بررسی تشابه توالی 16s ribosomal RNA در بین ایزوله‌های مختلف باکتری آلاینده آب *Escherichia coli*

محمد مهدوی*[1] و زهرا صفرنژاد بصرا[2]

1- دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی (باکتری شناسی)، دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

2- دانشجوی مقطع کارشناسی رشته گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*نویسنده مسئول: **mahdavi8262@yahoo.com**

خلاصه

پژوهش فوق در قالب بررسی تشابه توالی 16s ribosomal RNA در بین ایزوله‌های مختلف باکتری آلاینده آب *Escherichia coli* انجام گرفته است. در این بررسی، ژن های کدکننده 16s ribosomal RNA متعلق به 12 ایزوله باکتری گونه *E.coli* از سایت NCBI استخراج و توسط نسخه 10 نرم‌افزار MEGA خوشه‌بندی شدند. توالی 16s ribosomal RNA در تشکیل ساختمان ریبوزوم پروکاریوتی، شروع سنتز پروتئین، تاکسونومی و شناسایی باکتری و ... نقش دارد و دخیل می‌باشد و به نظر می‌آید با توجه به اهمیت آن، این توالی می‌تواند کاندیدی برای مطالعات فیلوژنتیکی باشد. باکتری *E.coli* ، شاخص اصلی آلودگی آب و مواد غذایی است و در سایر موارد نظیر مهندسی ژنتیک، میکروبیولوژی، زیست‌فناوری و ... نیز دارای اهمیت بسیار فراوانی است و بایستی مطالعات بیشتر و گسترده‌تری روی این گونه از باکتری صورت گیرد. در این پژوهش، توالی مذکور در 12 ایزوله از این باکتری مورد مقایسه گرفتند و تشابهات و تفاوت‌هایی را نشان دادند. به عنوان مثال دو ایزوله از مصر و ایتالیا، دو ایزوله از ژاپن، دو ایزوله از آلمان و عراق و دو ایزوله از مالزی و یونان با یکدیگر به حالت خواهری مشاهده شدند.

کلمات کلیدی: 16s ribosomal RNA، *Escherichia coli*، MEGA – X، آنالیز فیلوژنتیکی، فیلوژنی.

Abstract

This research has been conducted on sequence similarity of 16s ribosomal RNA among different isolates of *Escherichia coli* water polluting bacteria. In this study, 16s ribosomal RNA coding genes belonging to 12 isolates of *E.coli* species were extracted from NCBI site and clustered by MEGA software version 10. The sequence of 16s ribosomal RNA is involved in the formation of the structure of the prokaryotic ribosome, the initiation of protein synthesis, taxonomy and identification of bacteria, etc., and it seems that due to its importance, this sequence can be a candidate for phylogenetic studies. E.coli bacteria is the main indicator of water and food contamination and is very important in other cases such as genetic engineering, microbiology, biotechnology, etc. and more and more extensive

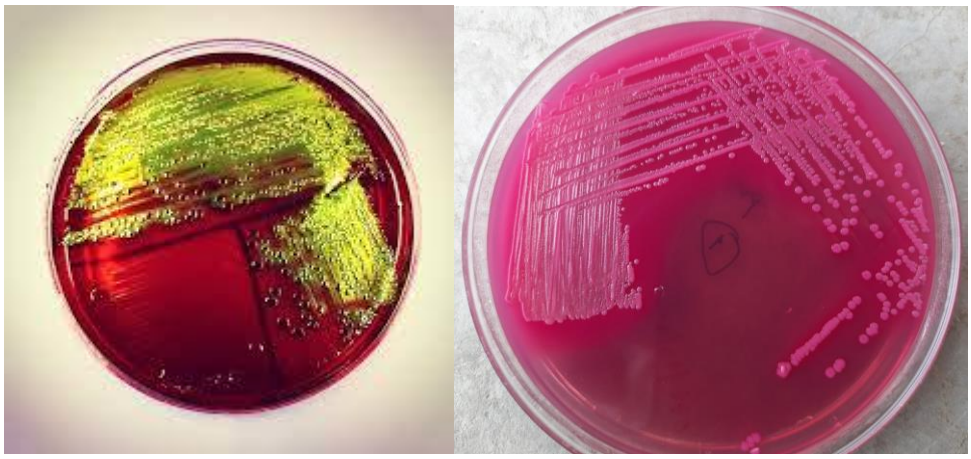
studies on this type of bacteria should be done take. In this research, the mentioned sequence was compared in 12 isolates of this bacteria and showed similarities and differences. For example, two isolates from Egypt and Italy, two isolates from Japan, two isolates from Germany and Iraq and two isolates from Malaysia and Greece were observed as sisters (very similar sequences).

