

بررسی و مقایسه اثر پرایمر در ارزیابی ساختار جوامع باکتریایی خاک مناطق نیمه خشک با روش

Illumina Miseq^۱

مریم تیموری^{۱*}، پریسا محمدی^{۳*}، عادل جلیلی^۳، رقیه زارعی^۲

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نوع پرایمر در ارزیابی ساختار جمعیت میکروبی در خاک یک اکوسیستم نیمه خشک بوده است. **مواد و روشها:** DNA نمونه‌های خاک پس از استخراج و انجام PCR با دو جفت پرایمر مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 توالی‌یابی و داده‌ها با نرم افزار QIIME آنالیز شدند. **نتایج:** آنالیز *Next Generation Sequencing* نشان داد پرایمر V4-V5 توانست ۹۷/۹ درصد از باکتری‌ها را شناسایی کند در حالیکه ۹۰/۴ درصد از باکتری‌ها با جفت پرایمر V1-V3 شناسایی شدند. جفت پرایمر V1-V3 توانست درصد بیشتری از *Proteobacteria* (۳۷/۸ درصد) را شناسایی کند در صورتی‌که جفت پرایمر V4-V5 در شناسایی *Actinobacteria* (۳۳/۶ درصد) بهتر عمل کرده است. بعلاوه جفت پرایمر V4-V5 در سطوح تاکسونومیکی راسته، خانواده و جنس تعداد بیشتری را در نمونه‌های خاک مطالعه شده در مقایسه با جفت پرایمر V1-V3 شناسایی کرد. **بحث:** با وجود عملکرد بهتر پرایمر V4-V5 و با توجه به اینکه برخی از اجزای سطوح مختلف

این مقاله بر اساس داده‌های پایان نامه دکتری مریم تیموری (بررسی ارتباط بین پتانسیل بهره‌وری خاک با تنوع میکروبی پوسته‌های زیستی خاک مناطق بیابانی)

۱. دانشجوی دکترا، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

(نویسنده مسئول: [*p.mohammadi@alzahra.ac.ir](mailto:p.mohammadi@alzahra.ac.ir))

۳. استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

تاکسونومیکی با یکی از جفت پرایمرهای استفاده شده شناسایی شدند به نظر می‌رسد به منظور ارزیابی دقیق‌تر جمعیت‌های میکروبی بهتر است از حداقل دو سری پرایمر استفاده شود.

واژه های کلیدی: تاکسونومی، تنوع زیستی، توالی یابی نسل دوم، جامعه میکروبی، میکروبیولوژی خاک

مقدمه

میکروارگانسیم‌های خاک علیرغم کوچک بودن اندازه، موجودات اصلی و مهم خاک بوده و نقش کلیدی در چرخه‌های ژئوشیمیایی ازت، کربن و سایر عناصر در خاک‌های طبیعی و نیز خاک‌های مدیریت شده کشاورزی دارند. به علاوه جوامع میکروبی در فرآیندهای تجزیه‌ای مانند حذف مواد سمی نقش کلیدی دارند و مسئول ۹۰ درصد از فعالیت‌های زیستی و شیمیایی خاک هستند (Wurst et al., 2012).

باوجود اهمیت میکروارگانسیم‌ها در عملکرد و پایداری خاک، هنوز دانش بشری در مورد ساختار و تنوع جوامع میکروبی کم است. نبود روش‌های مناسب، یکی از دلایل عمده فقدان دانش بشری در مورد تنوع زیستی پروکاریوت‌ها در اکوسیستم‌های مختلف از جمله خاک است. در واقع دانش ما در مورد تنوع میکروبی حداقل تا اوایل قرن ۲۱ محدود به میکروب‌های قابل کشت بوده است. شمارش مستقیم در زیر میکروسکوپ نشان داده است که هر گرم خاک دارای بیش از 10^9 باکتری است در حالی که تعداد باکتری‌ها رشد یافته در محیط‌های کشت ۱۰۰-۱۰۰۰ بار کمتر ارزیابی می‌شود (Nannipieri, و Torsvik & Øvreås, 2002) (2003).

طی یک دهه گذشته در حوزه اکولوژی میکروبی، پیشرفت‌های چشمگیری رخ داده است که این پیشرفت مرهون روش‌های جدید متازنومیکس، و تکنیک‌های توالی‌یابی در این حوزه می‌باشد. استخراج مستقیم DNA و توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی این امکان را برای محققان فراهم کرده است که دنیای میکروارگانسیم‌ها را دقیق‌تر و عمیق‌تر مطالعه کنند (Hamady et al., 2008; Pinto & Raskin, 2012). بعلاوه، پیشرفت‌های اخیر در زمینه تکنولوژی توالی‌یابی DNA این امکان را فراهم کرده است که بتوان میکروبیوم‌های محیط‌های پیچیده را از نظر تاکسونومیکی شناسایی کرد. با پیشرفت در زمینه تکنولوژی توالی‌یابی، میکروبیولوژیست‌ها توانسته‌اند شاخه‌ها، رده‌ها و جنس‌ها و ژن‌های میکروبی بیشتری را شناسایی کنند، بنحوی که تعداد میکروارگانسیم‌های شناسایی شده در ۱۵ سال اول قرن ۲۱ معادل تعداد میکروارگانسیم‌های شناسایی شده از زمان کشف آن‌ها بوده است. امروزه توالی‌یابی ژن‌های میکروبی به یک تکنیک پر کاربرد در تعیین ترکیب جوامع، تنوع و غنای میکروبی در نمونه‌های محیطی تبدیل شده است. این اطلاعات منجر به افزایش اطلاعات در مورد اثرات آسیب‌های طبیعی و آسیب‌های ناشی

از فعالیت‌های انسانی بر خاک و گیاهان و جوامع میکروبی شده است. توالی‌یابی های نسل دوم همچنین امکان تعیین توالی میکروارگانیسم‌ها را در حجم انبوه فراهم کرده است. بی شک روش‌های جدید توالی‌یابی بعد جدیدی را در تحقیقات تنوع زیستی میکروبی ایجاد کرده است که این تکنولوژی پیچیدگی‌هایی نیز دارد. یکی از مهمترین مراحل در این تکنیک، مرحله انتخاب پرایمری است که در تکثیر بکار می‌رود. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر 16S rDNA اغلب بخشی از نواحی بسیار متغیر 16S rRNA را در بر می‌گیرند که امکان شناسایی تاکسونومیک در سطح گونه را فراهم می‌آورند (Fredriksson *et al.* 2013). انتخاب ناحیه متغیر و پرایمرهای مربوطه بایستی با دقت فراوان صورت گیرد تا بیشترین گروه‌های تاکسونومیک میکروبی را در برگرد و ارزیابی واقعی از گروه‌های میکروبی داشته باشد. استفاده از پرایمرهای نامناسب باعث می‌شود که ارزیابی برخی گروه‌های تاکسونومیک کمتر از مقدار واقعی باشد یا ارزیابی برخی از گونه‌های خاص، بیش از مقدار واقعی گزارش گردد و نیز موجب صرف هزینه‌های غیرضروری می‌شود.

