نشان می‌دهند گوناگونی باکتریایی خاک با افزایش آلودگی خاک به فلزهای سنگین سرب و روی کاهش می‌یابد و این کاهش با میزان آلودگی متناسب است.

بررسی همبستگی‌های پیرسون نشان می‌دهد شناسه گوناگونی شانون همبستگی زیاد، منفی و معناداری با قابلیت جذب سرب ($R^2 = -0.79$) و روی ($R^2 = -0.73$)



شکل ۲- الگوهای بانندی به دست آمده در DGGE؛ افزون بر همه تفاوت‌هایی که میان خاک‌های پژوهش شده دیده می‌شوند و در نوشتار یاد شده‌اند باند قوی و ویژه‌ای در S3 دیده می‌شود که دارای بیشترین آلودگی به فلزهای سرب و روی است و G+C زیادی دارد. این باند با فراوانی بسیار زیادی که دارد نشان‌دهنده باکتری‌های پایدار و سازگار شده به آلودگی زیاد سرب و روی این خاک است. حرف R نشان‌دهنده تکرار برای نمونه‌ها و حرف L نشان‌دهنده خط کش (Ladder) یا نشانگر استاندارد برای DGGE است.

جدول ۴- شناسه‌های گوناگونی جوامع باکتریایی خاک‌های کانسار سرب و روی باما که از نیم‌رخ‌های DGGE به دست آمده‌اند.

شناسه‌های گوناگونی			جایگاه نمونه برداری
یکنواختی گونه‌ای (Pielou)	غنا گونه‌ای (شمار باندها)	شانون-وینر (H')	
۰/۶۵۶ ^a	۳۸ ^a	۴/۸۳ ^a	S1
۰/۵۳۴ ^a	۳۳ ^b	۴/۲۷ ^b	S2
۰/۳۱۱ ^b	۲۷ ^c	۳/۷۱ ^c	S3

حرف‌های a، b و c نشان‌دهنده ناهمبندی‌های معنادار آماری در پایه ۱ درصد ($P < 0.01$) هستند.

بحث

بررسی ژن‌های باکتری‌های خاک‌ها به روش DGGE نشان می‌دهد این روش در بررسی دگرگونی باکتریایی رخ داده در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین بسیار سودمند است. دیگر پژوهشگران نیز کارآمدی این روش را برای شناخت تغییر گوناگونی خاک‌ها گزارش کرده‌اند. لی و همکاران (۳۴) و هو و همکاران (۳۵) با کاربرد روش PCR-DGGE در بررسی دگرگونی خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین گزارش کرده‌اند این روش آگاهی‌های بیشتری در برابر روش‌های کشت ریزجانداران خاک فراهم می‌کند. این بررسی‌ها به خوبی نشان می‌دهند آلودگی خاک به فلزهای سنگین باعث کاهش زیتوده و گوناگونی ژنتیک باکتریایی خاک می‌شود. آنها همچنین پیدایش برخی باکتری‌های پایدار در برابر آلودگی زیاد به فلزهای سنگین را در خاک‌های آلوده گزارش کرده‌اند. در پژوهش حاضر نیز باندهای ویژه‌ای برای هر خاک در نیم‌رخ‌های آن دیده شد به‌ویژه در S3 که باندهای جدید و با مقدار G+C بیشتر و جنبش کمتر دیده شدند. این گونه باندها نشان‌دهنده پیدایش گونه‌های باکتریایی سازگار و پایدار در برابر آلودگی خاک به سرب و روی هستند ولی برای آگاهی بیشتر از بودن این باکتری‌های پایدار در خاک به توالی‌یابی این باندها نیاز است. از آنجاکه خاک و ریزجانداران آن زمان بسیاری در برابر آلودگی بوده‌اند با روش به کاررفته می‌توان از پیدایش گونه‌های پایدار و سازگار شده آگاهی یافت. یک باند ویژه در نیم‌رخ S3 دیده شد که در دیگر نیم‌رخ‌ها وجود نداشت. بر پایه گزارش لی و همکاران (۳۴) و هو و همکاران (۳۵) پیدایش این باند در نیم‌رخ DGGE نشان‌دهنده باکتری ویژه پایدار و سازگار شده در زمان طولانی به آلودگی زیاد فلزهای سنگین سرب و روی در خاک است.

