



Research Paper

<https://doi.org/10.5564/pib.v38i1.2542>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Soil bacterial diversity in the Zaamar mining area, Mongolia

Damdinsuren NARANTUYA¹ , Choidash BATTSETSEG^{1,*} , Sodbaatar NARANJARGAL² 

¹Department of Biology, School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolia

²Laboratory of Food Safety and Hygiene, Institute of Veterinary Medicine, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: battsetseg@num.edu.mn, <https://orcid.org/0000-0001-8516-2452>

Abstract. The bacterial diversity of the sample BM from the non-interacted mining area was significantly abundant compared to mining interacted samples. Nine phyla were dominant in the bacterial community structure. But in samples from the mining operation area sample VBKB-b and abandoned mining sample are VBKB-b, 3 phyla *Firmicutes* (59-66%), *Actinobacteria* (17.4-26.8%), *Proteobacteria* (11-14%) were dominant in the bacterial community.

Keywords: mining soil, DNA sequencing technology, bacterial diversity

Received 15 September 2022; received in revised form 09 November 2022; accepted 09 December 2022

© 2022 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Introduction

In recent years, diverse groups of microbes with metal biosorption potential were revealed. These include a variety of rhizobacteria (*Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Serratia*) [1], members of actinobacteria *Streptomyces spp* and *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 [2] and lactic acid bacteria (*Bifidobacterium longum* 46, *B. lactis* Bb12, *Lactobacillus fermentum* ME3) [3].

Ji *et al.* [4] studied a gold mining area that is polluted by mercury expulsion and found that mercury and lead affected the community composition and *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were the dominant phyla in the community. Furthermore, an Hg resistant bacterial species was isolated and identified as *Pseudomonas plecoglossicida*. Resistance was up to 30 mg/L.

The Zaamar gold mining area was reported as a large heavy metal polluted region and is located along the Tuul River, which is connected to Lake Baikal. Lake Baikal heavy metal concentration also showed increased level

due to this reason [1], [5], [6]. Microorganisms play important roles in the ecological balance of certain area, including nitrogen cycle, promoting plant growth, the decomposition of organic waste, and so on. Bacterial species abundance indicates environmental health.

Materials and Methods

Soil collection site

The soil samples were collected from the Zaamar Soum gold mining field, in Tuv Province; Central North of Mongolia is considered a cold semi-arid climate. The Tuv province has an average temperature of about -18°C to 0°C and annual precipitation of 267 millimeters [7]. The samples were collected in September. The locations and information of the soil samples are listed in Table 1.

Sampling and storage

For sampling, the first 3-5 cm of topsoil was removed and each sample was collected using a sterilized shovel

Table 1. Soil sample information

Name	Name of location	Coordinates	Elevation (m)	pH
VBKB b (mining area)	Valley behind Khailaast bag	N 48°18'255" E 104°24'638"	943	9.1
VBKB br (abandoned mining site)	Valley behind Khailaast bag	N 48°18' 255" E 104°24'638"	943	9.41
RS yb (mining area)	Movement rise of red soil	N 48°18'462" E 104°24'962"	950	8.69
RS b (mining area)	Movement rise of red soil	N 48°18'462" E 104°24'962"	950	8.7
BM (non-interacted)	Bayasgalant Mountain	N 48°21'245" E 104°30'133"	950	8.22
HT db (mining area)	Bayangol	N 48°22'000" E 104°29'886"	914	8.18
HT lb (mining area)	Mouth of Khailaast valley	N 48°22'000" E 104° 29'886"	916	8.39
HT b (mining area)	Mouth of Khailaast valley	N 48°22'000" E 104°29'886"	916	8.44
WIKb (Well soil)	Well in Khailaast valley	N 48°18'978" E 104°26'017"	984	8.8
SNB (Well soil)	Well in Khailaast valley	N 48°18'978" E 104°26'017"	984	8.2

and Bunsen burner. Then in each site, about 150- 200 g of soil were transferred into labeled sterile polyethylene bags [8] and were shipped 20 g each to the laboratory at Zhejiang University of Technology. Collected samples were preserved at 40°C before analysis and during experiments. 6 g of each soil sample was transferred to sealed polyethylene bags and kept cool in a preserving box. They were sent to the Hangzhou Legenomics Bio-Pharm Technology Company for MiSeq high-throughput sequencing.

MiSeq system preparation

a) First, genomic DNA extraction was applied and was checked on 1% agar gel electrophoresis.

b) Sequencing primer selection

Region-specific primers with barcodes are used for 16S rRNA variable region sequencing. 515F/806R primers [10] were used for prokaryotes.

Forward primer:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA-CAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse primer:

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA-CAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

c) PCR amplification and purification

The PCR amplification is followed by its instructions and high throughput thermal cycler the ABI GeneAmp 9700 PCR System was used.

For prokaryote V4 region amplification, the PCR reaction mixtures are as follows: PCR-grade water 13.0 µL, PCR master mix (2x) 10.0 µL, forward primer (10 µM) 0.5 µL, reverse primer (10 µM) 0.5 µL and template DNA 1.0 µL total reaction volume 25.0 µL.

PCR thermocycler conditions are as follows:

Initial denaturation at 94°C for 3 min, amplification stages including denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 50°C for 60 s, extending at 72°C for 90 s and each stage repeated for 35 times, at 72°C for 10 min of extending and hold at 4°C. Each sample amplified 3 replicate 25-µL PCR reactions. Amplicons from each sample ran on an agarose gel.

d) PCR product quantification and homogenization

Electrophoresis was used for the quantification of

amplicons and tested with PicoGreen dsDNA binding dye, and amplicons from each sample were combined into a single sterile tube and diluted with Tris HCl, and purified using 80% ethanol. Clean amplicon pool concentration was measured and the A260/A280 ratio was between 1.8-2.0.

e) MiSeq pair-end library construction

The purified DNA was connected to Y adapters. Magnetic beads were used to remove self-ligating fragments of the linker. Then PCR was used for enriching the library. The libraries were denatured with sodium hydroxide for single-stranded DNA fragments and diluted with a hybridization buffer, following heat denaturing before MiSeq sequencing.

f) MiSeq high-throughput sequencing

After the library was constructed, it was transferred to the sequencing process. DNA fragment one end is complementary to the primer base and loaded onto the amplification chip; The other end is complementary to the adapter sequence and primer added so it can form a "bridge" by bending; PCR amplification was used for generating DNA clusters. The DNA amplicon is linearized and added to the DNA polymerase and dNTP with 4 fluorescent labels. Scanned the surface of the reaction plate with a laser to read the nucleotide species polymerized in the first round of each template sequence; Fluorescent and termination tags are stored at the 3'-end; Measured the fluorescence signal results and obtained the sequence of the template DNA fragment in each round.

High-throughput sequencing data analysis

The MiSeq software was used to identify the index sequence on each read and extracted the data. It is saved in fastq format. Fastq format is a text-based format for storing both a biological sequence (usually nucleotide sequence) and its corresponding quality scores. Primers and barcodes were removed using the FLASH algorithm and Trimmomatic software. Barcodes, low-quality fragments, failed reads and tags shorter than 50 bp were also removed.

The reads were classified into OTUs using USEARCH 7.1 [10] for OTU clustering. USEARCH is a method for generating clusters (OTUs) from next-gen-

eration sequencing reads of marker genes such as 16S rRNA. The clustering method itself is the UPARSE-OTU algorithm, implemented as the cluster, OTUs command in USEARCH. To run UPARSE in practice, one needs to run a pipeline of USEARCH commands [10]. Non-repetitive sequences were reduced according to 97% similarities. Removed single reads that did not overlap and, overlapped sequences were clustered into OTUs with a similarity of 97% and chimeric reads were removed during it as well. The obtained OTU were sorted in the map with a similarity of 97% constructed OTU table.

OUT-based species diversity analysis

Alpha diversity

a) Chao1-type estimator

A Chao 1 estimator is used for undetected species in the community and makes more accurate count [11].

$$S_{chaol} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

S_{chaol} = the estimated richness

S_{obs} = the observed number of species

n_1 = the number of OTUs with only one sequence (singletons)

n_2 = the number of OTUs with only two sequences (doubletons)

b) Coverage-based estimator: Abundance-based coverage estimator (ACE)

Coverage is an objective measure of the degree of sample completeness which is interpreted as the proportion of the total number of individuals in a community that belongs to the OTU. The coverage index reflects whether the sequencing results represent the true state of the microorganisms in the sample. The ACE is used to estimate species relative abundances.

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

C = coverage

n_1 = the number of OTUs that have been sampled once

N = the total number of individuals in the sample

$$S_{ACE} = \begin{cases} S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, \text{ for } \hat{V}_{ACE}^2 < 0.80 \\ S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, \text{ for } \hat{V}_{ACE}^2 \geq 0.80 \end{cases}$$

n_1 = the number of OTUs with individuals

S_{rare} = the number of OTUs with 'abund' or fewer individuals

S_{abund} = the number of OTUs with more than 'abund' individuals

'abund' = the threshold to be considered an 'abundant' OTU

c) Shannon index and Simpson index

The Shannon index and Simpson index estimate species richness and evenness in a community.

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i-1)}{N(N-1)}$$

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

S_{obs} = the number of observed OTUs

n_i = the number of individuals in OTU i

N = the total number of individuals in the community

d) Rarefaction curve

A rarefaction curve shows the species richness of the sample, as in the number of observed OTUs as a function of the distance between sequences and the number of sequences sampled [12]. OTU, on the other hand, indicates that further sequencing may also result in newer OTUs. Therefore, by making a dilution curve, the sequencing depth of the sample can be obtained. The R programming language was used for construction.

e) Shannon-Wiener curve

A Shannon-Wiener curve shows the microbial diversity in the sample. It is constructed using the obtained sequencing data of each sample in different coverage. The R programming language was used for construction.

g) Rank abundance curve

A rank abundance curve shows the species richness and species evenness. It was constructed with a number of different species (OTU) obtained and their evenness through the different samples. Each sample OTUs were ordered by its abundance, from large to small. The R programming language was used for construction.