هدف این مطالعه، بررسی کاربرد و مقایسه دو جفت پرایمر مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 در ارزیابی ترکیب جوامع میکروبی خاک نواحی نیمه بیابانی منطقه حفاظت شده حیات وحش خبر و روچون در دو اقلیم سرد و گرم و منطقه تحت چرا و قرق بود.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون، با ۱۷۰ هزار هکتار وسعت، در محدوده حوزه استحفاظی شهرستان بافت و در فاصله ۴۰ کیلومتری جنوب غرب شهرستان بافت واقع در استان کرمان و ۳۷ کیلومتری شهرستان حاجی‌آباد واقع در استان هرمزگان قرار دارد. میانگین بارندگی‌های سالانه ۲۵۳/۶۹ میلی‌متر و میانگین سالانه دمای روزانه بین ۱۳/۷ تا ۲۵/۳ درجه سانتی‌گراد متغیر است. متوسط تعداد روزهای یخبندان ۷۸ روز در سال و حداکثر میانگین سالانه رطوبت نسبی، ماهانه ۴۷ درصد است. برای نمونه برداری دو منطقه استپی گرم و استپی سرد در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده در منطقه حفاظت شده پارک ملی خبر و پناهگاه حیات وحش روچون استان کرمان انتخاب شد (شکل ۱) که مختصات جغرافیایی و ارتفاع و گونه غالب گیاهی آنها در جدول ۱ آورده شده است. در هر کدام از مناطق انتخاب شده یک پلات ۱ هکتاری پیاده شد. با ابزار از پیش استریل شده نمونه خاک از عمق ۱۰-۰ سانتی‌متری برداشت شد. نمونه های خاک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خاک پس از الک کردن (۲ میلی‌متری) و یکدست شدن، برای تعیین تنوع میکروبی با روش‌های مولکولی و نیز استخراج DNA، در فریزر 80°C قرار داده شد (Page, 1982).



شکل ۱- نمایی از مناطق نمونه برداری شده، بالا: راست، گرم دست نخورده و چپ گرم دست خورده. پایین: راست، سرد دست نخورده و چپ سرد دست خورده.

Figure 1. View of sampled areas. Above: right: warm-undisturbed; left: warm-disturbed. Down: right: cold-undisturbed; left: cold-disturbed.

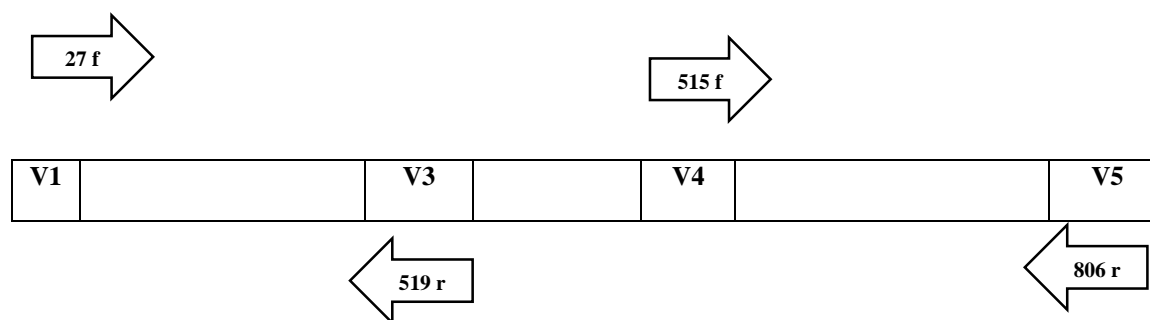
جدول ۱- خصوصیات عمومی مناطق نمونه برداری شده

Table 1. General characteristics of sampled areas

گیاه غالب	ارتفاع	مختصات جغرافیایی		منطقه
		طول	عرض	
درمنه	۱۶۵۴	۵۶°۱۸'۰۸" E	۲۸°۳۸'۰۸" N	استپی گرم دست نخورده
درمنه	۱۷۰۷	۵۶°۱۸'۳۹" E	۲۸°۳۹'۵۴" N	استپی گرم دست خورده
درمنه و Stipia	۲۳۸۹	۵۶°۲۳'۰۹" E	۲۸°۵۲'۱۶" N	استپی سرد دست نخورده
درمنه و Stipia	۲۳۶۵	۵۶°۲۲'۵۹" E	۲۸°۵۲'۲۷" N	استپی سرد دست خورده

استخراج DNA و تعیین تنوع باکتریایی

DNA از نمونه‌های خاک با استفاده از کیت PowerSoil® DNA Isolation متعلق به شرکت MO BIO Laboratories, Inc و بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت استخراج شد. کمیت و خلوص DNA با استفاده از نانودراپ (NaNo DROP 2000 spectrophotometer, ThermoScience) تعیین شد. کیفیت و عدم شکستگی مولکول‌های DNA به طریق الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد با بافر X ۰/۵ TBE حاوی تریس بیس، اسید بوریک و اتیلن‌دی‌آمین تتراسات تعیین شد. برای تعیین تنوع میکروبی با روش توالی‌یابی نسل جدید، ابتدا DNA استخراج شده با کیت Whole Genome Amplification (WGA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تکثیر شد و سپس با کمک کیت RNase Cocktail™ Enzyme Mix و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ناخالصی‌های RNA حذف شد. کتابخانه Illumina با تکنولوژی Illumina compatible Nextra Technology, Illumina, Inc, San Diego, CA, USA و بر اساس دستورالعمل دو مرحله‌ای PCR تهیه شد که منجر به تکثیر دو ناحیه V1-V3 و V4-V5 از ژنوم RNA ریبوزومی 16S در باکتری‌ها شد (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر شماتیکی از نواحی متغیر استفاده شده در توالی‌یابی 16S rRNA

Figure 2. Schematic presentation of hypervariable regions used in 16s rRNA sequencing