مارتینز-اینگو^{۲۰} و همکاران (۴۰) دریافتند استخراج DNA از باکتری‌های ریزوسفری خاک و به کارگیری روش PCR-DGGE شناسه زیستی بسیار توانمندی در پاسخ‌دهی باکتری‌های این زیستگاه به آلودگی فلزهای سنگین و همچنین ردیابی فرایندهای بهسازی خاک است. بهاتکا و همکاران (۴۱) این روش را ابزار بسیار توانمندی برای پژوهش و جست‌وجوی باکتری‌های پایدار به آلودگی زیاد فلزهای سنگین در محیط‌زیست و فرایندهای زیست‌بهسازی خاک و PCR-DGGE را شناسه زیستی بسیار سودمندی در این زمینه دانستند. بسیاری از پژوهشگران پیامدهای آسیب رسان آلودگی کم فلزهای سنگین را گزارش کرده‌اند (۳۱، ۴۲-۴۴). کاهش فروزینگی لاشبرگ یکی از این پیامدهای زیان‌آور است که بر چرخه کربن، نیتروژن و ... تأثیر می‌گذارد (۴۵ و ۴۶)؛ بنابراین، از کارکردهای ریزجانداران خاک مانند تنفس پایه و برانگیخته برای پی‌بردن به پیامدهای آلودگی فلزهای سنگین در زیستگاه‌ها بهره‌برداری می‌شود. تنفس خاک سرآغاز کانی‌شدن کربن و شناسه بسیار مهمی برای ارزیابی کیفیت خاک است (۵). همان‌طور که در پژوهش‌های پیشین آمده است تنفس برانگیخته و بهره‌متابولیک شناسه‌های بهتری هستند و نتایج پژوهش حاضر نیز با این یافته همخوانی دارند. تفاوت‌های شناسه بهره‌متابولیک میان همه خاک‌ها معنادار بود ولی تنفس برانگیخته در میان دو نمونه خاک معنادار بود و نشان می‌دهد بهره‌متابولیک شناسه بهتری نسبت به تنفس برانگیخته است زیرا کربن ریزجانداران را نیز در خود دارد.

پژوهش حاضر نشان می‌دهد الگوهای به‌دست آمده در نیم‌رخ‌های DGGE بازتابی از دگرگونی رخ داده در ژنتیک باکتری‌ها هستند که خود به علت آلودگی به

حاضر بسته به اینکه آلودگی به فلزهای سنگین در بازه زمانی ۵۰ سال رخ داده است ریزجانداران سازگاری یافته‌اند و پایدارتر شده‌اند و گوناگونی باکتری‌ها در خاک‌های بسیار آلوده همچنان زیاد است هرچند به‌طور معناداری کمتر از خاک‌های غیرآلوده است. توانایی سازگاری باکتری‌ها، پایدار شدن آنها و کارکردهای مهم بوم‌شناختی که در تنش فلزهای سنگین پدید می‌آید بسیار ارزشمند هستند و انجام پژوهش‌های بیشتر درباره آنها را پیشنهاد می‌کند؛ بنابراین، بهره‌گیری از دیگر روش‌های مولکولی و مستقل از کشت مانند روش‌های متاآنالیزی بسیار سودمند خواهد بود. این روش‌ها از گوناگونی بسیار زیاد، ساختار و کارکرد این ریزجانداران در خاک‌ها و همه زیستگاه‌های دیگر پرده‌برداری می‌کنند.

References

- (1) Thies JE. Molecular approaches to studying the soil biota. In: Paul EA., editor. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. 4th ed. USA: Academic Press, Elsevier; 2015: 151-185.
- (2) Nakatsu CH. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal* 2007; 71(2): 562-571.
- (3) Hemmat-Jou MH. *Metagenomics; Unraveling the secrets of our microbial planet*. 1st ed. Isfahan: Chapar press; 2017.
- (4) Austin AT., Ahdjian LY., Stark JM., Belpap J., Porporato A., Norton U., et al. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 2004; 141: 221-235.
- (5) Safari Sinigani AA., Sharifi Z., Safari Sinigani M. *Methods in applied microbiology*. Hamadan: Bu-Ali Sina University press; 2010.

فلزهای سنگین پدید آمده است. از سوی دیگر، بررسی و اندازه‌گیری تنفس برانگیخته و برآورد بهره متابولیک برای نشان دادن کارکرد ریزجانداران خاک در چنین زیستگاه‌هایی بسیار راه‌گشا و سودمند است زیرا این ویژگی‌های خاک به تنش‌هایی مانند فلزهای سنگین خاک بسیار پاسخ‌دهنده هستند. باید به یاد داشت روش PCR-DGGE دارای محدودیت‌هایی است و با آن تنها ۱ تا ۱۰ درصد همه ژن‌ها و باکتری‌ها ارزیابی می‌شوند (۴۷) و در نتیجه، تنها ژن‌های باکتری‌های چیره خاک و نه ژن همه باکتری‌های خاک در این روش بررسی می‌شوند (۴۸)؛ از این رو، در پژوهش حاضر نیز تنها باکتری‌های چیره ارزیابی شدند. در چندین پژوهش دیگر نیز پژوهشگران دریافته‌اند انگشت‌نگاری DGGE به‌اندازه کافی پاسخ‌دهنده است تا دگرگونی‌های ساختار و گوناگونی ریزجانداران را در پژوهش‌های آلودگی به فلزهای سنگین نشان دهد (۴۱، ۴۳، ۴۴، ۴۹).