Taxonomy

The Silva, Greengenes, and ribosomal database project (RDP) classifier with a confidence threshold of 70% was applied to assign OTU for the taxonomic approach. In order to obtain the information of each OTU corresponding species, the RDP classifier Bayesian algorithm was used to classify the OTU representative sequence of 97% similarity level: domain, kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species. Statistics of the sample composition of the community comparison database are as follows: 16S bacterial and fungal ribosomal database [13]. SILVA database was a comprehensive online resource for quality-checked and aligned ribosomal RNA sequence data. SILVA provides comprehensive, quality checked and regularly updated datasets of aligned small (16S/18S, SSU) and large subunit (23S/28S, LSU) rRNA sequences for all three domains of life (Bacteria, Archaea, and Eukarya) [14]. Functional gene-extracted data analysis was performed on the FunGene bank (7.3) [15] and QIIME [16].

Results

Bacterial diversity and composition

Alpha diversity

The total reads of each sample (51037 to 81958) were clustered into OTUs (468 to 2292) with a similarity of 97% (**Table 2**). The number of VBKB-b and VBKB-r reads were similar to other samples, but they were clustered into a much smaller number of OTUs, indicating that samples in this area are the least diverse. Sample BM read number was the lowest at 51037 but OTUs were the highest at 2,292, which interprets that BM is the most diverse compared to other samples.

The Chao1, ACE, Shannon, and Simpson indexes were calculated at 97% similarity for representing sample richness and evenness. The Shannon indexes

of samples were between 2.75 and 6.58. The Shannon indexes in VBKB-b and VBKB-r were lower than the rest of the samples, while the Shannon index in BM was the highest. Species richness and evenness are lowest in VBKB-b and VBKB-r and highest in the BM. The Simpson indexes of samples were between 0.0059 and 0.1674. Species richness and evenness in SNB were the highest, while VBKB-b and VBKB-r were the lowest.

Rarefaction curve

Rarefaction curves show sample species richness in graphs. On curve 'a', the horizontal axis shows the num-

ber of reads; the vertical axis is the Shannon index of the sample (**Fig.1**). Sample BM species richness is the highest, and following RSyb, SNB, HT-lb and RS-b, WIKB, HT-db, the least diverse was VBKB-b and VBKBbr. On curve b, the horizontal axis is the number of reads; the vertical direction is the number of OTU of the sample. Evenness and richness are relatively higher in sample BM, and VBKB-b and VBKB-r were again the lowest.

Rank abundance curve

The rank abundance curve graph's horizontal axis is the number of sequences in each OTU across

Table 2. Species richness and evenness of bacterial diversity. The similarity of OTU is 97%.

Sample	Reads	0.97					
		OTU	Chao1	ACE	Coverage	Shannon	Simpson
VBKB b	58664	573	694	705	0.997477	2.92	0.1457
VBKB r	75422	468	567	584	0.998369	2.75	0.1674
RS yb	57324	1948	2170	2177	0.994121	5.77	0.0152
RS b	68150	1827	2156	2165	0.993881	4.63	0.0526
BM	51037	2292	2498	2450	0.994102	6.58	0.0032
HT db	57280	1185	1473	1488	0.994605	4.68	0.0321
HT lb	81958	1916	2272	2284	0.994595	5.16	0.0179
HT b	80949	1492	1805	1841	0.995775	5.22	0.0171
SNB	77528	1938	2115	2124	0.99635	6.09	0.0059
WIKB	68264	1582	1879	1886	0.994609	4.5	0.0524

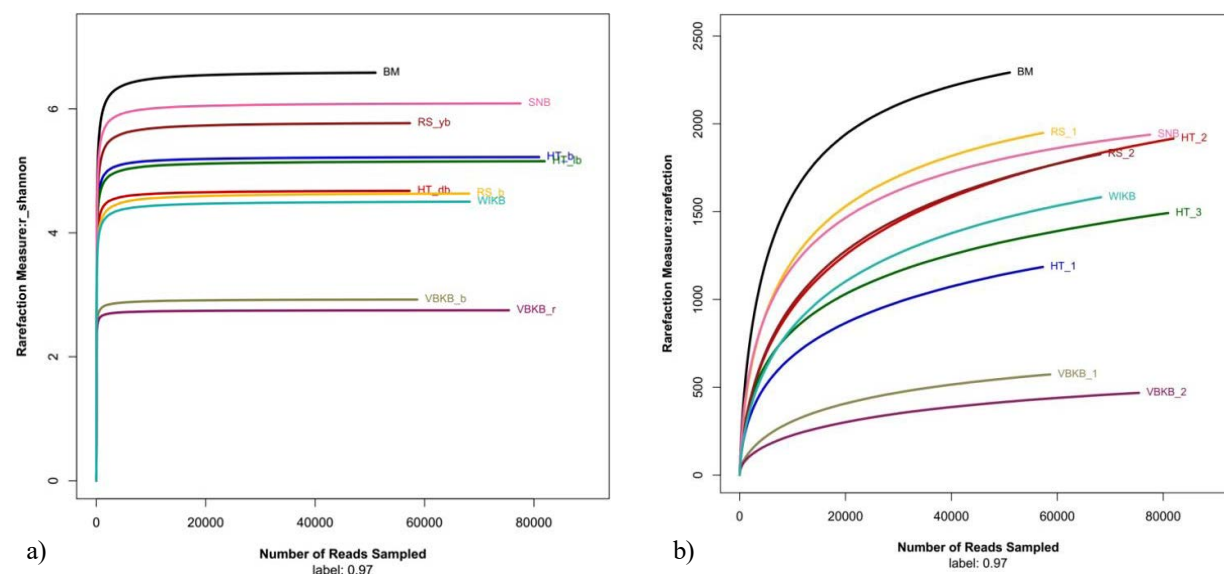


Fig. 1. Rarefaction curves of species richness between samples. a) Shannon index of each sample on the vertical axis and number of reads on the horizontal axis. b) OTU number of each sample on the vertical axis and number of reads on the horizontal axis. The similarity of OTU is 97%.

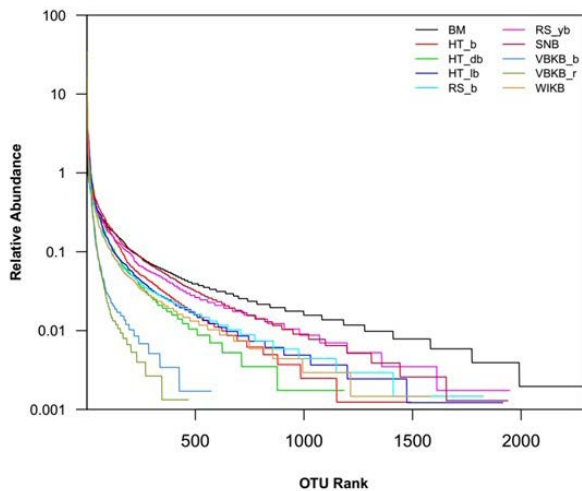


Fig. 2. Bacterial rank abundance distribution curve

all samples (OTU rank); the vertical axis is the relative percentage of the number of sequences in the OTU of each sample (Fig. 2). Compared to samples RS-yb, SNB, HT-lb and RS-b, WIKB, HT-db, sample BM is the most abundant in species and VBKB-b and VBKB-r were the least abundant in species.

Bacterial community structure

The bacterial community bar graph was constructed using relative abundance by percent of family composition in each sample (Fig. 3). In sample BM, bacterial families are evenly distributed. The relative abundance of *Acidobacteriaceae* (8%), *Planctomycetacea* (6%) was higher in BM than in any other samples. *Nocardiaceae* was more abundant in WIKb with (36%), and RS-b (29%); *Streptococcaceae* more abundant in VBKB-b (39%) and VBKB-r (41%). *Bacillaceae* was the highest family in VBKB-b (16%) and VBKB-r (20%) compared to other samples. Less than 1% bacterial families were considered as 'Other'.

The bacterial composition in phylum level and similarity of sample

On the left is a hierarchical clustering analysis based on community composition between samples using the Bray-Curtis algorithm, and on the right is a histogram of the community structure of the sample (Fig. 4). 9 main phyla were dominant in the community structure. Actinobacteria were more abundant in HT-b, HT-db, HT-lb,

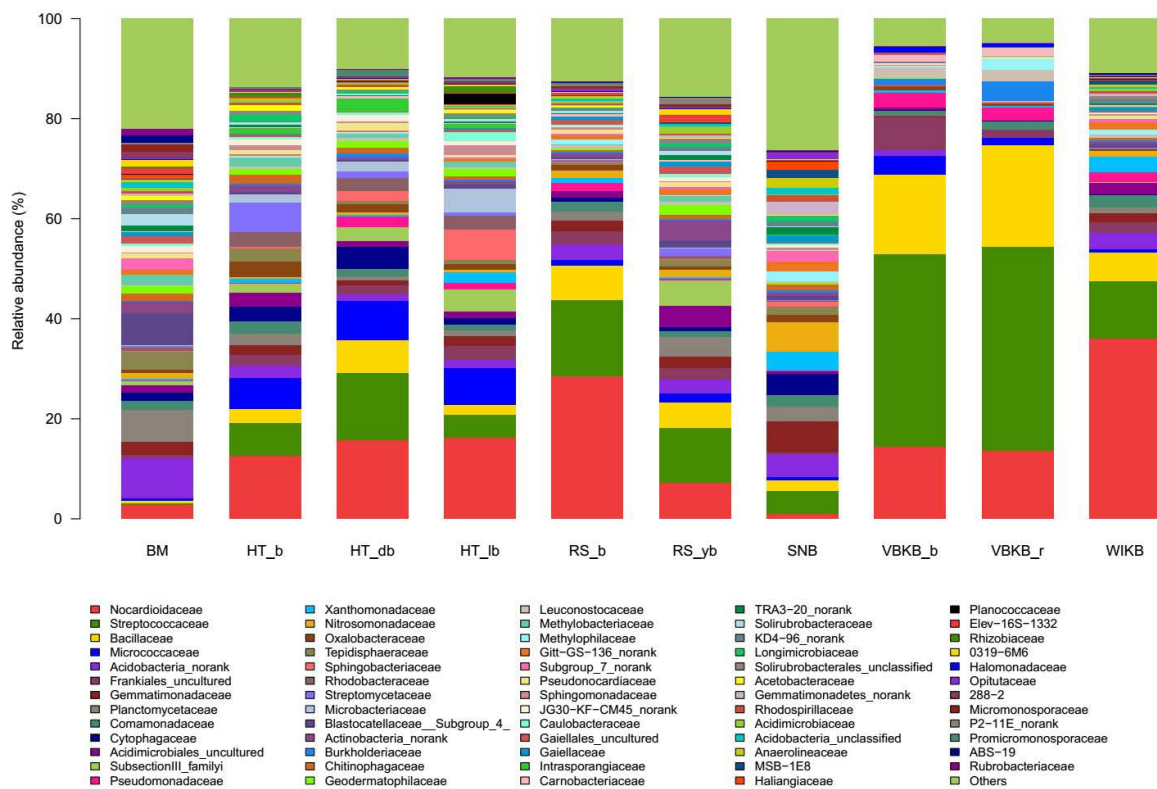


Fig. 3. Bacterial community bar graph by family, relative abundance by percentage.