Key words: 16s ribosomal RNA, *Escherichia coli*, MEGA – X, Phylogenetic analysis, Phylogeny.

مقدمه

آب مایه حیات و یکی از مهمترین مولفه‌های ارزیابی سلامت جامعه به حساب می‌آید[1]. در طول تاریخ نیز این متده حیات‌بخش نقش بسیار مهمی در پیدایش و گسترش جوامع انسانی ایفاء نموده است بطوریکه اکثر تمدن‌های بشری در کنار رودخانه‌ها و دریاها شکل گرفته‌اند و سپس توسعه یافته‌اند[2]. آب امروزه یک کالای بسیار ارزشمند محسوب میگردد؛ بطوریکه هرگونه کمبود در توزیع آب سالم، می‌تواند سلامت جامعه را به شدت تهدید کرده و از سوی دیگر سبب بروز نارضایتی‌های مدنی گردد. نیازهای رو به رشد جمعیت، محدودیت شدید منابع مالی، تبعات توسعه ناپایدار، عدم مدیریت کارآمد در توزیع آب، همگی از جمله عواملی هستند که موجبات بروز نگرانی و دغدغه خاطر مجامع بین‌المللی در زمینه تامین نیازهای آبی جوامع انسانی شده است[3,4].

بیماری‌های ناشی از آب، به‌طور معمول از طریق پاتوژن‌های روده‌ای که اساسا از مسیر مدفوع منتقل می‌شوند، ایجاد می‌گردند. *E.coli* به عنوان شاخص اصلی آلودگی آب و مواد غذایی شناخته شده است. علت این امر آن است که این باکتری به تعداد فراوان در مدفوع انسان یافت می‌شود و حضور آن در آب و غذا به عنوان خطری برای سلامتی مصرف کنندگان می‌باشد[5]. *E.coli* نوعی باکتری گرم منفی بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل از از خانواده *Enterobacteriaceaea* است که به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد[6,7]. بیشتر سویه‌های این باکتری، بی‌آزار هستند اما برخی موجب مسمومیت غذایی و اسهال می‌شوند[8]. اشریشیا کلی بر روی محیط کشت MacConkey agar، کلنی‌های ارغوانی ایجاد می‌کند زیرا باکتری از نوع لاکتوز مثبت است و قند را تخمیر کرده و اسید تولید می‌کند. اسید موجب کاهش pH در این محیط کشت شده و در نتیجه رنگ ارغوانی ایجاد می‌شود. همین اتفاق نیز در محیط EMB (Eosin Methylene Blue) رخ داده و کلنی‌های ارغوانی تیره با جلای سبز فلزی ایجاد می‌کند. باکتری در محیط TSI به صورت اسید/ اسید و با تولید گاز و هیدروژن سولفید منفی است. برای بررسی وجود توکسین می‌توان از کشت سلولی یا PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) استفاده کرد[9].



شکل1- کلنی‌های ارغوانی *E.coli* روی محیط کشت MacConkey agar (راست) و کلنی‌های این باکتری با جلای سبز فلزی روی محیط EMB

در این پژوهش از توالی 16s ribosomal RNA متعلق به 12 ایزوله باکتری *E.coli* با استخراج از سایت NCBI استفاده گردید که به شرح زیر می‌باشند:

نام ایزوله	Accession Code	کشور محل نمونه برداری
Escherichia coli isolate AAE	LC764402.1	Egypt
Escherichia coli isolate DH7	LC666913.1	Egypt
Escherichia coli isolate Mt1B1	AM944637.2	Germany
Escherichia coli isolate 101 (MBG-DUTH)/3414727-1 (MED-DUTH)	OU548744.1	Greece
Escherichia coli isolate SSH1	LC754127.1	India
Escherichia coli isolate IRQBAS127	LC648289.1	Iraq – Basreh
Escherichia coli isolate IQ1	LC738862.1	Iraq – Karbala
Escherichia coli isolate BYPFP	LN875375.1	Italy
Escherichia coli isolate JCM 20392	LC654900.1	Japan
Escherichia coli isolate JCM 20071	LC571936.1	Japan
Escherichia coli isolate JCM 16946	LC682250.1	Japan
Escherichia coli isolate UM-AEU214	LT009427.1	Malaysia