در اولین دور PCR برای تکثیر ناحیه V1-V3 از جفت پرایمر 27f-519r، و برای تکثیر ناحیه V4-V5 از جفت پرایمر 515f-806r استفاده شد (جدول ۲). پرایمرهای مورد استفاده در روش توالی‌یابی نسل دوم از سه بخش تشکیل شده‌اند که عبارتند از بخش متصل شونده Illumina Nextra adapter، جدا کننده (sapacer) و توالی پرایمر مورد استفاده در تکثیر و توالی‌یابی. این توالی‌ها در جدول بصورت ایتالیک، تیره و خط‌دار مشخص شده‌اند. ترکیبات موجود در محلول واکنش PCR اول و برنامه زمانی PCR برای جفت پرایمرهای ذکر شده به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده در تهیه کتابخانه Illumina برای تعیین تنوع باکتریایی

Table 2. Sequences of primers used in Illumina library to determine bacterial diversity

پرایمر	توالی
F 27	<i>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG TCGATCGGA</i> <u><i>AKRGT</i></u> <i>TYGATYNTGGCTCAG</i>

R 519	<i>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGGACTTGATGTACGAACGNTBACCGCDGCTGCTG</i>
F 515	<i>CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCTGTTCATGGAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</i>
R 806	<i>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGTAGCTACGCACGGACTACHVGGGTWCTAAT</i>

جدول ۳: مخلوط واکنش PCR برای جفت پرایمر F27/R519 و F515/R806

Table 3. PCR reaction mixture for primer pairs of F27/R519 and F515/R806

F 515/R 806	F 27/R 519	ترکیب
مقدار	مقدار	
۱۲/۵ µl	۱۲/۵ µl	GO® taq colorless Master mix
۰/۵ µl	۰/۵ µl	پرایمر پیش رو (۲۰ mM)
۰/۵ µl	۰/۵ µl	پرایمر پس رو (۲۰ mM)
۱ µl	۱ µl	DNA الگو
۱ µl	۱ µl	سرم آلبومین گاوی
۹ µl	۹ µl	آب مقطر دیونیزه
۲۵ µl	۲۵ µl	حجم نهایی

جدول ۴- شرایط واکنش PCR برای تکثیر نواحی (F27/R519) V1-V3 و (F515/R806) V4-V5

Table 4. PCR reaction conditions for amplification of V1-V3 (F27/R519) and V4-V5 (F515/R806) regions

مرحله	پرایمر	نام مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
اول	F 27/R 519	واسرشتی اولیه	۹۵	۴ min	۱
	F 515/R 806		۹۵	۶ min	
دوم	F 27/R 519	واسرشتی	۹۴	۱ min	۳۵
	F 515/R 806		۹۴	۴۵ sec	
	F 27/R 519	اتصال	۵۸	۱ min	
	F 515/R 806		۵۸	۱ min	
	F 27/R 519	طویل شدن	۷۲	۹۰ sec	
	F 515/R 806		۷۲	۹۰ sec	
سوم	F 27/R 519	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ min	۱

	۱۰ min	۷۲		F 515/R 806	
۱	Δ min	۴	نگهداری	F 27/R 519	چهارم
	Δ min	۴		F 515/R 806	

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از بافر، الکتروفورز شد. قطعات دارای اندازه مناسب با اندازه ۴۹۰ bp برای ناحیه V1-V3 و ۲۹۰ bp برای ناحیه V4-V5 با استفاده از کیت QIAquick gel extraction و طبق دستورالعمل کارخانه از آگارز جدا شد. محصولات PCR خالص شده در مرکز Molecular and Cellular Imaging Center (MCIC) واقع در مرکز تحقیق و توسعه کشاورزی اوهایو (Ohio Agricultural Research and Development Center; OARDC) وابسته به دانشگاه ایالتی اوهایو تعیین توالی شد. تعیین توالی با دستگاه Illumina MiSeq instrument و با استفاده از MiSeq kit V3 و MiSeq Control Software و Reporter v 2.4.1 صورت گرفت. تعیین توالی نمونه‌ها به صورت دو طرفه (paired-end) و با خوانش ۲×۳۰۰ برای ناحیه V1-V3 و ۲×۱۵۰ برای تکثیر ناحیه V4-V5 انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار QIIME تجزیه و تحلیل شد. توالی‌ها از سایت Basespace به صورت خوانش‌های جداگانه R1 و R2 مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 دانلود شد. ابتدا توالی‌های بارکد نواحی V1-V3 و V4-V5 در R1 و R2 حذف شدند. با استفاده از نرم‌افزار pandaseq 8.2 توالی‌های R1 و R2 هر کدام از نمونه‌ها، به هم متصل و به یک فایل واحد با فرمت fasta تبدیل شد (Masella *et al.*, 2012). پس از اتصال خوانش‌های (R1 و R2) بقیه مراحل بررسی، با ترمینال لینوکس و توسط نرم افزار QIIME v 1.9 انجام شد.

نتایج

تعیین توالی ژنوم RNA ریبوزومی 16S امکان مقایسه ترکیب تاکسونومیکی باکتری‌ها را در نمونه‌های خاک فراهم ساخت. در جدول‌های ۵ و ۶ تعداد شاخه، راسته، رده، خانواده و جنس در هر کدام از مناطق مورد مطالعه در فصل بهار و پاییز با استفاده از جفت پرایمر ناحیه‌های V1-V3 و V4-V5 ارائه شده است.

جدول ۵- تعداد اعضا شناسایی شده توسط پرایمرهای F27/R519 و F515/R806 در فصل بهار در هر کدام از سطوح رده‌بندی در مناطق مطالعه شده

Table 5. Number of members identified by primers F27/R519 and F515/R806 in spring in each of the classification levels in the studied areas

منطقه	پرایمر	شاخه (کل)	شاخه (شناخته شده)	رده (کل)	رده (شناخته شده)	راسته (کل)	راسته (شناخته شده)	خانواده (کل)	خانواده (شناخته شده)	جنس (کل)	جنس (شناخته شده)
سرد دست‌خورده	F 27/R 519	۱۸	۱۸	۵۶	۵۱	۸۷	۶۶	۱۴۱	۸۳	۱۶۸	۵۷
	F 515/R 806	۱۹	۱۹	۶۰	۵۷	۱۰۴	۷۹	۱۶۲	۷۷	۲۰۱	۷۵
سرد دست‌نخورده	F 27/R 519	۱۹	۱۹	۵۹	۵۶	۱۰۰	۷۴	۱۴۹	۸۹	۱۸۲	۶۱
	F 515/R 806	۱۹	۱۹	۶۳	۵۹	۱۰۴	۸۲	۱۷۲	۹۸	۲۱۲	۸۴
گرم دست‌خورده	F 27/R 519	۱۴	۱۴	۴۴	۴۱	۶۶	۴۷	۹۹	۵۷	۱۱۱	۲۸
	F 515/R 806	۱۷	۱۷	۵۱	۴۷	۸۲	۶۵	۱۳۳	۷۹	۱۵۸	۵۳
گرم دست‌نخورده	F 27/R 519	۱۹	۱۹	۵۷	۵۱	۹۶	۷۲	۱۳۹	۷۵	۱۶۵	۵۲
	F 515/R 806	۲۰	۲۰	۶۰	۵۷	۱۰۰	۷۹	۱۶۴	۱۰۰	۱۸۹	۶۱