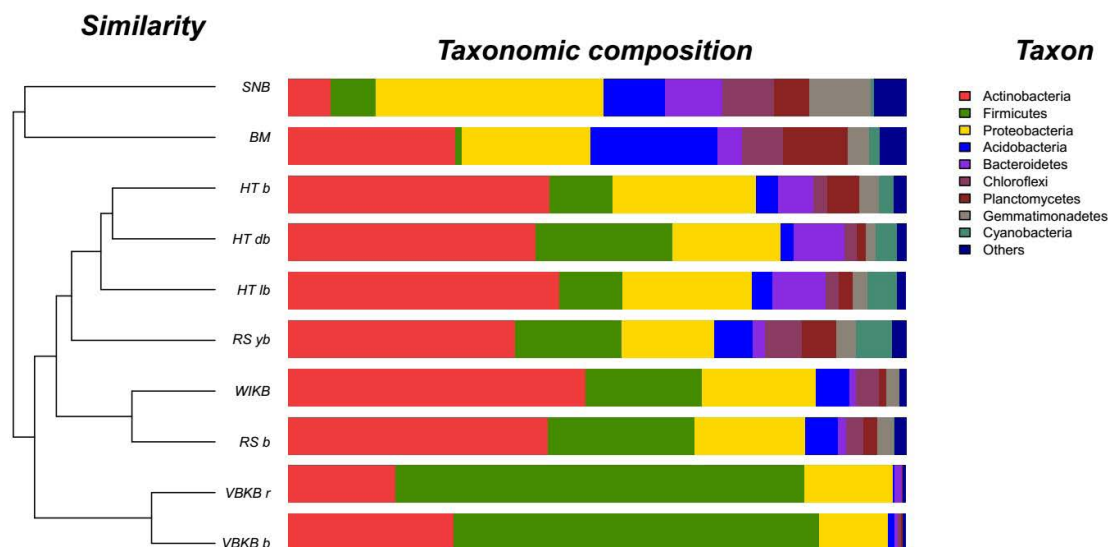


Fig. 4. Bacterial community phylum bar graph with cluster tree.

RS-yb, WIKB, and RS-b, *Firmicutes* were more abundant in sample VBKB-r and VBKBb, *Proteobacteria* in SNB, *Acidobacteria* in BM, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, and *Cyanobacteria* were less dominant in the samples.

Heatmap of bacterial community

The bacterial family structures were clustered into relative abundance and abundance similarity was 0 to 42.18%, blue to red (Fig. 5). Families *Nocardiaceae*, *Streptococcaceae*, and *Bacillaceae* were most abundant in all samples compared to other families. The abundance of the families among the samples, VBKB-r and VBKB-b was the lowest, and RS-yb and BM were the most abundant.

Discussion

The purpose of studying microbiome is to gain the knowledge of microorganism function and their roles in the microbial system and the interactions to each other, in order to find the better evaluation and manipulation to prevent negative environmental impacts [17], [18]. The mining area is considered a potentially toxic metal-polluted area, which will cause bacterial diversity changes on these sites. All organisms including plants, animals,

and microorganisms play bioindicators roles. Here, Zaamar mining soil sample's bacterial diversity and community structure were analyzed using high-throughput sequencing data.

The samples were randomly collected from Zaamar gold mining non-remediated area and non-mining interacted area for evaluating microbial diversity for monitoring the influence of mining processes. According to the results (Table 2), species richness in the BM sample was significantly different from other samples. The BM sample was taken from soil that did not directly interact with the mining area (Bayasgalant Mountain). Bacterial species richness and evenness were higher in BM compared with other samples from mining operation-related areas. These interacted samples' bacterial species richness was up to 1.17-4.8 times greater than sample BM.

Ji et al. [4]. studied microbial communities from gold mine tailings and found that the major phyla of the communities were *Firmicutes* (3.2%-92.4%), *Proteobacteria* (4.3-37.2%), and *Actinobacteria* (1.62-29.5%). In this study, at the phylum level, 9 main phyla were the major bacterial community structure. But in samples from mining operations VBKB-b and abandoned mining area sample VBKBb, 3 phyla were dominant in the bacterial composition, *Firmicutes* (59-66%), *Actinobacteria* (17.4-26.8%), *Proteobacteria* (11-14%) and other bacterial phyla were less than 1%. Other site samples' bac-

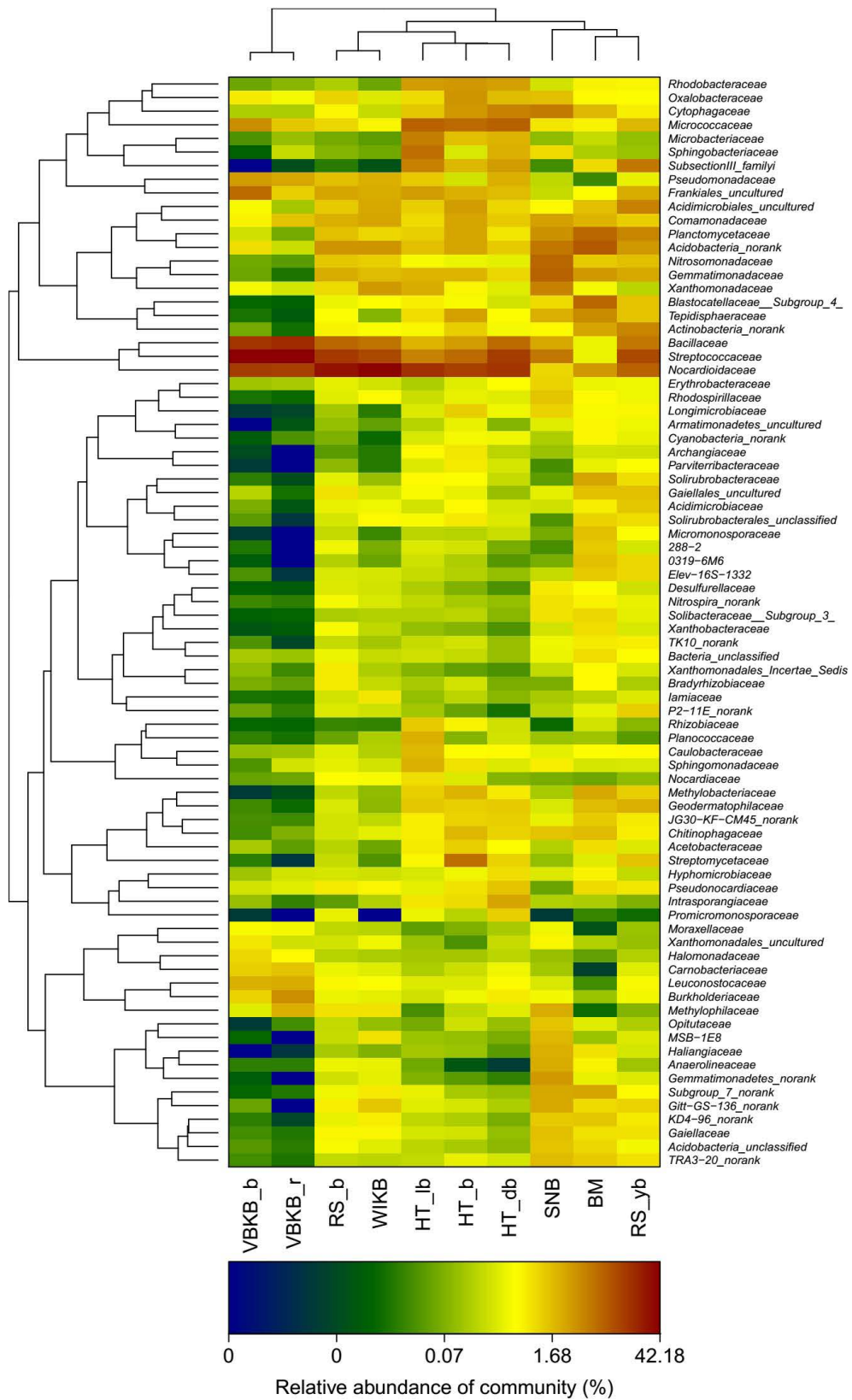


Fig. 5. Heat map of bacterial family.

terial community structures were quite similar to Hongbing et al. but *Planctomycetes* (1-10%) was considerably higher.

Conclusion

In this study, bacterial diversity was studied using 16S rRNA sequencing technology and further analysis was done for evaluating using an OUT-based analysis and visualizing the results using an alpha diversity analysis.

In conclusion, bacterial diversity and their composition were significantly different in mining process-related areas and non-related areas. Nonrelated area samples showed a higher abundance in species, OTUs, and composition compared to mining process-related areas. Alpha diversity rarefaction curves, rank abundance curve, bacterial community bar, bacterial community phylum bar graph with cluster tree, and heat map graphs showed the visualization of samples and the relatedness of samples. Bacterial community samples from non-related mining are BM's bacterial families and are evenly distributed whereas mining-related samples showed less distribution. *Nocardiaceae* was the most abundant in sample WIKb with 36%, in sample RS-b with 29%; *Streptococcaceae* in samples VBKB-b (39%) and VBKB-r (41%) and *Bacillaceae* were also the highest in VBKB-b (16%) and VBKB-r (20%) compared to other samples.