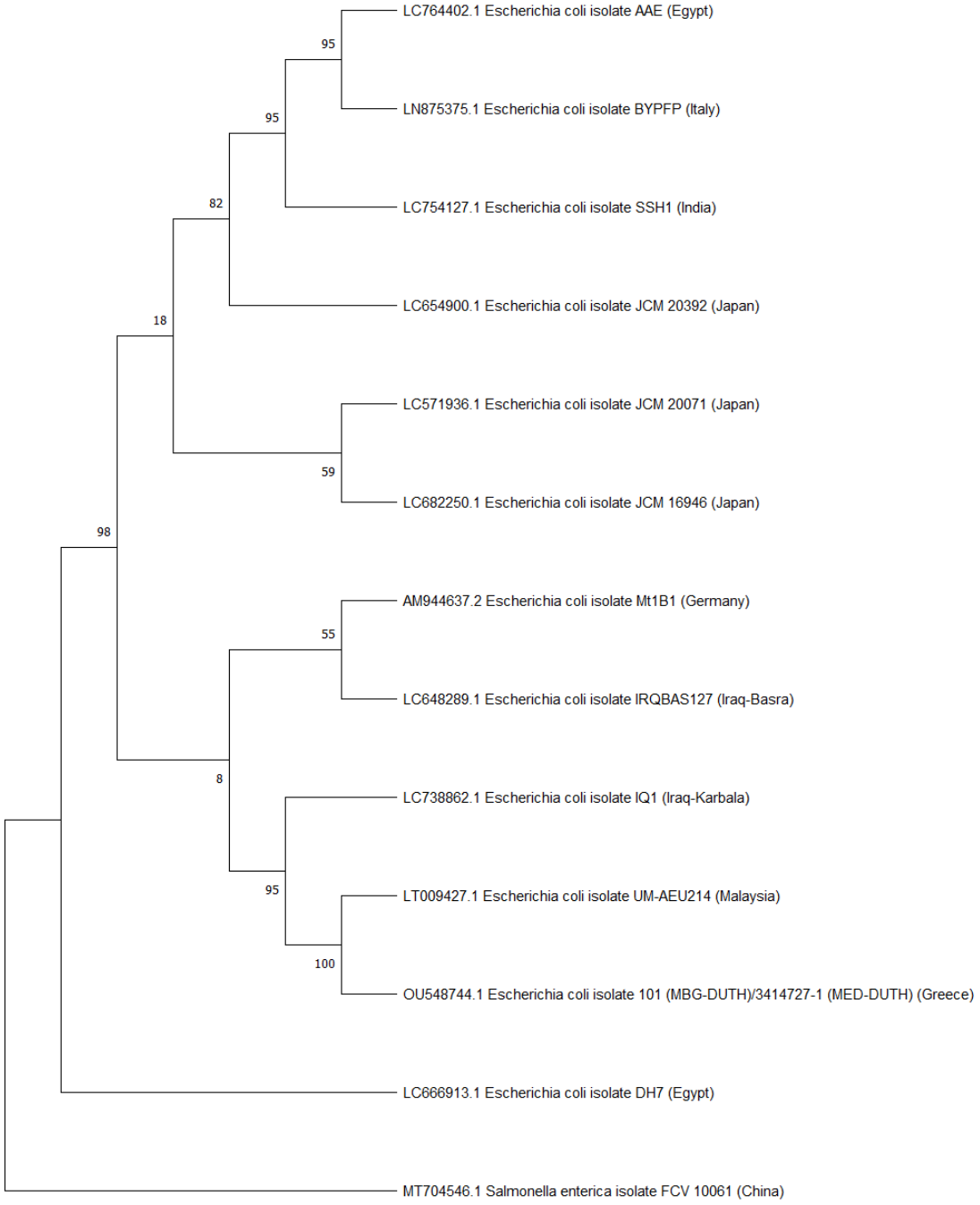
پروکاریوت‌ها 3 نوع RNA ریبوزومی دارند که براساس سرعت رسوب‌گذاری به سه نوع 23S، 5S و 16S نام‌گذاری شده اند. 16s ribosomal RNA، بخش RNA در زیرواحد کوچک یک ریبوزوم پروکاریوتی است[10]. ژن‌های کدکننده آن، ژن 16s Rrna نامیده میشوند و به دلیل سرعت کم تکامل این ناحیه از ژن، به عنوان استانداردی برای تاکسونومی و شناسایی باکتری‌ها استفاده میشود[11]. از عملکرد آن می‌توان به این مورد اشاره نمود که مانند 23s rRNA، نقش ساختاری دارد و به عنوان داربستی عمل می‌کند که موقعیت پروتئین‌های ریبوزومی را مشخص می‌کند. هم‌چنین با اتصال به کدون آغاز AUG، در شروع سنتز پروتئین نقش دارد. ضمنا 16S با 23S تعامل دارد و به اتصال دو زیرواحد ریبوزومی (50s & 30s) کمک می‌کند[12].

مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری یا NCBI (National Center for Biotechnology Information) یکی از مراکز و شاخه های کتابخانه ملی پزشکی ایالات متحده آمریکا است که خود زیرمجموعه موسسه ملی سلامت (NIH) قرار دارد. از وظایف مرکز NCBI میتوان به ایجاد ساختار برای تحلیل و ذخیره سازی داده های تحقیقات ژنتیک، بیوشیمی و زیست شناسی سلولی مولکولی و ترویج و شیوع استفاده از این Data base ها در میان جامعه محققین اشاره نمود.

نرم افزار MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ، یک نرم افزار کامپیوتری برای انجام تجزیه و تحلیل آماری تکامل مولکولی و برای ساخت درختان فیلوژنتیک است. این برنامه شامل بسیاری از روش ها و متدهای پیچیده برای مطالعات فیلوژنومیک میباشد و به صورت رایگان در دسترس محققین قرار میگیرد.

روش کار

ابتدا برای استخراج توالی‌های موردنظر به سایت NCBI مراجعه شد و با جستجوی نام گونه مدنظر به همراه توالی موردنظر و با انتخاب قسمت Nucleotide از بخش Genomes ، توالی های مدنظر دریافت و استخراج شدند. سپس به صورت فایل و با پسوند FASTA دانلود شدند. سپس از طریق مسیر Align وارد نرم افزار MEGA-X (نسخه 10 نرم افزار Mega) شدند. برای صحت درخت، توالی‌ها اصلاح شدند و توالی همه 12 ایزوله *E.coli* و اوت گروپ *Salmonella* enterica (نام ایزوله: Salmonella enterica isolate FCV 10061 / Accession code: MT704546.1 / کشور محل نمونه برداری: China) که این گونه هم از خانواده *Enterobacteriaceae* می‌باشد و برای دقت درخت اضافه شد، باهمدیگر هم‌اندازه شدند. سپس برای Align DNA در این پژوهش، از الگوریتم Muscle استفاده شد. در ادامه نیز جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی در نرم افزار MEGA-X، از متد Bootstrap و با Bootstrap Number = 1000 استفاده شد. در نهایت درخت ترسیم شد و به شکل زیر نمایش داده شد:


LC764402.1 Escherichia coli isolate AAE (Egypt)
LN875375.1 Escherichia coli isolate BYPFP (Italy)
LC754127.1 Escherichia coli isolate SSH1 (India)
LC654900.1 Escherichia coli isolate JCM 20392 (Japan)
LC571936.1 Escherichia coli isolate JCM 20071 (Japan)
LC682250.1 Escherichia coli isolate JCM 16946 (Japan)
AM944637.2 Escherichia coli isolate Mt1B1 (Germany)
LC648289.1 Escherichia coli isolate IRQBAS127 (Iraq-Basra)
LC738862.1 Escherichia coli isolate IQ1 (Iraq-Karbala)
LT009427.1 Escherichia coli isolate UM-AEU214 (Malaysia)
OU548744.1 Escherichia coli isolate 101 (MBG-DUTH)/3414727-1 (MED-DUTH) (Greece)
LC666913.1 Escherichia coli isolate DH7 (Egypt)
MT704546.1 Salmonella enterica isolate FCV 10061 (China)
95
95
82
18
59
98
55
8
95
100

نتایج و بحث

همانطور که بیان شد، در مطالعه مذکور، تشابه توالی 16s ribosomal RNA در بین 12 ایزوله باکتری آلاینده آب *E.coli* و یک outgroup (یک ایزوله از باکتری *Salmonella enterica*) بررسی شد و پس از تحلیل، کلاستر بالا بدست آمد. می‌توان از بررسی این درخت فیلوژنتیکی، به نتایج زیر دست پیدا کرد:

گونه *Salmonella enterica* در outgroup قرار گرفت؛ چون از نظر نوکلئوتیدی شباهتی با ایزوله‌های گونه *E.coli* ندارد.

این درخت به دو شاخه کلی تقسیم شد. در یک شاخه ایزوله Escherichia coli isolate DH7 با Accession code = LC666913.1 از کشور مصر قرار گرفت و در شاخه دیگر، سایر ایزوله‌ها قرار گرفتند که در دیاگرام بالا قابل مشاهده هستند.

دو ایزوله (MED-DUTH) 101 (MBG-DUTH)/3414727-1 از کشور یونان و UM-AEU214 از کشور مالزی با یکدیگر به حالت خواهری درآمده‌اند. ایزوله IQ1 از کشور عراق(کربلا) از کلید خواهری دو ایزوله قبلی جدا شده است ولی چون با همدیگر در یک کلید قرار گرفتند، با هم شباهت دارند. احتمال می‌رود ایزوله IQ1 از نظر منبعی که در NCBI گرفته شده، تفاوت کوچکی با دو ایزوله دیگر دارد.