جدول ۶ - تعداد اعضا شناسایی شده توسط پرایمرهای F 27/R 519 و F 515/R 806 در فصل پاییز در هر کدام از سطوح رده‌بندی در مناطق مطالعه شده

Table 6. Number of members identified by primers F27/R519 and F515/R806 in autumn in each of the classification levels in the studied areas

منطقه	پرایمر	شاخه (کل)	شاخه (شناخته شده)	رده (کل)	رده (شناخته شده)	راسته (کل)	راسته (شناخته شده)	خانواده (کل)	خانواده (شناخته شده)	جنس (کل)	جنس (شناخته شده)
سرد دست‌خورده	F 27/R 519	۲۰	۲۰	۵۰	۴۷	۱۲۹	۱۹	۱۲۹	۵۵	۱۵۷	۹۳
	F 515/R 806	۲۰	۲۰	۶۳	۵۹	۱۰۲	۸۳	۱۷۹	۱۰۸	۲۲۰	۷۸
سرد دست‌نخورده	F 27/R 519	۱۸	۱۸	۵۶	۵۱	۸۹	۲۲	۱۳۴	۵۵	۱۵۹	۱۰۵
	F 515/R 806	۲۱	۲۱	۶۷	۶۴	۱۱۱	۸۹	۱۸۵	۱۰۴	۲۲۰	۷۵
گرم دست‌خورده	F 27/R 519	۱۷	۱۷	۵۲	۴۸	۷۲	۱۷	۱۰۹	۴۵	۱۳۴	۸۸
	F 515/R 806	۱۸	۱۸	۵۴	۵۱	۸۸	۶۶	۱۴۲	۸۸	۱۸۶	۷۰
گرم دست‌نخورده	F 27/R 519	۲۲	۲۲	۶۴	۵۸	۶۴	۲۸	۱۴۴	۶۳	۱۷۱	۱۲۰
	F 515/R 806	۱۸	۱۸	۵۴	۵۲	۹۵	۷۳	۱۶۰	۹۳	۱۹۳	۶۹

با استفاده از پرایمر ناحیه V1-V3، ۲۲ شاخه باکتریایی در نمونه‌های مطالعه شده، مشاهده گردید (جدول‌های ۵ و ۶) که ۱۳ شاخه *Firmicutes*، *FBP*، *Chloroflexi*، *Bacteroidetes*، *Armatimonadetes*، *Actinobacteria*، *Acidobacteria*، *Gemmatimonadetes*، *Nitrospirae*، *Planctomycetes*، *TM7*، *Proteobacteria* و *Verrucomicrobia* در تمام نمونه‌ها ولی با فراوانی متفاوت وجود داشت. در این میان ۱۰ شاخه که بالاترین فراوانی را داشتند حدود ۸۷ درصد فیلوטיפ‌ها را در برمی‌گیرند. شاخه‌های *Proteobacteria* و *Actinobacteria* در هر دو فصل بهار و پاییز، در هر دو منطقه سرد و گرم و نیز نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده شاخه غالب محسوب می‌شوند که پس از آنها شاخه‌های *Chloroflexi*، *Acidobacteria* و *Bacteroidetes* قرار می‌گیرند. با تکثیر DNA باکتریایی با پرایمر ناحیه V4-V5، ۲۱ شاخه باکتریایی در نمونه‌های مطالعه شده مشاهده گردید (جدول‌های ۵ و ۶) که ۹ شاخه *Actinobacteria*، *Acidobacteria*، *Armatimonadetes*، *Bacteroidetes*، *Chloroflexi*، *Planctomycetes*، *TM7*، *Proteobacteria* و *Verrucomicrobia* در تمام نمونه‌ها اما با فراوانی متفاوت مشاهده شد. ۱۰ شاخه که بالاترین فراوانی را داشتند حدود ۹۵ درصد فیلوטיפ‌ها را در برمی‌گیرند. با استفاده از پرایمر V4-V5، در هر دو فصل بهار و پاییز و در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده در منطقه سرد *Proteobacteria* و در منطقه گرم *Actinobacteria* شاخه غالب بودند.

با استفاده از پرایمر ناحیه V1-V3 در نمونه‌های مورد مطالعه، ۶۴ رده باکتریایی یافت شد (جدول‌های ۵ و ۶) که ۱۸ رده در تمام نمونه‌ها مشاهده گردید. حدود ۶۹ درصد فیلوטיפ‌ها را ۱۰ رده غالب تشکیل می‌دهند. رده‌های *Actinobacteria*، *Alphaproteobacteria*، *Gammaproteobacteria*، *Rubrobacteria* و *Thermoleophilia* در تمام نمونه‌ها و با فراوانی متفاوت یافت شدند. رده‌های *Alphaproteobacteria* (متعلق به شاخه *Proteobacteria*)، *Gammaproteobacteria* (متعلق به شاخه *Proteobacteria*) و *Actinobacteria* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) رده‌های باکتریایی غالب در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده مناطق سرد در فصل بهار هستند. در منطقه گرم رده *Thermoleophilia* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) جایگزین *Gammaproteobacteria* شده است. در نمونه‌های فصل پاییز منطقه سرد، رده *Rubrobacteria* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) جایگزین *Actinobacteria* در هر دو ناحیه دست‌نخورده و دست‌خورده شده است. در منطقه گرم برخلاف فصل بهار، فراوانی نسبی *Thermoleophilia* کم شده است و *Actinobacteria* و *Acidimicrobia* (متعلق به شاخه *Actinobacteria*) به رده‌های غالب تبدیل شده‌اند. تعداد رده‌های یافت شده در نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر ناحیه V4-V5 بیشتر و ۶۷ رده بود که ۱۸ رده در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. حدود ۶۹ درصد فیلوטיפ‌ها را ۱۰ رده غالب تشکیل می‌دهند. در فصل بهار، رده‌های *Gammaproteobacteria*، *Thermoleophilia*، *Actinobacteria* و *Alphaproteobacteria* جزء ۱۰ رده غالب در هر دو منطقه سرد و گرم و

نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده بود اگرچه فراوانی آن‌ها متفاوت بود. در نواحی دست‌خورده در هر دو منطقه سرد و گرم، درصد فراوانی رده Gammaproteobacteria (متعلق به شاخه Proteobacteria) بیش از نواحی دست‌نخورده بود اما در نواحی دست‌نخورده فراوانی Thermophilia بیشتر بود هرچند در هر دو ناحیه دست‌نخورده و دست‌خورده منطقه گرم فراوانی رده Thermophilia بیش از نواحی دست‌نخورده و دست‌خورده منطقه سرد بود. ۱۰ رده غالب در نمونه‌های منطقه سرد یکسان هستند و فقط از نظر فراوانی با هم فرق دارند، اما تفاوت میان نمونه‌های مناطق سرد و گرم در سطح رده نیز کاملاً آشکار است. رده‌های Acidobacteria-6 و Saprospirae فقط در مناطق سرد مشاهده شدند و رده MB-A2-108 در هر دو ناحیه دست‌خورده و دست‌نخورده نواحی گرم مشاهده شد. نمونه‌های فصل پاییز و در منطقه سرد، در هر دو ناحیه دست‌خورده و دست‌نخورده رده Alphaproteobacteria با بالاترین درصد فراوانی بود و برخلاف فصل بهار، تفاوتی بین درصد فراوانی Gammaproteobacteria بین نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده وجود نداشت. در منطقه گرم در نواحی دست‌خورده همچنان فراوانی Gammaproteobacteria بیش از نواحی دست‌نخورده بود. اگرچه فراوانی نسبی رده Thermophilia در فصل پاییز، در مقایسه با فصل بهار کاهش یافته بود اما همچنان جزء رده‌های غالب محسوب می‌شد و فراوانی آن‌ها در منطقه گرم بیش از منطقه سرد بود.

در سطح تاکسونومیکی بعدی یعنی رسته، ۱۳۱ رسته در نمونه‌هایی که با پرایمر V1-V3 تکثیر شدند یافت شد. ۱۸ رسته از رسته‌های شناخته شده در همه نمونه‌ها وجود داشت. به‌طور متوسط حدود ۶۰ درصد از باکتری‌ها متعلق به ۱۰ رسته با فراوانی بالاتر بودند. از این میان، رسته Actinobacteriales به عنوان رسته غالب شناسایی شد. در نمونه‌های بهار رسته‌های Oceanospirillales و Aeromonadales فقط در نواحی دست‌خورده مشاهده شدند. رسته Saprospirales نیز منحصراً در نواحی دست‌نخورده مشاهده شد. در نمونه‌های پاییز، فراوانی Actinobacteriales در منطقه سرد کاهش یافته بود و در این منطقه در هر دو ناحیه دست‌خورده و دست‌نخورده رسته‌های غالب Sphingomonadales و Rhizobiales بودند (شکل ۵-۳). در منطقه گرم تفاوت بین نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده نیز وجود داشت به‌نحوی که در ناحیه دست‌خورده رسته Aeromonadales و در ناحیه دست‌نخورده رسته Actinobacteriales بالاترین فراوانی را داشتند. توسط جفت پرایمر ناحیه V4-V5، ۱۱۱ رسته در نمونه‌های مطالعه شده، وجود داشت که ۸۹ رسته نام‌گذاری شده بودند. ۴۶ رسته از رسته‌های شناخته‌شده، در همه نمونه‌های وجود داشتند. به‌طور متوسط حدود ۵۸ درصد از باکتری‌ها به ۱۰ رسته برتر تعلق دارند رسته‌های Oceanospirillales، Actinomycetales، RB4، Solirubrobacterales، Gaiellales، Alteromonadales، Rubrobacterales، Sphingomonadales، Rhizobiales، Saprospirales، Rhizobiales و Nitrososphaerales رسته‌های غالب را در نمونه‌های بهار تشکیل می‌دهند. رسته‌های Oceanospirillales، Actinomycetales، Solirubrobacterales، Gaiellales، Rubrobacterales، RB4 و Saprospirales به‌طور مشترک در همه مناطق و نواحی، جزء

راسته‌های غالب بودند. علاوه بر راسته‌های غالب ذکر شده در نمونه‌های بهاره، راسته‌های *Lactobacillales*، *Chthoniobacterales*، *Acidimicrobiales* و *0319-7L14* جزء راسته‌های غالب قرار گرفتند. در نمونه‌های پاییزه، تفاوت مناطق مختلف به‌وضوح دیده می‌شود به‌نحوی که فقط ۵ راسته *Actinomycetales*، *Solirubrobacterales*، *Gaiellales*، *Alteromonadales* و *Rubrobacterales* در تمام مناطق و نواحی مشترک هستند و در نمونه‌های بهاره، راسته اختصاصی برای هیچ کدام از مناطق گرم و سرد و یا نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده مشاهده نگردید. اما در نمونه‌های پاییزه راسته RB1 فقط در مناطق سرد و راسته *Acidimicrobiales* فقط در نواحی گرم مشاهده شد.