نتیجه‌گیری

آلودگی به فلزهای سنگین پیامدهای منفی بر فراوانی و گوناگونی باکتریایی دارد و با افزایش مقدار قابل جذب فلزهای سنگین سرب و روی، پیچیدگی و گوناگونی جوامع باکتریایی خاک کاهش می‌یابد و ترکیب و ساختار جوامع باکتریایی دگرگون می‌شود. یافته‌ها نشان دادند فراوانی نسبی باکتری‌های پایدارتر با افزایش آلودگی افزایش می‌یابد. آلودگی خاک به فلزهای سنگین فراوانی باکتری‌های کشت‌پذیر و تنفس برانگیخته خاک را کاهش می‌دهد. پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند آلودگی به فلزهای سنگین زیتوده ریزجانداران و کارکرد آنها را کاهش می‌دهد که با یافته‌های پژوهش حاضر هماهنگ است. در پژوهش

- (6) Alloway BJ. *Heavy Metal in Soil*. New York: John Wiley & Sons; 1990.
- (7) Alvarez A., Saez JM., Costa JSD., Colin VL., Fuentes MS., Cuzzo SA., et al. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* 2017; 166: 41-62.
- (8) Li X., Meng D., Li J., Yin H., Liu H., Liu X., et al. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environmental Pollution* 2017; 231: 908-917.
- (9) Erfanmanesh M., Afyuni M. *Environmental pollution; Water, Soil & Air*. Isfahan: Arkane Danesh press; 2008.
- (10) Parsadoust F. Study of numbers and activities of some rhizosphere microflora and bioaccumulation of heavy metals in range-land plants in contaminated soils of Irankoh mountain side in Isfahan. [Dissertation]. Hamadan: Bu Ali Sina University; 2005.
- (11) Bouyoucos GJ. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal* 1962; 54: 464-465.
- (12) Jackson ML. *Soil Chemical analysis*. New Jersey: Prentice-Hall; 1958.
- (13) Richards LA. *Diagnosis and improvement of saline and alkaline soils*. New York: USDA Agricultural Handbook No. 60; 1954.
- (14) Walkley A. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils-effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 1947; 63(4): 251-264.
- (15) Hinds A., Lowe LE. Application of the Berthelot reaction to the determination of Ammonium-N in soil extracts and soil digests. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 1980; 11(5): 469-475.
- (16) Bower CA., Reitmeir RF., Fireman M. Exchangeable cation analysis of saline and alkali soils. *Soil Science* 1952; 73: 251-261.
- (17) Sposito G., Luud J., Change AC. Trace metal chemistry in arid zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. *Soil Science Society of America Journal* 1983; 46(2): 260-264.
- (18) Lindsay WL., Norvell WA. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal* 1978; 42(3): 421-428.
- (19) Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 89(6): 670-679.
- (20) Muyzer G., de-Waal EC., Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59(3): 695-700.
- (21) Rettedal EA., Clay S., Brozel VS. GC-clamp primer batches yield 16S rRNA gene amplicon pools with Variable GC-clamps, affecting denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Letters* 2010; 312(1): 55-62.
- (22) Martínez-Iñigo MJ., Pérez-Sanz A., Ortiz I., Alonso J., Alarcón R., García P., et al. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and β -galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Chemosphere* 2009; 75(10): 1376-1381.
- (23) Rajapaksha RM., Tobor-Kaplon MA., Baath E. Metal toxicity affects fungal and bacteria activities in soil differently. *Apply and Environmental Microbiology* 2004; 70(5): 2966-2973.
- (24) Saeki K., Kunito T., Natsumoto S. Relationships between bacterial tolerance