Acknowledgments

We would like to thank the Mongolian Foundation for Science and Technology and Prof. Zhong Wei Hong, for giving me the opportunity, support, and trust to conduct this study in his group. We also would like to thank the faculty of Biology at the Zhejiang University of Technology.

References

- [1] E. J. Gray and D. L. Smith, "Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 37, no. 3, pp. 395-412, Mar. 2005, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>.
- [2] M. A. Polti, J. D. Aparicio, C. S. Benimeli, and M. J. Amoroso, "Simultaneous bioremediation of Cr(VI) and lindane in soil by actinobacteria," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 88, pp. 48-55, Mar. 2014, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.004>.
- [3] T. Halttunen, S. Salminen, and R. Tahvonen, "Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 114, no. 1, pp. 30-35, Feb. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040>.
- [4] H. Ji, Y. Zhang, P. Bararunyeretse, and H. Li, "Characterization of microbial communities of soils from gold mine tailings and identification of mercury-resistant strain," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 165, pp. 182-193, Dec. 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.011>.
- [5] J. Thorslund, J. Jarsjö, S. R. Chalov, and E. V. Belozeroва, "Gold mining impact on riverine heavy metal transport in a sparsely monitored region: the upper Lake Baikal Basin case," *J. Environ. Monit.*, vol. 14, no. 10, p. 2780, 2012, <https://doi.org/10.1039/c2em30643c>.
- [6] M. Kida, O. Myangan, B. Oyuntsetseg, V. Khakhinov, M. Kawahigashi, and N. Fujitake, "Dissolved organic matter distribution and its association with colloidal aluminum and iron in the Selenga River Basin from Ulaanbaatar to Lake Baikal," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 25, no. 12, pp. 11948-11957, Apr. 2018, <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1462-z>.
- [7] B. Batsaikhan et al., "Hydrochemical evaluation of the influences of mining activities on river water chemistry in central northern Mongolia," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 24, no. 2, pp. 2019-2034, Jan. 2017, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7895-3>.
- [8] Choidash B, *Microbiology practicum*. UB Art Science 2007, 2011.
- [9] J. G. Caporaso et al., "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. 4516-4522, Mar. 2011, <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.
- [10] R. C. Edgar, "UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 10, pp. 996-998, Oct. 2013, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>.
- [11] A. Chao and C. Chiu, "Species Richness: Estimation and Comparison," in Wiley StatsRef: Statistics Reference

- Online, 1st ed., N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorsch, F. Ruggeri, and J. L. Teugels, Eds. Wiley, 2016, pp. 1–26. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat03432.pub2>.
- [12] “rarefaction.single.” <https://mothur.org/wiki/rarefaction.single/> (accessed Feb. 13, 2022).
- [13] S. F. Stoddard, B. J. Smith, R. Hein, B. R. K. Roller, and T. M. Schmidt, “rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D593–D598, Jan. 2015, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- [14] “Silva.” <https://www.arb-silva.de/> (accessed Feb. 13, 2022).
- [15] “Functional Gene Pipeline / Repository.” <http://fungene.cme.msu.edu/index.spr> (accessed Feb. 13, 2022).
- [16] J. G. Caporaso *et al.*, “QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 5, pp. 335–336, May 2010, <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- [17] K. E. Giller, E. Witter, and S. P. Mcgrath, “Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 30, no. 10–11, pp. 1389–1414, Sep. 1998, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8).
- [18] P. Bridge and B. Spooner, “Soil fungi: Diversity and detection,” *Plant Soil*, vol. 232, pp. 147–154, May 2001, <https://doi.org/10.1023/A:1010346305799>.

**Заамар сумын алтны уурхай орчмын хөрсний бактерийн олон янз байдал**Дамдинсүрэн НАРАНТУЯА¹ , Чойдаш БАТЦЭЦЭГ^{1,*} , Содбаатар НАРАНЖАРГАЛ² ¹Монгол улсын их сургууль, Шинжлэх ухааны сургууль, Байгалийн ухааны салбар, Биологийн тэнхим, Улаанбаатар, Монгол Улс²Мал эмнэлгийн хүрээлэн, Хүнсний аюулгүй байдал ба эрүүл ахуйн лаборатори, Улаанбаатар, Монгол Улс*Холбоо барих зохиогч: battsetseg@num.edu.mn, <https://orcid.org/0000-0001-8516-2452>

Хураангуй. Уул уурхайн үйл ажиллагаа явуулаагүй талбайгаас авсан дээжний бичил биетний олон янз байдал нь уул уурхайн үйлдвэрлэл явуулж байгаа газраас авсан дээжтэй харьцуулахад нэлээд их байсан. Бактерийн бүлгэмдлийн бүтцэд есөн фила давамгайлж байв. Харин бактерийн бүлгэмдлийн хувьд уурхайн ашиглалтын талбайгаас авсан дээжинд VBKB-b, орхигдсон уурхайн дээжинд VBKB-b, 3 төрлийн Firmicutes (59-66%), Actinobacteria (17.4-26.8%), Proteobacteria (11-14%) зонхилж байна.

Түлхүүр үгс: уурхайн хөрс, ДНХ-ийн секвенсийн технологи, бактерийн олон янз байдал

Хүлээн авсан 2022.09.15; хянан тохиолдуулсан 2022.11.09; зөвшөөрсөн 2022.12.09

© 2022 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).**Оршил**

Сүүлийн жилүүдэд металл биосорбцийн чадвартай олон төрлийн микробууд илэрсэн. Үүнд төрөл бүрийн ризобактерууд (*Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Serratia*) [4], актинобактерийн төрөл болох *Streptomyces* spp болон *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 [5] болон лактик хүчлийн бактер (*Bifidobacterium longum* 46, *B. lactis* Bb12, *Lactobacillus fermentum* ME3) орно [6].

Ji нар [7] мөнгөн ус гадагшлуулж бохирдсон алт олборлодог газар нутгийг судалж үзээд мөнгөн ус, хар тугалга нь бактерийн бүлгэмдлийн бүтцэд нөлөөлөх ба Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria зэрэг нь бүлгэмдэлд зонхилох бүлэг болохыг тогтоожээ. Түүнчлэн, Hg-ийг тэсвэрлэх чадвартай бактерийн төрлийг ялгаж, *Pseudomonas plecoglossicida* гэж тодорхойлсон. Тэсвэрлэх чадвар нь 30 мг/л хүртэл байсан.

Заамарын алт олборлолтын талбайг хүнд металлын бохирдол ихтэй бүс нутаг гэж мэдээлж

байсан бөгөөд Байгаль нууртай холбогддог Туул голын дагуу оршдог. Байгаль нуурын хүнд металлын агууламж ч энэ шалтгааны улмаас нэмэгдсэн байна [1], [2], [8]. Бичил биетнүүд тодорхой газар нутгийн экологийн тэнцвэрт байдалд чухал үүрэг гүйцэтгэдэг, үүнд азотын эргэлт, ургамлын өсөлтийг дэмжих, органик хог хаягдлыг задлах гэх мэт. Бактерийн төрөл зүйл элбэг байгаа нь хүрээлэн буй орчны эрүүл ахуйн байдлыг илтгэнэ.

Материал, арга зүй**Хөрсний дээж цуглуулсан цэгүүд**

Хөрсний дээжийг Монголын төв хойд хэсэгт оршдог, хүйтэн хагас хуурай уур амьсгалтай гэж тооцогддог Төв аймгийн Заамар сумын алтны уурхайн талбайгаас авсан. Төв аймгийн хувьд дундаж температур -18°C-аас 0°C орчим, жилийн хур тунадас 267 миллиметр [3]. Дээжийг есдүгээр сард цуглуулсан. Хөрсний дээжийн байршил, мэдээллийг 1-р хүснэгтэд үзүүлэв.

1р хүснэгт. Хөрсний дээжний мэдээлэл

Дээжний нэр	Байршил	Координаци	Өндөршил, м	pH
VBKB b (уурхай орчмын газар)	Хайлааст багийн арын хөндий	N 48°18'255" E 104°24'638"	943	9.1
VBKB br (орхигдсон уурхайн талбай)	Хайлааст багийн арын хөндий	N 48°18'255" E 104°24'638"	943	9.41
RS yb (уурхай орчмын газар)	Улаан хөрсний хөдөлгөөний өсөлт	N 48°18'462" E 104°24'962"	950	8.69
RS b (уурхай орчмын газар)	Улаан хөрсний хөдөлгөөний өсөлт	N 48°18'462" E 104°24'962"	950	8.7
BM (non-interacted)	Баясгалант уул	N 48°21'245" E 104°30'133"	950	8.22
HT db (уурхай орчмын газар)	Баянгол	N 48°22'000" E 104°29'886"	914	8.18
HT lb (уурхай орчмын газар)	Хайлаастын амны хөндий	N 48°22'000" E 104°29'886"	916	8.39
HT b (уурхай орчмын газар)	Хайлаастын амны хөндий	N 48°22'000" E 104°29'886"	916	8.44
WIKb (Худаг орчмын хөрс)	Хайлааст багийн худаг	N 48°18'978" E 104°26'017"	984	8.8
SNB (Худаг орчмын хөрс)	Хайлааст багийн худаг	N 48°18'978" E 104°26'017"	984	8.2

Дээж авах, хадгалах

Дээж авахдаа эхлээд 3-5 см хөрсний дээд хэсгийг хуулж, дээж бүрийг ариутгасан хүрз, Бунсен дэн ашиглан цуглуулсан. Дараа нь талбай бүр дээр 150-200 гр орчим хөрсийг шошготой ариутгасан полиэтилен уутанд [9] шилжүүлж, тус бүр 20 г хөрсний дээжийг Zhejiang технологийн их сургуулийн лабораторид хүргүүлсэн. Цуглуулсан дээжийг шинжилгээний өмнө болон туршилтын явцад 4°C-т хадгалсан. Хөрсний дээж бүрээс 6 г битүүмжилсэн полиэтилен уутанд хийж, хөргөлттэй хадгалах хайрцагт хадгалсан. Хөрсний дээжийг MiSeq өндөр бүтээмжтэй технологиор секвенсийг тогтоохоор Hangzhou Legenomics Bio-Pharm Technology компани руу илгээсэн.