در مجموع، ۲۰۱ خانواده باکتریایی در نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر V1-V3 تشخیص داده شد که ۹۷ خانواده آن نام‌گذاری شده‌اند. از این میان، ۵۰ خانواده از خانواده‌های باکتریایی شناخته شده، در همه نمونه‌های مطالعه شده وجود داشتند. حدود ۴۵ درصد از باکتری‌ها با بیشترین فراوانی، متعلق به ۱۰ خانواده هستند. نتایج نشان می‌دهد که وقتی به سمت سطوح پایین تر رده بندی حرکت می‌کنیم تفاوت در ترکیب جمعیت باکتریایی آشکارتر می‌شود، به‌نحوی که فقط ۴ خانواده مشترک در مناطق مختلف وجود دارد. در نمونه‌های بهاره خانواده‌های *Aeromonadaceae* و *Pseudonocardiaceae* به‌ترتیب فقط در نواحی دست‌خورده و منطقه گرم مشاهده شد. در نمونه‌های پاییزه نیز خانواده *Chthoniobacteraceae* و *Gaiellaceae* به‌ترتیب فقط در مناطق سرد و گرم مشاهده شدند. همانند فصل بهار خانواده‌های *Aeromonadaceae* فقط در نواحی دست‌خورده مشاهده شد. در سطح خانواده و در بین ۱۰ خانواده برتر، تعداد بیشتری از خانواده‌ها یافت شد که هنوز شناسایی نشده‌اند. در نمونه‌های تکثیر شده با جفت پرایمرهای متعلق به ناحیه V4-V5، ۱۶۷ خانواده مختلف باکتریایی در نمونه‌ها تشخیص داده شد که ۲۴ خانواده از خانواده‌های باکتریایی شناخته شده، در همه نمونه‌های مطالعه شده وجود داشتند. حدود ۴۱ درصد از باکتری‌ها متعلق به ۱۰ خانواده با بیشترین فراوانی هستند. خانواده‌های *Halomonadaceae*، *Gaiellaceae*، *Shewanellaceae*، *Rubrobacteraceae*، *Geodermatophilaceae*، *Sphingomonadaceae*، *Nitrososphaeraceae*، *Chitinophagaceae*، *Chthoniobacteraceae*، *Micromonosporaceae* و *Bradyrhizobiaceae* جزء ۱۰ خانواده غالب در نمونه‌های بهاره مناطق سرد بودند. ۲ خانواده *Micromonosporaceae* و *Bradyrhizobiaceae* در مناطق گرم مشاهده نشدند در حالی که خانواده‌های *Campylobacteraceae*، *Streptococcaceae* و *Solirubrobacteraceae* فقط در مناطق گرم مشاهده شدند. در نمونه‌های بهاره فقط ۵ خانواده مشترک در مناطق مختلف وجود داشت. در نمونه‌های فصل بهار، فراوانی خانواده‌های *Halomonadaceae* و *Shewanellaceae* در نواحی دست‌خورده هر دو منطقه سرد و گرم بیش از نواحی دست‌نخورده بود. در نمونه‌های پاییزه منطقه سرد، ۸ خانواده با خانواده‌های مشاهده شده در فصل بهار مشترک بودند و به جای خانواده‌های *Micromonosporaceae* و *Bradyrhizobiaceae*، خانواده‌های *Ellin6075*

Beijerinckiaceae جزء ۱۰ خانواده برتر قرار گرفتند. برخلاف نمونه‌های بهاره، در نمونه‌های پاییزه خانواده *Campylobacteraceae* جزء ۱۰ خانواده برتر قرار نگرفت.

۱۰ جنس برتر به طور متوسط حدود ۳۰ درصد فیلو تیپ‌ها را در نمونه‌های تکثیر شده با پرایمر ناحیه V1-V3 در برمی‌گیرند. بیشترین اختلاف در ترکیب باکتریایی نمونه‌ها در سطح جنس مشاهده شد و جنس‌هایی که جز ۱۰ جنس غالب بودند شناخته شده نیستند که نشان‌دهنده عدم شناخت بخش اعظم تنوع میکروبی در این سطح تاکسونومیک است. در نمونه‌های بهاره، باکتری *Rubrobacter* و در نمونه‌های پاییزه *Balnimous* و *Rubrobacter* در همه نمونه‌ها جزء ۱۰ جنس غالب بودند. از بین ۲۲۰ جنس باکتریایی مشاهده شده در نمونه‌های تکثیر شده با جفت پرایمر مربوط به ناحیه V4-V5 فقط ۶۹ جنس شناخته شده بود. ۱۰ جنس برتر به طور متوسط حدود ۲۹ درصد فیلو تیپ‌ها را در برمی‌گیرد. در نمونه‌های بهاره، ۴ جنس *Rubrobacter*، *Halomonas*، *Nitrososphaera* و *Geodermatophilus* در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده‌ی هر دو منطقه سرد و گرم یافت می‌شوند. جنس *Prevotella* و *Segetibacter* به ترتیب، جزء ۱۰ جنس غالب نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده قرار گرفتند. فراوانی جنس‌های *Halomonas* و *Shewanella* در نواحی دست‌خورده بیشتر بود در حالی که در نواحی دست‌نخورده جنس *Rubrobacter*، *Candidatus* و *Nitrososphaera* فراوانی بیشتری از خود نشان دادند. در نمونه‌های پاییزه، جنس‌های *Halomonas*، *Shewanella* و *Nitrososphaera* در نواحی دست‌خورده و دست‌نخورده‌ی هر دو منطقه سرد و گرم یافت می‌شوند. در منطقه سرد و گرم بین نمونه‌های فصل بهار و پاییز به ترتیب ۶ و ۵ جنس مشترک یافت شد. در منطقه سرد *Geodermatophilus* و *Bacillus* به ترتیب فقط در نمونه‌های بهاره و پاییزه جزء ۱۰ جنس غالب قرار گرفتند. در نواحی دست‌خورده منطقه گرم، جنس‌های *Campylobacter* و *Fusobacterium* به ترتیب فقط در نمونه‌های بهاره و پاییزه جزء ۱۰ جنس غالب قرار گرفتند. جنس‌های *Prevotella* و *Euzebya* فقط در نمونه‌های بهاره جزء ۱۰ جنس غالب قرار می‌گیرند، در حالی که *Bacillus*، *Catonella* و *Marinilactibacillus* فقط در نمونه‌های پاییزه جزء ۱۰ جنس غالب قرار می‌گیرند.

بحث

در این مطالعه ساختار جمعیت باکتریها در دو منطقه سرد و گرم دست‌خورده و دست‌نخورده، در دو فصل بهار و پاییز با روش توالی‌یابی نسل دوم و با استفاده از جفت پرایمرهای مربوط به نواحی V1-V3 و V4-V5 مطالعه و مقایسه شد. در بالاترین سطح تاکسونومیک یعنی شاخه در مجموع ۱۴ شاخه در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. تاکنون در کل، ۵۲ شاخه باکتریایی شناخته شده است