- levels and forms of copper and zinc in soils. *Environmental Quality Journal* 2002; 31: 1570-1575.
- (25) Touceda-Gonzalez M., Brader G., Antonielli L., Ravindran VB., Waldner G., Friesl-Hanl W., et al. Combined amendment of immobilizers and the plant growth-promoting strain *Burkholderia phytofirmans* PsJN favor's plant growth and reduces heavy metal uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 2015; 91: 140-150.
- (26) Safari Sinegani AA., Mirahamdi Araki, H. Changes in chemical forms of lead in temperate and semiarid soils in sterile and unsterile conditions. *Environmental Chemistry Letters* 2010; 8(4): 323-330.
- (27) Stefanowicz AM., Kapusta P., Szarek-Łukaszewska G., Grodzińska K., Niklińska M., Vogt RD. Soil fertility and plant diversity enhance microbial performance in metal-polluted soils. *Science of the Total Environment* 2012; 439: 211-219.
- (28) Zalaghi R., Safari-Sinegani AA. The importance of different forms of Pb on diminishing biological activities in a calcareous soil. *Chemistry and Ecology* 2014; 30: 446-462.
- (29) Anderson JPE., Domsch KH. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 1978; 10: 214-221.
- (30) Nordgren A., Baath E., Soderstrom B. Evaluation of soil respiration characteristics to assess heavy metal effects on soil microorganisms using glutamic acid as a substrate. *Soil Biology and Biochemistry* 1988; 20(6): 949-954.
- (31) Bérard A., Mazzia C., Sappin-Didier V., Capowiez L., Capowiez Y. Use of the MicroResp™ method to assess Pollution-Induced Community Tolerance in the context of metal soil contamination. *Ecological Indicators* 2014; 40: 27-33.
- (32) Saeki K., Kunito T., Natsumoto S. Relationships between bacterial tolerance levels and forms of copper and zinc in soils. *Environmental Quality Journal* 2002; 31: 1570-1575.
- (33) Luca C., Daniele A., Marisa M., Carlo C., Giuseppe C. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. *International Dairy Journal* 2002; 12(5): 407-411.
- (34) Li Z., Xu J., Tang C., Wu J., Muhammad A., Wang H. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere* 2006; 62(8): 1374-1380.
- (35) Hu Q., Qi H., Zeng J., Zhang H. Bacterial diversity in soils around a lead and zinc mine. *Journal of Environmental Science (China)* 2007; 19(1): 74-79.
- (36) Wallis PD., Haynes RJ., Hunter CH., Morris CD. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology* 2010; 46(1): 147-150.
- (37) Ding GC., Piceno YM., Heuer H., Weinert N., Dohrmann AB., Carrillo A., et al. Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semiarid ecosystem. *PLoS One* 2013; 8(3): e59497.
- (38) Crecchio C., Curci M., Pizzigallo MDR., Ricciuti P., Ruggiero P. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biology and Biochemistry* 2004; 36(10): 1595-1605.
- (39) Gelsomino A., Keyzer-Wolters AC., Cacco G., van-Elsas JD. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 1999; 38(1): 1-15.
- (40) Martínez-Iñigo MJ., Pérez-Sanz A., Ortiz I., Alonso J., Alarcón R., García P., Lobo MC. Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR-DGGE profiles and β -galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene*

- vulgaris* (Moench) Garcke. *Chemosphere* 2009; 75(10): 1376-1381.
- (41) Bhakta JN., Lahiri S., Bhuiyna FA., Rokunazzaaman M., Ohonishi K., Iwasaki K. et al. Profiling of heavy metal(loid)-resistant bacterial community structure by metagenomic-DNA fingerprinting using PCR-DGGE for monitoring and bioremediation of contaminated environment. *Energy, Ecology and Environment* 2018; 3(2): 102-109.
- (42) Fulladosa E., Murat JC., Villaescusa I. Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target. *Chemosphere* 2005; 58(5): 551-557.
- (43) Sobolev D., Begonia MFT. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: Lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2008; 5(5): 450-456.
- (44) Deng L., Zeng G., Fan C., Lu L., Chen X., Chen M., et al. Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99(19): 8259-8269.
- (45) Fritze H., Niini S., Mikkola K., Mäkinen, A. Soil microbial effects of a Cu-Ni smelter in southwestern Finland. *Biology and Fertility of Soils* 1989; 8(1): 87-94.
- (46) Chander K., Brookes PC., Harding SA. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludge to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 1995; 27(11): 1409-1421.
- (47) Valášková V., Baldrian P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil and Environment* 2009; 55(10): 413-423.
- (48) Ascher J., Ceccherini MT., Chronakova A., Jirout J., Borgogni F., Elhottova D., et al. Evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010; 26(9): 1721-1726.
- (49) Lorenz N., Hintemann T., Kramarewa T., Katayama A., Yasuta T., Marschner P., et al. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. *Soil Biology and Biochemistry* 2006; 38: 1430-1437.

¹- Fingerprints

²- Sequencing

³- denaturing or temperature gradient gel electrophoresis (DGGE or TGGE)

⁴- terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

⁵- Basal Respiration, BS

⁶- Substrate Induced Respiration, SIR

⁷- Soil Microbial Biomass, SMB

⁸- PowerSoil DNA Isolation Kit

⁹- Optical Density

¹⁰- GC-clamps

¹¹- MUYZER

¹²- Images

¹³- way ANOVA-One

¹⁴- metabolic quotient

¹⁵- Pielou's evenness index

¹⁶- Li

¹⁷- Hu

¹⁸- Wallis

¹⁹- Ding

²⁰- Martínez-Iñigo