MiSeq системийн бэлтгэл

а) Эхлээд геномын ДНХ-ийн экстрактыг ялгаж, 1% агар гель электрофорез дээр шалгасан.

б) Секвенсийн праймерын сонголт

16S rRNA хувьсах бүсийн секвенсид баркод бүхий

хамрах бүсийн тусгай праймерыг ашигладаг. 515F/806R праймеруудыг [10] прокариотуудад ашигласан.

Forward праймер: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
Reverse праймер: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

в) ПГУ-ын олшруулалт ба цэвэршүүлэх

ПГУ-ын олшруулалтыг зааврын дагуу хийж, өндөр хүчин чадалтай дулааны циклийг хэрэглэн ABI GeneAmp 9,700 ПГУ-ын системийг ашигласан. Прокариот V4 бүсийг олшруулахын тулд ПГУ-ын урвалын хольц нь дараах байдалтай байна: ПГУ-ын зэрэглэлийн ус 13.0 µL, ПГУ-ын мастер хольц (2x) 10.0 µL, урагшлах (forward) праймер (10 µM) 0.5 µL, урвуу (reverse) праймер (10 µM) 0.5 µL ба загвар ДНХ 1.0 µL нийт урвалын хэмжээ 25.0 µL. ПГУ-ын термоциклийн нөхцлүүд нь дараах байдалтай байна: 94°C-т 3 минутын турш анхны денатураци, 94°C-т 45 секундын турш денатураци хийх, 50°C-т 60 секундын турш задлах, 72°C-т 90 секунд үргэлжлэх ба үе шат

бүр 35 удаа давтагдана, 72°C-г 10 минут сунгаж, 4°C-г барина. Дээж тус бүр 3 давталттай 25 µL ПГУ-ын урвалыг олшруулсан. Дээж бүрийн ампликонуудыг агароз гель дээр гүйлгэж шалгав.

г) ПГУ-ын бүтээгдэхүүний тоо хэмжээ, гомогенизаци

Электрофорезыг ампликоны хэмжээг тодорхойлоход ашиглаж, PicoGreen dsDNA холбогч будагч бодисоор туршсан ба дээж бүрээс авсан ампликоныг нэг ариутгасан тюбинд нэгтгэж, Tris HCl-ээр шингэлж, 80% этилийн спирт ашиглан цэвэршүүлсэн. Цэвэр ампликоны концентрацийг хэмжих A260/A280 харьцаа 1.8-2.0 хооронд байна.

д. MiSeq хос төгсгөлийн сангийн бүтэц: Цэвэршүүлсэн ДНХ нь Y адаптертай холбогдсон. Холбогчийг өөрөө холбосон хэсгүүдийг арилгахын тулд соронзон бөмбөлгүүдийг ашигласан. Дараа нь ПГУ-ыг санг баяжуулахад ашигласан. Сангуудыг нэг утаслагтай ДНХ-ийн фрагментийг натрийн гидроксидоор денатураци болгож, MiSeq секвенсид оруулахын өмнө халуунаар денатурацид оруулсаны дараа эрлийзжүүлэх буферээр шингэлнэ.

е) MiSeq өндөр бүтээмжтэй секвенс

Сан бий болсны дараа секвенсийн процесст шилжсэн. ДНХ-ийн фрагментийн нэг төгсгөл нь праймерын суурьтай нэмэлт бөгөөд олшруулах чип дээр ачаалагдсан; Нөгөө төгсгөл нь адаптерийн дараалалд нэмэлт бөгөөд праймер нэмсэн тул гулзайлгах замаар "гүүр" үүсгэх боломжтой; ДНХ-ийн кластер үүсгэхийн тулд ПГУ-ын олшруулалтыг ашигласан. ДНХ-ийн ампликоныг шугаман болгож, ДНХ полимераза болон dNTP-д 4 шошготой флюоресцентийг нэмнэ. Загвар бүрийн секвенсийн эхний шатанд полимержсэн нуклеотидын төрлийг уншихын тулд урвалын хавтангийн гадаргууг лазераар сканнердсан; Флюоресцент ба төгсгөлийн шошго нь 3'-төгсгөлд хадгалагддаг; Флюоресценцийн дохионы үр дүнг хэмжиж, тойрог бүрт загвар ДНХ-ийн фрагментийн секвенсийг олж авсан.

Өндөр бүтээмжтэй секвенсийн өгөгдөлд дүн шинжилгээ хийх

MiSeq программ хангамжийг уншсан, задалсан өгөгдөл бүрийн индексийн секвенсийг тодорхойлоход

ашигласан. Энэ нь fastq форматаар хадгалагддаг. Fastq формат нь биологийн секвенс (ихэвчлэн нуклеотидын дараалал) болон түүний чанарын оноог хоёуланг нь хадгалахад зориулагдсан текстэд суурилсан формат юм. Праймер болон баркодыг FLASH алгоритм болон Trimmomatic программ хангамжийг ашиглан устгасан. Мөн баркод, чанар муутай фрагмент, уншигдалт амжилтгүй болсон, 50 bp-ээс богино тэмдэглэгээг устгасан. Уншсан мэдээллийг OTU кластерын хувьд USEARCH 7.1 [11] ашиглан OTU-д ангилсан. USEARCH нь 16S rRNA гэх мэт маркер генүүдийн дараагийн үеийн секвенсийн уншилтаас кластер (OTU) үүсгэх арга юм. Кластер хийх арга нь өөрөө USEARCH дээр кластер, OTUs команд хэлбэрээр хэрэгжсэн UPARSE-OTU алгоритм юм. UPARSE-г практикт ажиллуулахын тулд USEARCH командуудын шугамыг ажиллуулах шаардлагатай [11]. 97% ижил төстэй байдлын дагуу давтагдахгүй секвенсийг багасгасан. Давхцаагүй, давхцсан секвенсийг 97%-ийн ижил төстэй OTU-д нэгтгэж, химерик уншилтуудыг мөн устгасан. Хүлээн авсан OTU-г зураг дээр 97% ижил төстэй байдлаар эрэмбэлж OTU хүснэгтийг бүтээсэн.

OTU-д суурилсан зүйлийн олон янз байдлын шинжилгээ

Альфа олон янз байдал

а) Chaol төрлийн тооцоологч

Chaol тооцоологчийг бүлгэмдэлд илрээгүй зүйлүүдэд ашигладаг бөгөөд илүү нарийвчлалтай тоолдог [12].

$$S_{chaol} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

Schaol = тооцоолсон баялаг байдал

Sobs = ажиглагдсан зүйлийн тоо

n1 = зөвхөн нэг секвенс бүхий OTU-ийн тоо (синглтон)

n2 = зөвхөн хоёр секвенс бүхий OTU-ийн тоо (даблетон)

б) Хамрах хүрээний тооцоологч: харьцангуй арвид

суурилсан хамрах хүрээний тооцоологч (ACE)

Хамрах хүрээ нь "түүврийн иж бүрэн байдлын зэрэг"-ийн бодит хэмжүүр бөгөөд энэ нь OTU-д харьяалагдах бүлгэмдлийн нийт индивидуалын эзлэх хувь гэж тайлбарлагддаг. Хамрах хүрээний индекс бол секвенсийн үр дүн нь дээж дэх бичил биетний жинхэнэ төлөв байдлыг илэрхийлж байгаа эсэхийг харуулдаг. ACE нь зүйлийн харьцангуй баялаг байдлыг тооцоолоход хэрэглэгддэг.

$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

C = хамрах хүрээ

n_1 = нэг удаа дээж авсан OTU-ийн тоо

N = түүвэрт хамрагдсан индивидуалын нийт тоо

$$S_{ACE} = \begin{cases} S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, for \rho_{ACE}^2 < 0.80 \\ S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{n_1}{C_{ACE}}, for \rho_{ACE}^2 \geq 0.80 \end{cases}$$

n_1 = индивидуал бүхий OTU-ийн тоо

S_{rare} = "элбэг" буюу цөөн тооны индивидуалтай OTU-ийн тоо

S_{abund} = олон тооны индивидуалтай OTU-ийн тоо

'abund' = 'элбэг' OTU гэж үзэх босго

в) Shannon индекс ба Simpson индекс

Shannon индекс ба Simpson индекс нь бүлгэмдлийн зүйлийн баялаг, жигд байдлыг үнэлдэг.

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i-1)}{N(N-1)}$$

$$H_{shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

S_{obs} = ажиглагдсан OTU-ийн тоо

n_i = OTU i -д байгаа индивидуалын тоо

N = бүлгэмдэл дэх нийт индивидуалын тоо

г) Ховор байдлын муруй

Ховоржилтын муруй нь дээжийн төрөл зүйлийн

баялаг байдлыг харуулдаг, тухайлбал ажиглагдсан OTU-ийн тоо нь секвенс хоорондын зай болон дээж авсан секвенсийн тооноос хамаарч байна [13]. Нөгөө талаас OTU нь цаашдын секвенс нь шинэ OTU-г үүсгэж болзошгүйг харуулж байна. Тиймээс шингэрүүлэлтийн муруйг хийснээр дээжийн секвенсийн гүнийг олж авах боломжтой. Бүтцийн ажилд R програмчлалын хэл ашигласан.

д) Shannon-Wiener -ийн муруй

Shannon-Wiener -ийн муруй нь дээж дэх бичил биетний олон янз байдлыг харуулж байна. Энэ нь янз бүрийн хамрах хүрээний дээж бүрийн олж авсан секвенсийн өгөгдлийг ашиглан бүтээгдсэн болно. Бүтцийн ажилд R програмчлалын хэл ашигласан.