(Giovannoni & Rappe, 2003) که به نظر می‌رسد در بیشتر خاک‌ها، شاخه‌های غالب را تعداد معدودی از آن‌ها تشکیل می‌دهند. چنین بنظر می‌رسد که تیمارهای اعمال شده در این مطالعه، بر شاخه‌های غالب تاثیر داشته است به نحوی که *Proteobacteria* و *Actinobacteria* به ترتیب شاخه‌های غالب نواحی دست‌خورده مناطق سرد و گرم را تشکیل می‌دهند. *Actinobacteria* تا ۵۰ درصد جوامع میکروبی را در بسیاری از اکوسیستم‌ها به خود اختصاص می‌دهد که نشان‌دهنده اهمیت نقش آنها در خاک است (Hackl et al. 2010; Bachar et al. 2004). غلبه اعضای شاخه‌های *Proteobacteria* و *Actinobacteria* در محیط‌های نیمه خشک و خاک‌های قلیایی (شرایط مشابه مناطقی که در اینجا بررسی شد) قبلاً گزارش شده است (Aislabie et al. 2009; Makhalanyane et al. 2013; Wang, 2015, McHugh & Schwartz, 2015). شاخه *Chloroflexi* نیز جزء شاخه‌هایی است که فراوانی زیاد آن در خاک بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک و همین‌طور نواحی با شرایط محیطی نامتعارف گزارش شده است (Keshri et al. 2013; Rao et al. 2012). در سطح بعدی رده‌بندی یعنی کلاس، کلاس‌های *Alpha-Proteobacteria* و *Actinobacteria* در تمام نمونه‌ها غالب بودند که با فراوانی زیاد آنها در محیط‌های خاکی و نیز خاک مناطق نیمه‌خشک مطابقت دارد (Castro et al. 2010; Rao et al. 2016). تفاوت در ترکیب باکتریایی در سطوح پایین‌تر رده‌بندی بیشتر مشاهده می‌شود، به نحوی که در سطح خانواده فقط دو خانواده بین مناطق سرد و گرم مشترک بود. در سطح جنس، قسمت عمده‌ای از جنس‌ها به شکل ناشناخته گزارش شد که ممکن است دو دلیل داشته باشد: ۱- وجود تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌هایی که هنوز شناسایی نشده‌اند. ۲- با توجه به استفاده از بانک اطلاعاتی Greengens، چنین بنظر می‌رسد که این بانک برای شناسایی نمونه‌های محیطی ایران کارآمدی لازم را ندارد. این تفاوت در سطوح پایین‌تر، با نتایج Dowd و همکاران (۲۰۰۸) و نیز Jesus da و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. مقایسه نتایج حاصل از دو جفت پرایمر V1-V3 و V4-V5 برای بررسی ترکیب جمعیت باکتریایی در نمونه‌های خاک، نشان می‌دهد که حداقل در سطح شاخه پرایمر V4-V5 عملکرد بهتری داشت و توانسته است که درصد بالاتری از باکتری‌ها را شناسایی کند (۹۷/۹ درصد در برابر ۹۰/۴ درصد ناحیه دیگر). در ضمن، جفت پرایمر V1-V3 توانسته است درصد بالاتری از *Proteobacteria* (۳۷/۸ درصد) را شناسایی کند حال آنکه جفت پرایمر V4-V5 در شناسایی *Actinobacteria* (۳۳/۶ درصد) عملکرد بهتری داشته است. مقایسه عملکرد دو جفت پرایمر متعلق به نواحی V1-V3 و V4-V5 در جدول ۷ آورده شده است.

شاخه‌های MVP-21، OD1 و WS2 فقط توسط جفت پرایمر V1-V3 و شاخه‌های *Crenarchaeota*، *Fusobacteria* و *Spirochaetes* فقط توسط جفت پرایمر V4-V5 شناسایی شدند. شاخه‌های MVP-21، OD1 و WS2 فقط بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیک از نمونه‌های محیطی مختلف شناسایی شده‌اند و تاکنون در شرایط آزمایشگاهی مه‌جداسازی آنها صورت نگرفته است.

در سطح بعدی طبقه‌بندی یعنی رده درصد بیشتری از *Alpha-Proteobacteria* و *Gamma-Proteobacteria* توسط پرایمر V1-V3 مشاهده شد. مقدار *Beta-Proteobacteria* شناسایی شده توسط هر دو جفت پرایمر مساوی بود اما درصد *Delta-Proteobacteria* شناسایی شده توسط پرایمر V1-V3 تقریباً دو برابر میزان شناسایی شده توسط جفت پرایمر V4-V5 بود. از نظر تعداد رده شناسایی شده، ۲۹ رده توسط هر دو پرایمر شناسایی شد اما به ترتیب ۳ و ۱۴ رده به شکل انحصاری توسط جفت پرایمر V1-V3 و V4-V5 شناسایی شدند.

جدول ۷- مقایسه کارایی پرایمرهای نواحی V1-V3 و V4-V5 در شناسایی سطوح مختلف رده‌بندی

Table 7. Comparison of primers efficiency V1-V3 and V4-V5 areas in identifying different levels of classification

مشترک	موارد انحصاری V1-V3	موارد انحصاری V4-V5
شاخه	۳	۳
رده	۳	۱۴
راسته	۵	۲۱
خانواده	۱۲	۲۵
جنس	۹	۲۵

از بین راسته‌های شناسایی شده، ۵۰ راسته مشترک، ۵ راسته توسط جفت پرایمر V1-V3 و ۲۱ راسته فقط توسط جفت پرایمر V4-V5 شناسایی شد. در سطح خانواده نیز عملکرد جفت پرایمرها با هم متفاوت بود. علاوه بر ۵۲ خانواده که توسط هر دو جفت پرایمر شناسایی شدند به ترتیب ۱۲ و ۲۵ خانواده توسط جفت پرایمرهای V1-V3 و V4-V5 به شکل انحصاری شناسایی شدند که نشان می‌دهد در این سطح از طبقه‌بندی نیز، جفت پرایمر V4-V5 عملکرد بهتری از خود نشان داده است. در بین جنس‌هایی که شناسایی شدند علاوه بر ۳۳ جنس مشترک، ۹ جنس فقط توسط جفت پرایمرهای V1-V3 شناسایی شد در حالی که ۲۵ جنس فقط توسط جفت پرایمر V4-V5 شناسایی شد. به نظر می‌رسد با وجود آنکه در بسیاری از مطالعات برای تعیین کنسرسیون‌های میکروبی به‌ویژه در نمونه‌های کلینیکی در روش‌های مستقل از کشت، استفاده از ناحیه V1-V3 نتایج بهتری داشته و غنای میکروبی بیشتری را نشان داده است (Rintala et al., 2017)، اما نتایج این بررسی نشان داد که ناحیه V4-V5 که با جفت پرایمر 515f/806r تکثیر شده است توانست علاوه بر شناسایی غنای بیشتر در همه سطوح طبقه‌بندی از نظر کمی، درصد بالاتری از DNA میکروبی موجود در نمونه‌ها را نیز تکثیر کند. یافته‌های ما در عملکرد بهتر ناحیه V4-V5 با یافته‌های Tremblay و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد. در واقع بنظر

می‌رسد که خوانش‌های ۲۵۰ جفت بازی paired-end MiSeq که روی هم افتادگی زیادی دارند دارای کیفیت بالاتری بوده و این امر باعث بالا رفتن احتمال مشاهده باکتری‌های از قبل شناخته شده و نیز کشف انواع جدید می‌شود. بنابراین می‌توان گفت انتخاب نوع پرایمر اهمیت بیشتری از نوع پلت فرم مورد استفاده در روش NGS دارد.