همچنین دو ایزوله IRQBAS127 از کشور عراق(بصره) و Mt1B1 از کشور آلمان با همدیگر در یک کلید و به صورت خواهری درآمده‌اند.

در شاخه‌ای دیگر نیز می‌توان حالت خواهری دو ایزوله JCM 16946 و JCM 20071 که هر دو از کشور ژاپن می‌باشند را مشاهده نمود.

دو ایزوله BYPFP از کشور ایتالیا AAE از کشور مصر نیز با یکدیگر در یک کلید و به حالت خواهری مشاهده می‌شوند. ایزوله SSH1 از کشور هندوستان از آنها جداشده ولی چون با آن‌ها در یک کلید قرار گرفته است، شباهتش با دو ایزوله نامبرده مشهود است. ایزوله JCM 20392 از کشور هندوستان با مجموع سه ایزوله قبلی در یک کلید قرار گرفته است و به آن‌ها شباهت دارد که خود جای بحث دارد.

در مجموع با توجه به اهمیت بالای باکتری *E.coli* در مسئله آلایندگی آب و هم‌چنین سایر کاربردهایش در مباحثی نظیر مهندسی ژنتیک، زیست‌فناوری، میکروبیولوژی و ... ، می‌توان آنالیزهای فیلوژنتیکی بسیار بیشتری در رابطه با این باکتری ارائه نمود. این مسئله نیازمند آن است که بررسی‌های مولکولی بیشتری روی آن انجام شود؛ به عنوان مثال تشابه سایر توالی‌های حفاظت شده (conserved) و ژن های خانه‌زاد (housekeeping) مربوط به ایزوله‌های این گونه بررسی شود. هم‌چنین توالی‌های آمینواسیدی پروتئین‌های حاصل از این دسته از ژن‌ها نیز می‌تواند موضوعات خوبی جهت انجام پژوهش‌های نوین دیگر باشد.

با توجه به اهمیت توالی 16s ribosomal RNA و نقش آن در شروع سنتز پروتئین، تاکسونومی و شناسایی باکتری، تشکیل ساختمان ریبوزوم‌های پروکاریوتی و ... ، پیشنهاد می‌شود با استخراج این توالی در سایر باکتری‌ها علی الخصوص باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی آلاینده آب، مقایسه‌هایی در این زمینه انجام شود.

منابع

1- Abedi Kohpayi J. Impact of Mashhad Landfill on ground water contamination. Fourth National Conference on Environmental Health. Yazd, 2001, pp 714-720.

2- Dehghani MH, Jahed Gh, Mohammadi H. Microbiological quality of drinking water in shadegan township. Iran, World Applied Sciences J. 2011; 1:114-118.

3- Physical and Chemical Properties of Drinking Water. Iranian institution for standards and economic research. 19973; 5:105.

4- Pishkar Dehkordi AR. Survey the possible effects of industrial wastewater disposal lagoon steel on groundwater chemical quality of the surrounding. Master Thesis, School of health, Isfahan University of Medical Sciences, 2004.

5- یحیی‌زاده، ف. و دخیلی،م. (1394)، "بررسی کیفیت میکروبی بطری‌های آب معدنی طبیعی در شهر تهران در سال 1394" ، فصلنامه علمی – پژوهشی بیولوژی کاربردی، دوره6، شماره24، اسفند1395، صفحه 20-11.

6- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E (March 2010). "The population genetics of commensal Escherichia coli". Nature Reviews. Microbiology. 8 (3): 207–17.

7- Singleton P (1999). Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine (5th ed.). Wiley. pp. 444–54.

8- Escherichia coli". CDC National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Retrieved 2012-10-02.

9- Paton JC, Paton AW (1 July 1998). "Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections". Clin. Microbiol. Rev. 11 (3): 450–79. PMC 88891.

10- Schluenzen, Frank; Tocilj, Ante; Zarivach, Raz; Harms, Joerg; Gluehmann, Marco; Janell, Daniela; Bashan, Anat; Bartels, Heike; Agmon, Ilana (2000-09-01). "Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution". Cell.623–615 :(5) 102 .

11- Woese CR, Fox GE (November 1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74 (11): 5088–5090.

12- Czernilofsky AP, Kurland CG, Stöffler G (October 1975). "30S ribosomal proteins associated with the 3'-terminus of 16S RNA". FEBS Letters. 58 (1): 281–284.