е) Зэрэглэлийн харьцангуй арвийн муруй

Зэрэглэлийн харьцангуй арвийн муруй нь зүйлийн баялаг, зүйлийн жигд байдлыг харуулдаг. Энэ нь янз бүрийн дээжээс олж авсан янз бүрийн зүйл (OTU) ба тэдгээрийн жигд байдлыг харгалзан бүтээжээ. Дээж бүрийг томоос жижиг хүртэл харьцангуй арвиар нь эрэмбэлсэн. Бүтцийн ажилд R програмчлалын хэл ашигласан.

Таксономи

Таксономийн аргад OTU оноохдоо 70%-ийн итгэлцүүрийн босго бүхий Silva, Greengenes болон рибосомын мэдээллийн сангийн төслийн (RDP) ангилагчийг ашигласан. OTU-ийн харгалзах зүйл бүрийн мэдээллийг олж авахын тулд RDP ангилагч Bayesian алгоритмыг ашиглан 97% ижил төстэй байдлын түвшний OTU төлөөлөгчийн секвенсийг дараах байдлаар ангиллаа: домэйн, аймаг, хүрээ, анги, бүлэг, овог, төрөл, зүйл. Бүлгэмдлийн харьцуулсан мэдээллийн сангийн дээжийн бүрэлдэхүүний статистикийг дараах байдлаар үзүүлэв: 16S бактери ба мөөгөнцрийн рибосомын мэдээллийн сан [14]. SILVA мэдээллийн сан нь рибосомын PHX-ийн секвенсийн мэдээллийн чанарыг шалган, зэрэгцүүлсэн онлайн нөөц юм. SILVA нь амьдралын гурван талбарт (Бактери, Архей, Эукариа) зориулагдсан жижиг (16S/18S, SSU) болон том дэд нэгж (23S/28S, LSU) рPHX-ийн секвенсээр иж бүрэн, чанартай шалгагдсан, тогтмол шинэчлэгддэг мэдээллийн багцыг хангадаг [15]. Функциональ

генээс гаргаж авсан өгөгдлийн шинжилгээг FunGene банк (7.3) [16] болон QIIME [17] дээр хийсэн.

Үр дүн

Бактерийн олон янз байдал, бүрэлдэхүүн

Альфа олон янз байдал

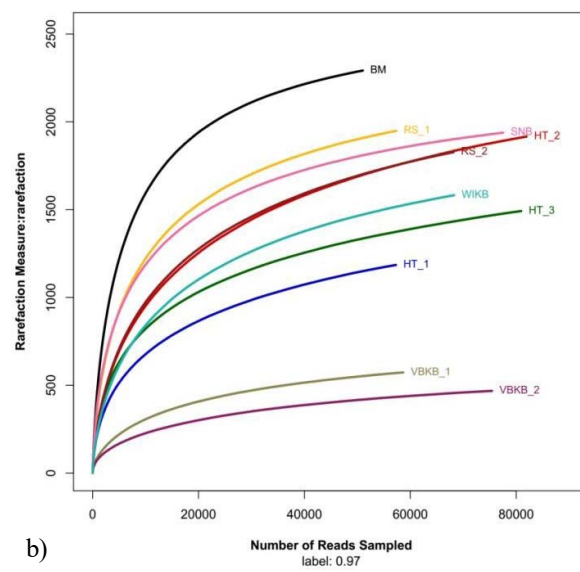
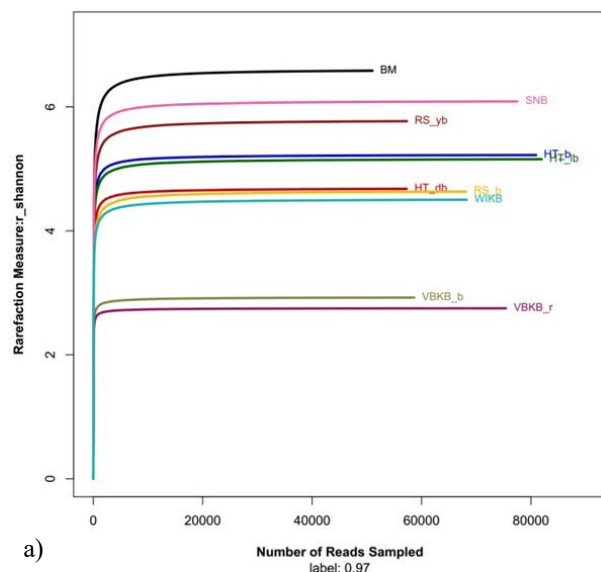
Дээж тус бүрийн нийт уншилтыг (51037-аас 81958 хүртэл) 97% ижил төстэй байдлаар OTU-д (468-аас 2292) нэгтгэсэн (2-р хүснэгт). VBKB-б болон VBKB-

г-ийн уншигдах тоо бусад дээжтэй төстэй байсан ч тэдгээр нь хамаагүй бага тооны OTU-д нэгтгэгдсэн нь энэ хэсгийн дээжүүд хамгийн бага ялгаатай байгааг харуулж байна. Түүврийн BM уншсан тоо хамгийн бага нь 51037 байсан ч OTU нь 2292 буюу хамгийн өндөр нь байсан нь бусад дээжтэй харьцуулахад BM нь хамгийн олон янз байна гэж тайлбарлаж байна.

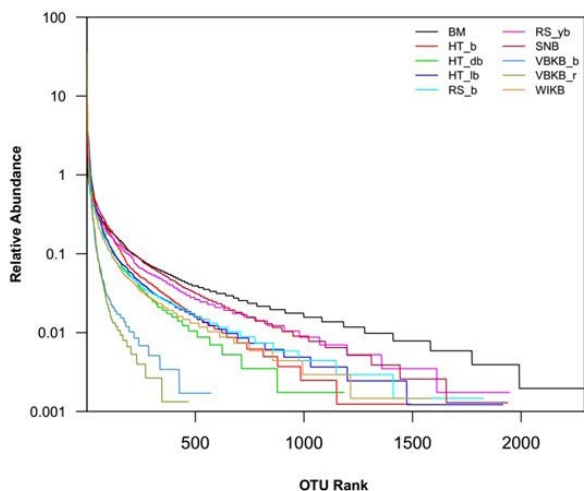
Chao1, ACE, Shannon, Simpson индексийг түүврийн баялаг, тэгш байдлыг илэрхийлэхийн тулд 97% ижил төстэй байдлаар тооцоолсон. Түүврийн Shannon индекс 2.75-6.58 хооронд байна. VBKB-б

2-р хүснэгт. Зүйлийн баялаг, бактерийн олон янз байдлын жигд байдал. OTU-ийн ижил төстэй байдал 97% байна.

Дээж	Уншилт	0.97					
		OTU	Chao1	ACE	Хамрах хүрээ	Shannon	Simpson
VBKB б	58664	573	694	705	0.997477	2.92	0.1457
VBKB г	75422	468	567	584	0.998369	2.75	0.1674
RS yb	57324	1948	2170	2177	0.994121	5.77	0.0152
RS б	68150	1827	2156	2165	0.993881	4.63	0.0526
BM	51037	2292	2498	2450	0.994102	6.58	0.0032
HT db	57280	1185	1473	1488	0.994605	4.68	0.0321
HT lb	81958	1916	2272	2284	0.994595	5.16	0.0179
HT б	80949	1492	1805	1841	0.995775	5.22	0.0171
SNB	77528	1938	2115	2124	0.99635	6.09	0.0059
WIKB	68264	1582	1879	1886	0.994609	4.5	0.0524



1-р зураг. Дээж хоорондын зүйлийн баялаг ховор тохиолдох муруй. а) Босоо тэнхлэг дээрх дээж бүрийн Шеннон индекс ба хэвтээ тэнхлэгт уншсан тоо. б) Босоо тэнхлэг дээрх дээж бүрийн OTU дугаар, хэвтээ тэнхлэгт уншсан тоо. OTU-ийн ижил төстэй байдал 97% байна.



2-р зураг. Бактерийн зэрэглэлийн харьцангуй арвийн тархалтын муруй.

ба VBKB-г дахь Shannon -ы индекс бусад түүврээс доогуур байсан бол BM дахь Shannon индекс хамгийн өндөр байна. Зүйлийн баялаг, тэгш байдал нь VBKB-б ба VBKB-г-д хамгийн бага, BM-д хамгийн өндөр байна. Түүврийн Simpson -ы индекс 0.0059-0.1674 хооронд байна. SNB дахь зүйлийн баялаг,

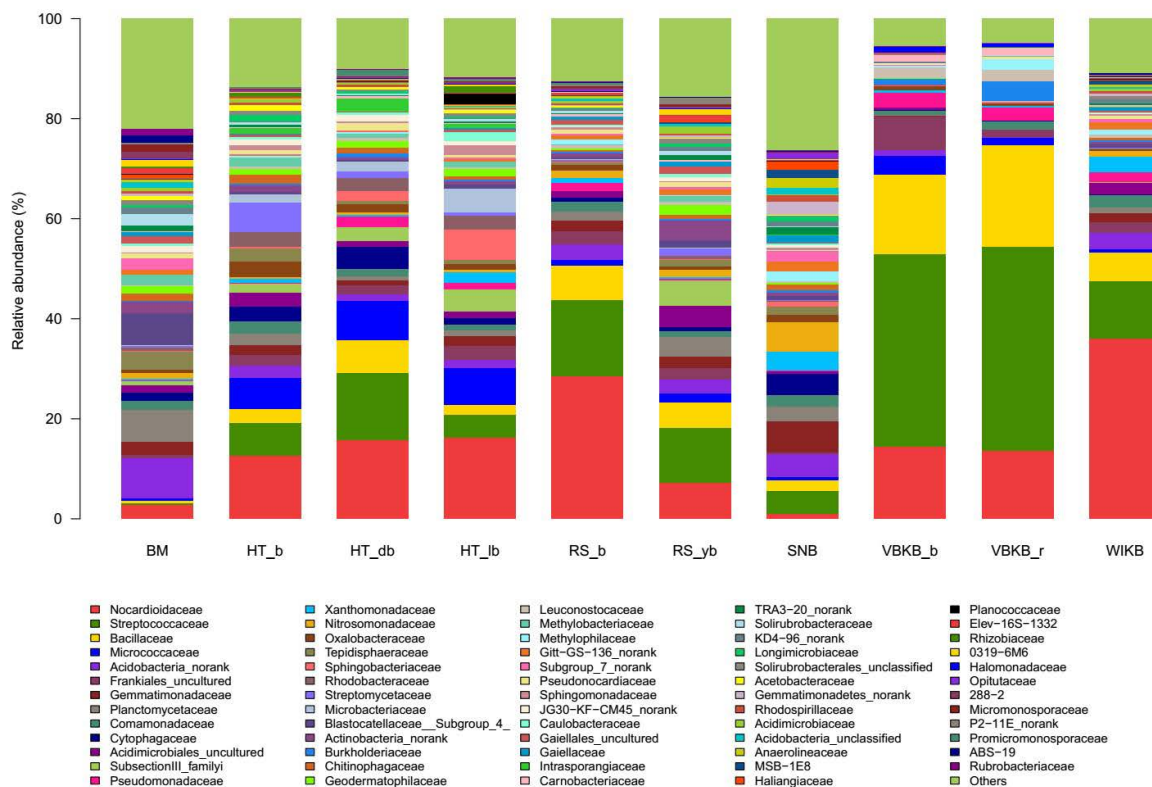
тэгш байдал хамгийн өндөр байсан бол VBKB-б болон VBKB-г хамгийн бага байв.

Ховор байдлын муруй

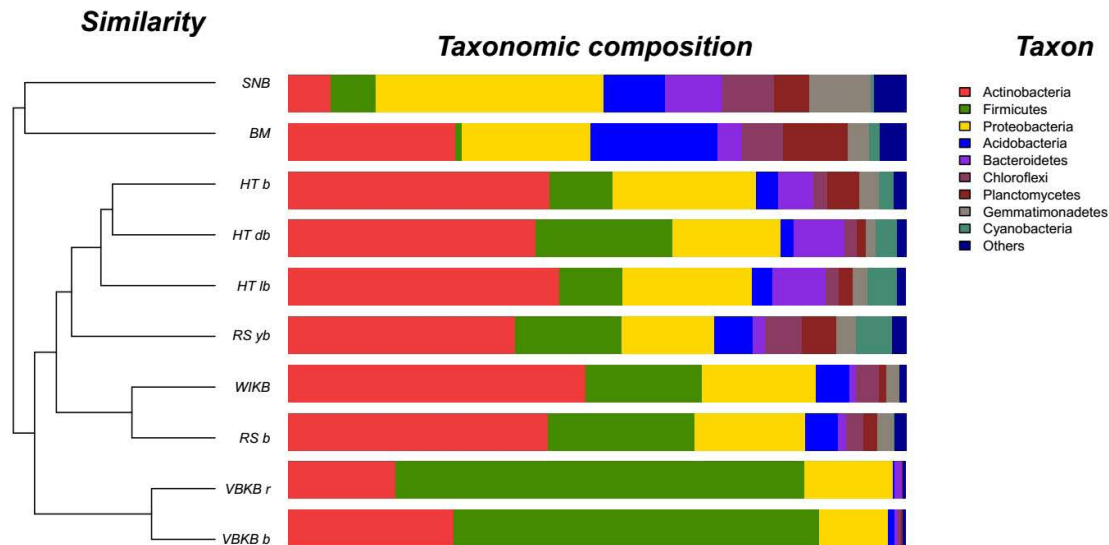
Ховор байдлын муруй нь дээжийн төрөл зүйлийн баялаг байдлыг графикаар харуулдаг. 'a' муруй дээр хэвтээ тэнхлэг нь уншсан тоог харуулна; босоо тэнхлэг нь дээжийн Shannon индекс юм (**1-р зураг**). Дээжийн BM зүйлийн баялаг хамгийн өндөр бөгөөд RSyb, SNB, HT-lb болон RS-b, WIKB, HT-db-ийн дараа хамгийн бага ялгаатай нь VBKB-б, VBKBbr байв. 'b' муруй дээр хэвтээ тэнхлэг нь уншсан тоо; босоо чиглэл нь дээжийн OTU-ийн тоо юм. Түүврийн BM-ийн тэгш байдал, баялаг нь харьцангуй өндөр, VBKB-б болон VBKB-г нь дахиад хамгийн бага байв.

Зэрэглэлийн харьцангуй арвийн муруй

Зэрэглэлийн харьцангуй арвийн графикийн хэвтээ тэнхлэг нь бүх дээж дээрх OTU тус бүрийн секвенсийн тоо юм (OTU зэрэг); босоо тэнхлэг нь дээж бүрийн OTU дахь секвенсийн тооны харьцангуй хувь юм (**2-р зураг**). RS-yb, SNB, HT-lb болон RS-b, WIKB, HT-db дээжүүдтэй харьцуулахад



3-р зураг. Бактерийн бүлгэмдлийн баганан графикийг овгоор, харьцангуй арвийг хувиар үзүүлэв.



4-р зураг. Бактерийн бүлгэмдлийн хүрээнүүдийн кластер мод бүхий баганан график.

төрөл зүйлийн хувьд ВМ дээж хамгийн их, VBKB-b, VBKB-г нь төрөл зүйлийн хувьд хамгийн бага байна.

Бактерийн бүлгэмдлийн бүтэц

Бактерийн бүлгэмдлийн баганан графикийг дээж тус бүрийн овгийн бүрэлдэхүүний хувиар харьцангуй арвийг ашиглан бүтээв (3-р зураг). Дээжний ВМ-д бактерийн овог жигд тархсан байна. Acidobacteriaceae (8%), Planctomycetaceae (6%)-ийн харьцангуй арви нь бусад дээжтэй харьцуулахад ВМ-д өндөр байв. Nocardiaceae нь WIKb (36%), RS-b (29%)-д харьцангуй арви нь илүү байсан; Streptococaceae нь VBKB-b (39%) ба VBKB-г (41%)-д харьцангуй арви нь илүү байсан. Bacillaceae нь бусад дээжтэй харьцуулахад VBKB-b (16%) болон VBKB-г (20%)-ийн хамгийн өндөр овог байв. 1% хүрэхгүй бактерийн овгийг "Бусад" гэж тооцсон.

Филумын түвшний бактерийн найрлага ба дээжийн ижил төстэй байдал

Зүүн талд Bray-Curtis алгоритмыг ашиглан дээжүүдийн хоорондын бүлгэмдлийн бүрэлдэхүүнд суурилсан шаталсан кластерын шинжилгээ, баруун талд түүврийн бүлгэмдлийн бүтцийн гистограмм (4-р зураг) байна. Бүлгэмдлийн бүтцэд 9 үндсэн фила давамгайлж байв. Actinobacteria HT-b, HT-db, HT-lb, RS-yb, WIKb, RS-b, Firmicutes нь дээжинд VBKB-г

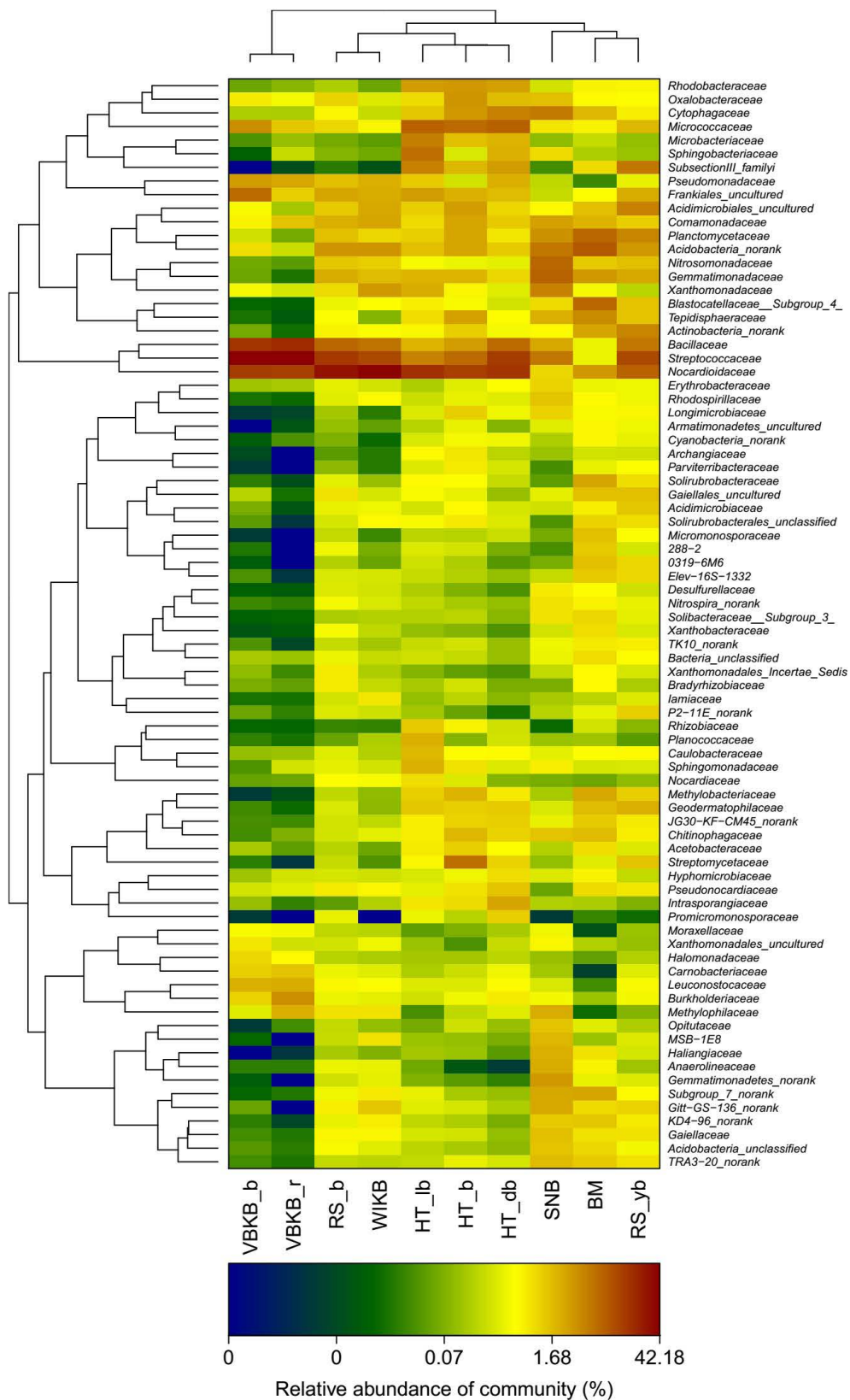
ба VBKBb, SNB-д Proteobacteria, ВМ-д Acidobacteria харьцангуй арви давамгайлж байсан. Дээжинд Bacteroidetes, Chloroflexi Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Cyanobacteria харьцангуй арви бага байсан.

Бактерийн бүлгэмдлийн heatmap

Бактерийн овгийн бүтцийг харьцангуй арвиар нэгтгэсэн бөгөөд харьцангуй арвийн ижил төстэй байдал нь 0-ээс 42.18%, буюу цэнхэрээс улаан хүртэл байв (5-р зураг). Nocardiaceae, Streptococaceae, Bacillaceae овгууд бусад овогтой харьцуулахад бүх дээжинд хамгийн элбэг байсан. Дээжийн овгийн харьцангуй арви, VBKB-г ба VBKB-b хамгийн бага, RS-yb болон ВМ хамгийн элбэг байна.

Хэлэлцүүлэг

Микробиомыг судлах зорилго нь бичил биетний үйл ажиллагаа, тэдгээрийн бичил биетний систем дэх үүрэг, харилцан үйлчлэлийн талаархи мэдлэгийг олж авах, хүрээлэн буй орчны сөрөг нөлөөллөөс урьдчилан сэргийлэх илүү сайн үнэлгээ, зохицуулалтыг олоход оршино [18], [19]. Уурхайн талбайг хортой металлын бохирдолтой газар гэж үздэг бөгөөд энэ нь эдгээр талбайн бактерийн олон янз байдлыг өөрчлөхөд хүргэдэг. Ургамал, амьтан,



5-р зураг. Бактерийн овгийн heatmap

бичил биетэн зэрэг бүх организм биоиндикаторын үүрэг гүйцэтгэдэг. Энд Заамарын уурхайн хөрсний дээжийн бактерийн олон янз байдал, бүлгэмдлийн бүтцэд өндөр бүтээмжтэй секвенсийн өгөгдөл ашиглан шинжилгээ хийсэн.

Уул уурхайн үйл явцын нөлөөллийг хянах зорилгоор бактерийн олон янз байдлыг үнэлэх зорилгоор дээжийг Заамарын алтны уурхайн нөхөн сэргээлт хийгээгүй талбай болон олборлолтын бус харилцан үйлчлэлийн бүсээс санамсаргүй байдлаар цуглуулсан. Үр дүнгээс харахад (**2-р хүснэгт**) ВМ-ийн дээж дэх зүйлийн баялаг бусад дээжээс эрс ялгаатай байв. ВМ-ийн дээжийг уурхайн талбайтай (Баясгалант уул) шууд харьцдаггүй хөрсөөс авсан. Уурхайн үйл ажиллагаатай холбоотой бусад дээжтэй харьцуулахад ВМ-д бактерийн зүйлийн баялаг, жигд байдал өндөр байв. Эдгээр харилцан үйлчлэлцсэн дээжийн бактерийн зүйлийн баялаг нь ВМ-ээс 1.17-4.8 дахин их байв.

Hongbing нар алтны уурхайн хаягдлын бичил биетний бүлгүүдийг судалж үзээд бүлгэмдлийн гол бүлгүүд нь Firmicutes (3.2%-92.4%), Proteobacteria (4.3-37.2%) болон Actinobacteria (1.62-29.5%) болохыг тогтоожээ [7]. Энэхүү судалгаагаар филумын түвшинд 9 үндсэн фила нь бактерийн бүлгэмдлийн бүтцэд голлох байр суурь эзэлдэг. Харин уурхайн VBKB-b болон орхигдсон уурхайн VBKBb дээжид Firmicutes (59-66%), Actinobacteria (17.4-26.8%), Proteobacteria (11-14%) гэсэн 3 фила бактерийн бүрэлдэхүүнд зонхилж байсан ба бусад бактерийн фила 1% -иас бага байна. Бусад талбайн дээжийн бактерийн бүлгэмдлийн бүтэц нь Hongbing нартай нэлээн төстэй байсан боловч Planctomycetes (1-10%) нэлээд өндөр байв.

Дүгнэлт

Энэхүү судалгаанд бактерийн олон янз байдлыг 16S rRNA секвенс технологийг ашиглан судалж, OTU-д суурилсан шинжилгээг ашиглан үнэлэх, альфа олон янз байдлын шинжилгээг ашиглан үр дүнг харуулах зорилгоор цаашдын шинжилгээг хийсэн. Дүгнэж хэлэхэд, бактерийн олон янз байдал, тэдгээрийн найрлага нь уул уурхайн үйл явцтай холбоотой болон хамааралгүй хэсгүүдэд ихээхэн

ялгаатай байв. Уурхайтай холбогдоогүй талбайн дээжүүд нь уул уурхайн үйл явцтай холбоотой газар нутгуудтай харьцуулахад төрөл зүйл, OTU болон бүтцийн хувьд илүү элбэг байгааг харуулсан. Альфа олон янз байдлын ховордлын муруй, эрэмбийн харьцангуй арвийн муруй, бактерийн бүлгэмдлийн бар, кластер мод бүхий бактерийн бүлгэмдлийн бар график, heatmap график нь дээжийн дүрслэл, хамаарлыг харуулсан. Уурхайтай холбогдоогүй талбайгаас авсан бактерийн бүлгэмдлийн дээжинд ВМ-ийн бактерийн овог ба уул уурхайтай холбоотой дээж дэх бактериуд бага тархсан тохиолдолд жигд тархсан байна. Nocardiaceae нь WIKb дээжинд 36%, RS-b дээжинд 29%; Streptococcaceae нь VBKB-b (39%) болон VBKB-г (41%) болон Bacillaceae VBKB-b (16%) болон VBKB-г (20%) дээжинд бусад дээжтэй харьцуулахад хамгийн их байсан.

Талархал

Энэхүү судалгааг хийх боломж, дэмжлэг, итгэлийг олгосон Монгол Улсын Шинжлэх ухаан, технологийн сан болон профессор Жун Вэй Хонг нарт баярлалаа. Мөн Zhejiang технологийн их сургуулийн Биологийн факультетэд талархал илэрхийлье.

Ашигласан бүтээл

- [1] E. J. Gray and D. L. Smith, "Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 37, no. 3, pp. 395–412, Mar. 2005, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>.
- [2] M. A. Polti, J. D. Aparicio, C. S. Benimeli, and M. J. Amoroso, "Simultaneous bioremediation of Cr(VI) and lindane in soil by actinobacteria," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 88, pp. 48–55, Mar. 2014, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.004>.
- [3] T. Halttunen, S. Salminen, and R. Tahvonen, "Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 114, no. 1, pp. 30–35, Feb. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040>.
- [4] H. Ji, Y. Zhang, P. Bararuneretse, and H. Li, "Characterization

- of microbial communities of soils from gold mine tailings and identification of mercury-resistant strain,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 165, pp. 182–193, Dec. 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.011>.
- [5] J. Thorslund, J. Jarsjö, S. R. Chalov, and E. V. Belozeroва, “Gold mining impact on riverine heavy metal transport in a sparsely monitored region: the upper Lake Baikal Basin case,” *J. Environ. Monit.*, vol. 14, no. 10, p. 2780, 2012, <https://doi.org/10.1039/C2EM30643C>.
- [6] M. Kida, O. Myangan, B. Oyuntsetseg, V. Khakhinov, M. Kawahigashi, and N. Fujitake, “Dissolved organic matter distribution and its association with colloidal aluminum and iron in the Selenga River Basin from Ulaanbaatar to Lake Baikal,” *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 25, no. 12, pp. 11948–11957, Apr. 2018, <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1462-z>.
- [7] B. Batsaikhan *et al.*, “Hydrochemical evaluation of the influences of mining activities on river water chemistry in central northern Mongolia,” *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 24, no. 2, pp. 2019–2034, Jan. 2017, <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7895-3>.
- [8] Choidash B, *Microbiology practicum*. UB Art Science 2007, 2011. (in Mongolia)
- [9] J. G. Caporaso *et al.*, “Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. 4516–4522, Mar. 2011, <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.
- [10] R. C. Edgar, “UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 10, pp. 996–998, Oct. 2013, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>.
- [11] A. Chao and C. Chiu, “Species Richness: Estimation and Comparison,” in *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1st ed., N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorisch, F. Ruggeri, and J. L. Teugels, Eds. Wiley, 2016, pp. 1–26. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat03432.pub2>.
- [12] “rarefaction.single.” <https://mothur.org/wiki/rarefaction.single/> (accessed Feb. 13, 2022).
- [13] S. F. Stoddard, B. J. Smith, R. Hein, B. R. K. Roller, and T. M. Schmidt, “rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D593–D598, Jan. 2015, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>.
- [14] “Silva.” <https://www.arb-silva.de/> (accessed Feb. 13, 2022).
- [15] “Functional Gene Pipeline / Repository.” <http://fungene.cme.msu.edu/index.spr> (accessed Feb. 13, 2022).
- [16] J. G. Caporaso *et al.*, “QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 5, pp. 335–336, May 2010, <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- [17] K. E. Giller, E. Witter, and S. P. Mcgrath, “Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review,” *Soil Biol. Biochem.*, vol. 30, no. 10–11, pp. 1389–1414, Sep. 1998, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8).
- [18] P. Bridge and B. Spooner, “Soil fungi: Diversity and detection,” *Plant Soil*, vol. 232, pp. 147–154, May 2001, <https://doi.org/10.1023/A:1010346305799>.