نتیجه‌گیری

پرایمرها نقش مهمی در تعیین پروفایل باکتریایی محیط‌های پیچیده مانند خاک، به روش توالی‌یابی نسل دوم دارند. این نقش به‌ویژه وقتی اهمیت پیدا می‌کند که برخی از اعضای یک جمعیت با استفاده از یک جفت پرایمر خاص نادیده انگاشته و یا بیش از مقدار موجود ارزیابی می‌شوند و در نتیجه موجب خطا در ارزیابی‌ها می‌گردند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در مطالعات مشابه، حداقل از دو سری پرایمر استفاده شود تا ارزیابی‌ها دقیق‌تر باشد.

تشکر و قدردانی

بخشی از این پژوهش با حمایت معاون محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء و در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی صنعتی دکتر شایسته سپهر انجام شده است که به این ترتیب تقدیر می‌گردد.

منابع

- Aislabie, J., Jordan, S., Ayton, J., Klassen, J. L., Barker, G. M. and Turnerb, S. (2009). Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 21-36.
- Bachar, A., Al-Ashhab, A., Soares, M.I., Sklarz, M.Y., Angel, R., Ungar, E.D. and Gillor, O. (2010). Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. *Microbial Ecology*, 60: 453-61.
- Castro, H.F., Classen, A.T., Austin, E.E., Norby, R.J. and Schadt, C.W. (2010). Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 999–1007.

- da C Jesus, E., Marsh, T. L., Tiedje, J. M., and de S Moreira, F. M. (2009). Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *ISME Journal*, 3: 1004–1011.
- Dowd, S.E., Callaway, T. R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R. G. and Edrington, T.S. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology*, 8: 1-8.
- Fredriksson, N.J., Hermansson, M. and Wilen, B.M. (2013). The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8:e76431. doi:10.1371/journal.pone.0076431
- Hackl, E., Bachmann, G. and Zechmeister-Bolternstern, S. (2004). Microbial nitrogen turnover in soils under different types of natural forest. *Forest Ecology and Management*, 188: 101–112.
- Hamady, M., Walker, J.J., Harris, J.K., Gold, N.J., Knight, R. (2008). Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods*, 5: 235–237.
- Keshri, J., Mishra, A. and Jha, B. (2013). .Microbial population index and community structure in saline-alkaline soil using gene targeted metagenomics. *Microbiology Research*, 168:165-73
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41: e1
- Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Birkeland, N.K., Cary, S.C., Tuffin, I.M. and Cowan, D.A. (2013). Evidence for successional development in Antarctic hypolithic bacterial communities. *The ISME Journal*, 7: 2080–2090.
- Mc Hugh, T.A. and Schwartz, E. (2015). A watering manipulation in a semiarid grassland induced changes in fungal but not bacterial community composition. *Pedobiologia*, 59: 121-127.
- Nannipieri, P., Ascher, J. Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. and Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655–670.
- Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D. G., Neufeld, J.D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*, 13, Article number: 31.

- Page, A. L. (1982). *Methods of Soil Analysis. Part 2-Chemical and microbiological Properties*, 2th Edition. American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc 1159 Pp. Wisconsin
- Pinto, A.J. and Raskin, L. (2012). PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PLOS ONE*;7: Article e43093.
- Rao, S., Chan, Y., Lacap, D. C., Hyde, K. D., Pointing, S. B. and Farrell, R. L. (2012). Low-diversity fungal assemblage in an Antarctic Dry Valleys soil. *Polar Biology*, 35: 567–574.
- Rao, S., Chan, Y., Bugler-Lacap, D.C., Bhatnagar, A., Bhatnagar, M. and Pointing, S.B. (2016). Microbial diversity in soil, sand dune and rock substrates of the Thar Monsoon Desert. India. *Indian Journal of Microbiology*, 5: 35–45.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-394.
- 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*, 28, 19–30.
- Torsvik, V. and Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinions in Microbiology*, 5: 240-245.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., Kirton, E.S. He, S., Woyke, T., Lee, J., Chen, F., Dangl, J.L. and Tring, S.G. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Frontier in Microbiology*; 6: 771.
- Wang, M., Liu, S., Wang, F., Sun, B., Zhou, J. and Yang, Y. (2015). Microbial responses to southward and northward Cambisol soil transplant. *Microbiology Open*, 4: 931–940.
- Wurst, S., De Deyn, G.B. and Orwin, K. (2012). Soil biodiversity and function. Pages 28-44 in Wall, DH, ed. *Soil Ecology and ecosystem services* Oxford University Press.

Assay and comparison the impact of primer in evaluation of bacterial community structure in semiarid area by Illumina Miseq

M. Teimouri^{1,2}, P. Mohammadi^{1,3*}, A. Jalili³, R. Zarei⁴

Received: 2021.06.10

Accepted: 2021.9.4

Abstract

Introduction: The aim of this study was to compare the effect of primers in evaluating soil bacterial community structure. **Methods and Materials:** For this purpose, soil samples were taken from cold and warm area which grazed (disturbed) or not grazed (undisturbed) in spring and autumn. Microbial DNA was extracted and sequenced after amplification by two primers which amplify V1-V3 and V4-V5 area of 16S rRNA. Next generation sequencing data were analyzed by QIIME to determine bacterial community structure. **Results:** Results showed the effect of area, grazing and season on bacterial community structure. NGS data analysis showed that primers which amplified V4-V5 area identified more bacteria (97.9%) in compared to V1-V3 primers (90.4%). V1-V3 primers had better efficiency to identify Proteobacteria (37.85%) in compared to V4-V5 which identified more Actinobacteria (33.6%). In addition, V4-V5 primers identified more bacteria in class, family and genus taxonomic groups in compared to V1-V3 primer. **Discussion:** Although V4-V5 primer had better efficiency in bacteria identification, it is recommended to use both primers to evaluate precisely bacterial community structure.

Keywords: Biodiversity, Microbial Community, Next Generation Sequencing, Soil Microbiology, Taxonomy

1. PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran-
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Applied Microbiology and Microbial Biotechnology Research Center, Al-Zahra University, Tehran.. (*Corresponding author: p.mohammadi@alzahra.ac.ir).

3. Professor, National Forestry and Pasture Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran.